

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KABUKLU KATI DENİZ ÜRÜNÜ (*Penaeus* sp.)

ATIĞINDAN KİTİN KAZANIMI

Ali Özhan AYTEKİN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 05\09\2007

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Bornova-İzmir

III

Ali Özhan AYTEKİN tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**Kabuklu Katı Deniz Ürünü (*Penaeus* sp.) Atığından Kitin Kazanımı**” başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05/09/2007 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Murat ELİBOL

Raportör Üye : Yrd.Doç.Dr. Gaye ÖNGEN

Üye : Yrd.Doç.Dr. İhsan YAŞA

ÖZET**KABUKLU KATI DENİZ ÜRÜNÜ (*Penaeus* sp.)
ATIĞINDAN KİTİN KAZANIMI****AYTEKİN, Ali Özhan****Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı****Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Murat ELİBOL****Eylül 2007, 89 sayfa**

Deniz kabuklularının atıkları kitin olarak bilinen ve doğada kendiliğinden oluşan biyopolimerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Kitin ve türevleri, fizikokimyasal özellikleri bakımından diğer biyopolimerlerden farklı olup, çok çeşitli alanda kullanılmaktadır. Bu çalışmada derin kültür yöntemi ile üç farklı mikroorganizma kullanılarak ve farklı stratejiler uygulayarak, karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve kimyasal yöntemle karşılaştırılmıştır. *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* mikroorganizmalarının kullanıldığı çalışmada farklı glukoz konsantrasyonlarındaki kitin ekstraksiyon veriminin nasıl değiştiği incelenmiştir. Ayrıca *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* ile hazırlanan kokültür prosesleri ile de kitin ekstraksiyon verimi arttırılmaya çalışılmıştır. Kitin kalitesi düşük mineral (kalsiyum), kül ve protein değerleri ile belirlendiğinden, çalışmanın her aşamasında, proteaz aktivitesi, protein ve kül tayinleri ile pH değişimi ölçülerek her bir prosesi etkileyen parametreler optimize edilmeye çalışılmıştır. Proses verimine ve son ürünlerdeki kitin yüzdesine göre, en yüksek biyolojik kitin

VI

ekstraksiyonu, Önce *Teredinobacter turnirae*'nin sonra *Lactococcus lactis*'in inokülasyonunun yapıldığı K-2 prosesinde %5 (ağırlık/hacim) glukoz içeren ortamda elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kitin, *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis*, *Teredinobacter turnirae*, derin kültür, kokültür, deniz kabuklusu atığı

ABSTRACT
RECOVERY OF CHITIN FROM MARINE
CRUSTACEAN SHELL WASTE (*Penaeus* sp.)

AYTEKİN, Ali Özhan

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Murat ELİBOL

September 2007, 89 page

Marine crustacean shell wastes have been the primary source of a naturally occurring biopolymer known as chitin. Chitin and its derivatives have different physicochemical properties comparing to other biopolymers and have been used widely. In this study, chitin extraction from prawn shell was carried out in submerged fermentation using three different microorganisms. The results obtained from biological methods were then compared with those of chemical method. *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* were used for bioprocessing of prawn shells using an appropriate medium supplemented with glucose. In order to obtain high chitin extraction, different strategies were performed. Moreover, an attempt was made to enhance chitin extraction by applying co-cultivation technique with *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae*. A good quality of chitin is evaluated with low levels of calcium and ash, along with a low residual protein value. Therefore, in order to optimize the best conditions affecting chitin extraction, protease activity, ash, residual protein and pH were monitored in every single step of process. The highest biological extraction, in terms of process yield and percentage of chitin, was

VIII

recorded by co-culture process *K-2* that is first *Teredinobacter turnirae*, then *Lactococcus lactis* inoculation in a medium with 5% (w/v) glucose.

Keywords: Chitin, marine shell waste, *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis*, *Teredinobacter turnirae*, submerged fermentation, co-culture

IX

TEŞEKKÜR

Bu tezin oluşumu süresince, tez konusunun belirlenmesinden tezin yazım aşamasına kadar her konuda yardımlarını benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, laboratuvar uygulamaları sırasında yardım eden ve bana destek olan Özlem ÜSTÜN ve Işık ÇOBAN'a, çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve sağlanan uygun çalışma koşulları nedeniyle Biyomühendislik Bölümüne, bu noktaya ulaşabilmemde yardımlarını ve desteklerini hiç azaltmayan aileme ve Pelin ARSLAN'a teşekkür ederim.

2007-İzmir

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	V
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Deniz Ürünleri Atıkları	5
2.1.1. Balık Kas Proteini	5
2.1.2. Balık Derisi Kollajeni ve Jelatini	5
2.1.3. Balık Yağı	6
2.1.4. Balık Kemiği	7
2.1.5. Deniz Kabukluları Atığı	7
2.2. Kitin ve Kitosanın Özellikleri ve Kullanım Alanları	122
2.2.1. Çözünürlük	16
2.2.2. Koagülasyon	16
2.2.3. Adsorbsiyon ve Şelatlama	16
2.2.4. Biyolojik özellikleri	17
2.2.5. Ekonomik yaklaşım	17
2.2.6. Kullanım Alanları	18
2.3. Kitinin Üretim Yöntemleri	20
2.3.1. Üretim Kaynakları	20
2.3.2. Kitinin Üretim Yöntemleri	23
3. MATERYAL VE METOT	276

XII

3.1. Materyaller	276
3.1.1. Karides Kabuğu	276
3.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar	276
3.1.3. Kimyasallar	287
3.1.4. Kullanılan Başlıca Cihazlar	287
3.1.5. Tamponlar, Reaktifler ve Çözeltiler	298
3.2. Metod	310
3.2.1. Kimyasal Üretim	31
3.2.2. Biyolojik Üretim	332
3.2.3. Biyolojik Üretim Sonrası İşlemler	365
3.2.4. Protein Tayini	365
3.2.5. Azot Tayini	387
3.2.6. Kül Tayini	3938
3.2.7. Proteaz Aktivite Tayini	4039
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	410
4.1. Karides kabuğundan kimyasal yolla kitin ekstraksiyonu.....	410
4.2. Karides kabuğundan biyolojik yolla kitin ekstraksiyonu.....	454
4.2.1. Kitin ekstraksiyonu için <i>R.oryzae</i> 'nin kullanılması.....	454
4.2.2. Kitin ekstraksiyonu için <i>L.lactis</i> 'in kullanılması	5049
4.2.3. Kitin ekstraksiyonu için <i>T.turnirae</i> 'nin kullanılması	554
4.2.4. Kitin ekstraksiyonu için <i>L.lactis</i> ve <i>T.turnirae</i> 'nin kokültürlerinin kullanılması.....	6059
ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kitinin Molekül Yapısı ve Selüloz ile Benzerliği	13
2.2. Kitin ve Türevleri	15
3.1. Protein Tayini Standart Eğrisi Grafiği	387
4.1. Karides	410
4.2. Önce DP ardından DM uygulamasından geçmiş kitin	443
4.3. Önce DM ardından DP uygulamasından geçmiş kitin	443
4.4. <i>Rhizopus oryzae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi	465
4.5. <i>Rhizopus oryzae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi	476
4.6. <i>Rhizopus oryzae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre 4. gün için % protein ve proteaz aktivitesi değişimi	4947
4.7. <i>Rhizopus oryzae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	48
4.8. <i>Lactococcus lactis</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi	520
4.9. <i>Lactococcus lactis</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi	531
4.10. <i>Lactococcus lactis</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre 2. gün için % protein ve proteaz aktivitesi değişimi	52
4.11. <i>Lactococcus lactis</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil**Sayfa**

4.12. <i>Teredinobacter turnirae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi.....	55
4.13. <i>Teredinobacter turnirae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminde proteaz aktivitesi değişiminin zamana göre değişimi.....	56
4.14. <i>Teredinobacter turnirae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminde % protein değişiminin zamana göre değişimi.....	57
4.15. <i>Teredinobacter turnirae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi.....	57
4.16. <i>Teredinobacter turnirae</i> ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	5958
4.17. <i>K-1</i> 'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi	610
4.18. <i>K-1</i> 'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	621
4.19. <i>K-1</i> 'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi	621
4.20. <i>K-2</i> 'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi	643

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21. <i>K-2</i> 'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	654
4.22. <i>K-2</i> 'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi	665
4.23. <i>K-3</i> 'ün farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi	687
4.24. <i>K-3</i> 'ün farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi	6968
4.25. <i>K-3</i> 'ün farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi	6968
4.26. Kokültürdeki üretimlerin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki mineral giderimi.....	70
4.27. Kokültürdeki üretimlerin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki protein giderimi.....	71
4.28. <i>R-1</i> üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi.....	73
4.29. <i>R-1</i> üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi.....	74
4.30. <i>R-2</i> üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi.....	76
4.31. <i>R-2</i> üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Sekil****Sayfa**

4.32. <i>R-3</i> üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi.....	78
4.33. <i>R-3</i> üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.DİE 2003 yılı, Türkiye’de avlanan kabuklu su ürünleri istatistikleri.....	9
2.2. Kabuklu atıklarındaki protein içeriğinin soya fasulyesi ve balık içeriğine göre karşılaştırılması (Simpson et al., 1994).....	10
2.3. Kitin ve türevlerinin kullanım alanları.....	19
2.4. Kitinin biyosferdeki kaynakları.....	200
2.5. Bazı mikroorganizmaların kitin içerikleri.....	22
2.6. <i>M.rouxii</i> ’nin zamana göre büyümesi sırasındaki içeriğinin değişimi.....	233
3.1. Çalışmada kullanılan karides kabuğunun bileşimi.....	276
3.2.Deniz Kabuklusu Kabuğundan Kimyasal Yolla Kitin Üretimi.....	321
3.3.Erlenlerin Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Hazırlanması.....	332
3.4.Plackett-Burman besi ortamı (PB).....	354
3.5.Biüret Protein Analizi İçin Standart Çözeltiler.....	376
3.6.Biüret Protein Tayini Yöntemi.....	377
3.7.Proteaz aktivite tayini prosedürü.....	4039
4.1.İşlem sırasının son üründeki etkisi.....	432
4.2. <i>R.oryzae</i> ’de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	49
4.3. <i>L.lactis</i> ’de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	54
4.4. <i>T.turnirae</i> ’de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**Cizelge****Sayfa**

4.5. <i>K-1</i> 'in glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	62
4.6. <i>K-2</i> 'nin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	66
4.7. <i>K-3</i> 'ün glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	69
4.8. Kokültürlerin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%).....	71
4.9. En iyi ekstraksiyon sonucuna sahip <i>K-2</i> üretiminin yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	79

1. GİRİŞ

Kitin; selülozdan sonra doğada en fazla bulunan ikinci yenilenebilir polimerdir. Omurgasızların, kabukluların, böceklerin dış iskeleti ve küf ile mayanın hücre duvarının temel bileşeni olup, koruyucu ve destekleyici olan dış iskeletin oluşumunda görev alır. Kitin, poly-(164)-N-asetil-D-glukozamin yapısında olup selüloz benzeri bir biyopolimerdir (Kumar, 2000).

Kitin, antimikrobiyal ajan olarak; yenilebilir film olarak gıda kaplamalarında koruma ve uzun süre dayanıklılık kazandırması amacı ile; gıda katkı maddesi olarak, lezzet arttırıcı ve renk koruyucu olarak; yağ emilimini azaltıcı ve zayıflama ürünü olarak; tarımda tohum ve meyve kaplama ile gübre olarak; kozmetik alanında deri ve saç bakım ürünlerinde; biyomedikal ve farmasötikal ürünlerde hedefe yönelik ilaç tasarımlarında ve yapay deri uygulamalarında; sudaki kirlilik yaratan elemanların uzaklaştırılmasında; bundan başka da enzim immobilizasyonunda, kromatografide ve sentetik fiber üretiminde kullanım alanı bulmuştur (Kumar, 2000; Li-Qunvu, 2002; No, 1996; Rinaudo, 2006).

Kitinin endüstriyel anlamda üretimi deniz kabuklusu atıklarından yapılmaktadır. Kitin ve kitosan üretimi özellikle Oregon, Washington, Virginia gibi A.B.D eyaletleri ve Japonya'daki konserve fabrikalarının, yengeç ve karides kabukları atıklarına dayanmaktadır. Norveç, Meksika ve Şili gibi birçok ülke yüksek miktarlarda kullanılamayan deniz kabuklusu atığına sahiptir (Kumar, 2000). Kitin üretiminde en fazla kullanılan deniz kabuklusu, karides, yengeç ve istakoz kabuklarıdır. Mevsime, türe ve yaşına bağlı olarak içerdikleri kitin miktarı değişiklik göstermektedir

(Simpson et al., 1994). Bu çalışmada kullanılan karides kabuğu atığı İzmir Pınarbaşı'ndaki Köseoğlu karides çiftliğinden alınmıştır.

Karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu için kabukta bulunan mineral ve proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Kimyasal yöntem ile kitin ekstraksiyonunda minerallerin uzaklaştırılması için asit; proteinlerin uzaklaştırılması içinse baz kullanılmaktadır (No et al., 1989). Ancak kullanılan kimyasal miktarları çok fazla olduğundan ve geri dönüşümü yapılamadığından çevreye zararı vardır. Bu yüzden biyolojik yolla kitin ekstraksiyonu tavsiye edilmektedir (Simpson et al., 1994). Biyolojik yöntemde farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan üretimler ile mikroorganizmaların laktik asit üretmesi ve böylelikle de mineral gideriminin yapılması hedeflenmiştir. Karides kabuğunun içindeki proteinle de proteaz aktivitesinin artırılması hedeflenmiş ve bununla da protein gideriminin gerçekleşmesi sağlanmıştır.

Bu çalışmada da *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* mikroorganizmaları farklı glukoz konsantrasyonlarında kullanılmış ve kitinin kimyasal yolla yapılan ekstraksiyonun son üründeki kitin yüzdesi ve proses verimi açısından karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Deniz balıkçılığı, dünyadaki toplam balıkçılığın yarısından fazlasına ve %70'inden fazla bir oranda da bunların işlenip kullanılmasına katkı sağlar. Sonuçta, her yıl önemli miktarlarda işleme atıkları çıkar ki bunlar, yüzgeçler, baş, deri ve iç organlardır. Buna ek olarak, deniz ürünleri işleme tesislerinden gelen deniz kabuklularının ve kabuklu deniz hayvanlarının atıkları da büyük miktarlarda birikmektedir. Son tahminlere göre dünyada deniz balıkçılığının yaklaşık % 25'i kadar yani 20 milyon ton balıkçılık atığı çıkmaktadır. Bu yüzden, deniz ürünü atıklarının biyoproses sanayisi kullanarak biyodönüşüme uğratılması büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu biyoaktif bileşikler arasında kitin ve kitosan önemli bir yer tutmaktadır (Simpson et al., 1994). Deniz kabuklusundan da her yıl yaklaşık 3,5 milyon ton değerinde katı atık, deniz ürünleri işleme endüstrisi tarafından yeryüzüne bırakılmakta ve gittikçe artan bu miktar bu atıkları bir şekilde bertaraf etme gereğini ortaya çıkarmaktadır (Kırubagaran, 2005). İşleme fabrikaları atıkları değerlendirilmeden denize döküldüğünde kirlilik gibi önemli problemlere sebep olarak çevre sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Çalkı ve Kılınç, 2004). Bu atıkların değerlendirilmesi hem deniz ürünleri endüstrisi açısından hem de halk sağlığı açısından oldukça önemli bir konudur.

Balıkçılığın yan ürünleri temel olarak balık yağı üretimi, balık eti, gübre, hayvan yemi ve balık silajıdır. Ancak, bunların birçoğunun geri dönüşümü ekonomik bir değer teşkil etmemektedir. Son çalışmalar balık kas proteinleri, kollajen ve jelatin, balık yağı, balık kemiği, iç organlar ve deniz kabuklusu ile kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarından biyoaktif bileşiklerin elde edilebileceği göstermiştir. Bu biyoaktif bileşikler, biyoteknolojik ve farmasötikal uygulamalarda kullanılabilecek olan

basitten karmaşığa kadar çok çeşitli bileşikler olarak; peptitler, oligosakkaritler, yağ asitleri, enzimler, suda çözünen mineraller ve biyopolimerler olarak söylenebilir. Bundan başka, bu biyoaktif bileşiklerden bazıları nütrisotikal potansiyele ve insan sağlığını destekleyici yararları da mevcuttur. Günümüzün deniz mahsulleri sanayisinde, deniz ürünleri işleme sanayisinin yan ürünleri içerisinde değerli biyoaktif bileşiklerin araştırılması ve bulunması önemli bir konudur (Kim and Mendis, 2006; Rinaudo, 2006).

Kitin ve kitosanın en büyük avantajı yenilenebilir bir kaynak olması ve çevre dostu olan doğal bir biyopolimer olmasıdır. Bu özellikleri ile son yıllarda birçok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur (Synowiecki et al., 2003; Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Kitin ve bunun türevleri olan kitosan, glukozamin ve N-asetil glukozamin; yapay deri ve yara iyileştirme elbiseleri, ilaç taşıyım sistemleri, kozmetik, beslenme ve diyet ürünleri, enzim immobilizasyonu, ağır metal giderimi, tekstil boyalarının giderimi, kağıt üretimi, agronomik uygulamalar, oftalmoloji, fotoğrafçılık gibi çeşitli alanlarda kullanım yeri bulmuştur (Shahidi and Abuzaytoun, 2005; Rinaudo, 2006).

Kitinin klasik üretim yöntemi, deniz kabuklusu atıklarından kuvvetli asit ve baz uygulamalarına dayanan kimyasal yöntemdir. Kimyasal yöntemde en fazla kullanılan asit HCl ve baz da NaOH'dir. Bunların yüksek konsantrasyonlarda ve miktarlarda kullanılması çevre için bir tehlike oluşturmaktadır. Bu yüzden, kimyasal yöntemle alternatif biyolojik metodlar üzerinde çalışılmaktadır. Biyolojik yöntemde enzim ya da doğrudan mikroorganizma aracılığı ile ekstraksiyon gerçekleştirilmek istenmektedir (Simpson et al., 1994; Synowiecki et al., 2003). Bu

Çalışmada da temel olarak karides kabuğu atığından biyolojik yöntemle kitin ekstraksiyonu üzerinde durulmuştur.

2.1. Deniz Ürünleri Atıkları

2.1.1. Balık Kas Proteini

Balıkların mekanik olarak kemiklerinin çıkartılması işlemi sonucunda önemli ölçüde kas proteinleri açığa çıkar. Bu proteinler, aminoasit kompozisyonu açısından çok dengeli olup, kolayca sindirilebilen ve besinsel değeri yüksek olan yapılardır. Bu yüzden biyokütleden bu proteinlerin kazanımı enzimatik hidroliz ile yapılmaktadır. Birçok deniz canlısının yan ürünlerinden elde edilen protein hidrolizatlarının besinsel ve fonksiyonel özellikleri ile biyolojik olarak aktif peptitlerin kazanımı araştırılmaktadır. Bundan başka, balık protein hidrolizatının fonksiyonel özelliklerinin bilgisinin artması ile fonksiyonel gıdalar ve nütrisotikal üzerinde geliştirmeler ve uygulamalar yapılmaktadır (Kim and Mendis, 2006).

2.1.2. Balık Derisi Kollajeni ve Jelatini

Balık derisi, kollajen ve jelatin için potansiyel bir kaynaktır. Kollajen ve jelatin, gıda, kozmetik ve biyomedikal sanayi gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Kollajenin biri diğerinin etrafına sarılmış üçlü protein zincirlerinin oluşturduğu sarmal bir yapısı vardır. Kollajen ve jelatin aynı molekülün farklı formlarıdır. Jelatin, kollajenin kısmi hidrolize olmuş halidir. Isıl müdahalelerle kollajen kolaylıkla jelatine dönüştürülebilir. Balık derisinin yanı sıra, kemik ve yüzgeçlerinin işleme atıklarından da kollajenin ve jelatinin izolasyonu gerçekleştirilebilir. Kollajen ve jelatin, kas proteinlerine göre daha özeldir. Bu özellik Glisin,

Alanin, Valin ve Prolin gibi non-polar aminoasitlerin %80'den daha fazla bir oranda kollajen ve jelatin içerisinde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Şu andaki kollajen ve jelatin kaynağı olarak sığır ya da domuz derisi kullanılmasına rağmen, balık derisinden kollajen ve jelatin izolasyonu ve bunların endüstriyel uygulamaları ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Balık derisinin kollajen ve jelatin için alternatif kaynak olarak kullanılması dikkat çekmektedir. Bunun nedeni, kaynak olarak domuzun bazı dini sebeplerden dolayı istenmemesi olarak gösterilebilir. Aynı zamanda, sığırın kaynak olarak kullanılmasında da hala tartışma konusu olan deli dana hastalığı, sığır spongiform ensefalopati (BSE) ve insan sağlığı için daha birçok hastalığın bulunması da üretim için risk taşımaktadır. Aksine, balık kollajeni ve jelatini çok daha az risk taşımaktadır (Kim and Mendis, 2006).

