



**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN
FUNGUSLARLA KİTİN VE KİTOSAN
ÜRETİMİ**

Fatih KAYAR

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Hakan ÖZKAN
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN FUNGUSLARLA KİTİN VE KİTOSAN
ÜRETİMİ**

(Production of chitin and chitosan by locally isolated fungi)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih KAYAR

Danışman: Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Erzurum
Haziran, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Fatih KAYAR tarafından hazırlanan “Lokal olarak izole edilen funguslarla kitin ve kitosan üretimi” başlıklı çalışması **24.06.2021** tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Hakan ÖZKAN
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ
Erzurum Teknik Üniversitesi

Enstitü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve sayılı
kararı.

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Hakan ÖZKAN danışmanlığında sunulan “Lokal olarak izole edilen funguslarla kitin ve kitosan üretimi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Yöntem	11	35
Bulgular	2	20
Tartışma	2	20
Tezin Geneli	9	25

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

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Fatih KAYAR	Doç. Dr. Hakan ÖZKAN
24.6.2021	24.6.2021
İmza:	İmza:

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

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

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma boyunca bana her türlü konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım, Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a, Tez çalışmamın deneysel kısmının yürütülmesi aşamasında bana bilgi ve tecrübesiyle her konuda yardımcı olan, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a, bana Erzurum Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarını kullanma imkânı veren ve deneysel malzemelerin temini açısından desteğini esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımın son aşamasına kadar daima yanımda olan, deneysel aşamalarda beni bilgilendiren, sabırlı ve güler yüzlü çok değerli dostum Sayın Öğr. Gör. Meryem DOYMUŞ'a, her zaman yanımda olduğunu hissettiren, beni daima motive eden, her konuda bana yardımcı olan ve beni destekleyen Sayın Fatma ALTINOK'a, deneylerimin belli aşamalarında bana yardımcı olan ve beni bilgilendiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hamid CEYLAN, Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI, Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU'a, laboratuvar ortamında birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli laboratuvar arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK, Sayın Arş. Gör. Tuğba ORAK'a çok teşekkür ederim.

Başarımdaki manevi katkıları çok büyük olan, bana daima güvenen ve her zaman yanımda olan hayatımdaki en büyük destekçilerim canım annem Sevim KAYAR'a, canım babam Osman KAYAR'a, canım abim Halil İbrahim KAYAR'a, canım kardeşim Sinan Şamil KAYAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Fatih KAYAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN FUNGUSLARLA KİTİN VE KİTOSAN ÜRETİMİ

Fatih KAYAR

Danışman: Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Amaç: Mevcut çalışma lokal olarak izole edilen küflerden kitin üretmek, üretilen kitini kitosana dönüştürmek ve hazırlanan kitosanın biyolojik aktivitelerini (antimikrobiyal, antioksidan) belirlemek için gerçekleştirildi.

Yöntem: Farklı çevrelerden toplanan toprak örnekleri dilüsyon metodu ile dilüe edildi ve hazırlanan dilüsyon örnekleri daha sonra melas bazlı agar besiyeri içeren petriler üzerine transfer edildi. Petriler 25°C’de 6 gün süreyle inkübe edildi. Gelişen küf izolatları alt kültüre alındı ve saflaştırıldı. İzolatlar kitin içerikleri bakımından tarandı ve en yüksek kitin içerikli izolat seçildi. Seçilen izolat 18S rRNA analizine göre teşhis edildi. En üretken izolattan kitin üretimini arttırmak için bazı kültür parametreleri (melas konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi) optimize edildi. İzolattan ekstrakte edilen kitin, deasetilasyon prosesi ile (sıcak su banyosunda %50 (w/v) NaOH ile 100°C’de, 2 saat süreyle) kitosana dönüştürüldü. Hazırlanan kitosanın fonksiyonel grup analizi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan kitosanın antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri sırasıyla disk difüzyon yöntemi ve DPPH• metodu kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Bu tez çalışmasında 35 küf farklı toprak örneklerinden izole edildi ve en yüksek kitin içerikli izolatın TZ18 kodlu izolat olduğu belirlendi. İzolat TZ18, *Penicillium crustosum* olarak teşhis edildi. Bu izolattan kitin üretimi için optimum pH, melas konsantrasyonu, sıcaklık ve inkübasyon süresi sırasıyla 6, 120 g/l, 25°C ve 5 gün olarak belirlendi. Optimal koşullar altında üretilen *Penicillium crustosum* TZ18 biyomasının kitin içeriği %26,4 olarak belirlendi. TZ18 *Penicillium* Kitosanın (PK) ve Ticari Kitosanın (TK) deasetilasyon dereceleri sırasıyla %78,3 ve 76,9 olduğu bulundu. TK'ya kıyasla PK'nın *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulundu. TK'nın aksine PK, DPPH• giderme aktivitesi göstermedi.

Sonuç: Mevcut çalışmada ticari kitosana kıyasla *Penicillium crustosum* kitininden hazırlanan kitosanın daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterildi. *Penicillium crustosum* ile kitin ve kitosanın üretimi ve hazırlanan kitosanın biyolojik aktivitesi ilk kez mevcut çalışmada test edildi.

Anahtar Kelimeler: Kitin, Kitosan, Melas, *Penicillium crustosum*, Antimikrobiyal, Antioksidan

Haziran 2021, 80 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION OF CHITIN AND CHITOSAN BY LOCALLY ISOLATED FUNGI

Fatih KAYAR

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Purpose: The present study was performed to produce chitin from locally isolated molds, to convert the produced chitin into chitosan and to determine the biological activities (antimicrobial and antioxidant) of the prepared chitosan.