2.1.3. Balık Yağı

Balık işleme tesislerinin yan ürünlerinin daha iyi kullanılması için balık yağına dönüştürülebilir. Genel olarak, balığın yağ içeriği %2 – 30 arası değişmektedir. Bu değişim, türe, beslenmesine, çevresel ve mevsimsel özelliklere bağlıdır. Ancak, deniz balıkçılık kaynaklarının yağ üretimine yönlendirilmesi ekonomik olarak gözükmemektedir. Bu yüzden, işlemeden çıkan yüksek miktarlardaki sakatat, insan tüketiminde iyi kalite balık yağı olarak kullanılabilmek için kaynak teşkil etmektedir. Balık yağı, diğer yağlardan yapısal olarak farklıdır. Temelde iki tip yağ asiti bulunur. Bunlar; eikozapentanoik asit (EPA) ve dokosahekzanoik asit (DHA). Bunlar, omega-3 yağ asitleri sınıfında doymamış poli yağ asitleridir ve doymamış yağ içerikli birçok soğuk su balıklarında bulunur. Doymuş yağ asitlerine göre, balık yağındaki doymamış yağ asitleri enerji üretimi ve

çeşitli biyoaktiviteler için daha kolay sindirilebilmektedir (Kim and Mendis, 2006).

2.1.4. Balık Kemiği

Kas proteinlerinin ayrılmasından sonra sağlık destekleyici bileşenlerden biri de balık kemiğidir. Balık kemiğinin yaklaşık % 30'luk bir kısmı olan organik yapısı kollajenden oluşmuştur. Bu yüzden, balık derisine ek olarak kollajen ve jelatin için ekstra kaynak olarak göze çarpmaktadır. Buna karşın, balık kemiğinden geriye kalan % 60 – 70'lik kısmı kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit olarak inorganik maddelerden oluşmaktadır.

İnsan sağlığı için önemli bir element olan kalsiyumun balık kemiğinden elde edilmesi dikkate alınmaktadır. Ancak, balık kemiği kalsiyumunun biyouyumluluğu ve potansiyel uygulamaları ile ilgili çok az çalışma vardır. Son zamanlarda, hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ medikal ve diş uygulamalarında kemik aşısı olarak kullanılmaktadır (Kim and Mendis, 2006).

2.1.5. Deniz Kabukluları Atığı

Son 20 yılda, beslenme alışkanlıklarının değişmesi ve yeni ürünlerin tüketiciye sunulması çabası sonucu; deniz kabuklusu sanayisinde önemli bir gelişme görülmüştür. Dondurulmuş ve konserve gıda sanayisinin etkileyici yükselişi, deniz kabuklularının yüksek miktarlarda elde edilip toplama alanlarında biriktirilmesi gibi sebeplerden dolayı; deniz kabuklularından bir şekilde faydalanma yolları aranmaya başlanmıştır (Simpson et al., 1994).

Ticari olarak en fazla toplanan kabuklu türleri yengeç, karides ve türleri ile kerevittir. Kabuklu yemek sanayisinde, atık materyal olarak çıkan miktar işlenenin neredeyse %80'i kadardır. Bu sanayi işletmeleri çevresel koruma ya da yan ürün ıslahı gibi faktörleri dikkate almadan çalışmalarını sürdürmektedirler. Kabuklunun içeriği, %25'i katı, %20 – 25'i yenebilir kısım ve % 50 – 60'ı da işlenebilir atık olarak bildirilmiştir (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Türkiye' de avlanan kabuklu su ürünleri için DİE – 2003 istatistikleri ton olarak Çizelge 2.1'de verilmiştir. Raporda atıkların miktarı ve değerlendirilmesine ilişkin herhangi bir veriye rastlanmamaktadır (Türkiye İstatistik Yıllığı, 2004). Kabuklu deniz ürünleri atıkları Türkiye' de değerlendirilmemesine karşılık, çeşitli ülkelerde bu atıklardan çeşitli endüstriyel ürünler elde edilmekte ve bu ürünlerden de farklı sektörlerde yararlanılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada Türkiye'de belli bir potansiyeli olan bu katı atıkların değerlendirilmesi, çalışmanın ana hedefini oluşturmaktadır. Bu katı atıklar, başta kitin (Li-Qunwu et al., 2002; Aberg et al., 2004; Beaney et al., 2005) olmak üzere, protein hidrolizatı (Jaswal, 1990), pigment ekstraksiyonu (Chen and Meyers, 1983) üretimlerinde değerlendirilme anlamında kullanılmışlardır.

Çizelge 2.1.Devlet İstatistik Enstitüsü 2003 yılı, Türkiye’de avlanan kabuklu su ürünleri miktarı (ton).

	1999	2000	2001	2002	2003
Avlanan Deniz Ürünleri Miktarı (kabuklu ve yumuşakça)	13634	18831	19230	29298	46948
Akivades (kum midyesi)	3585	10000	7500	10000	19700
Deniz Anası	1203	900	2000	500	4000
Deniz Salyangozu	3638	2150	2650	6241	5500
Karides	890	2000	3000	4000	6000
Midye	1800	1200	1500	5000	8100
Diğer Deniz Ürünleri	2518	2581	2580	3557	3648

Deniz kabuklularının protein içeriği besin değeri olarak yüksektir ve geri kazanımları da verimli şekilde yapılabilmektedir. Çizelge 2.2’de kabuklu atık proteinlerin standart proteinlerle karşılaştırması yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Kabuklu atıklarındaki protein içeriğinin soya fasulyesi ve balık içeriğine göre karşılaştırılması (g amino asit/16g azot) (Simpson et al., 1994)

Aminoasit	Kabuklular	Soya fasulyesi	Balık
Lys ^a	8,34	2,88	5,07
His	2,97	1,12	1,59
Arg	8,06	3,24	3,81
Asp	8,63	-	-
Thr ^a	3,91	1,89	2,82
Ser	4,69	2,52	2,52
Glu	17,80	-	-
Pro	4,54	-	-
Gly	7,52	1,89	3,68
Ala	7,14	-	-
Cis + Met ^a	2,60	2,25	3,46
Val	5,62	2,25	3,46
Ile ^a	5,17	2,20	3,06
Leu ^a	8,14	3,42	4,98
Tyr ^a	3,61	1,58	2,22
Phe ^a	5,05	2,20	2,75
Trp	0,73	0,58	0,78
Met	-	0,63	1,95

^a Esansiyel amino asit

Çizelgeden de görüldüğü gibi kabuklu atığının protein içeriği oldukça iyi gözükmektedir. Esansiyel amino asit içeriği standartların üzerinde; kükürtlü amino asitlerin içeriği ise soya fasulyesinden fazla ama balıktan daha az bulunmaktadır.

Türlere bağlı olarak, protein içeriğinde doğal bir pigment olan astaksantin önemli miktarlarda bulunabilir. Aslında, kabuklu atığı özellikle astaksantin ve onun esterleri gibi doğal pigmentler için ilginç bir kaynaktır. Ancak, bu pigmentler sıcaklığa ve kimyasallara karşı çok

hassas olduğu için ekstraksiyon işlemlerine de özellikle dikkat edilmelidir (Synowiecki et al., 2003; Simpson et al., 1994).

Kabuklu atığı, mineral olarak %90 veya daha fazlası oranda kalsiyum karbonat içerir, geri kalanı da kalsiyum fosfattır. Bu yüksek miktarlardaki kalsiyumun eldesi ve tanzimi önemli bir sorundur (Aye and Stevens, 2004).

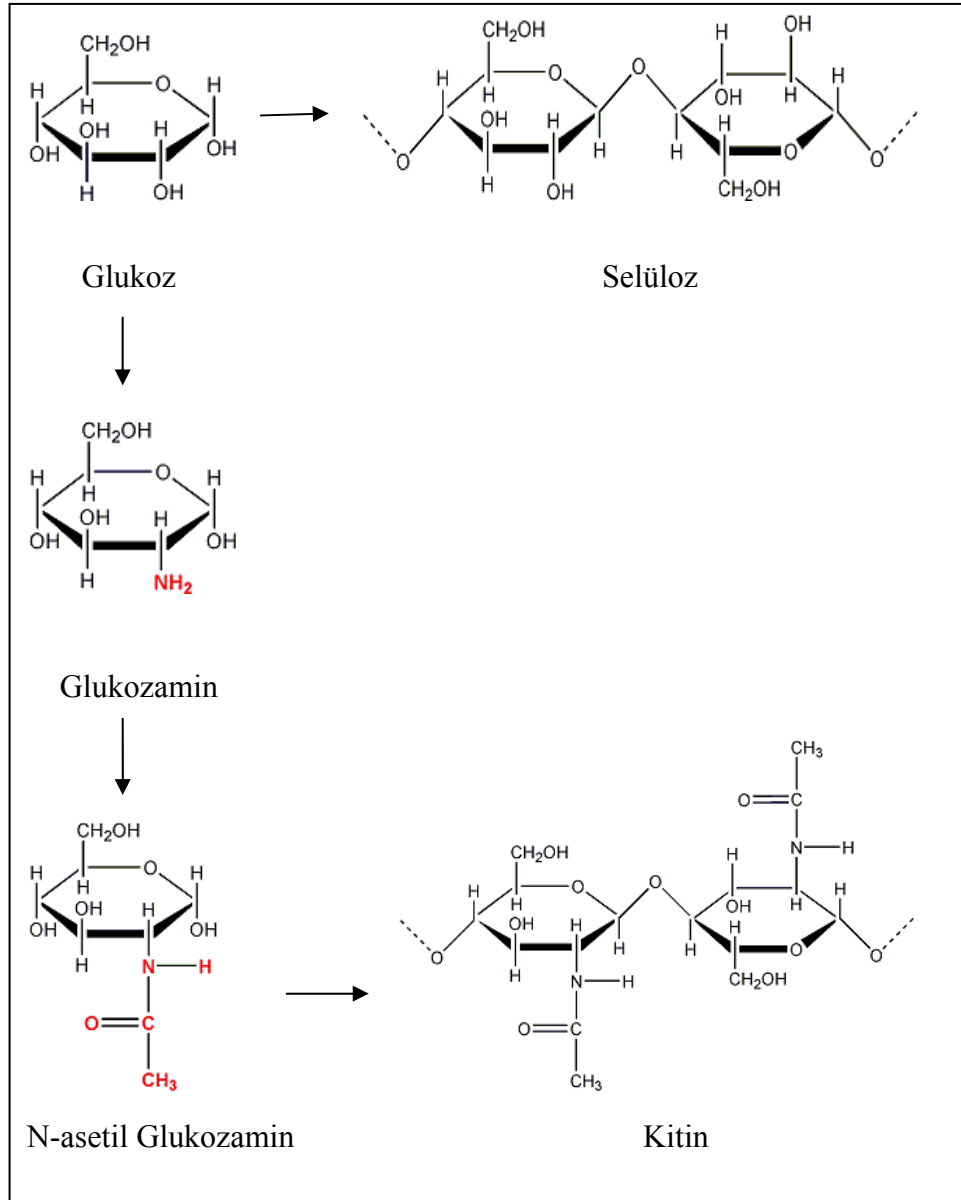
Yağ içeriğı ve çeşitleri özellikle iç organlardan türevlenmiştir. Örneğin temiz yengeç bacağı kabukları yağ içermemekte, karides ya da istakoz da %5 ya da daha fazla; küçük karides (krill) atıklarında ise %10 ya da daha fazla yağ bulunmaktadır (Simpson et al., 1994).

Kabuk atığındaki az miktardaki lipid iç organların ve kasların atıklarında kalmaktadır. Kabuklu lipidlerinin besinsel değeri doymuş ve doymamış yağ asitlerinin arasındaki orana bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, soğuk sulardaki kar yengecinin kabuk atığındaki lipid içeriğı, doymuş (% 17,0 - 18,1), monoenler (% 50,0 – 55,8) ve polyenler (% 28,2 – 32,0) olarak verilmektedir. Kabuk atığının düşük lipid içeriğı, hayvan gıda katkı maddesi olarak kullanılmasını sınırlamaktadır. Kabuklardaki bir diğer değerli bileşende dış iskeletin iç duvarında proteinlerde birleşik olan karetonoidlerdir. Kabuklulardaki karetonoid miktarı çok azdır ve bu, organizmanın büyüklüğüne, olgunlaşmasına ve genetik farklılıklarına bağlıdır. Örneğin, karides (*Pandalus borealis*) ve yengeç (*Chionoecetes opilio*) sakatatlarındaki pigment konsantrasyonun ortalama değeri, karideste % 14,7 ve yengeçte % 13,9 olarak hesaplanmıştır. Kabukluların dış iskeletindeki asıl karetonoid bileşeni astaksantin ve esterleri olup, kuru temelde kabuklarda yaklaşık 25 µg/g olarak bulunmaktadır (Synowiecki et al., 2003).

2.2. Kitin ve Kitosanın Özellikleri ve Kullanım Alanları

Kitin kelimesi, Yunanca kökenli olup tırnak örtüsü anlamına gelen chiton'dan türemiştir. Omurgasızların, kabukluların, böceklerin dış iskeleti ve küf ile mayanın hücre duvarının temel maddesi olup, koruyucu ve destekleyici bileşen olarak görev alır. Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan yenilenebilir polimerdir. Yılda en az 10 gigaton kitin biyosferde kullanılıp hidrolize olmaktadır. Kitin, poly-(164)-N-asetil-D-glukozamin yapısında olup selüloz benzeri bir biyopolimerdir. Şekil 2.1'de kitinin molekül yapısı ve selüloz ile karşılaştırması gösterilmiştir. 1811 yılında Fransız bilim adamı Henri Bracoonot tarafından mantardan izole edilmiş ve keşfedilmiştir. 1823 yılında Odier, kitin yapısını böceklerin kabuklarında bulmuştur. Kitinin biyosentezi, membrana bağlı kitin sintaz ile yapılır. Eklembacaklıların dış iskeletinde ve birçok küfte, kitin sintaz (EC 2.4.1.16), üridin difosfat-N-asetil-D-glukozamin'i kitine polimerleştirir (Kumar, 2000).

Yapısal olarak, kitin selülozun türevlenmiş haline benzer. Selülozun C2'deki hidroksil grubu yerine asetamid grubu gelmiştir. C3 – OH --- C5 moleküller arası ve NH --- C = O ile C6 – OH --- O = C moleküller içi hidrojen bağları ile stabilite kazanmıştır. Kitinin alfa, beta ve gamma formları, kitin mikrofibrillerinin farklı yapılarıdır. Alfa yapısı, doğada en fazla bulunan formudur; antiparalel zincir yapısı vardır. Deniz kabuklularının kabuklarında, küflerde, mayalarda ve böceklerde bulunur. Beta formu, doğada daha az görülmekte olup, mürekkep balığının kollarında bulunur; paralel zincir yapısı vardır. Gamma formu, paralel ve antiparalel yapıların karışımı olarak böceklerin kozalarında görülür (Zhang and Haga, 2000).

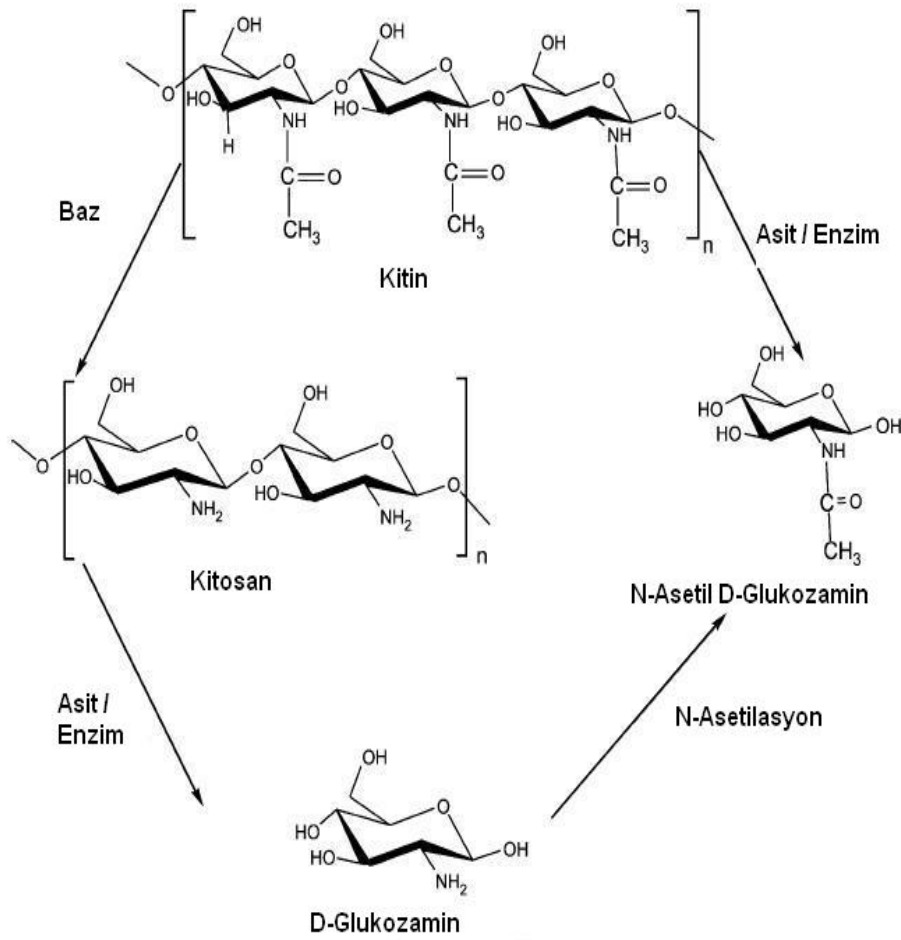


Şekil 2.1. Kitinin Molekül Yapısı ve Selüloz ile Benzerliği

Kitosan, kitinin alkali ya da enzimatik deasetilasyonu ile elde edilir ve doğada bolca bulunur. Kitosan, 1859 yılında Rouget tarafından içerisinde kitin bulunan derişik KOH çözeltisini kaynatırken keşfedilmiştir. Kitosan, temelde organize olmamış yapı olarak kristal ve

yarı kristal formları vardır. Özellikle çevresel toksisite problemleri ve diğer farklı nedenler açısından; kitin ve kitosan biyopolimerleri çalışılması gereken ilginç maddelerdir. Özel yapılarından dolayı, biyoyenilenebilir, biyobozunabilir ve biyofonksiyonel gibi yüksek biyolojik ve mekaniksel özelliklere sahiptirler (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Farklı deasetilasyon, polimerizasyon ve moleköl ağırlığı derecelerinde; kitin, kitosan ve bunların oligomerlerinin hazırlanması için kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki farklı yöntem vardır. Şekil 2.2’de kitin ve türevleri gösterilmektedir. Kitin, kitosan ve bunların oligomerleri, konsantre HCl uygulaması ile üretildikten sonra, kolon kromatografik yöntemi ile fraksiyonlarına ayrılırlar. Kitin ve kitosan oligomerlerinin izolasyonu işlemi için üç farklı yöntem vardır. Bunlar, asetolizis, florohidrolizis ve sonolizistir. Aynı zamanda, kitin ve kitosan oligomerleri mikrobiyolojik ve fungal uygulamalarla (enzimatik hidrolizler) da hazırlanabilir. Kitin ve kitosanın parçalanması için sırasıyla kitinaz ve kitosanaz enzimleri kullanılmaktadır (Synowiecki et al., 2003; Shahidi and Abuzaytoun, 2005).



Şekil 2.2. Kitin ve Türevleri (Shahidi and Abuzaytoun, 2005)

Kitin, kitosan ve bunların oligomerleri yara tedavi edici ajan gibi medikal kullanımda, hipokolesterolemik ajan gibi beslenmede, antitümöral ve antiülser ajan olarak, yapay bacak, kol ve diğer uzuvlar gibi yapıların kaplanması için kullanılır. Asidite düzenleyici ve antibakteriyel ve antifungal ajan olması ile deniz gıdalarının ve meyvelerin bozulmadan saklanması için kullanılır (Kumar, 2000; Rinaudo, 2006).

2.2.1. Çözünürlük

Kitin, içerisindeki güçlü hidrojen bağlarından dolayı sık kullanılan çözügenlerde çözünmez ve sadece %5-8 LiCl içeren hekzafloroaseton ya da N-N-dimetil asetat gibi özel çözügenler çözünür. Son zamanlarda, naylon için kullanılan solventlerden biri olan kalsiyum klorür dihidrat ile doyurulmuş metanol'de kitin solventi olarak kullanılabilmektedir. β -kitin, α -kitinden farklı olarak, formik asit içerisinde çözünebilmekte ve su içinde de şişmektedir. Kitosan, herhangi bir organik solventte ya da suda çözünmemektedir, ancak; serbest amino gruplarına sahip sulu asitlerde çözünebilmektedir. formik asit, laktik asit, piruvik asit, okzalik asit gibi bazı organik asitlerde çoğunlukla çözünmektedir. Hidroklorik asit ve nitrik asit gibi bazı mineral asitlerde de çözünme gerçekleştirilebilir ama fosforik asiti ve sülfirik asiti solvent olarak kullanmak uygun değildir (Kurita, 2006; Rao and Stevens, 2005).

2.2.2. Koagülasyon

Kitosan, koagülasyonda polikasyon polimer olarak etkindir ve atık su arıtım uygulamalarında aktif çamurun susuzlaştırılmasında kullanılmaktadır. Kitosan, geniş çapta kullanılan akrilamid kopolimerleri gibi sentetik polikasyon polimerlerine göre pahalı olsa da biyobozunur ve daha az toksik olduğu için çevre korumasında tercih edilebilmektedir. Gıda işleme fabrikalarının atık suları, kitosan ile floküle edilip proteinlerin kazanımı sağlanır, bu da hayvan beslenmesinde kullanılabilmektedir (Kurita, 2006).

2.2.3. Adsorbsiyon ve Şelatlama

Kitin ve kitosan, boyalara, aromatik hidrokarbonlara ve proteinlere adsorblanabilir. Kitin ve kitosan aynı zamanda, bakır, civa, kadmiyum,

demir, mangan, nikel, çinko, kurşun ve gümüş gibi metal katyonlarına adsorblanır ama kitosan özellikle serbest amino gruplarına bağlanma eğilimi gösterir. Metal adsorbsiyon kapasitesi asetilasyon derecesi ile doğrudan ilişkilidir. Genellikle, asetil içeriğinin azalması ile metal adsorbsiyon kapasitesi artmaktadır, ancak; bu sınır %50 deasetilasyona kadardır. Bu sonuçta, sadece asetil grubuyla ilişkili olmadığını, adsorban moleküllerin hidrofilitesi ile ilgili olduğu anlamına gelmektedir (Kurita, 2001; Kurita, 2006).

2.2.4. Biyolojik özellikleri

Kitin ve kitosan, non-toksik, biyouyumlu ve biyobozunurdur. Selülozdan farklı olarak, amino polisakkaritler ilginç biyolojik, fizyolojik ve farmakolojik özellikler gösterir. Yara iyileşmesinde, hemostatik aktivitede, immun yanıt artırımında, hipolipidemik aktivitede, mukoadazyonda ve antimikrobiyal aktivitede önemli uygulamaları vardır. Kitosan aynı zamanda, gen aktarımında, hücre ve doku kültürü çalışmalarında destek materyal olarak kullanılmaktadır (Kumar, 2000; Kurita, 2001).

2.2.5. Ekonomik yaklaşım

Kitin ve kitosan üretimi özellikle Oregon, Washington, Virginia gibi A.B.D eyaletleri ve Japonya'daki konserve fabrikalarının, yengeç ve karides kabukları atıklarına dayanır. Norveç, Meksika ve Şili gibi birçok ülke yüksek miktarlarda kullanılamayan deniz kabuklusu atığına sahiptir. Gıda endüstrisi atığı olarak deniz kabuklusundan kitosan üretimi, özellikle karetonoid kazanımını da kapsıyorsa, ekonomik olarak kazançlı bir proses olur. Kabuklar, önemli ölçüde astaksantin içerir. Karetonoidler, yapay

olarak sentezlenemeyip, özellikle somon üretiminde gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Karides kabuğundan, 1 kg % 70 deasetillenmiş kitosan üretebilmek için; 6,3 kg HCl ve 1,8 kg NaOH ile azot takviyesi; bunun yanı sıra ortam için 0,5 ton su ve soğutma içinde 0,9 ton su gerekmektedir. Üretim maliyetini belirlemenin önemli noktalarından biri de taşımadır. Hindistan, Balıkçılık Teknolojisi Enstitüsünün kitin ve kitosan ile ilgili yaptığı araştırmaya göre; kuru karides %23 kitin içermektedir. Aynı araştırmaya göre, Hindistan bölgesindeki ortalama kitinsel katı atık miktarı 60000 ile 80000 ton arasında değişmektedir. Kitin ve kitosan ticari olarak, Hindistan, Japonya, Polonya, Norveç ve Avustralya'da yapılmaktadır. Sigma-Aldrich'in fiyat listesine göre (düşük miktarlardaki) kitosanın dünya piyasasındaki bedeli 7,5\$/10g olarak verilmiştir (Kumar, 2000).

2.2.6. Kullanım Alanları

Kitin, kitosan ve türevleri olarak medikal ve gıda alanları başta olmak üzere çeşitli alanlarda kullanım yeri bulmuştur. Özellikle medikal alanda son zamanlarda kitosan temelli yara iyileştirme elbiseleri üstüne çalışmalar artmaktadır. Kitin ve kitosan türevlerinin elde edilmesinin kolay bir işlem olmasından dolayı çok farklı kompozisyonlardaki kitin ve kitosan ilaç taşıyım sistemlerinde ve kontrollü ilaç salınımlarında kullanım yeri bulmuştur. Kitosan tabletleri ve/veya fiberleri diyet ürünü olarak kullanılabilmekte ve yağların vücutta metabolize olmadan dışarı atılmasını sağlamasıyla zayıflama ürünü olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği ile aynı zamanda kolesterol seviyesini de düşürdüğü görülmüştür (Kumar, 2000; Li-Qunvu, 2002; No, 1996; Rinaudo, 2006).

Kitin, kitosan ve türevlerinin bakteri, maya ve küflere karşı antimikrobiyal aktivitesi mevcuttur. Kitosan pH 6.0'dan daha düşük pH'larda çözünür şelatlaştırma aracı olma özelliği ile kitine göre daha iyi

bir antimikrobiyal ajandır. Çizelge 2.3’de kitin ve türevlerinin kullanım alanları verilmiştir (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

Çizelge 2.3. Kitin ve türevlerinin kullanım alanları (Shahidi and Abuzaytoun, 2005)

Uygulama Alanı	Örnekler
Antimikrobiyal ajan	• Bakteriyisidal • Fungisidal • Bitkilerde küf kontaminasyonun ölçülmesinde
Yenilebilir film	• Gıda ile çevresi arasında kontrollü nem transferi • Antimikrobiyal maddelerin kontrollü salınımında • Besin, tat ve ilaçların kontrollü salınımında • Oksijenin kısmi basıncının azaltılmasında • Solunum hızının kontrolünde • Sıcaklık kontrolünde • Meyvelerdeki enzimatik kararmanın kontrolünde
Gıda katkı maddesi	• Meyve sularının asitsizleştirilmesi ve berraklaştırılmasında • Doğal lezzet artırıcı • Emülsifiye edici ajan • Kalınlaştırıcı ve tutucu ajan • Renk koruyucu
Besinsel	• Diyetel fiber • Hipokolesterolomik ajan • Çiftlik hayvanı ve balık gıda katkısı • Lipid emilimini azaltıcı • Tek hücre proteini üretiminde • Antigastirit ajanı • Bebek gıda bileşeni
Su uygulamaları	• Sudan, metal iyonlarının, pestisidlerin, fenollerin ve PCB’lerin geri kazanımında • Boyaların ve radyoizotopların ayrıştırılmasında
Tarım	• Tohum ve meyve kaplamada • Gübre olarak • Fungisid olarak
Kozmetik	• Deri ve saç ürünlerinde

Çizelge 2.3. (devam)

Uygulama Alanı	Örnekler
Biyomedikal ve farmasötikal ürünlerde	• Yapay deri • Cerrahi uygulamalarda • Kontak lenslerde • Büyük yanıklarda tedavi edici olarak • Kan diyaliz membranlarda • Yapay kan damarında
Diğer	• Enzim immobilizasyonunda • Nütrostikallerin enkapsülasyonunda • Kromotagrafide • Analitik bileşen olarak • Sentetik fiber

2.3. Kitinin Üretim Yöntemleri

2.3.1. Üretim Kaynakları

Kitinin üretimi ya da ekstraksiyonu için öncelikle, kitinin bulunduğu yerlerin belirlenmesi lazımdır. Çizelge 2.4’de kitinin biyosferde bulunduğu yerler listelenmiştir.

Çizelge 2.4. Kitinin biyosferdeki kaynakları (Kırubagaran, 2005)

Deniz Canlıları	Böcekler	Mikroorganizmalar
Halkalı solucanlar	Akrepler	Yeşil alg
Yumuşakçalar	Örümcekler	Kahverengi alg
Deniz omurgasızları	Kolsu ayaklılar	Maya
Kabuklular:	(Brachiopods)	Penicillium miselleri
Yengeç	Karıncalar	Ascomydes
Karides	Hamam böceği	Chytridiaceae
İstakoz	Arılar	Blastocladiaceae

Kabuklular, kitinin endüstriyel proseslerinde halen en büyük kaynaktır. Kitinin en iyi kaynakları içerisinde kabuklular (karides, yengeç, istakoz), mürekkep balığı ve istiridye bulunur. Kabukluların toplam kütlelerine göre kitin içeriği % 2 – 12 arasında değişmektedir. Kabuklu atığındaki kitin, protein, mineral ve karetonoid içeriğinin çeşitliliği proses sırasındaki kabuk soyma koşullarına, türlere, organizmanın kısımlarına, yaşam döngüsünün evresine bağlıdır. Kabukluların kabuğu temelde % 30 – 40 protein, % 30 – 50 mineral tuzlar ve % 13 – 42 arası kitin içerir. Protein çoğunlukla etin atıklarında tutulurlar ve dokuların arasında da kitin ve mineral tuzlarla kompleks yapılar oluşturarak deniz kabukluların dış iskeletini oluştururlar. Hayvanların çoğalma dönemlerine ve yaşlarına bağlı olarak, mineral tuzlar kabuğun dayanıklılığını ve geçirgenliğini etkiler. Yaşlı örneklerin dış iskeletinde kalsiyum içeriğinin daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak kitin içeriğinin daha düşük olduğu gözlenir. Kabuktaki mineral oranı çoğunlukla kalsiyum ve magnezyumun fosfatları ve karbonatları olarak bulunmaktadır (Shahidi and Abuzaytoun, 2005; Simpson et al., 1994).

Allomyces, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor, Rhizopus, Choanephora, Tamnidium, Zygorrhynchus ve *Phygcomyces* gibi çeşitli küflerin misellerinden de kitin elde edilebilir. Bunların kitin içeriği Çizelge 2.5’da verilmiştir. Kitinden ayrı olarak, misel kalıplarının hücre duvarları önemli miktarlarda kitosan ve çeşitli asidik polisakkaritler içermektedir.

Çizelge 2.5. Bazı mikroorganizmaların kitin içerikleri (Shahidi and Abuzaytoun, 2005)

Mikroorganizmalar	% Kitin içeriği
<i>Aspergillus niger</i>	42
<i>Aspergillus phoenicis</i>	23,7
<i>Mucor rouxii</i>	9,4
<i>Neurospora crassa</i>	8 – 11,9
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19,5 – 42
<i>Trichoderma viridis</i>	12 – 22
<i>Saacharomyces gutulata</i>	2,3
<i>Blastomyces dermatidis</i>	13
<i>Histoplasma capsulatum</i>	25,8 – 26,4
<i>Tremeliamesenterica</i>	3,7
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	11

Şu anda bu polisakkaritlerin eldesi için pratik olarak kullanılması uygun olmasa da, kitin ve kitosanın üretimi için çeşitli yöntemler denenmiş ve geliştirilmiştir (Pochanavanich and Suntornsuk, 2002; Teng et al., 2001). Fungal hücre duvarlarından kitin ve kitosanın elde edilip kullanılması, kolay elde edilebilmesinden dolayı avantajlıdır. Bu gruptaki mikroorganizmalar yüksek büyüme hızına sahiptir ve optimal kültür koşullarda ikilenme süresi 1 – 3 saattir. Küfler, kağıt ve gıda sanayinin yan ürünü olan selüloz gibi substratlarda bile büyüebildiği için ucuzdur. Bundan başka, küfler, kalsiyum karbonat ve diğer mineral tuzları bulundurmazlar. Bu yüzden de, kitin üretimi için yapılan asit uygulaması yapılmayacağı için deniz kabuklusuna göre maliyet azalır. Ek olarak, asidik polisakkaritlerin üretim verimi fermantasyonun kontrol uygulamaları ile ayarlanabilir.

Fungal hücre duvarlarındaki kitin ve kitosanın kuru ağırlığa göre % 2 – 60 olarak değişmektedir. *Basidiomycetes* ve *Ascomycetes*'in

deproteine edilmiş hücre duvarlarındaki kitin ve gluklan içeriği sırasıyla % 26 – 65 ile % 22 – 67 arasında değişmektedir. *Agaricus bisporus* hücre duvarlarının içeriği, % 22 protein, % 72 kitin, % 3 selüloz, glukozamin ve mineral tuzlardan oluşmaktadır. *Mucor rouxii*, fungal kitin kaynakları içerisinde en fazla çalışılanıdır ve kitosan içeriği kuru hücre ağırlığına göre % 8,9 – 35 arasında değişmektedir. Kitin verimliliği bakımından *Basidiomycetes*, diğer küflere göre önemli ölçüde üstün gelmektedir. Küf misellerinin verimli şekilde kullanılabilmesi için büyüme ortamının kompozisyonunun optimal şekilde ayarlanması gerekmektedir. *Mucor rouxii*'nin büyümesine bakıldığında, kitin, kitosan ve protein içeriğinin zamana göre değişimi Çizelge 2.6'da görülmektedir. Buna ek olarak, en fazla 2 güne kadar kitosan sentezine başlarlar (Shahidi and Abuzaytoun, 2005; Simpson et al., 1994; Synowiecki et al., 2003; Kurita, 2001).

Çizelge 2.6. *M.rouxii*'nin zamana göre büyümesi sırasındaki içeriğinin değişimi (Synowiecki et al., 2003)

Bileşen (% kuru bazda)	Büyüme Zamanı (saat)			
	12	24	48	96
Protein	63,7	61,7	60,1	55,5
Deproteine edilmiş misel	11,8	13,8	16,4	17,1
Ham Kitin	7,0	7,7	8,9	9,6
Kitosan	4,4	6,1	7,3	7,0

2.3.2. Kitinin Üretim Yöntemleri

Kitin üretim prosesi klasik anlamda, demineralizasyon için asitlerin, deproteinizasyon için de bazların kullanımından ibarettir. Ancak bu prosesler polimerin hidrolizine, istenmeyen ve beklenmeyen fiziksel özelliklere ve kirliliğe sebep olabilmektedir (Simpson et al. 1994). Kimyasal yöntemleri geliştirilmesine yönelik bazı çalışmalar da

yapılmaktadır. Örneğin; fiziksel uygulama ile kurutma, öğütme ve eleme ile toz halinde karides proteininin %50'sinin kazanımı yapılmıştır. Asitli su ile yapılan ön işlemle de proteinin %60'ının uzaklaştırılması ve kitin veriminde herhangi bir azalma olmadan mineral içeriğinin de azalması sağlanmıştır. Her iki ön işlem prosedürü kitin üretimi için daha temiz bir teknolojiyi desteklemekte, göreceli olarak daha az kimyasal gereksinimi sağlamakta, yararlı yan ürün proteini eldesi ve daha az kirlenmiş endüstriyel atık su sağlanmaktadır (Aye and Stevens, 2004). Ancak bunlara rağmen hala kullanılan kimyasalların geri kazanımı mümkün olmamaktadır. Bu yüzden pahalı ve çevre dostu olmayan bu kimyasal proseslere alternatif olarak demineralizasyon ve deproteinizasyon için mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik prosesler önerilmiştir (Hall and De Silva, 1992; Shirai et al., 1997; Rao and Stevens, 1997; Rao et al., 2000; Jung et al., 2005). Karides atıklarının demineralizasyonu laktik asit bakterileriyle, ortamda bir karbon kaynağının, organik asitlerin veya çeşitli tuzların bulunduğu durumda çalışılmıştır (Hall and De Silva, 1992; Shirai et al., 1997). Deproteinizasyon işlemi de proteaz üreten mikroorganizmalarla muamele sonucu ve ayrıca her iki işlemin, yani demineralizasyon ve deproteinizasyon işleminin aynı ortamda yapıldığı prosesler de gerçekleştirilmiştir. (Jung et al., 2005).

Bu proseslerde en fazla kullanılan bakteri *Lactobacillus plantarum*'dur. *L.plantarum*'un laktik asit üretimi ve proteaz aktivitesi ile kitin ekstraksiyonu hedeflenmiştir. Mikroorganizmanın büyümesinde ortamın başlangıç pH'sının ayarlanması işleminde asetik asit ve sitrik asit denenmiş ve farklı asitlerin kullanılması ile demineralizasyon ve deproteinizasyon oranlarının da değiştiği görülmüştür. Asetik asit kullanıldığı zaman demineralizasyonun % 86, deproteinizasyonunda % 75

olduğunu; ancak, asetik asit yerine sitrik asit kullanıldığı zaman DM'nin % 90 ve DP'nin de % 88 olduğu belirtilmiştir (Rao et al., 2000).

Yine *L.plantarum*'un kullanıldığı başka bir çalışmada da karides kabuğu atıkları baş ve kabuk olarak kısımlandırılıp ayrı ayrı işlemlere tabi tutulmuştur. Buna göre; başlarda % 88 DM ve % 83 DP sağlanırken; kabuklarda % 63 DM ve % 68 DP sağlanmıştır (Rao and Stevens, 2005).

Kitin üretiminin büyük ölçeklerde biyolojik yolla yapılabilmesi için yapılan çalışmada, laktik asit üretimini indüklemek amacıyla sakkaroz, peyniraltı suyu ve laktoz denenmiş ve sükrozun kabuktan kitin ekstraksiyonunda daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Cira and Huerta, 2002).

Bir başka çalışmada deniz kabuklusu atığından değil de doğrudan mikrobiyal yolla kitin üretimi için yapılan çalışmada da *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus*)'nin miselleri kullanılmış ve kültür ortamının temel iki bileşeni üzerinde durulmuştur. Bunlar; üretim zamanı ve D-glukoz, L-asparagin ve tiaminin konsantrasyonudur. En yüksek kitin verimi (%23,9) 60g/l glukoz, 3g/l asparagin ve 0,008mg/l tiamin varlığında elde edilmiştir (Andrade et al., 2003).

Karides atığının fermantasyonu pH 6.0'da *Lactobacillus plantarum*'un iki tane suşu ile çeşitli tuz konsantrasyonları denenmiştir. Bu denemenin sonuçlarına göre % 6'ya kadarlık tuz konsantrasyonuna kadar her iki suşunda büyüdüğü ancak sonraki tuz konsantrasyonlarında büyümenin gözlenmediği görülmüştür. Deproteinizasyon ve demineralizasyon oranlarında, 541 suşunda A6 suşuna göre daha iyi verimlilik gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda % 81,4 demineralizasyon ve % 59,8 deproteinizasyon olan maksimum oran, 541 suşunda % 2'lik tuz konsantrasyonunda elde edilmiştir. A6 suşunda ise

aynı tuz konsantrasyonunda % 65,5 demineralizasyon ve % 52,2 deproteinizasyon gözlenmiştir (Rao and Stevens, 2006).

Bu biyolojik yaklaşımlarla protein, mineral ve astaksantin bakımından zengin sıvı fraksiyonu; katı olarak da kitin fraksiyonu elde edilir. Sıvı kısım protein-mineral katkı maddesi olarak insan veya hayvan tüketimi için kullanılabilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Karides Kabuğu

Çalışma boyunca İzmir Pınarbaşı'ndaki Köseoğlu karides çiftliğinin işleme atığı olan karides kabukları işletmede yıkandıktan sonra, derin dondurucuda 100 g eşit parçalara bölünerek - 20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Gerektiğinde 80°C sıcaklıkta 1 gün bekletilmesiyle ya da 60 °C'de 2 gün bekletilip kurutulduktan sonra Waring tipi blender ile parçalanarak, toz halinde kullanılmıştır (Beaney et al., 2005). Çalışmada kullanılan karides kabuğunun bileşimi Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan karides kabuğunun bileşimi

Bileşen	% (Kuru madde)
Kitin	30
Protein	40
Mineral	30

3.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

Denemelerde kullanılan mikroorganizmalar, *Rhizopus oryzae* NRRL-395 ve *Lactococcus lactis* spp. *lactis* NRRL-B-1821 Amerika Tarım Bakanlığının Kültür Koleksiyonundan (NRRL) alınmıştır. *Teredinobacter turnirae* USDA (Peoria, IL) koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.3. Kimyasallar

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

3.1.4. Kullanılan Başlıca Cihazlar

pH-metre (Mettler-Toledo),
Nem analizörü (Mettler-Toledo),
Otoklav (Hirayama-Hiclave-HVE-50),
Santrifüj (Eppendorf),
Etüv (Memmert),
Çalkalamalı İnkübatörler (Gerhardt ve Certomat),
Statik İnkübatörler (Sanyo),
Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (Velp),
Analitik Hassas Terazi (Precisa),
Analitik Kaba Terazi (Precisa),
Homojenizatör (Waring),
Derin Dondurucu (Arçelik),
Vorteks (Heidolph),
Titrator (Schott),
Kjeldahl Azot Tayin cihazı (Vapodest),
Kül Fırını (Nüve),
Spektrofotometre (Jenway 6400)
Biyoreaktör 3.6L (Infors AG CH-4103)

3.1.5. Tamponlar, Reaktifler ve Çözeltiler

3.1.5.1. Biüret Protein Analizinde Kullanılan Çözeltiler

Biüret reaktifi: Fluka Biüret reaktifi kullanılmıştır.

NaOH çözeltisi (1 M): 40g NaOH (Merck), 1L'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmıştır.

Bovine serum albümin (BSA) çözeltisi (10mg/ml): 1g BSA (Merck), 100 ml saf suda çözündürülür.