Method: Soil samples collected from different environments were diluted by dilution method and the prepared dilution samples were then transferred on petri dishes containing molasses-based agar medium. The petri dishes were incubated at 25°C and 6 days. The developed mold isolates were subcultured and purified. The isolates were screened in terms of their contents and the isolate with the highest chitin content was selected. The selected isolate was identified according to 18S rRNA analysis. Some culture parameters (molasses concentration, pH, temperature and incubation time) were optimized to increase the chitin production from the most productive isolate. Chitin extracted from the isolate was converted into chitosan by the deacetylation process (2 hours at 100°C with 50% NaOH in a hot water bath). Functional group analysis of the prepared chitosan was performed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Antimicrobial and antioxidant activities of prepared chitosan were analyzed using Disk diffusion method and DPPH• method, respectively.

Findings: In this thesis study, 35 molds were isolated from different soil samples and it was determined that the isolate with the highest chitin content was the isolate coded TZ18. The isolate TZ18 was identified as *Penicillium crustosum*. Optimum pH, molasses concentration, temperature and incubation time for chitin production from this isolate were determined as 6, 120 g/l, 25°C and 5 days, respectively. The chitin content of *P. crustosum* TZ18 biomass which was produced under optimal conditions was determined as 26.4%. Deacetylation degrees of *P. crustosum* TZ18 chitosan (PC) and commercial chitosan (CC) were found to be 78.3 and 76.9%, respectively. Compared to CC, PC was found to have higher antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria. In contrast to CC, PC did not show DPPH• scavenging activity.

Results: In the present study, it was shown that chitosan prepared from *Penicillium crustosum* chitin had higher antimicrobial activity compared to commercial chitosan. The production of chitin and chitosan by *Penicillium crustosum* and the biological activity of the prepared chitosan were tested for the first time in the present study.

Key Words: Chitin, Chitosan, Molasses, *Penicillium crustosum*, Antimicrobial, Antioxidant

June 2021, 80 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Biyopolimerler	3
Funguslar.....	4
Kitin ve Kitosan	5
Kitin ve Kitosanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
Kitin ve Kitosanın Elde Edilmesi.....	9
Fungusların Üretiminde Kullanılan Besin Ortamı	12
Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları	13
Kitin ve Kitosanin Biyolojik Aktiviteleri.....	15
Literatür Araştırması	16
MATERYAL ve YÖNTEM	24
Materyal	24
Çalışmalarda kullanılan cihazlar	24
Deneysel Çalışmalarda kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve besiyerleri.....	24
Yöntemler.....	26
Toprak örneklerinin toplanması	26
Toprak örneklerinden küf izolasyonu	27
Kitin üretme yetenekleri açısından izolatların taranması.....	27
Seçimi yapılan küf izolatının DNA izolasyonu ve klonlanması	28
Seçimi yapılan küften DNA izolasyonu yapılması	28
İzole edilen DNA'nın PCR ve agaroz jel elektroforezi işlemleri	29
Klonlama	30
Seçimi yapılan küf izolatının optimizasyon çalışmaları	34