3.1.5.2. Kjeldahl Azot Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Derişik Sülfirik Asit: %95 saflıktaki H_2SO_4 kullanılmıştır.

Derişik Hidrojen Peroksit: %35 saflıktaki H_2O_2 kullanılmıştır.

Metilen Mavi (1mg/ml): 10mg metilen mavi, 10ml %95 saflıktaki etanolde çözündürülmüştür.

Metil Red (1mg/ml): 10mg metil red, 10ml %95 saflıktaki etanolde çözündürülmüştür.

Borik Asit: 40 g borik asit (Merck), tartılarak 600ml kaynayan suda çözölmüştür. Çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra, çözelti saf su ile 900 ml'ye tamamlanmıştır. 10 ml metilen mavi ve 7 ml metil red eklendikten sonra, saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Çözelti, oda sıcaklığında saklanır.

NaOH çözeltisi (%35): 350 g NaOH (Merck), 1L saf suda çözöndürölmüştür.

3.1.5.3. Kimyasal Yolla Kitin Üretiminde Kullanılan Çözeltiler

NaOH çözeltisi (1 M): 40g NaOH (Merck), 1L saf suda çözöndürölmüştür.

HCl çözeltisi (1 M): %37'lik derişik HCl reaktifinden (Merck) 124,2ml alınarak, hacmi 1,5L'ye tamamlanmıştır.

Aseton: %99,8 saflıktaki Merck marka aseton kullanılmıştır.

3.1.5.4. Proteaz Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Potasyum Fosfat Tamponu (0,1 M): 1M Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)'tan 61,5 ml ve 1M Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4)'tan 38,5 ml alınarak, çözelti saf su ile 1L'ye tamamlanır. pH 7.0'ye getirmek için NaOH ve HCl kullanılır.

K_2HPO_4 çözeltisi (1 M): 17,4g K_2HPO_4 (Merck), 100 ml saf suda çözündürölür.

KH_2PO_4 çözeltisi (1 M): 13,6g KH_2PO_4 (Merck), 100 ml saf suda çözündürölür.

$HClO_4$ çözeltisi (1,5 M): $HClO_4$ (Merck) çözeltisinden 40,8 ml çekilerek saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

Azo-kazein (% 0,8): 5 farklı glukoz konsantrasyonlarından alınan enzim örnekleri için 0,5 ml kullanılacağından 0,024 g azo-kazein (Fluka) tartılarak üzerine 3 ml 0,1 M potasyum fosfat tamponu eklenir.

NaOH çözeltisi (1 M): 40g NaOH (Merck), 1L saf suda çözündürölmüştür.

3.1.5.5. Tween 80 Çözeltisinin Hazırlanması

Tween 80 reaktifinden (Merck), 0,1 ml alınarak hacmi su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan çözelti, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kimyasal Üretim

3.2.1.1. Kimyasal Üretim Öncesi Hazırlıklar

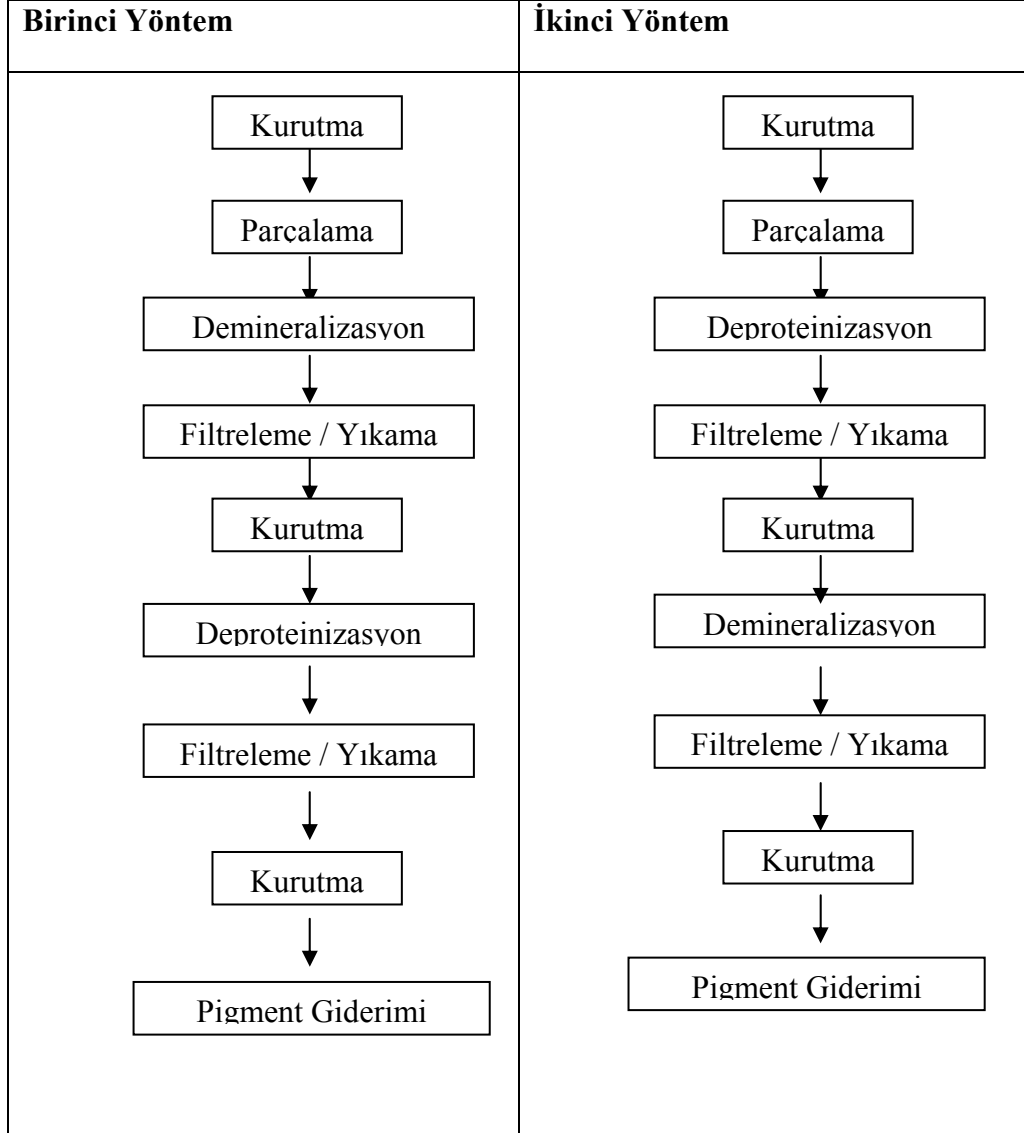
Kitinin ayrımı gerçekleştirileceği karides kabukları, yaş iken 100 g tartılıp etüvde 60 °C'de 2 gün boyunca kurutulmuştur. % 5 neme sahip karides kabukları, Waring tipi blender ile parçalanarak toz haline getirilmiştir.

3.2.1.2. Kimyasal Üretim Aşamaları

Kitinin karides kabuğu artığından kimyasal yolla ayrımı için iki farklı yol denemiştir. Birincisi, önce mineral gideriminin (Demineralizasyon, DM) sonra protein gideriminin (Deproteinizasyon, DP) yapıldığı yöntemdir. İkinci yol ise, önce DP, sonra DM'un yapıldığı yöntemdir. Demineralizasyon adımı için, 1M HCl çözeltisi oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 100 g yaş kabuğa 1,5 L çözelti olacak şekilde kullanılmıştır. Hidroklorik asit, karides kabuğunda mineral olarak fazlaca bulunan kalsiyum ile reaksiyona girerek kalsiyum klorür oluşturur ve çökelti halinde kalsiyum çözeltiye geçmiş olur. Deproteinizasyon adımı için, 1 M NaOH çözeltisi 70 °C'de 3 saat boyunca 100 g yaş kabuğa 1L çözelti olacak şekilde kullanılmıştır. Kullanılan NaOH protein zincirleri arasındaki bağları hidrolize ederek amino asitlerin açığa çıkmasını sağlar. Açığa çıkan amino asitler de filtrasyon ile kitinden uzaklaştırılır. Her bir adım arasında 40 mesh'lik filtre yardımıyla Ca ve protein çözeltilerinin uzaklaştırılması işlemi yapılmıştır. Katı kısım saf suyla yıkanarak üzerinde kalabilecek olan HCl/NaOH kalıntılarından arındırılarak etüvde 1 gece boyunca 60 °C'de kurumaya bırakılmıştır. Pigment olarak karides kabuğunda temel olarak bulunan astaksantinn uzaklaştırılması için aseton

kullanılmıştır. Çizelge 3.2’de deniz kabuklusu kabuğundan kimyasal yolla kitin üretiminin akış şeması verilmiştir (No et al., 1989; Beaney et al., 2005).

Çizelge 3.2.Deniz Kabuklusu Kabuğundan Kimyasal Yolla Kitin Üretimi (No, 1989)



3.2.2. Biyolojik Üretim

3.2.2.1. Biyolojik Üretim Öncesi Hazırlıklar

Kitinin ayrımının gerçekleştirileceği karides kabukları - 20 °C'den çıkartılıp etüvde 60 °C'de 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kuruyan karides kabukları, Waring tipi blender ile parçalanarak toz haline getirilmiştir. Her bir 250 ml'lik erlene 5 g olacak şekilde karides tozu konulmuştur. Kullanılacak olan organizmaların kitin ayrımını farklı glukoz konsantrasyonlarda hangi performansla gerçekleştireceğini bulmak için %0,0 %2,5 %5,0 %10,0 ve %15,0'lik glukoz konsantrasyonlarında ortamlar hazırlanmıştır. Ancak glukoz ve karides tozunun beraber sterilizasyonunda (otoklavda 121 °C, 15 dakika) Maillard reaksiyonu gözlenmiştir. Bu yüzden, karides tozu ve % 20 'lik glukoz stok çözeltisinin ayrı ayrı sterilizasyonu yapıp, steril koşullarda aktarımları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.3'de erlenlerin farklı glukoz konsantrasyonları için hazırlanan ortamlar verilmektedir.

Çizelge 3.3.Erlenlerin Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Hazırlanması

Bileşenler	Glukoz Çözeltileri				
	% 0	% 2,5	% 5	% 10	% 15
Karides Tozu (g)	5	5	5	5	5
Toplam Üretim Hacmi (ml)	50	50	50	50	50
İnokülasyon Hacmi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sterilizasyon Öncesi Eklenilecek Su (ml)	49,5	43,25	37	24,5	12
Sterilizasyon Sonrası Eklenilecek olan % 20 Glukoz Çözeltisi (ml)	-	6,25	12,5	25	37,5

***Rhizopus oryzae* İçin Yapılan Hazırlıklar**

PDA (patates dekstrozu agar, Oxoid) içeren tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterillendikten sonra yatırılarak donması beklenir. Spor süspansiyonu, eğik agar ortamlarında 28°C'de 7 gün inkübe edilmiş *R.oryzae*'ye, steril Tween 80 çözeltisi eklenerek elde edilmiştir. Eğik agar ortamından, *R.oryzae*'nin kaldırılması öze yardımıyla olmuştur. % 1 hacim/hacim oranında üretim ortamına ekim yapılmıştır. 1×10^4 spor / ml inokülayon için kullanılmıştır.

***Lactococcus lactis* İçin Yapılan Hazırlıklar**

Steril kabinin yüzey temizliği % 10'luk zefiran çözeltisi ile yapılmış ardından odadaki UV lamba yarım saat açık bırakılmıştır. NRRL'den kültür koleksiyonundan temin edilen liyofilize kültür ampulü alevde kırılarak açılmış ve ampul içine steril şırınga kullanılarak aktarılan M-17 (Merck) sıvı besiyeri 5 dakika süre ile tutularak liyofilize kültürün tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen kültürden yine steril şırınga kullanılarak mevcut hacmin tamamı 10 ml ilgili sıvı besiyerine aktarılmıştır. Bu ortamdan da yine 9 ml steril sıvı besiyeri içeren tüplere %10 hacim/hacim oranı ile transferler yapılmıştır. İnokülasyonları yapılan sıvı besiyeri 30°C'deki inkübatörde 24 saat inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kültür ortamından %10 hacim/hacim oranı ile 9 ml M-17 besiyeri içeren tüplere ekim yapılarak 12 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. 12 saat sonunda %1 – 5 ve 10 oranlarında besiyerine ekimler yapılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

***Teredinobacter turnirae* İçin Yapılan Hazırlıklar**

Çizelge 3.4’de verilen Plackett-Burman (PB) (Ahuja et al., 2004) besi ortamından 50 ml alınarak 250 ml’lik erlenlere konulmuştur. Başlangıç pH’sı 8,0’e ayarlanmıştır. Ayarlamalar için 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121 °C’de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda steril lenmiş ve steril lenen besiyerleri steril kabinde ortam sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Kriyojenik tüplerde - 86 °C’de stoklanan mikroorganizmadan, steril şartlarda 500 µl alınarak 50 ml’lik besiyerine ilave edilmiştir. Erlenler, 30 °C ve 125 rpm’de çalışan çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile mikroorganizma gelişimi sağlanmıştır. Gelişme ortamındaki mikroorganizma % 1 hacim/hakim oranında üretim ortamına eklenmiştir.

Çizelge 3.4.Plackett-Burman besi ortamı (Ahuja et al., 2004)

Bileşen	Miktar (g/L)
Sakkaroz	5
NH ₄ Cl	1
KCl	0.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.9
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.4
HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid)	4.9
Çözelti A	10 ml
Tuz çözeltisi	1 ml

Çizelge 3.4. (devam)

Çözelti A (g/L)		Tuz çözeltisi (g/L)	
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	24	H ₃ BO ₃	2.9
Na ₂ CO ₃	12	MnCl ₂ .4H ₂ O	7.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.04
		CoSO ₄ .7H ₂ O	0.05
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08

Biyoreaktör Denemeleri

Biyolojik kitin üretimi çalkalamalı sistemdeki erlenlerde ve 3.6 L toplam hacimli, 2 L çalışma kapasitesine sahip biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada pH, sıcaklık ve karıştırma hızının kontrol edilebildiği bir biyoreaktör kullanılmıştır.

3.2.3. Biyolojik Üretim Sonrası İşlemler

Biyolojik üretimden sonra ortam, 4000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilerek katı sıvı ayrımı yapılmıştır. Elde edilen katı kısım, 60 °C'de 1 gün bekletilerek kitin elde edilmiştir. Elde edilen kitin örneklerine gerekli analizler yapılarak % DP ve % DM oranları bulunmuştur.

3.2.4. Protein Tayini

Protein tayini için Biüret protein analizi kullanılmıştır. Duyarlılığı düşük (1 – 10 mg/ml) olmakla beraber, pratikliği nedeniyle geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Reaksiyonun esası belirteçteki bakır (Cu²⁺) iyonlarının peptid azotlarına bağlanması sonucu alkali çözeltide 550 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir kompleksin oluşumuna dayanır. Cu²⁺ iyonlarının ana zincire bağlanması nedeniyle amino asit çeşitlerinin ölçümler üzerinde herhangi bir önemli etkisi yoktur. Standart olarak BSA çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5.Biüret Protein Analizi İçin Standart Çözeltiler

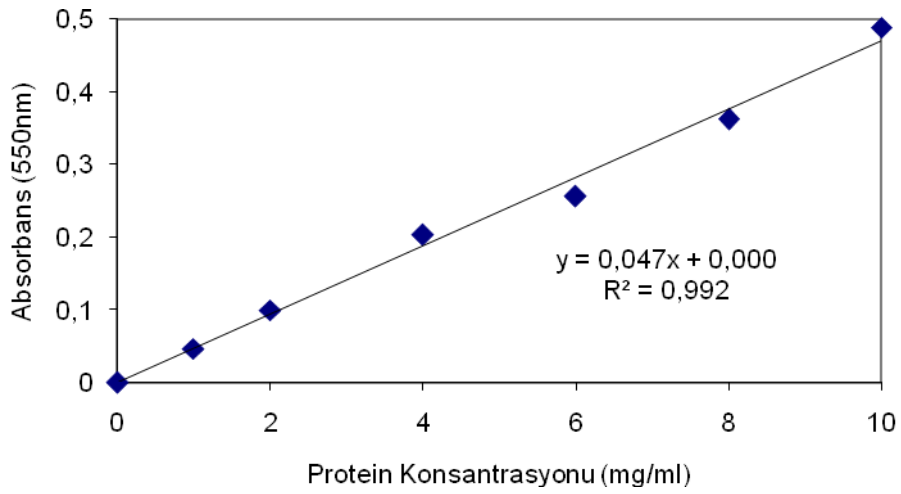
	% 1 'lik BSA (ml)	Destile Su (ml)	BSA Derişimi (mg/ml)
Std 1	0	15	0
Std 2	1,5	13,5	1
Std 3	3	12	2
Std 4	6	9	4
Std 5	9	6	6
Std 6	12	3	8
Std 7	15	0	10

Üretimler sonunda elde edilen örnekler katı olduğundan içeriklerinde bulunan proteinlerin sıvı ortama aktarılması gerekmektedir. Bunun için, protein tayini yapılacak olan örnekten 0,1 g alınarak 70 °C'de 2 saat 1M 10 ml NaOH ile muamele edilerek proteinlerin NaOH çözeltisine geçmesi sağlanmıştır. 2 saat sonunda örnekler filtre edilmiştir ve sıvı kısımdan 1 ml alınarak protein analizi yapılmıştır. Yöntem Çizelge 3.6'da verildiği gibi uygulanmıştır. Standart protein değişim grafiği hazırlandıktan sonra 1 M NaOH, kör olarak kullanılarak örneğin 550 nm'de absorbansı ölçülür. Deproteinizasyon oranı ; $\%DP = [(PO \times O) - (PR \times R)] \times 100 / (PO \times O)$ (Rao and Stevens., 2005) bağıntısı ile bulunur. *PO* ve *PR* (ağırlık/ağırlık) işlemden önceki ve sonraki protein yüzdelerini; *O* ve *R* (ağırlık) işleme giren ve çıkan kütle miktarını vermektedir.

Çizelge 3.6.Biüret Protein Tayini Yöntemi

(ml)	Kör	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8	Örnek
Tüplerde	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biüret	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Reaktifi										
1ml üzerine 4ml Biüret reaktifi konulur ve 30 dk. 25 °C sıcaklıkta beklenir. 550 nm’de köre karşı absorbans ölçülür ve standart grafiğe göre protein konsantrasyonu hesaplanır. Kör, 1M NaOH çözeltisidir.										

Protein analizine ait veriler Şekil 3.1’de verilen protein standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

**Şekil 3.1.**Protein Tayini Standart Eğrisi Grafiği

3.2.5. Azot Tayini

Azot tayini yöntemi olarak Kjeldahl metodu kullanılmıştır. Metot, yakma, distilasyon ve titrasyon olmak üzere üç aşamalı bir yöntemdir. 1 g örnek, % 95’lik 20 ml H₂SO₄, % 35’lik 8 ml H₂O₂, 2 tablet Kjeldahl katalizörü (Gerhardt) ve 3 tane kaynama taşı ile 405 °C’de 1 saat yakılır.

Yakma işlemi bittikten sonra bir süre soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra 90 ml destile su ve ardından % 35'lik 80 ml NaOH eklenir. Distilasyon ünitesine de 75 ml H₃BO₃ konulur. 3 dakika distilasyondan sonra; borik asitin 0,1 M HCl ile titrasyonu yapılır. Harcanan HCl miktarına göre örneğin azot içeriği bulunur. Üretim sonrası yapılan azot tayini ile % kitin içeriği hesaplanabilmektedir. Kitin yüzdesi için; *Kitin (%) = 14.25 x Azot Miktarı* (Rao and Stevens, 2005) bağıntısı; proses verimi içinse; *Proses verimi (%) = Son üründeki Kitin (g) / Başlangıçtaki Kitin (g)* bağıntıları kullanılmıştır.

3.2.6. Kül Tayini

Kül tayini için kullanılacak olan kroze, kromik asit içerisinde 8 saat bekletildikten sonra yıkanıp 12 saat 85 °C'de bekletilir. Böylelikle bir önceki uygulamadan herhangi bir kalıntı kalmayacaktır. Kurutulmuş kroze, pens yardımıyla boş tartımı yapılmış ve kaydedilmiştir. Krozelere 0,5 g örnek konulmuş ve kül fırınında 550 °C'de 3 saat bekletilerek bütün organik bileşiklerin uçması sağlanarak kül elde edilmiştir. Kül fırınından çıkartılan krozeler desikatöre alınarak soğumaya bırakılır. Son tartım okunduktan sonra örneklerin kül yüzdeleri ve % DM oranları hesaplanır. Demineralizasyon oranı ; $\%DM = [(MO \times O) - (MR \times R)] \times 100 / (MO \times O)$ (Rao and Stevens, 2005) bağıntısı ile bulunur. *MO* ve *MR* (ağırlık/ağırlık) işlemiden önceki ve sonraki kül yüzdeleri; *O* ve *R* (ağırlık) işleme giren ve çıkan kütle miktarını vermektedir.

3.2.7. Proteaz Aktivite Tayini

Farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan üretim sonrasında ne kadar proteaz üretildiğini bulmak için aktivite tayini yapılmıştır. Çizelge 3.7’de uygulanan proteaz aktivite tayini işlem sırası gösterilmiştir.

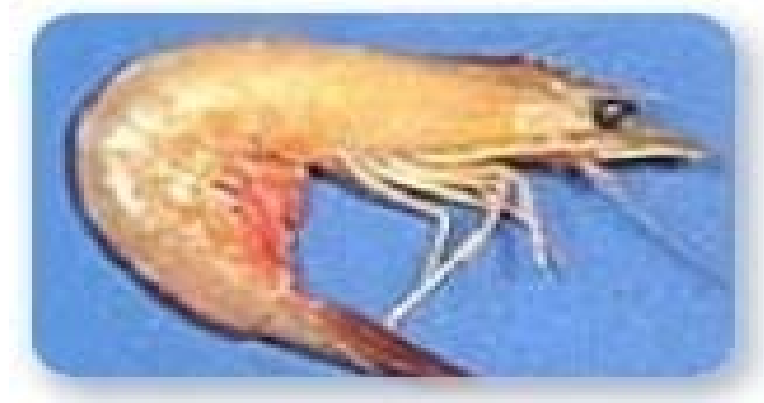
Çizelge 3.7. Proteaz aktivite tayini prosedürü

Glukoz çözeltileri (%)	0	2,5	5	10	15
Örnek Hacmi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
% 0,8 Azo-kazein çözeltisi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Örneğin üzerine azo-kazein eklendikten sonra oda sıcaklığında 3 saat inkübe edilir.					
1,5 M HClO ₄ çözeltisi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soğutulmuş HClO ₄ çözeltisi eklendikten sonra örnekler buz içerisine konularak 30 dakika bekletilir ve reaksiyonun durması sağlanır. 30 dakika sonra örnekler 13000g de 5 dakika santrifüj edilir.					
1 M NaOH (ml)	1	1	1	1	1
Santrifüjden sonra örneklerden 1 ml alınarak üzerine 1 ml NaOH eklenir ve kontrole karşı 440 nm’de absorbans değerleri okunur.					

1 birimlik OD, pH 7.0 ve 25°C’de 1 saatte harcanan 320µg azokazein olarak verilmiştir. Aynı zamanda bu değer, yine pH 7.0 ve 25°C’de 640 ünite enzim/ml’ye eşdeğerdir (Greene et al., 1989).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Daha önce Materyal ve Metotta belirtildiği gibi İzmir Pınarbaşı Köseoğlu karides işleme tesislerinden alınan karides kabukları (Şekil 4.1), aşağıda detaylı olarak verilen kimyasal ve biyolojik işlemlere tabi tutarak kitin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.



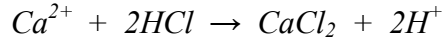
Şekil 4.1.Karides

4.1. Karides kabuğundan kimyasal yolla kitin ekstraksiyonu

Bu çalışmada öncelikle biyolojik yolla kitin elde edilmesiyle karşılaştırmak için, kimyasal yöntemle kitin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon, istenen maddenin karışım içerisinde alınarak saflaştırılmasıdır. Karides kabuğunun bileşimine bakıldığında % 30 mineral, % 40 protein, % 30 kitin (Çizelge 3.1) bulunmaktadır. Kitinin bu karışım içerisinde alınması işlemi, minerallerin ve proteinlerin uzaklaştırılmasıdır. Karışımdan minerallerin uzaklaştırılması olayına demineralizasyon; proteinlerin uzaklaştırılması olayına da deproteinizasyon denir.

Karides kabuğunun mineral içeriğinin büyük çoğunluğunu kalsiyum ve sonrasında magnezyum oluşturmaktadır. Kimyasal yolla bu minerallerin uzaklaştırılması için minerallerin suda çözünür formları haline getirilip filtrasyon ya da santrifugasyon ile katı halde kitinin elde edilmesi yapılmaktadır. Kalsiyum ve/veya magnezyumun çözünür hale getirmek için asit kullanılmaktadır. Genelde tercih edilen asit hidroklorik asittir.



Karides kabuğunun amino asit içeriği Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Kimyasal yolla bu amino asitlerin oluşturduğu kompleks protein yapılarının uzaklaştırılması için proteinlerin parçalanıp amino asitlerine ya da polipeptitlerine dönüştürerek yine filtrasyon ya da santrifugasyon ile katı halde kitin elde edilir. Proteinlerin parçalanması için baz kullanılmaktadır. Genelde tercih edilen sodyum hidroksit’tir. Sodyum hidroksitin yüksek sıcaklıkta, yüksek derişimde uzun süre muamelesi ile protein parçalanması gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada, demineralizasyon (DM) işlemi 1 M HCl 1:15 oranında oda sıcaklığında 30 dk. bekletilerek yapılmıştır. Deproteinizasyon (DP) içinse 1 M NaOH 1:10 oranında 70 °C’de 2 saat bekletilmiştir. İşlem prosedürü Çizelge 3.2’de daha önceden gösterilmiştir.

Karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu için özellikle işlem sırasının, kitin kazanımının verimini nasıl etkilediğine bakılmıştır. Birinci yöntemde önce DM sonra DP; ikinci yöntemde de önce DP sonra DM yapılmıştır. Çizelge 4.1’de işlem sırasının son ürünündeki içerik kompozisyonunu nasıl etkilediği gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.İşlem sırasının son ürünlerdeki etkisi

	Karides kabuğu	DM →DP	DP →DM
Kitin	% 30	% 88	% 75
Protein	% 35	% 1	% 15
Mineral	% 30	% 2,5	% 1,5
Nem	% 5	% 6	% 4
Renk	Kahverengi	Pembe / Kırmızı	Açık Kahverengi

Çizelge 4.1 incelendiğinde öncelikle DM yapıldığı zaman ekstraksiyonun daha verimli gerçekleştirildiği söylenebilir. Bunun nedeni olarak, kalsiyum ve magnezyumun protein bileşikleri etrafında yerleşerek uzun protein zincirlerinin peptit bağlarının kopartılmasını güçleştirilmesi olarak gösterilebilir. Proses verimlerine bakıldığında önce mienral gideriminin yapıldığı durumda proses verimi % 67 olurken; önce protein gideriminin yapıldığı durumda proses verimi % 60 olmuştur. Ayrıca koku ve renk özelliklerine bakıldığında yine öncelikle DM'nin yapıldığı proses sonucu elde edilen kitinin daha iyi kalitede olduğu görülmüştür. Şekilsel olarak da önce DP ardından DM'nin uygulandığı prodesteki kitin pul pul olmakta (Şekil 4.2); önce DM'nin sonra DP'nin uygulandığı proseslerde de açık pembe toz halinde kitin (Şekil 4.3) elde edilmektedir. Önce DM'nin yapıldığı kitin üretiminden sonraki aseton ve/veya etanol ile yapılan renk gideriminin daha verimli olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.2.Önce DP ardından DM uygulamasından geçmiş kitin



Şekil 4.3.Önce DM ardından DP uygulamasından geçmiş kitin

4.2. Karides kabuğundan biyolojik yolla kitin ekstraksiyonu

Kitinin karides kabuğundan biyolojik yolla ekstraksiyonu, kimyasal yöntemden esinlenerek geliştirilmiştir. DM ve DP için kimyasal yöntemde asit ve baz kullanılırken; biyolojik yöntemde DM için laktik asit, asetik asit gibi organik asitin ya doğrudan kendisi ya da bunları üreten mikroorganizmanın kullanılması; DP içinse proteazın kendisi ya da yine proteaz üretici bir organizmanın kullanılması uygun görülmektedir.

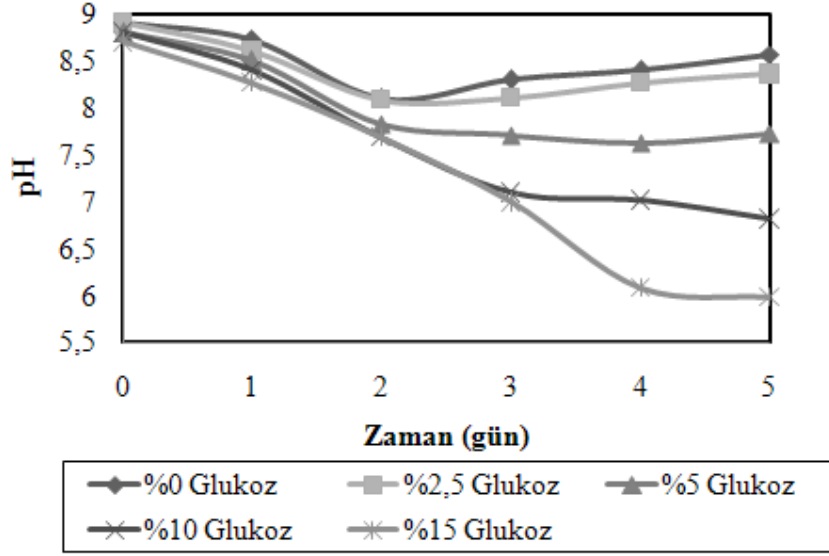
Bu çalışmada, ayrı ayrı olarak *Rhizopus oryzae* küfü, *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* bakterisi ile farklı zamanlarda ekimleri yapılan *L.lactis* ile *T.turnirae*'nin kokültürü denenmiştir. Her bir aşamada proteaz aktivitesi ve protein tayinleri ile DP; kül tayini ve pH değişimi ile de DM oranları bulunmuştur.

4.2.1. Kitin ekstraksiyonu için *R.oryzae*'nin kullanılması

R.oryzae, endüstriyel ölçekte laktik asit üreticisi küf olarak gösterilmektedir (Domínguez and Vazquez, 1999). Buna dayanarak özellikle DM için verimli sonuçlar elde edebileceği düşüncesiyle *R.oryzae* ile çalışılmıştır. Kitin ekstraksiyonu sırasında kül ve protein analizleri yapılarak ve ayrıca pH değişimi takip edilerek ekstraksiyonun nasıl ilerlediği takip edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde yapılan üretim 120 rpm'de ve 30°C'de gerçekleştirilmiştir.

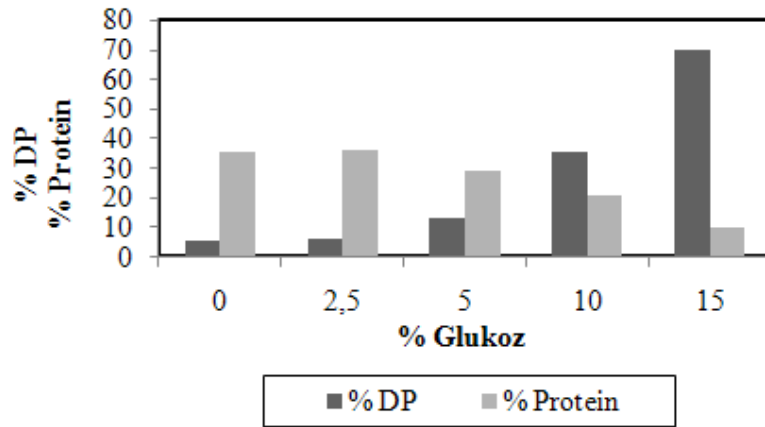
Şekil 4.4'de günlere göre farklı glukoz konsantrasyonlarındaki *R.oryzae*'nin bulunduğu ortamın (Çizelge 3.3) pH değişimi görülmektedir. Şekil incelendiğinde 2.güne kadar aynı oranda bir pH düşüşü görülürken; 2.günden itibaren glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak pH düşüşünün arttığı saptanmıştır. *R.oryzae* için glukoz konsantrasyonu

arttıkça pH'ın daha fazla düşeceği söylenebilir. pH düşüşü laktik asit üretimi ile doğrudan ilişkilendirilebilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi pH düşüşüne dayanarak *R.oryzae* ile yapılacak olan bir ekstraksiyon işleminin en az 4 gün sürmesi gerektiği söylenebilir.



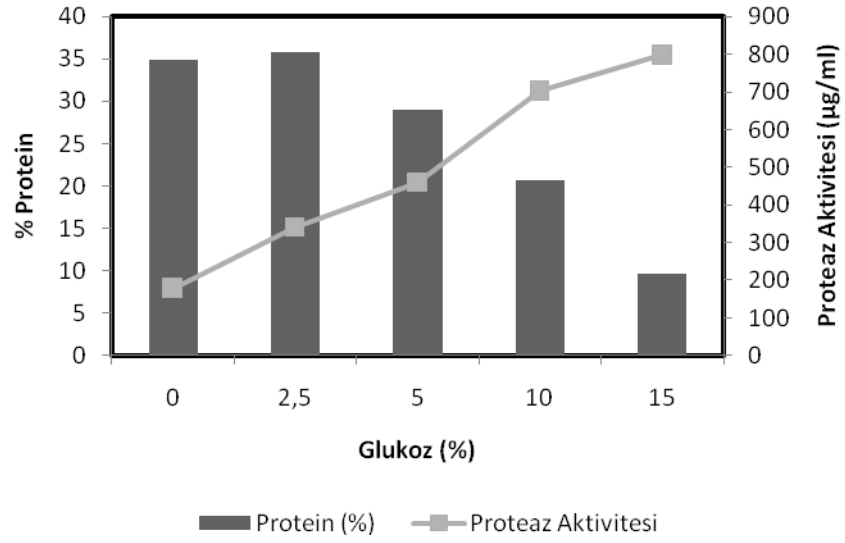
Şekil 4.4 *Rhizopus oryzae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi

Şekil 4.5’de 5.gün sonunda alınan örneklerin DP ve protein yüzdeleri gösterilmektedir. Şekilden de açıkça görülebileceği üzere glukoz konsantrasyonunun artması ile % DP oranının arttığı ve % proteinin azaldığı görülmektedir. *R.oryzae* ile yapılan daha önceki çalışmalarda glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak proteaz aktivitesinin değişimi ile ilgili bir bilgi verilmemiştir. Buna dayanarak, glukozun *R.oryzae*’nin biyokütle olarak daha fazla büyümesini sağlaması ve proteaz aktivitesinin de *R.oryzae*’nin biyokütle üretimi ile birlikte artış gösterdiği söylenebilir.



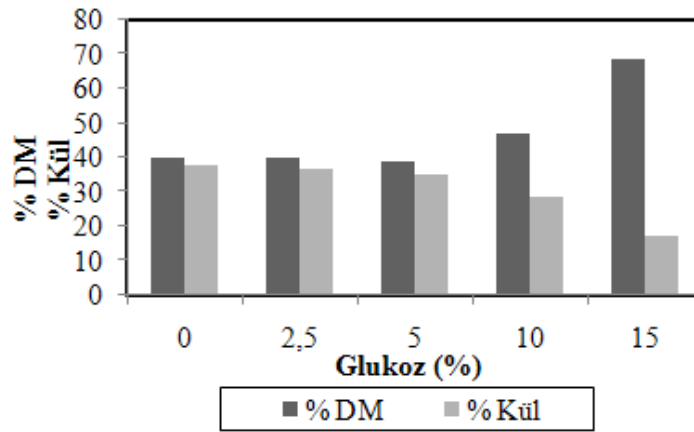
Şekil 4.5. *Rhizopus oryzae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

Şekil 4.6'da 4.gündeki proteaz aktivitesi ile % protein içerikleri verilmiştir. Şekil incelendiğinde, proteaz aktivitesinin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı Proteaz aktivitesinin artışı ile % protein oranının azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.6. *Rhizopus oryzae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretime göre 4. gün için % protein ve proteaz aktivitesi değişimi

Şekil 4.7’de 5.gün sonunda alınan örneklerin DM ve kül yüzdeleri gösterilmektedir. Yine bu şekle göre, glukoz konsantrasyon artışının % DM’yi arttırdığı ve % külü azalttığı görülmektedir. Ancak bu etki kendisini % 5 glukozlu ortamdan sonra göstermektedir. Buna dayanarak, kitin ekstraksiyonu için en az % 10’luk glukoz konsantrasyonunda üretimin gerçekleştirilmesi gerektiği söylenebilir.



  kil 4.7. *Rhizopus oryzae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki öğretimine g  re k  l ve DM'nin değişimi

R.oryzae için % DM ve % DP değerlerine bakıldığında en iyi sonuçların % 15 glukoz ortamında 5.günde alındığı söylenebilir. *R.oryzae*'nin % 15 glukoz konsantrasyonlu ortamdaki DM'si % 71,2 ; DP'si de % 69,5 olarak elde edilmiştir. Son örnekteki kitin içeriği de % 63,0'tür.

Çizelge 4.2'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında özellikle % 15 glukozlu ortamdaki proses veriminin % 134 olduğu görülmektedir. Bunun açıklaması olarak, yüksek glukoz konsantrasyonlarında *R.oryzae*'nin misel oluşturmaya yönelik biyokütle üretimi yapmaktadır. *R.oryzae*'ninde misellerinin yaklaşık % 10'u kitindir. Sadece ekstraksiyon değil, aynı zamanda kitin üretimi gerçekleştirildiğinden proses verimi % 100'den daha fazla çıkmıştır.

Çizelge 4.2. *R.oryzae*'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

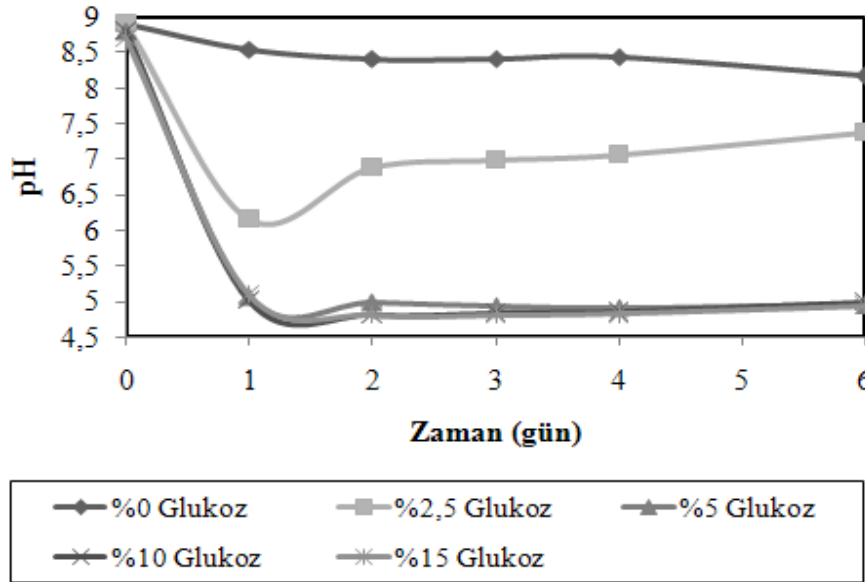
Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	27,1	42,9
2,5	27,2	44,0
5,0	36,0	63,0
10,0	50,5	92,6
15,0	73,2	134,2

Bu DM ve DP değerleri bakteriler ile yapılan denemelere göre oldukça düşüktür. Ayrıca uzun kültüvasyon süresinin olması ve biyokütleli büyümenin oldukça fazla olması katı halde elde edilen kitinin ekstraksiyonu için fazladan ayırma işlemleri gerektirmektedir. Ancak proses veriminin yüksek olmasından dolayı; kullanılacak olan kitin solventinin yeterli geri kazanımı yapılabildiği takdirde kitin ekstraksiyonu için *R.oryzae* kullanılabilir.

4.2.2. Kitin ekstraksiyonu için *L.lactis*'in kullanılması

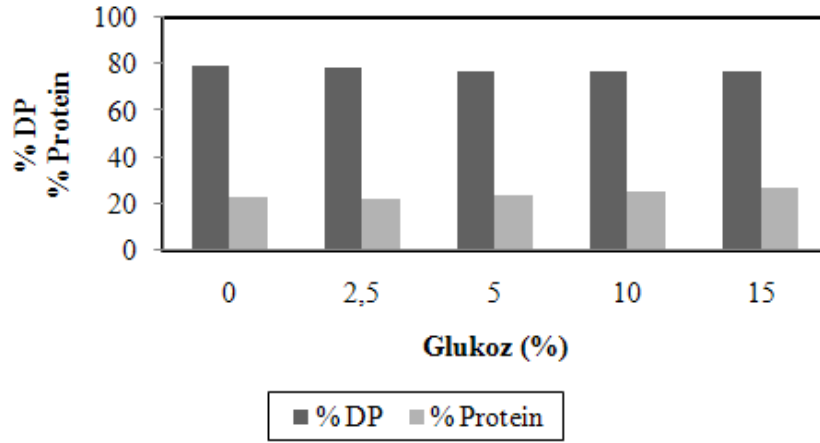
L.lactis, yoğurt bakterisi olup, iyi bir laktik asit üreticisi olarak gösterilmektedir. Çalkalamalı inkübatörde yapılan üretim 150 rpm'de ve 30°C'de gerçekleştirilmiştir (Mierau et al., 2005). Buna bağlı olarak yine farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan (Çizelge 3.3) üretimlerdeki pH değişimi şekil 4.8'de gösterilmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi pH'nın glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak daha fazla düştüğü, bunun nedeninde üretilen laktik asit olduğu söylenebilir. % 5 - 10 ve % 15 glukozlu ortamlardaki pH değişimi neredeyse aynıdır. Bu şekle göre,

L.lactis ile yapılacak olan bir üretimin 2.günde kesilmesi gerektiği söylenebilir.