Optimal melas konsantrasyonunun belirlenmesi	34
Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi	36
Optimal sıcaklığın belirlenmesi	36
Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi	37
Fermentasyon parametrelerinin analizi	37
Seçimi yapılan küften kitin ekstraksiyonu ve elde edilen kitinin kitosana dönüştürülmesi	37
Kitin ekstraksiyonu için uygulanan işlemler	37
Elde edilen kitinin kitosana dönüştürülmesi işlemi	42
Elde edilen kitosanın kimyasal karakterizasyonu	42
Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile kitosan örneklerinin fonksiyonel gruplarının analizi	43
Hazırlanan kitosan örneğinin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi	43
Hazırlanan kitosan örneğinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi	44
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	45
Melasın Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi	45
Topraktan Küf İzolasyonu	45
Kitin Verimine Göre Uygun Küf İzolatının Seçimi	46
Sekans Analiz Sonuçları	46
Seçilen Küf İzolatı	47
Optimizasyon Denemeleri	48
Kitin Üretimi İçin Optimal Melas Konsantrasyonunun Belirlemesi	48
Kitin Üretimi İçin Optimal pH Belirlenmesi	49
Kitin Üretimi İçin Optimal Sıcaklığın Belirlenmesi	50
Kitin Üretimi İçin Optimal İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	50
Fermentasyon Parametrelerinin Analizi	51
Kitin Ekstraksiyon İşlemi	51
Elde Edilen Kitosanın Analiz Ve Biyolojik Aktivite Sonuçları	51
Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile kitosan örneklerinin Fonksiyonel grupların analizi	51
Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi	54
Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi	57
SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı Organizmalarda Bulanan Ağırlıkça Saf Kitin Yüzdesi.....	6
Tablo 2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kitin ve Kitosan Üretiminin Karşılaştırılması....	10
Tablo 3. Kitosanın Kullanım Alanları	14
Tablo 4. PCR Analizinde Kullanılan Reaksiyon Karışımları	29
Tablo 5. PCR Programı.....	30
Tablo 6. Ligasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar	31
Tablo 7. Koloni PCR’da Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	32
Tablo 8. Koloni PCR Programı.....	33
Tablo 9. Çeşitli Küf İzolatlarının Biyokütleleri ve Kitin İçerikleri	46
Tablo 10. İzolatın Melas Konsantrasyonuna Göre Optimal Şartlarının Belirlenmesi.....	49
Tablo 11. İzolatın pH Konsantrasyonuna Göre Optimal Şartlarının Belirlenmesi.....	49
Tablo 12. İzolatın Farklı Sıcaklıklara Göre Optimal Sıcaklığının Belirlenmesi	50
Tablo 13. İzolatın Farklı İnkübasyon Sürelerine Göre Optimal İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	50
Tablo 14. İzolat İçin Belirlenen Tüm Optimal Parametrelerin Denenmesi	51
Tablo 15. Hazırlanan Örneklerin 517 nm’deki Absorbans Değerleri.....	57
Tablo 16. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Yüzdeleri	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyopolimerlerin sınıflandırılması	4
Şekil 2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı	8
Şekil 3. Kitin ve kitosanın elde edilmesi	11
Şekil 4. Toprak örneği alınan yerler	27
Şekil 5. Sıvı besiyerinde gelişimi tamamlanan farklı küf örnekleri	28
Şekil 6. Farklı melas konsantrasyonlarında geliştirilen küflerin kurutulmadan önceki görünümleri	35
Şekil 7. Farklı pH konsantrasyonlarında hazırlanan melas besiyeri	36
Şekil 8. Kuru küf biyokütlesi ve toz haline getirilmiş görüntüsü	38
Şekil 9. Bradford ile protein tayini	39
Şekil 10. Alkali çözünmeyen materyalin santrifüj ile çöktürülmesi	40
Şekil 11. Elde edilen kitinin kurutulmadan önceki görünümleri	41
Şekil 12. Az miktarda elde edilen kitosanın görünümü	42
Şekil 13. Elde edilen farklı tür küfler ve seçilen TZ18 kodlu küf izolatu	45
Şekil 14. <i>Penicillium crustosum</i> izolatının filogenetik ağacı	47
Şekil 15. Seçimi yapılan TZ18 kodlu küf izolatu (<i>Penicillium crustosum</i>)	48
Şekil 16. FTIR analizi sonucu	52
Şekil 17. Üretilen kitosanın <i>Escherichia coli</i> (Gram negatif) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	55
Şekil 18. Üretilen kitosanın, <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram pozitif) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikrolitre
DD	Deastilasyon Derecesi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
G	Gram
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Dansite
Nm	Nanometre
IPTG	İzopropil β-D-1- tiyogalaktopiranosid
Kb	Kilobaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
Da	Dalton
N	Normalite
Ppm	Parts per million (milyonda bir birim)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
AIM	Alkali çözünmeyen materyal
Mw	Moleküler ağırlık
mM	Milimolar
Lmw	Düşük moleküler ağırlık
Dk	Dakika
PK	<i>Penicillium</i> Kitosan
TK	Ticari Kitosan
AA	Askorbik Asit

GİRİŞ

Kitin, yapısal olarak incelendiğinde N-asetil-D-glukozamin birimlerine sahip bir biyopolimerdir. Doğada diğer biyopolimerlerle kıyaslandığı zaman selülozdan sonra en fazla bulunan polimer olmasıyla dikkat çekmektedir. Deniz kabukluları, böcekler, yumuşakçalar ve fungus türlerinin yapısında bulunmaktadır (Bartnicki-Garcia 1968).

Kitosan ise kitinin moleküler zincirinde bulunan, N-asetil-D-glukozamin yapısındaki asetil grubunun deasetilasyona uğraması sonucunda, D-glukozamin yapısına dönüşmesiyle oluşmaktadır. Kitinin organik ve sulu çözücülerde çözünememesi onun endüstriyel alanda kullanımını kısıtlamakta bu yönden çok daha fazla avantaja sahip olan kitosanın önemi artmaktadır. Kitin ve kitosanı birbirinden ayıran temel parametre deasetilasyon derecesidir. Deasetilasyon derecesi %60 ve üzerinde ise kitosan, %60'ın altındaki deasetilasyon dereceleri ise kitin olarak kabul görmektedir (Aiba 1992; Aranaz *et al.* 2009).

Günümüzde ticari kitosan üretimi için sıklıkla kabuklu deniz canlıları kullanılmaktadır. Ancak bu canlılardan kitosan üretiminde; canlıları temin etmede sezonluk sınırlama olması, kabuklarda bulunan proteinlerden kaynaklanabilecek alerji riski oluşturması gibi nedenlerden dolayı bu canlıları kullanarak kitosan üretiminin birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için, fermantasyon teknolojisi avantajlı bir yol olarak ortaya çıkmıştır. Fermantasyon yoluyla; hücre duvarlarında kitin ve kitosan bulunduran fungusların üretimi ve bunlardan kitin ve kitosan ekstraksiyonu önemli bir yol olmuştur. Fungusların kolay çoğalabilmesi, ucuz ve sınırsız bir kaynak olması düşük mineral içeriklerine sahip olması gibi nedenler, fermantasyon yoluyla kitin ve kitosan elde etmeyi oldukça avantajlı kılmaktadır (Nwe *et al.* 2002; Teng *et al.* 2001; Wu *et al.* 2005).

Kitinin kitosana dönüştürülmesi işlemi temel olarak iki yöntemle yapılabilmektedir. Bu yöntemlerden ilki, kitin deasetilaz enziminin kullanıldığı enzimatik yollarla kitinin kitosana dönüştürülmesi işlemidir. İkinci yöntem ise yüksek sıcaklıkların ve kuvvetli alkali çözücülerin kullanıldığı kimyasal yöntemlerle kitinin kitosana dönüştürülmesi işlemidir (Chang *et al.* 1997; Pareek *et al.* 2013).