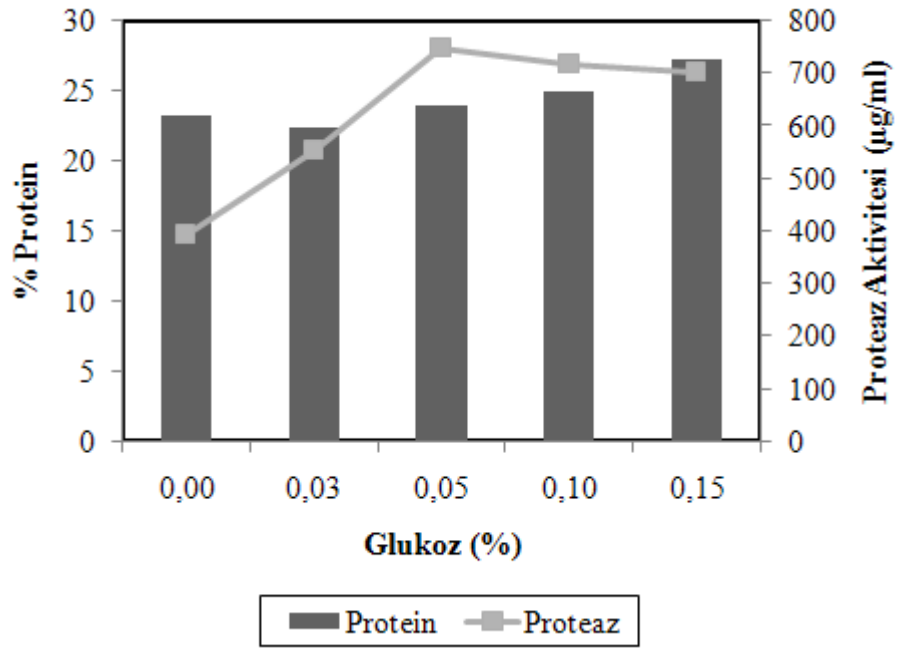
Şekil 4.8. *Lactococcus lactis* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi

Şekil 4.9’da 2.gündeki örneklerin % DP oranı ve % protein içerikleri verilmiştir. *L.lactis*’in proteaz aktivitesi ortamdaki proteinin indüklemesiyle olmaktadır. Bu yüzden, farklı glukoz konsantrasyonlardaki üretimlerde elde edilen sonuçların neredeyse aynı olduğu görülmektedir.



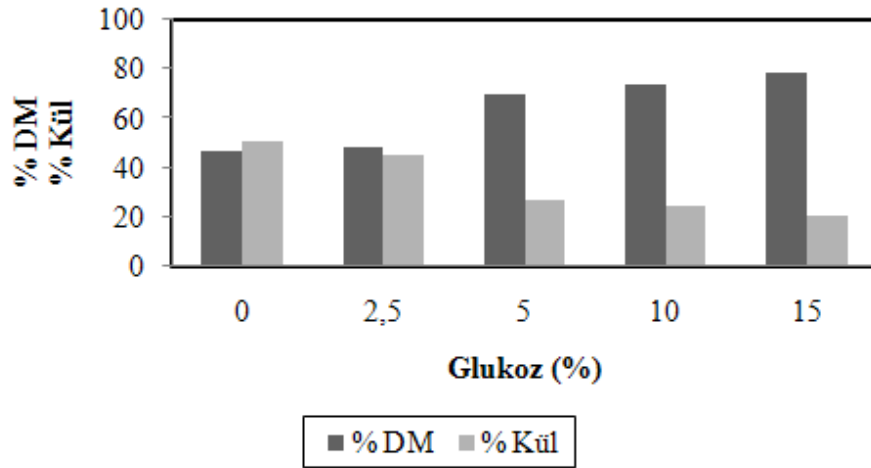
Şekil 4.9. *Lactococcus lactis* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

Şekil 4.10'da 2.gündeki proteaz aktivitesi ile % protein içerikleri verilmiştir. Şekil incelendiğinde, proteaz aktivitesinin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ancak % 5 glukoz konsantrasyonundan sonra aynı kaldığı görülmektedir. Proteaz aktivitesinin artışı ile % protein oranının azalacağı düşünülse de şekilden böyle olmadığı görülmektedir. Bu da, glukoz artışına bağlı olarak biyokütle artışının gerçekleştiği ve bunun da ortamın protein içeriğini arttırdığı sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4.10. *Lactococcus lactis* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre 2. gün için % protein ve proteaz aktivitesi değişimi

Ancak Şekil 4.11 incelendiğinde glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak % DM'nin arttığı ve % kül oranının azaldığı görülmektedir. Bu glukoz konsantrasyonun, laktik asit üretimini indüklediğini göstermektedir.



Şekil 4.11. *Lactococcus lactis* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi

Bu verilere göre, *L.lactis* ile yapılan kitin ekstraksiyonunda elde edilen DM ve DP oranlarının *R.oryzae* ile yapılan denemelere göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. *L.lactis* ile yapılan denemelerde % 15 glukozlu ortamda elde edilen DM değeri % 78,8 ve DP değeri de % 77,2 olarak bulunmuştur. Son örnekteki kitin içeriği de % 52,0'dir. Ekstraksiyon süresinin kısa olması ve yüksek DP ve DM değerlerinden dolayı *L.lactis* ile yapılacak olan kitin ekstraksiyonunun daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında kitin veriminin iyi olduğu ancak proses veriminin düşük olduğu görülmektedir. Son kütlenin diğer proseslerde elde edilen kütleye göre az olmasından dolayı proses verimi düşük olmaktadır. Proses

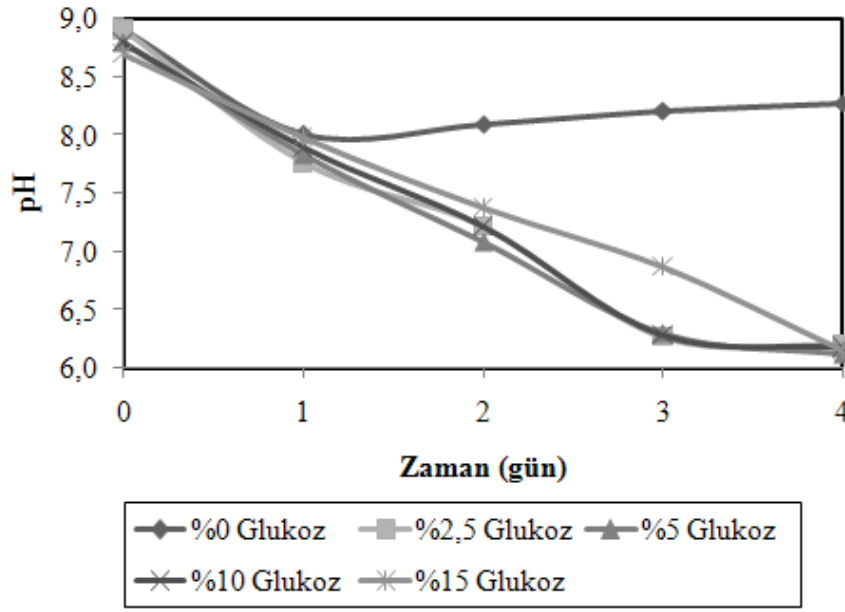
veriminin düşük olmasına rağmen kitin ekstraksiyonu için *L.lactis* kullanılabilir.

Çizelge 4.3. *L.lactis*'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	25,8	26,7
2,5	32,6	37,2
5,0	49,0	54,6
10,0	50,4	53,6
15,0	51,8	52,2

4.2.3. Kitin ekstraksiyonu için *T.turnirae*'nin kullanılması

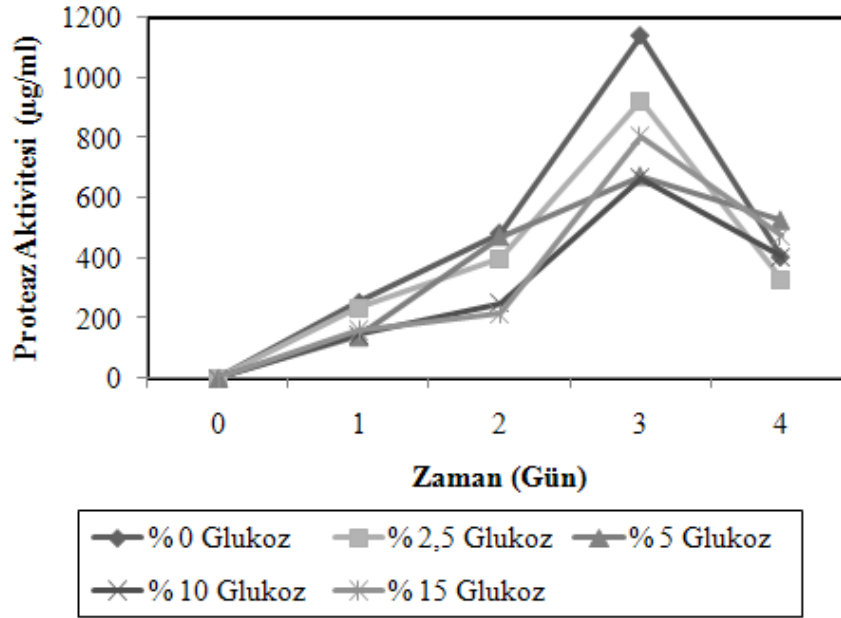
T.turnirae, proteaz aktivitesi yüksek olan bir denizel bakteri olarak gösterilmektedir (Elibol, M. and A. R. Moreira, 2003) . Çalkalamalı inkübatörde yapılan üretim 125 rpm'de ve 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12'de günlere göre pH değişimine bakıldığında glukoz içeren ortamlardaki pH değişiminin aynı olduğu söylenebilir.



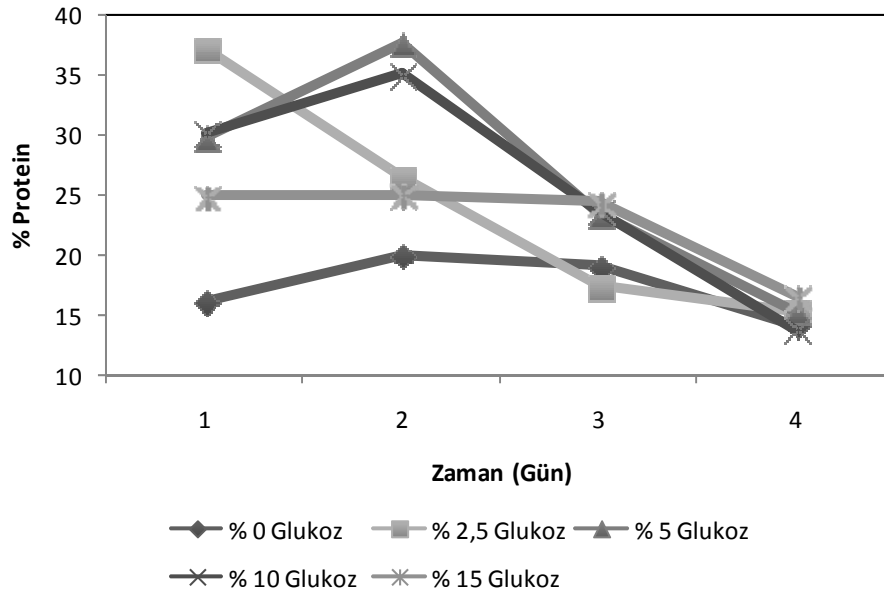
Şekil 4.12. *Teredinobacter turnirae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimin zamana karşı pH değişimi

Şekil 4.13 ve 4.14’de günlere göre değişen proteaz aktivitesi ve % protein içeriği görülmektedir. Şekil 4.13’de proteaz aktivitesinin 3.günde maksimum olduğu ve en fazla aktivitenin de glukoz içermeyen ortamda olduğu görülmektedir. Ancak % protein grafiğine bakıldığında (Şekil 4.14) 4.gündeki değerlerin, 3.güne göre daha az olduğu görülmektedir. Bundan yola çıkarak, proteaz enzimlerinin karides kabuğunun yapısındaki protein komplekslerine ulaşp onları parçalaması işleminin biraz daha uzun sürdüğünü göstermektedir. Şekil 4.15’de de glukoz konsantrasyonunun artışının % DP yi azalttığı ve % protein içeriğini arttırdığı görülmektedir.

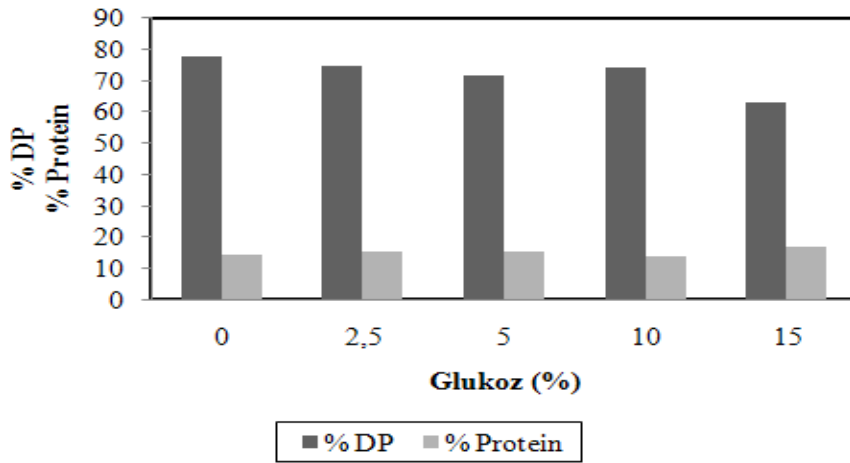
Şekil 4.13 – 4.14 ve 4.15’deki verilerden de anlaşılacağı üzere, ortamda bulunan glukozun *T.turnirae* proteaz enzimlerinin üretimini baskıladığı söylenebilir.



Şekil 4.13. *Teredinobacter turnirae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminde proteaz aktivitesi değişiminin zamana göre değişimi

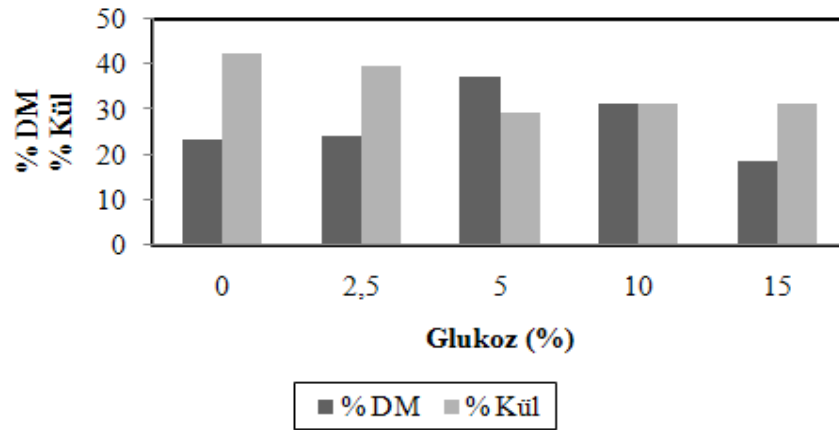


Şekil 4.14. *Teredinobacter turnirae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminde % protein değişiminin zamana göre değişimi



Şekil 4.65. *Teredinobacter turnirae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

Şekil 4.16'ya bakıldığında *T.turnirae*'nin % DM için pek verimli olmadığı görülmektedir. En iyi sonucun % 5 glukozlu ortamda gerçekleştiği ancak bunun da % 42,0 DM ve % 28,0 kül içeriği olmaktadır ki, diğer mikroorganizmalar arasındaki en kötü Demineralizasyon değerleridir. Protein gideriminin en fazla olduğu (DP : % 77,9 ; protein : % 17,0) glukozsuz ortamda kül içeriği % 41,0 ve DM oranı da %23,3'dür. Son örnekteki kitin içeriği de % 53,0'tür.



Şekil 4.16. *Teredinobacter turnirae* ile farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi

Çizelge 4.4'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında kitin veriminin en fazla % 5 glukozlu ortamda olduğu ve proses veriminin glukoz konsantrasyonu ile arttığı görülmektedir. Yüksek proses verimi olmasından dolayı *T.turnirae*'nin kitin ekstraksiyonu ve bununla birlikte yüksek DP değerinden dolayı da karides kabuğundan protein hidrolizatı elde edilmesi için kullanılabileceği görülmüştür.

Çizelge 4.4. *T.turnirae*'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

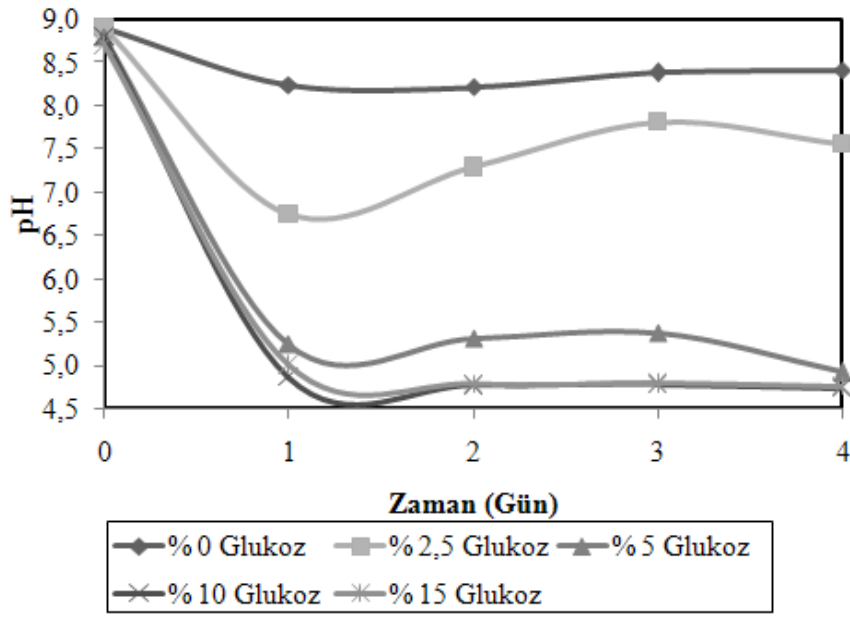
Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	43,5	49,2
2,5	45,1	56,2
5,0	55,5	82,1
10,0	54,9	83,8
15,0	51,9	90,6

4.2.4. Kitin ekstraksiyonu için *L.lactis* ve *T.turnirae*'nin kokültürlerinin kullanılması

Yapılan çalışmalarda *L.lactis*'in en iyi % DM değerini verdiği ve *T.turnirae*'ninde en iyi % DP değerini vermesinden dolayı; kimyasal yöntemdeki HCl ve NaOH kullanımından esinlenerek ortamda bu iki bakterinin yer aldığı kokültür çalışması yapılmıştır.

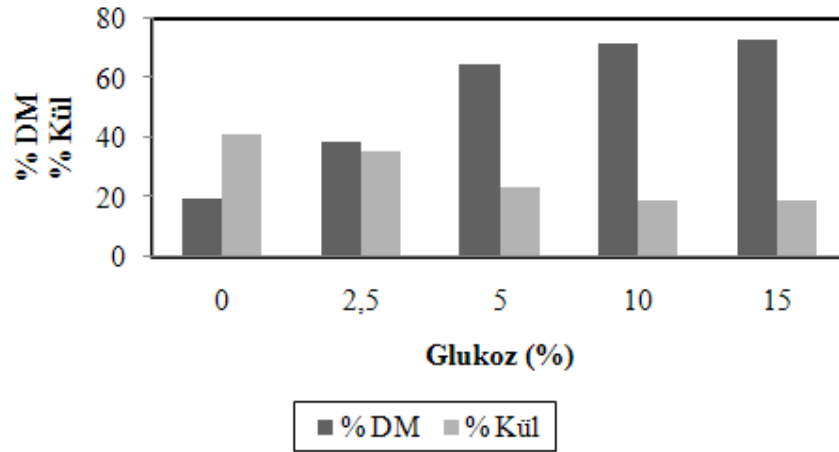
4.2.4.1. *L.lactis* ve *T.turnirae*'nin aynı anda inoküle edilip kullanılması (K-1)

K-1 üretimi, ekstraksiyonu yapması düşünülen iki organizmanın (*L.lactis* ve *T.turnirae*) aynı anda inokülasyonu yapıp biyoprosesin başlatılmasıdır. Çalkalamalı inkübatörde yapılan üretim 135 rpm'de ve 30°C'de 4 gün süre ile gerçekleştirilmiştir. Glukoz konsantrasyonlarına göre pH değişim grafiği incelendiğinde (Şekil 4.17), glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak *L.lactis* tarafından laktik asit üretildiği ve bu yüzden de pH'nın düştüğü söylenebilir. pH düşüşü *L.lactis*'in tek başına kullanıldığındaki durumdan daha fazla olmuştur.



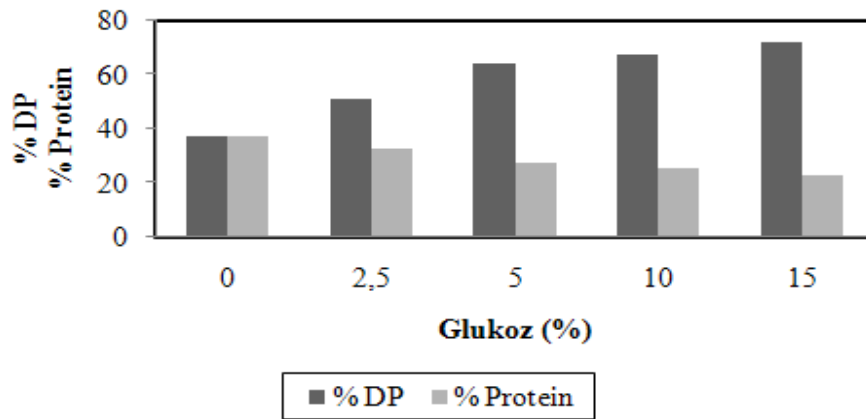
Şekil 4.17. *K-I*'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi

Buna bağlı olarak 4.gün sonundaki % DM ve % kül içerikleri incelendiğinde (Şekil 4.18), laktik asit üretiminin DM oranını arttırdığı ve kül içeriğini azalttığı görülmektedir. Özellikle % 5 ve daha fazla glukoz konsantrasyonlu ortamda DM oranı artmıştır.



  kil 4.18. *K-l*'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre k  l ve DM'nin değişimi

  kil 4.19'a bakıldığında ise yine glukoz konsantrasyonunun artışına göre % DP'inde arttığı % protein içeriğinin azaldığı görülmektedir.



  kil 4.19. *K-l*'in farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

K-l üretimine bakıldığında en fazla DM ve DP oranlarının % 15 glukozlu ortamda gerçekleştiği görülmektedir. Sırasıyla DM ve DP, % 72,8 ve % 72,1 olarak bulunmuştur. Bu değerler, *L.lactis*'in tek başına

kullanıldığı zaman ki değerlerden azdır. Ancak % protein içeriği *L.lactis* üretiminde % 27,9 olurken; *K-1* üretiminde % 22,9 ve % kül içeriği de *L.lactis* üretiminde % 21,0 iken *K-1*'de % 19,1 olarak bulunmuştur. Son örnekteki kitin içeriği de % 58,0'dir.

Çizelge 4.5'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında kitin veriminin ve proses veriminin glukoz konsantrasyonu ile arttığı görülmektedir.

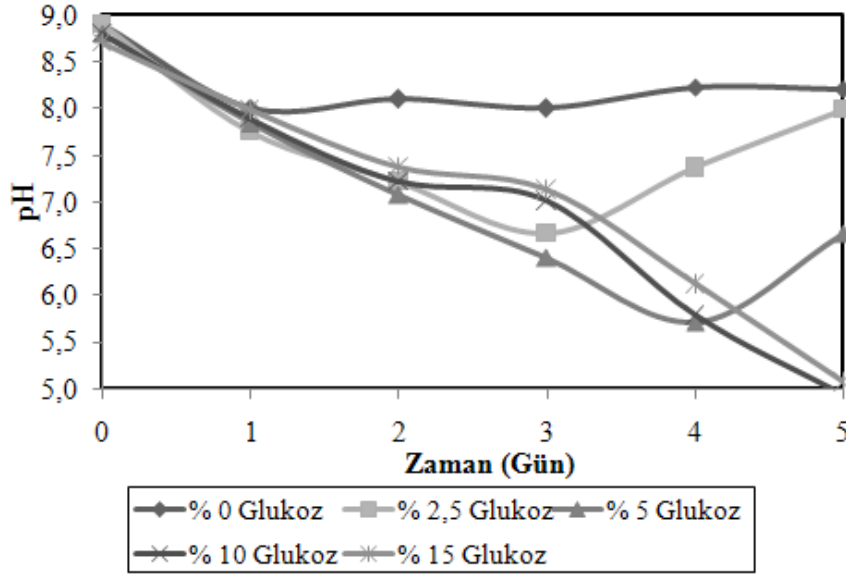
Çizelge 4.5. *K-1*'in glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	20,9	40,5
2,5	32,0	55,7
5,0	48,8	73,9
10,0	55,3	81,5
15,0	58,0	82,4

4.2.4.2. Önce *T.turnirae*, ardından *L.lactis*'in inoküle edilip kullanılması (K-2)

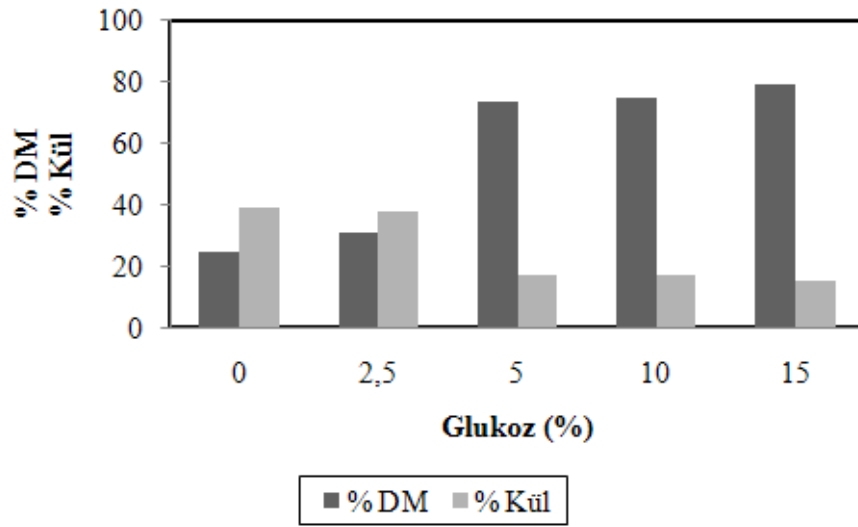
K-2 üretiminde üretim ortamına önce *T.turnirae* ekilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 125 rpm'de 3 gün inokülasyonu yapılmıştır. 3.günde *L.lactis* ekimi yapıp 150 rpm'de karıştırma ayarlanmıştır. pH değişimi (Şekil 4.20) incelendiğinde 3.güne kadar *T.turnirae* üretimindeki

değişimler görülürken, *L.lactis*'in inokülasyonundan sonra % 10 ve % 15 glukozlu ortamlarda pH düşüşü devam etmiştir.



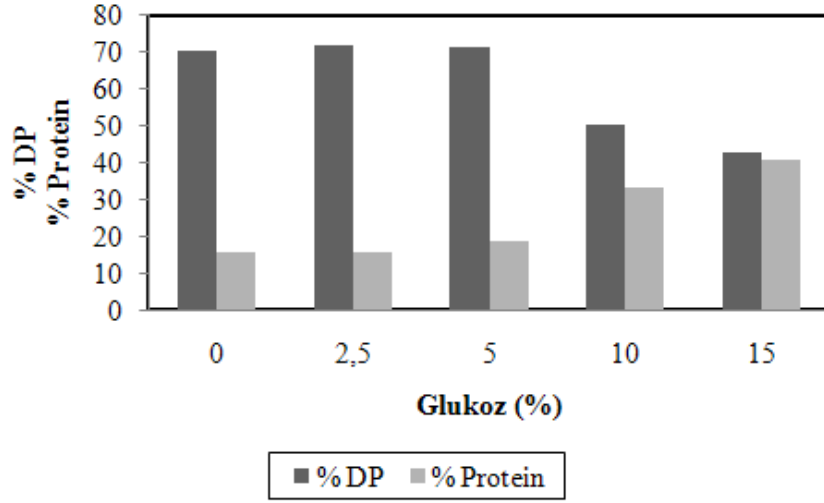
Şekil 4.20. K-2'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi

Şekil 4.21'e bakıldığında glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak % DM'nin arttığı ve kül içeriğinin azaldığı söylenebilir. En iyi % DM değeri % 15 glukozlu ortamda alınmış olup % 79; kül içeriği de % 15'dir.



Şekil 4.21. K-2'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi

Ancak,  ekil 4.22 incelendiğinde, DM için görülen sonucun tersi gözükmektedir. Glukoz konsantrasyonunun arttığı durumlarda % DP değeri azalmaktadır ve protein içeriği de artmaktadır. En iyi % DP değeri % 0 glukozlu ortamda elde edilmiştir. Bu ortamda DP değeri % 70,2 ve k l içeriği de % 15,4 olarak bulunmuştur. Son örnekteki kitin içeriği de % 44'tür.



Şekil 4.22. *K-2*'nin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

Bu sonuçlara bakıldığında ardı ardına yapılan inokülasyon sonucunda her bir mikroorganizmanın tek başlarına üretimdeki gibi bir yol izledikleri görülmektedir. Ekstraksiyon veriminin artırılması istendiği kokültür çalışmasında organizmaların tek başına kullanılmasına göre çok başarılı sonuçlar elde edilmemiştir.

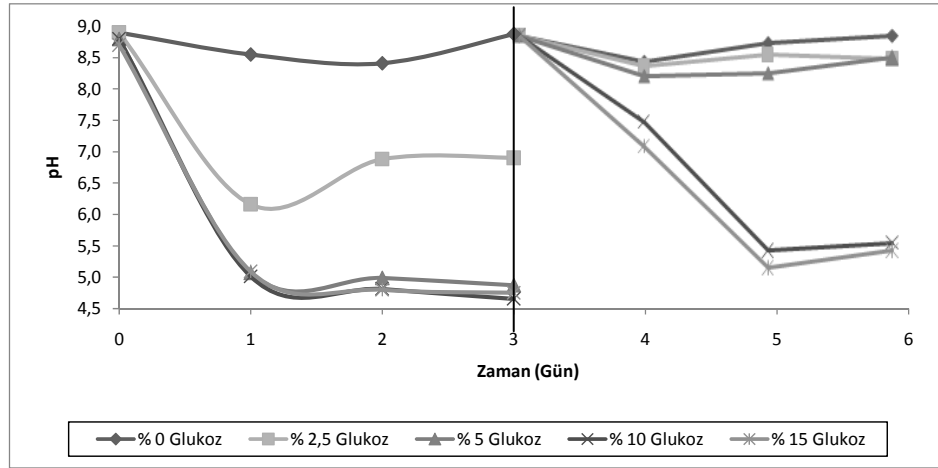
Çizelge 4.5'de glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında kitin ve proses veriminin % 5 glukozlu ortamda en iyisi olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.6. *K-2*'nin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	45,6	91,2
2,5	46,4	89,7
5,0	64,5	95,5
10,0	49,7	84,2
15,0	44,2	70,7

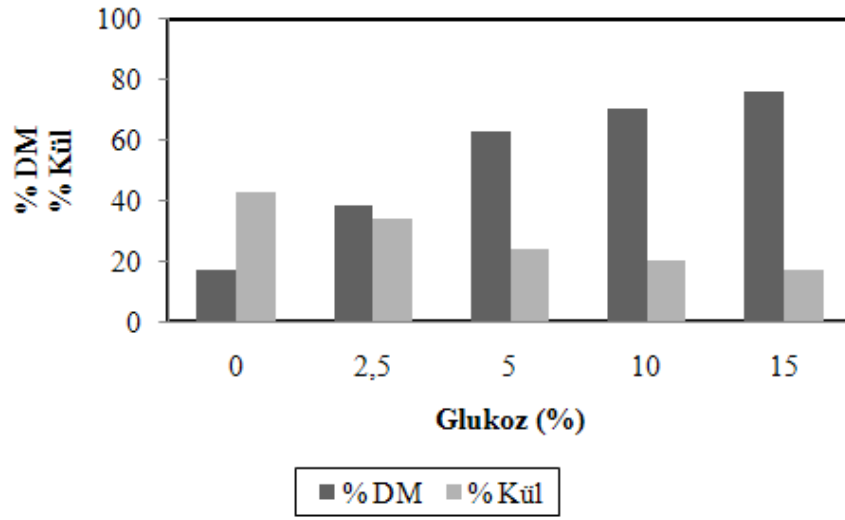
4.2.4.3. Önce *L.lactis*'in ardından *T.turnirae*'nin inoküle edilip kullanılması (K-3)

K-3 üretiminde üretim ortamına önce *L.lactis* ekilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de 3 gün kültivasyonu yapılmıştır. 3.günde *T.turnirae* ekimi yapıp 125 rpm'de karıştırma ayarlanmıştır. *T.turnirae* alkali proteaz üreticisi olmasından dolayı, inokülasyonu gerçekleştirilmeden önce pH'sı 1 M NaOH ile 8.9'a getirilmiştir. Şekil 4.23 incelendiğinde, *L.lactis*'in tek başına üretimindeki pH değişimi görülürken; pH ayarlaması ve *T.turnirae*'nin inokülasyonu ile % 0 - % 2,5 ve % 5 glukozlu ortamlardaki pH 8.0'e gelirken, % 10 ve % 15 glukozlu ortamlarda 2 gün boyunca pH 5.0'e kadar düşmektedir. Bu da *L.lactis*'in % 10 ve % 15 glukozlu ortamlarda da hala laktik asit ürettiğinin göstergesi olarak söylenebilir.

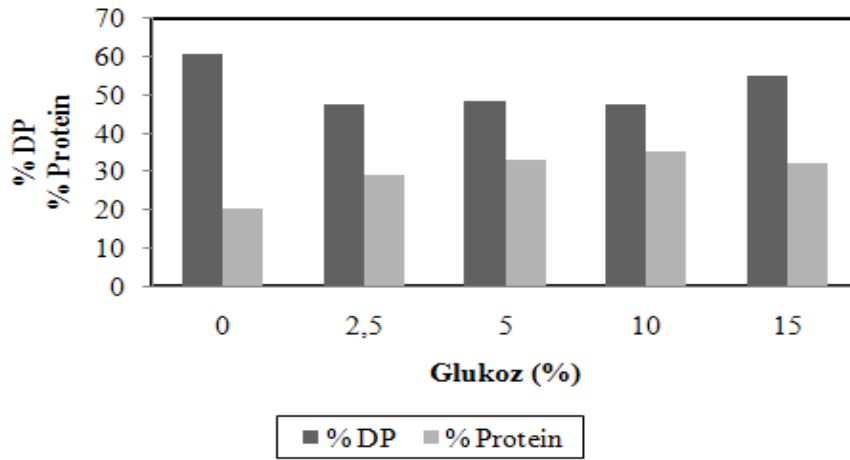


Şekil 4.237. *K-3*'ün farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretiminin zamana karşı pH değişimi

6.gün sonunda alınan örneklerle göre yapılan protein ve kül tayinlerine göre Şekil 4.24 ve Şekil 4.25 çizilmiştir. Bu şekillere bakıldığında glukoz konsantrasyonunun artması ile % DM değerinin arttığı ve kül içeriğinin azaldığı görülmektedir. Ancak protein değişimi için aynı şey söylenememektedir. *K-2* üretiminde olduğu gibi en düşük protein içeriği % 0 glukozlu ortamda görülürken en düşük kül içeriği de % 15 glukozlu ortamda görülmektedir. *K-3* üretiminin % 0 glukozlu ortamdaki DM değeri % 16,9 ve DP değeri de % 60,9; % 15 glukozlu ortam için DM değeri % 76,2 ve DP değeri de % 55,6 olarak bulunmuştur. Son örnekteki kitin içeriği de % 51'dir.



Şekil 4.24.K-3' n farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre kül ve DM'nin değişimi



Şekil 4.25.K-3' n farklı glukoz konsantrasyonlarındaki üretimine göre protein ve DP'nin değişimi

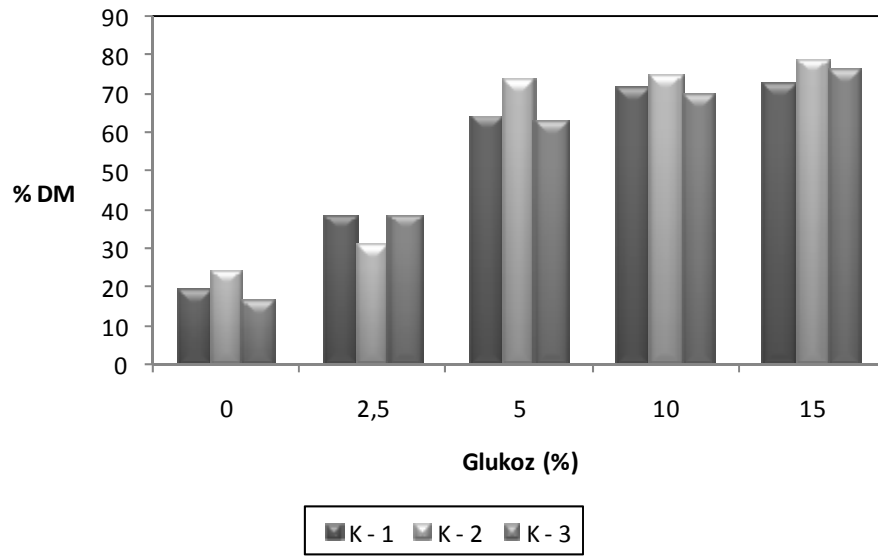
Çizelge 4.6’da glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen proses verimleri ve son örnekteki kitin yüzdeleri verilmiştir. Bu verilere bakıldığında kitin veriminin glukoz konsantrasyonu ile arttığı ancak proses veriminin % 0 ve % 15 glukozlu ortamda fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7. *K-3*’ün glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

Glukoz (%)	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
0,0	36,8	71,1
2,5	37	67,1
5,0	42,9	66,6
10,0	45	67,2
15,0	50,9	71,3

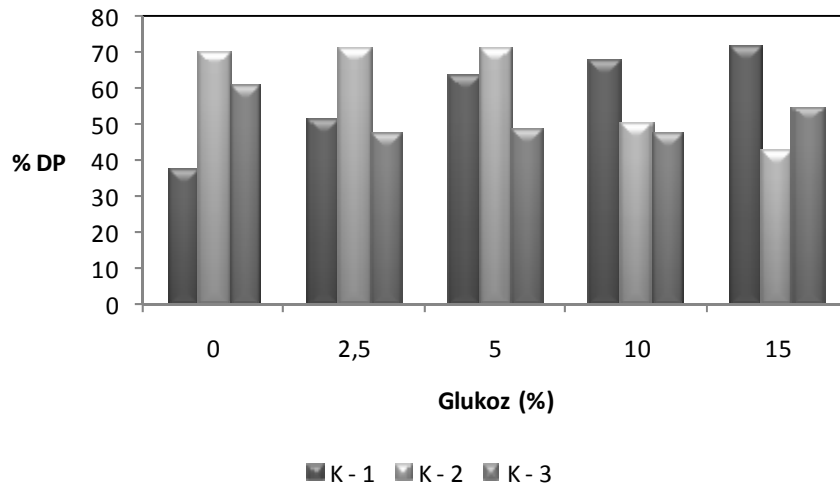
4.2.4.4. Kokültürlerin Karşılaştırılması

Kokültürlerle yapılan 3 farklı stratejideki ekstraksiyonlar sonuçları oldukça olumludur. Her 3 kokültürde, mineral giderimi (DM) değerleri, organizmaların tek başlarına kullanıldığı zamankinden daha fazladır. Şekil 4.26’da kokültürlerin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleştirdikleri mineral giderimlerinin değişimi görülmektedir.



Şekil 4.26. Kokültürdeki üretimlerin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki mineral giderimi

Yapılan kokültür üretimlerinde görülen protein giderimi (DP), *T. turnirae*'nin tek başına kullanıldığı zamankinden daha iyi olamamıştır. *T. turnirae*'de % 80,0'e varan DP oranı görülürken; kokültür içinde görülen en fazla % DP değeri 72,1'dir. Şekil 4.27'de kokültürlerin farklı glukoz konsantrasyonlarında yaptığı protein giderimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Kokültürdeki üretimlerin farklı glukoz konsantrasyonlarındaki protein giderimi

Farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan kokültür denemelerinin proses verimi ve son ürünlerdeki kitin yüzdesi tablosu, Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kokültürlerin glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişen kitin (%) ve proses verimi (%)

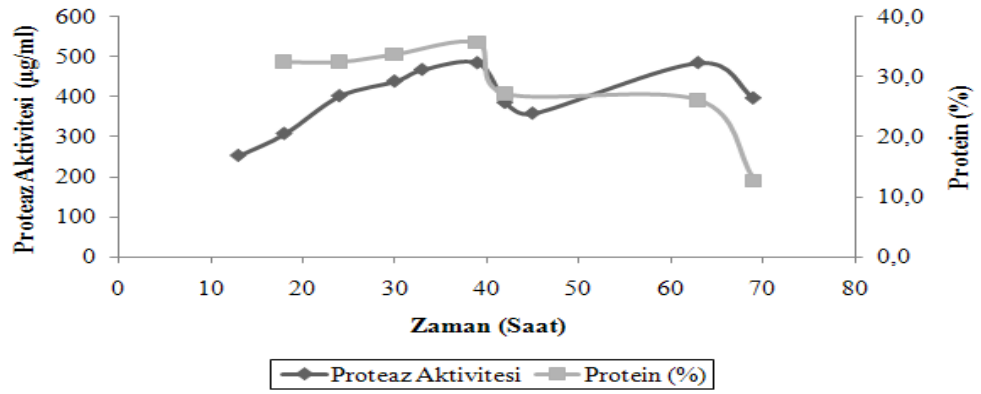
Glukoz (%)	Kitin (%)			Proses Verimi (%)		
	K - 1	K - 2	K - 3	K - 1	K - 2	K - 3
0,0	20,9	45,6	36,8	40,5	91,2	71,1
2,5	32,0	46,4	37	55,7	89,7	67,1
5,0	48,8	64,5	42,9	73,9	95,5	66,6
10,0	55,3	49,7	45	81,5	84,2	67,2
15,0	58,0	44,2	50,9	82,4	70,7	71,3

Çizelge 4.8 incelendiğinde bütün prosesler içerisindeki en iyi proses verimi değerinin % 5 glukozlu ortamda gerçekleştirilen *K-2* üretimi olduğu görülmüştür.