Bu tez çalışmasında, farklı illerden toplanan toprak örneklerinden saf küf izolatları elde edilmiş ve biyokütlesiyle de bağlantılı olacak şekilde kitin içeriği açısından en yüksek verimin bulunduğu izolat seçilmiştir. Bu izolatın 18s rRNA analizine göre identifikasyonu yapılarak *Penicillium crustosum* izolatı olduğu tespit edilmiştir. İzolat için optimizasyon çalışmaları

yapılarak en yüksek kitin içeriğinin elde edildiği optimal şartlar belirlenmiştir. Daha sonra bu küf izolatından kitin ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitin, kimyasal deasetilasyon yöntemiyle kitosana dönüştürülmüştür. Daha sonrasında elde edilen kitosanın FT-IR analiziyle karakterizasyonu yapılmıştır. FT-IR analizi sonucunda belirlenen bantlardaki absorbanların kullanıldığı eşitliklerle deasetilasyon derecesi hesaplanmıştır. Son olarak elde edilen kitosanın ticari kitosana kıyaslandığı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Kimyasal deasetilasyon yöntemiyle elde edilen kitosanın bazı bakteriler üzerinde ticari kitosana kıyasla çok daha yüksek inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen kitosanın kayda değer antimikrobiyal aktivitesinin bulunduğu saptanmıştır.



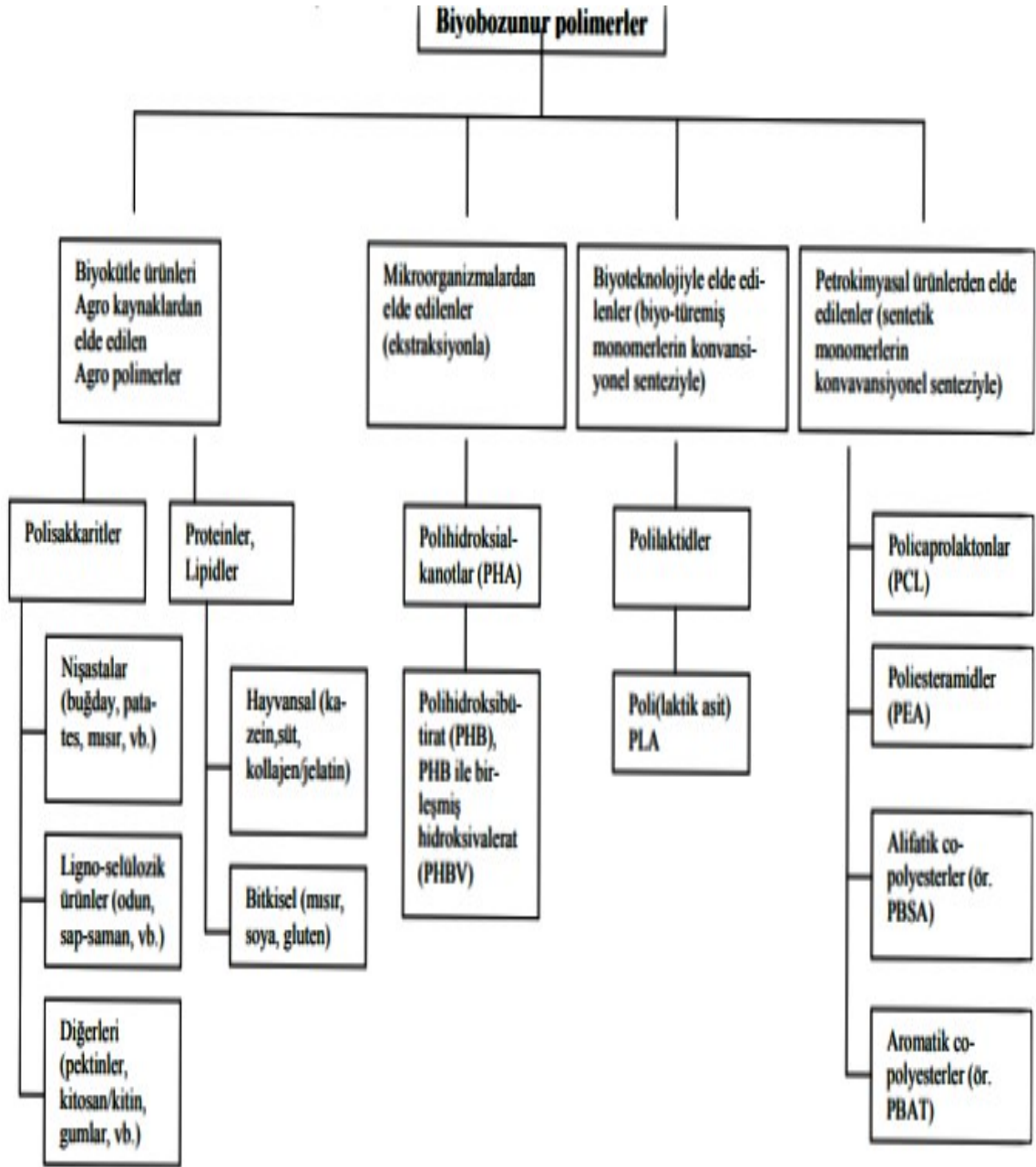
KURAMSAL TEMELLER

Biyopolimerler

Canlı organizmalar tarafından üretilmiş olan polimerlere genel olarak biyopolimer denilmektedir. Yeşil bitkiler, hayvanlar, bakteriler, mantarlar gibi organizmalar yaşam döngülerinde sürekli olarak selüloz, nişasta, kitin, kollajen, jelatin ve bunların birçok türevini doğal bir şekilde üretebilmektedirler (Einbu and Vårum 2008). Üretilmiş olan bu biyopolimerler organizmalarda koruma, genetik bilgi ekspresyonu, reaksiyon katalizörü, biyotik ve abiyotik algılama, diğer organizmaların yüzeyine yapışma aracı, enerji, karbon ve diğer maddeleri depolama gibi oldukça farklı temel işlevlerde görev almaktadırlar (Sato *et al.* 1998). Biyopolimer terimi, sadece doğal olarak meydana gelen uzun zincirli moleküller için değil, aynı zamanda biyo-bazlı monomerler ya da bunlardan türetilen materyaller için de kullanılan bir ifadedir (Song *et al.* 2009).

Biyopolimerler; polisakkaritler, proteinler ve polinükleotitler olarak üç ana sınıfta gruplandırılmıştır. Polisakkarit biyopolimerlere; nişasta (amiloz/ amilopektin), selüloz, agar, aljinat, pektin, kitin, kitosan, hyaluronik asit, ksantan, dekstran, levan, poligalaktozamin, pullulan, elsinan, maya glukanları gibi birçok polimer örnek verilebilir. Protein biyopolimerlere; ipek, kollajen / jelatin, elastin, resilin, yapıştırıcılar, poliamino asitler, soya, zein, buğday gluteni, kazein, serum albümin gibi polimerler örnek verilebilir (Rebelo *et al.* 2017).

Birçok biyopolimer türü arasında selüloz ve kitin en önemli biyokütle kaynaklarıdır. Selüloz bitkilerde sentezlenirken, kitin alt sınıf hayvanlardan ve funguslardan elde edilmektedir. Bunlar dünyadaki en bol organik bileşiklerdir. Kitin yapısal olarak selüloza benzemektedir. Aralarındaki fark; kitinin C-2 pozisyonunda hidroksil yerine asetamid grupları içermesidir. Kitinin en önemli türevi olan kitosan, alkali koşullar altında kitinin deasetilasyonu ile elde edilebilmektedir ve C-2 pozisyonunda amino grubu bulundurmaktadır. Kitosandaki NH₂ gruplarının varlığı, kitin ile karşılaştırıldığında farklı uygulamalarda kullanım için çok büyük avantaj sağlamaktadır (Kurita 2001; Rinaudo 2006).



Şekil 1. Biyopolimerlerin sınıflandırılması (Dursun et al. 2010)

Biyopolimerler biyolojik olarak yenilenebilir, parçalanabilir ve biyoyumlu olmalarından dolayı birçok alanda kullanılabilirler (Akıla 2014).

Biyopolimerler; biyoloji, kimya, fizik gibi temel alanlarda kullanılmasının yanı sıra gıda sektörü, tıp alanı, tekstil sanayi, ilaç sektörü, giyim sektörü gibi alanlarda; katkı maddesi, yapay organ uygulamaları, boyama, ilaç iletim sistemleri, dayanıklılık artırıcı olarak kullanılmaktadır ve daha birçok alanda biyopolimerlerden yararlanılmaktadır (Ataman 2006).

Funguslar

Mantarlar alemi 1 alt-alem, 7 şube, 10 alt-şube, 35 sınıf, 12 alt-sınıf ve 129 takım olmak üzere çok büyük bir alem olarak kabul edilmektedir (McLaughlin *et al.* 2009). Mantarlar,

fotosentetik olmayan ökaryotik organizmalardır ve çok çeşitli çevre koşullarında büyüebilmektedir (Miles and Chang 1997). Dünya üzerinde birçok farklı tür mantar ya kendiliğinden yetişmekte ya da ticari olarak satılmak üzere yetiştirilmektedir. Bu mantar türlerinin yaklaşık %30-%35'i insanlar için zehirlidir. Bunun aksine, %65-%70 gibi büyük orandaki türler insanlar için yenilebilirdir (Aksu *et al.* 1996; Aksu *et al.* 2006; Deniz *et al.* 2016). Yenilebilen olan türler insanlara oldukça sağlıklı besin maddeleri sağlamaktadır. Bu besin maddelerinin en önemli özelliği yüksek miktarda protein içermesidir. 100-gram mantar için 4-gram protein içeriği buna örnek verilebilir (Aşkun and Işıloğlu 1997; Chang and Buswell 1996; Polat and Selvi 2011; Ulziijargal and Mau 2011).

Yararlı olan mantarların aksine bazı mantarlar ise zararlı metabolitler üretmektedir. En iyi bilinen metabolit mikotoksin olup, bu mikotoksinler kansere ve ölümlere neden olabilmektedir (Flannigan *et al.* 1991). Funguslar ayrıca alkol, aldehit, keton gibi maddeler üretebilmektedir ve bu maddeler insanlarda baş ağrısı, yorgunluk, göz ve burun yanması yapabilmektedir (Miller 1992). Mikotoksinler, birincil metabolik süreçlerin basit bir ürünü olması ve mantarların büyümesi için elzem olmamasından dolayı ikincil metabolitler olarak kabul edilmektedirler. Mikotoksinlerin fonksiyonları tam olarak tespit edilemese de, aynı ortamda rekabet eden diğer mikroorganizmaların yok edilmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca, parazitik mantarların konakçı dokuları istila etmek için bu mikotoksinleri kullandığı da iddia edilmektedir. Mikotoksin üreten mantarlara toksijenik mantarlar denilmektedir. En sık çalışılan mikotoksinler (aflatoksin, fumonisin, patulin); *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* ve *Myrothecium* gibi türler tarafından üretilmektedir (Bräse *et al.* 2009).

Funguslar, hücre duvarlarının yapısına katılan kitin, kitosan, glukan gibi maddeleri yoğun bir şekilde bulundurmaktadır. Bu duvar yapısında bulunan maddeler birçok alanda kullanıldığı için kitin, kitosan, glukan gibi maddelerin elde edilebilmesi amacıyla son zamanlarda mantarlara olan ilgi oldukça artmıştır. Funguslardan; Basidiomycetes, Chytridiomycetes ve Ascomycetes türlerinin duvar yapıları kitin bakımından zenginken, Zygomycetesler'in duvar yapıları hem kitin hem de kitosan bakımından zengindir. Birçok endüstriyel alanda kullanılan kitin, kitosan, glukan gibi polimerler günümüzde genellikle deniz kabuklularından temin edilmektedir. Ancak, fungusların türüne göre hücre duvarında %22 - %44 oranında kitin bulunması ve kitine çok geniş bir alanda ihtiyaç duyulması funguslardan kitin eldesini çekici hale getirmiştir (Patil *et al.* 2000; Üçgül *et al.*).

Kitin ve Kitosan

Kitin, N-asetil-D-glukozamin gruplarını içermesi ve dünyada diğer polisakkaritlerle kıyaslandığında selülozdan sonra en yaygın bulunan polisakkarit olması bakımından önem

kazanmış bir biyopolimerdir (Castro and Paulín 2012; İmamoğlu 2011; Yıldız and Yanglar 2014). Funguslar, eklembacaklılar, algler, böcekler, su yosunları gibi birçok canlının yapısında kitinin bulunduğu bilinmektedir. Ticari anlamda kitinin elde edilmesinde en çok bilinen ve kullanılan yöntem deniz kabuklularından kitin eldesidir (Chaussard and Domard 2004; Kurita 1997; Kurita 2006). Kitin ayrıca, fungusların hücre duvarlarının ana maddelerden birini oluşturması ve sporlar ile misellerin zar yapılarına katılan polisakkarit olmasından dolayı son zamanlarda kitinin elde edilmesinde kullanılan bir diğer önemli yöntem olmuştur (Canlı taşar 2015). Kitin; Basidiomycetes, Ascomycetes ve Phycomycetes grubu mantarlarda bol miktarda bulunmasına karşın bazı mantarlarda mevcut değildir (Sbrana *et al.* 1995).

Tablo 1. Farklı Organizmalarda Bulanan Ağırlıkça Saf Kitin Yüzdesi (Üçgül et al. 2016)

Organizma	Ağırlıkça kitin %	Organizma	Ağırlıkça kitin %
KABUKLULAR		HAŞARAT	
Cancer (Yengeç)	72,1***	Periplaneta (Hamam böceği)	2****
Carcinus (Yengeç)	64,2**	Blatella (Hamam böceği)	18,4***
Paralithodes (Kral yengeç)	35**	Coleoptera (Uğur böceği)	27-35****
Callinectes (Mavi Yengeç)	14*	Diptera (Çift kanatlılar)	54,8***
Crangon and Pandalus(Karides)	17-40	Pieris (Kelebek)	64***
Alaska shrimp (Alaska karides)	28****	Bombyx (İpek böceği)	44,2***
Nephro (İstakoz)	69,8****	Galleria (Balmumu solucanı)	33,7***
Homarus (İstakoz)	60-75***	MANTARLAR	
YUMUŞAKÇALAR		Aspergillus niger	42*****
Clam (İstiridye)	6,1	Penicillium notatum	18,5*****
Shell oysters (Kabuk istiridye)	3,6	Penicillium chrysogenum	20,1*****
Squid pen (Kalamar)	41	Mucor rouxii	44,5
Krill (Kabuklar)	40,2	Lactarius vellereus	19

*Vücut taze kütlesi ile karşılaştırılması

**Gövde kuru kütlesine göre

***Organik kütikül kütlesine göre

****Kütikül toplam kütlesine göre

*****Hücre duvarının kuru kütlesine göre değerini göstermektedir.

Kitinin bulunduğu fungusların yapısındaki mikrofibrillerin durumuna göre α , β ve γ formları olarak 3 farklı kitin formu bulunmaktadır. Bu yapılar içerisinde α formu doğada en fazla bulunan formdur (Gardner and Blackwell 1975; Rudall 1963).

Kitosan, kitinin deasetilasyonu sonucunda oluşmaktadır ve kitinin en önemli türevidir (Oyar 2015). Kitosan, kitinin deasetilasyonundan farklı olarak; *Mucor*, *Absidia* ve *Rhizopus* gibi mantar türlerinde ise doğal bir şekilde üretilmektedir (Akila, 2014). Kitosanın direkt olarak elde edilebilmesi günümüzde yalnızca funguslarla sınırlıdır (Miyoshi *et al.* 1992). Kitosan; doğal, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve yüksek moleküler ağırlıklı bir biyopolimerdir ayrıca kitosanın nemlendirici, viskozite ve metal iyonlarının seçici şelatörü olması gibi çok önemli özellikleri bulunmaktadır (Alper 2003).

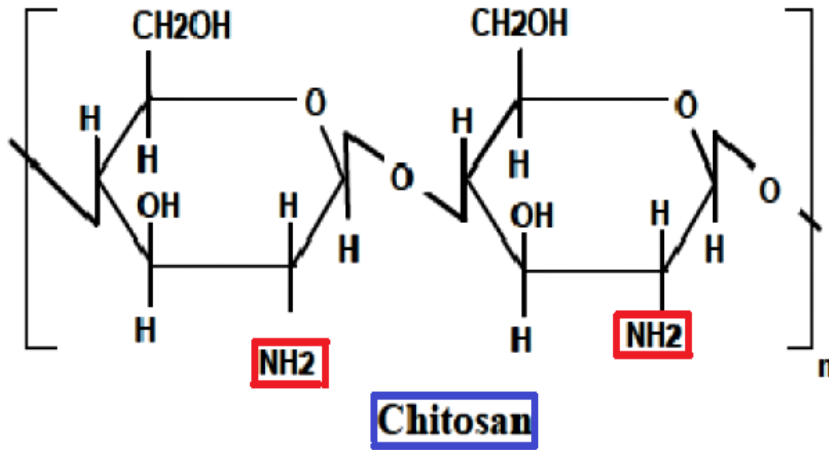
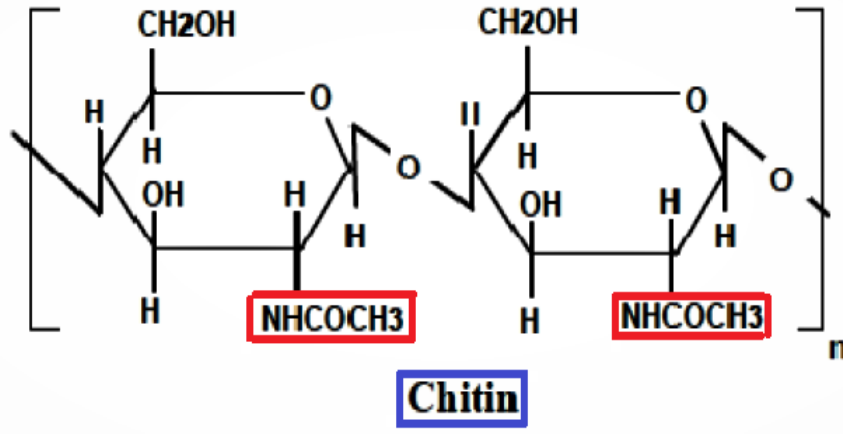
Kitin ve kitosanın, gıda endüstrisi, tarım, biyotıp, kâğıt yapımı ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan bir polimer olması, kitin ve kitosana olan ilgiyi oldukça artırmış ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılan yeni bir alan oluşmuştur (Sato *et al.* 1998).

Kitin ve Kitosanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kitin ve kitosan arasındaki temel farklardan biri çözünürlük özelliklerinin değişiklik göstermesidir. Kitin, oldukça hidrofobiktir ve suda çözünmemesinin yanında diğer çoğu organik çözücüde de çözünmemektedir (Madhavan 1992). Kitinin deasetilasyonu sonucunda oluşturulan kitosan ise asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünmektedir (Dutta *et al.* 1997; Kumar *et al.* 1999). Kitin, güçlü hidrojen bağları içermesinden dolayı çoğu toksik olan özel çözeltilerde çözülebilmektedir ve kitinin sadece özel çözeltilerde çözünebilmesi çoğu alanda dezavantaja yol açmaktadır. Kitosanın serbest amino grupları sayesinde bazı toksik olmayan organik çözeltilerde çözünebilmesi, kitinle kıyaslandığında büyük bir avantaj sağlamaktadır (Furusaki *et al.* 1996; Kurita 1986; Winterowd and Sandford 1995).

Kitin, β -(1-4)-N-asetil-D-glukozamin monomerlerinden oluşmaktadır. Görünüş olarak bakıldığında beyaz bir renk, sert ve elastik olmayan bir yapı göstermektedir. Kitosan ise kitinin deasetilasyonu sonucunda oluşmuş olan poli D-glukozamin kimyasal yapısına sahip bir polisakkarittir (Muzzarelli and RAA 1973; Zikakis 2012).

Kitosanın katı haldeki yapısına bakıldığında ise sarımsı-beyaz bir renge sahip, kokusuz, tatsız ve şeffaf olduğu görülmektedir (Canlı taşar 2015).



Şekil 2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı

Kitin ve kitosan arasındaki fark yukarıdaki şekilde de belirtildiği gibi kitinin C-2 pozisyonunda asetamido (NHCOCH_3) grubu bulunurken, kitosanın C-2 pozisyonunda amin ($-\text{NH}_2$) grubunun bulunmasıdır (Demir and Seventekin 2009).

Kitin ve kitosanın birbirinden ayırt edilebilmesi için deasetilasyon derecesi baz alınmaktadır. Deasetilasyon derecesi %60 ve üzerinde ise kitosan, bunun altında ise kitin olarak kabul edilmektedir. Deasetilasyon derecesi; çözünürlük, kimyasal reaktivite ve biyolojik aktivite de dahil olmak üzere kitin ve kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkileyen en önemli parametrelerden biridir (Akila 2014).

Deasetilasyon derecesini ölçmek için birçok yöntem kullanılabilir. Örneğin; ninhidrin testi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, kızılötesi spektroskopi (IR), ultraviyole spektrometresi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılan yöntemlerdendir. Bu teknikler arasında kızılötesi spektroskopisi (IR), minimum örnek hazırlamadaki kolaylığı nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir. Ancak, kızılötesi spektroskopisi tekniği hassas bir kalibrasyon gerektirmektedir (Aiba 1992; Akila 2014; Khan *et al.* 2002).

Kitinin moleküler ağırlığı $1,03 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^6$ Da arasında olmasına rağmen kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın moleküler ağırlığı 1×10^5 - 5×10^5 Da'a kadar

düşmektedir. Moleküler ağırlığındaki bu azalmanın nedeni deasetilasyonun moleküler ağırlığı düşürmesidir (Cheba 2011). Moleküler ağırlığın düşmesine neden olan diğer parametreler incelendiğinde; ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarındaki yaşanan artışla paralel bir şekilde, kitosanın yapısında parçalanmalar meydana gelmekte ve bu durum moleküler ağırlığı düşürmektedir. Bir diğer parametre ise, 280 °C ve üzerindeki sıcaklıkların kitosanın mevcut kimyasal yapısındaki zincirlere zarar vermesidir. Bu zararın hızı, sıcaklık artışıyla paralel bir şekilde değişmekte ve kitosanın yapısında bozulmalar meydana getirerek moleküler ağırlıkta azalmaya neden olmaktadır (Agboh and Qin 1997; Demir and Seventekin 2009). Kitin ve kitosan biyopolimerlerinin moleküler ağırlığı; kaynak materyalin varyasyonu, hazırlanışı ve ekstraksiyon metodlarına göre değişkenlik göstermektedir. Bu biyopolimerlerin moleküler ağırlığı, onların uygun kullanım alanını da belirlemektedir. Örneğin, düşük molekül ağırlıklı kitosanın daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Elsoud and El Kady 2019).

Kitin ve Kitosanın Elde Edilmesi

Yengeç, karides, istakoz gibi deniz canlıları yüksek kitin bulundurmasıyla dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, kitinin birçok böcek türünün dış iskelet yapısını ve çoğu fungus türünün hücre duvarının ana bileşenini oluşturduğu görülmektedir (Üçgül *et al.* 2016). Çoğu mantar türünün hücre duvarı yapıtaşı olarak kitin bulundurmasının yanı sıra Zygomycetes sınıfı mantar türlerinin kitine ek olarak, doğal bir şekilde kitosan içerdiği de tespit edilmiştir (Arcidiacono and Kaplan 1992; George *et al.* 2011; Nadarajah *et al.* 2001). Günümüzde *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes*, *Gongronella butleri*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma reesei*, *Absidia blakesleeana*, *Absidia glauca*, *Absidia coerulea* gibi birçok mantar türü kitin ve kitosanın elde edilebilmesi için çalışma odağı olmuştur. Çalışılan bu türler arasında en sık araştırma yapılan tür *Mucor rouxii*'dir. Bu türün miselyumundaki kitin ve kitosan miktarı, hücre duvarı kuru ağırlığının %35'ine kadar ulaşabilmektedir (Elsoud and El Kady 2019).

Mantar miselyumundan kitin elde etmek, diğer yöntemlerle kıyaslandığı zaman (deniz kabukluları gibi) mevsimlik sınırlama olmaması, uygun ve kolay fermentasyon sürecinin olması, üretim sonrası atık sıkıntısının az olması, kabukların oluşturabileceği alerji riskinin olmaması gibi nedenlerden dolayı popülerite kazanmış ve kitin eldesi için önemli bir avantaja sahip olmuştur (Muslim *et al.*). Kabuklulardan elde edilen kitin ve kitosan, farklı fiziko-kimyasal özellikler gösterebilirken, fungal kitin ve kitosan nispeten kontrollü fermentasyon koşulları nedeniyle tutarlı özellikler göstermektedir. Fungal kitin ve kitosan, bitki bağışıklık tepkisini indüklemeye daha etkilidir ve potansiyel olarak tarımsal uygulamalar için daha

uygundur (Cooney and Emerson 1964; Kučera 2004). Funguslarda kitin ve kitosan üretiminin bir önemli avantajı da üretim sırasında diğer yöntemlerde kullanılan demineralizasyon işleminin funguslardaki düşük mineral içeriğinden dolayı kullanılmamasıdır. Bu basamağın olmaması hem maliyeti azaltmakta hem de üretim hızını olumlu yönde etkilemektedir (Synowiecki and Al-Khateeb 2003; Teng *et al.* 2001).

Tablo 2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kitin ve Kitosan Üretiminin Karşılaştırılması (Elsoud *et al.*, 2019)

BASİT KARŞILAŞTIRMA	FUNGAL MİSELYA	KABUKLU CANLILAR
Kullanılabilirlik	Mevsimsel veya coğrafi sınırlamaları yoktur.	Balıkçılık endüstrisine bağlı ve mevsimler ile sınırlıdır.
İnorganik materyaller	Düşük seviyede	Yüksek seviyede
Ekstraksiyon işlemi	Basit	Sert çözücüler gerektirir
Atık yönetimi maliyeti	Düşük	Yüksek
Demineralizasyon işlemi	Gerekli değil	Gerekli
Fiziko-kimyasal özellikler	Tutarlı	Değişken
Bitki bağışıklık tepkisinin indüksiyonu	Daha etkili	Daha az etkili