4.2.4.5. Biyoreaktörde önce *L.lactis*'in ardından *T.turnirae*'nin inoküle edilip kullanılması (R-1)

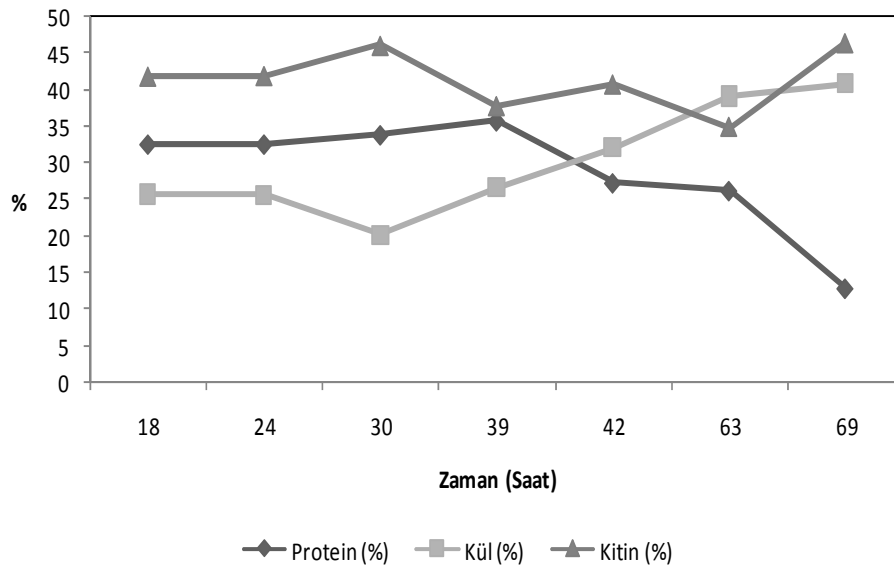
R-1 üretiminde üretim ortamına önce *L.lactis* ekilmiş ve biyoreaktörde 2 L'lik çalışma hacminde 30 °C ve 400 rpm'de % 10 glukoz konsantrasyonlu (v/v) ortamda üretilmiştir. 33.saatte *T.turnirae* ekimi yapıp karıştırma hızı 320 rpm'e düşürülmüştür. *T.turnirae* ve *L.lactis* inokülasyon oranı % 5 (v/v) olarak yapılmıştır.

Şekil 4.26'da proteaz aktivitesinin % protein ile nasıl değiştiği gösterilmiştir. Şekle göre, *T.turnirae* inokülasyonuna kadar protein içeriğinde bir değişiklik görülmemekte; ancak, *T.turnirae* inokülasyonundan yaklaşık 30 saat sonra % proteinin çok düştüğü görülmektedir. Proteaz aktivitesinde düşmeye başladığı görüldüğü için proses 69.saatte durdurulmuştur.



Şekil 4.28. *R-I* üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi

Şekil 4.27’de *R-I* üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin değişimi % olarak görülmektedir. *L.lactis* üretimi boyunca kül içeriğinin azaldığı; ancak, *T.turnirae* inokülasyonundan sonra kül içeriğinin doğrusal bir şekilde arttığı görülmektedir.



Şekil 4.29. *R-I* üretiminin zamana göre değişen kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi

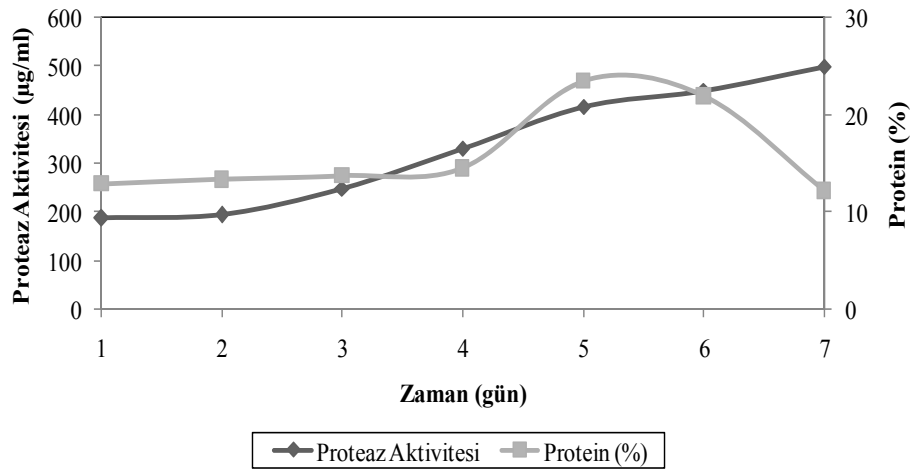
2 L'lik biyoreaktör üretiminde 69. saatteki sonuçlara göre son katı kısımdaki protein % 12,8 ve DP % 87,0 iken; kül % 40,8 ve DM % 44,9 olarak bulunmuştur. Son örnekteki kitin içeriği % 47,0 ve proses verimi de % 63,0 olarak bulunmuştur.

Biyoreaktörde yapılan ekstraksiyon işlemi erlenmayer denemelerine göre oldukça farklılık göstermiştir. Bunun nedeni, hacim artışından dolayı arttırılan inokülasyon oranı olarak düşünülmektedir.

4.2.4.6. Biyoreaktörde önce *T.turnirae*'nin ardından *L.lactis*'in inoküle edilip kullanılması (R-2)

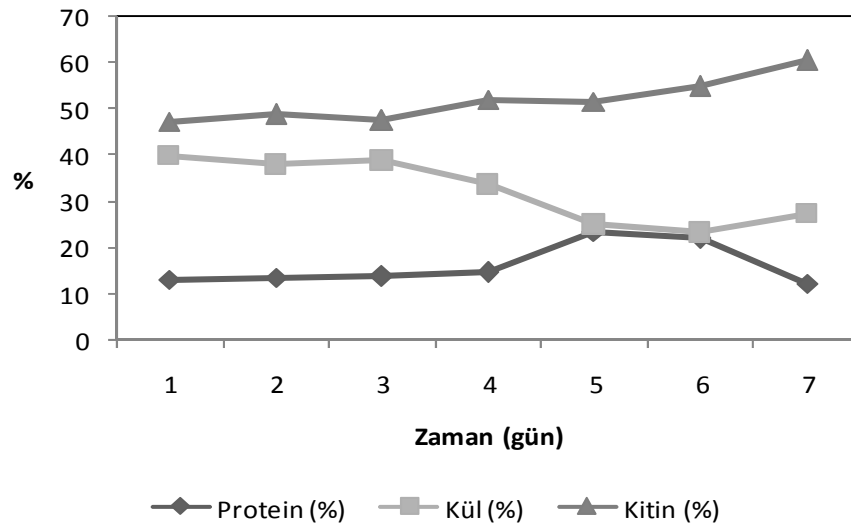
R-2 üretiminde üretim ortamına önce *T.turnirae* ekilmiş ve biyoreaktörde 1 L'lik çalışma hacminde 30 °C ve 320 rpm'de % 0 glukoz konsantrasyonlu (v/v) ortamda üretilmiştir. 4.gün'de ortama sakkaroz eklenerek ortamın % 2,5 sakkarozlu olması sağlanmıştır. *T.turnirae*'nin sentetik besi ortamı olan PB ortamında karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanıldığından; erlenmayer denemeleri sonucu görülen glukozun proteaz aktivitesini baskılayıcı etkisinden ötürü, ortama glukoz eklenmesi yerine sakkaroz eklenilmiştir. Ardından *L.lactis* ekimi yapıp karıştırma hızı 400 rpm'e çıkarılmıştır. *T.turnirae* ve *L.lactis* inokülasyon oranı % 10 (v/v) olarak yapılmıştır.

Şekil 4.28'de proteaz aktivitesinin % protein ile nasıl değiştiği gösterilmiştir. *L.lactis*'in inokülasyonundan sonra (4.günden sonra) protein içeriğinin arttığı ancak 5.günden sonra azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.30. *R-2* üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi

Şekil 4.29'da *R-2* üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin değişimi % olarak görülmektedir. *T.turnirae* üretimi boyunca ortam bileşenlerinin yüzdesel olarak değişmediği; ancak, *L.lactis* inokülasyonundan sonra kül içeriğinin azaldığı protein içeriğinin artmaya başladığı görülmektedir. 7.gün sonunda % 60,4 kitin içeriğine ulaşılmıştır.

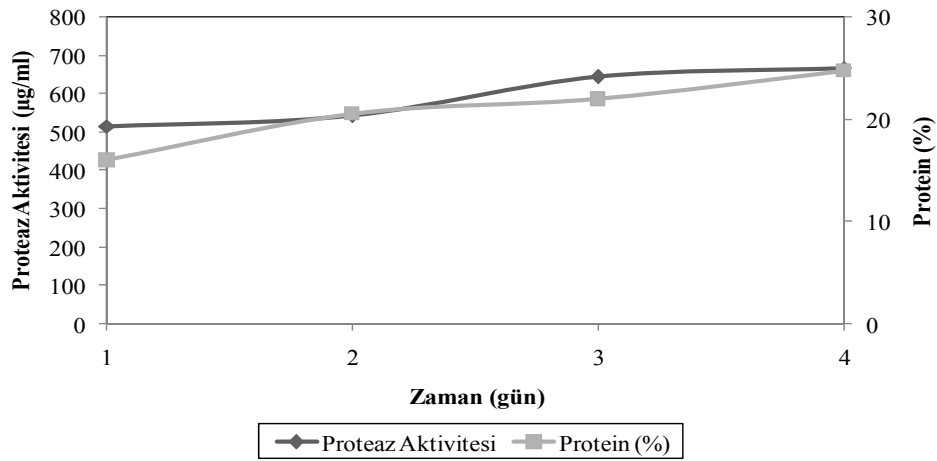


Şekil 4.31. *R-2* üretiminin zamana göre değişen kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi

4.2.4.7. Biyoreaktörde *L.lactis* ve *T.turnirae*'nin aynı anda inoküle edilip kullanılması (R-3)

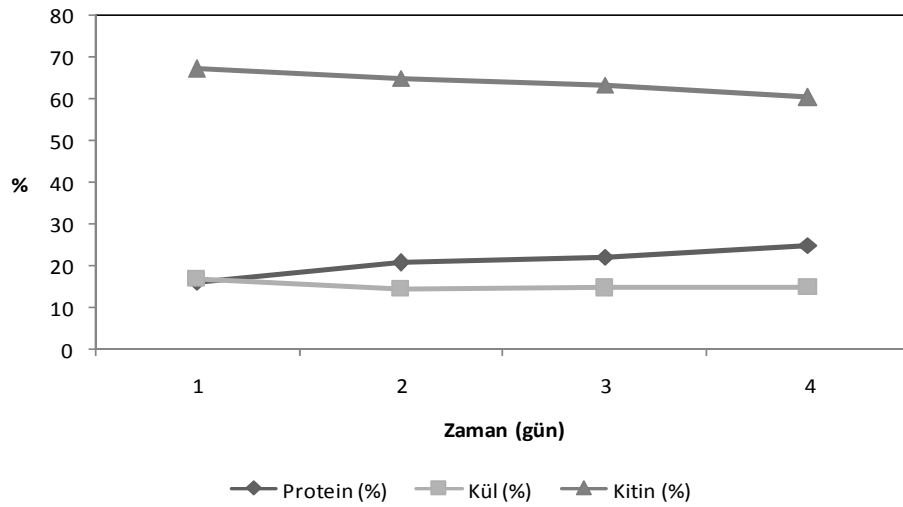
R-3 üretiminde üretim ortamına *T.turnirae* ve *L.lactis* % 10 (v/v) olacak şekilde biyoreaktöre inokülasyonları yapılmıştır. 1 L'lik çalışma hacminde 30 °C ve 360 rpm'de % 10 glukoz konsantrasyonlu (v/v) ortamda üretim gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.30'da proteaz aktivitesinin % protein ile nasıl değiştiği gösterilmiştir. Proteaz aktivitesi artarken, protein içeriğinin azalması gerektiği düşünülürken; protein içeriğinde arttığı görülmektedir. Biyokütle üretiminin olmasından dolayı protein giderimi tam anlamıyla yapılamamaktadır.



Şekil 4.32. *R-3* üretiminin zamana göre % protein ve proteaz aktivitesi değişimi

Şekil 4.31’de *R-3* üretiminin zamana göre kül, protein ve kitin değişimi % olarak görülmektedir. 4 günlük üretim sonundaki kitin % 60,3 iken 1.gündeki kitin % 67,1 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre, *L.lactis* ve *T.turnirae*’nin aynı anda kullanılmasında 1 günlük ekstraksiyon yapılması daha iyi sonuç verecektir.



Şekil 4.33. *R-3* üretiminin zamana göre değişen kül, protein ve kitin içeriklerinin değişimi

Çizelge 4.9 incelendiğinde, şu ana kadar yapılan ekstraksiyon işlemleri içinde, uygulamış olduğumuz kokültür prosesinin (Önce *T.turnirae* sonra *L.lactis* inokülasyonu) diğer proseslere göre daha iyi sonuçlar vermiş olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9 En iyi ekstraksiyon sonucuna sahip K-2 üretiminin yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması

	% DP	% DM	Kitin (%)	Proses Verimi (%)
K-2, % 5 Glukoz	71,3	73,6	64,5	95,5
Rao et al., 2000 (asetik asit)	75,0	86,0	---	---
Rao et al., 2000 (sitrik asit)	88,0	90,0	---	---
Rao and Stevens, 2005	68,0	63,0	68,4	81,3
Cira and Huerta, 2002	---	---	65,1	---
Andrade et al., 2003	---	---	23,9	---
Rao and Stevens, 2006 (541)	59,8	81,4	---	---
Rao and Stevens, 2006 (A6)	52,2	65,5	---	---
Beaney et.al., 2005	---	---	71,1	---

ÖNERİLER

Bu çalışmada klasik kimyasal kitin üretim metoduna alternatif olarak, farklı stratejiler belirleyerek kitin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma esnasında karides kabukları içeriğindeki proteinin ve astaksantin kazanımı, şüphesiz “proseslerde sıfır atık” yaklaşımını sağlayacaktır. Özellikle astaksantin süper kritik tekniği ile ekstraksiyonu, kitin prosesi esnasında çalışılması gereken konulardan biri olarak önerilebilir. Kitin ve türevlerinin eldesinde takip edilen parametrelerin NMR, FTIR gibi aletlerle takip edilmesi veya desteklenmesi ürün kalitesini de arttıracaktır.

KAYNAKLAR

Aberg C., Chen T., Olumide A., Raghavan S.R. and Payne G.F.

(2004). Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes. J. Agric. Food Chem. 52, 788-793.

Ahuja, S. K.; G. M. Ferreira. A. R. Moreira (2004). Application of

Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. Biotechnology and Bioengineering 85(6): 666-675.

Andrade V. S., Neto B. B., Fukushima K., Campos G. M., (2003)

Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. Rev Iberoam Micol; 20: 149-153

Aye, K. N. and W. F. Stevens (2004). Improved chitin production by

pretreatment of shrimp shells. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 79: 421-425.

Beaney P., Lizardi-Mendoza J. and Healy M. (2005). Comparison of

chitins produced by chemical and bioprocessing methods J Chem Technol Biotechnol 80:145–150.

KAYNAKLAR (devam)

- Bulut S., Elibol M., Özer D.,** (2004), Effect of carbon source on L(+) - lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biochemical Engineering Journal, Volume 21, p.33-37
- Cira, L. A., S. Huerta, et al.** (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry 37: 1359-1366.
- Chen H. and Meyers S.P.** (1983). Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. Journal of Food Science 48, 1516-1520.
- Çalkı Ş. ve Kılınç B.,** (2004) Kabuklu su ürünleri işleme artıklarının endüstriyel alanda değerlendirilmesi. EÜ SU Ürünleri Dergisi 21 (1-2), 145-152.
- Domínguez, J. M., Vázquez, M.,** (1999), Effect of the operational conditions on the L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, Cienc. Tecnol. Aliment. Vol. 2, No. 3, pp. 113-118
- Elibol, M. and A. R. Moreira** (2003). Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. Process Biochemistry 38: 1445-1450.

KAYNAKLAR (devam)

- Greene, R. V., M. A. Cotta, et al.** (1989). A novel, symbiotic bacterium isolated from marine shipworm secretes proteolytic activity. *Current Microbiology* 19(6): 353-356.
- Hall G.M. and DeSilva S.,** (1992) Lactic acid fermentation of scampi (*Penaeus monodon*) waste for chitin recovery. In: C.J. Brine, P.A. Sandford, J.P. Zikakis (eds). *Advances in chitin and chitosan*. Elsevier Applied Science, London, pp 633-668.
- Jaswal A.S.** (1990). Amino acid hydrolysate from crab processing waste. *Journal of Food Science* 55 (2), 379-397.
- Jung W.J., Kuk J.H., Kim K.Y and Park R.D.** (2005) Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 851-854.
- Jung W.J., Jo G.H., Kuk J.H., Kim K.Y and Park R.D.** (2005). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* On line first section. DOI: 10.1007/s00253-005-0126-3.

KAYNAKLAR (devam)

- Kirubakaran R.,** (2005) Application of chitin and chitosan. OSTI Newsletter, Issue 8
- Kim, S.-K. and E. Mendis** (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. Food Research International 39(4): 383-393.
- Kumar R.,** (2000). A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers 46: 1-27.
- Kurita, K.** (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. Progress in Polymer Science 26(9): 1921-1971.
- Kurita, K.** (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, Marine Biotechnology, Mini-Review.
- Li-Qunvu, Embree H., Smith P. and Payne G.F.** (2002). Utilizing renewable resources to create functional polymers:Chitosan-based associative thickener. Environ. Sci. Technol. 36,3446-3454.
- Mierau, I., P. Leij, et al.** (2005). Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. Microb Cell Fact 4: 15.

KAYNAKLAR (devam)

Murphy MG, Skonberg DI, Camire ME, Dougherty MP, Bayer RC, and Briggs JL (2003). Chemical composition and physical properties of extruded snacks containing crab-processing by-product. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(11):1163-1167.

No H. K., Meyers S. P., Lee K. S., (1989). Isolation and Characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.* 37 (3): 575-579.

No, H. K.; Cho, Y. I.; Meyers, S. P. (1996). Dye binding capacity of commercial chitin products. *J. Agric. Food Chem.*, 44,1939-1942.

Pochanavanich, P. and W. Suntornsuk (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology* 35: 17-21.

Rao M.S. and Stevens W.F. (1997). Processing paramters in scale-up of *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste. In: A.Domard, Roberts G.A.F., K.M. Varum (eds), *Advances in chitin science*, vol 2. Jacques Andre, Lyon, France, pp 88-93.

Rao M.S., Munoz J. and Stevens W.F. (2000) Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 808-813.

KAYNAKLAR (devam)

- Rao M.S., Stevens W. F.** (2005). "Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80(9): 1080-1087.
- Rao, M. S., Stevens, W. F.** (2006). Fermentation of Shrimp Biowaste under Different Salt Concentrations with Amylolytic and Non-Amylolytic *Lactobacillus* Strains for Chitin Production. *Food Technology and Biotechnology*, Vol 44; Part 1, Pages 83-88
- Rinaudo, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31(7): 603-632.
- Shirai K. G.I. Legaretta, Rodriguez-Serrano S., Huerta-Ochoa S., Saucedo-Castaneda G. and Hall G.M.** (1997). Aspects of protein breakdown during the lactic acid fermentation of prawn waste. In: A.Domard, Roberts G.A.F., K.M. Varum (eds), *Advances in chitin science*, vol 2. Jacques Andre, Lyon, France, pp 56-63.
- Shahidi, F. and R. Abuzaytoun** (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res* 49: 93-135.
- Simpson B.K., Gagne N. and Simpson M.V.,** (1994) Bioprocessing of chitin and chitosan. *Fisheries Processing : Biotechnological applications*. (Ed. A.M. Martin) Chapman and Hall, London, pp. 155-203.

- Synowiecki, J., Al-khatteb, Nadia A. A.** (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, March, vol. 43, no. 2, p. 145-171.
- Teng, W. L., E. Khor, et al.** (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research* 332: 305-316.
- Zakaria, Z., G. M. Hall, et al.** (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry* 33: 1-6.
- Zhang, M., A. Haga, et al.** (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules* 27: 99-105.
- Türkiye İstatistik Yıllığı**, 2004. http://www.die.gov.tr/yillik/11_Tarim.pdf

ÖZGEÇMİŞ

Ali Özhan AYTEKİN 1980 yılında Samsun’da doğmuştur. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Samsun’da tamamlamıştır. 2005 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden “Random Search Optimizasyon Algoritmasının Biyoproseslerde Uygulanması” Lisans Tezi ile mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır.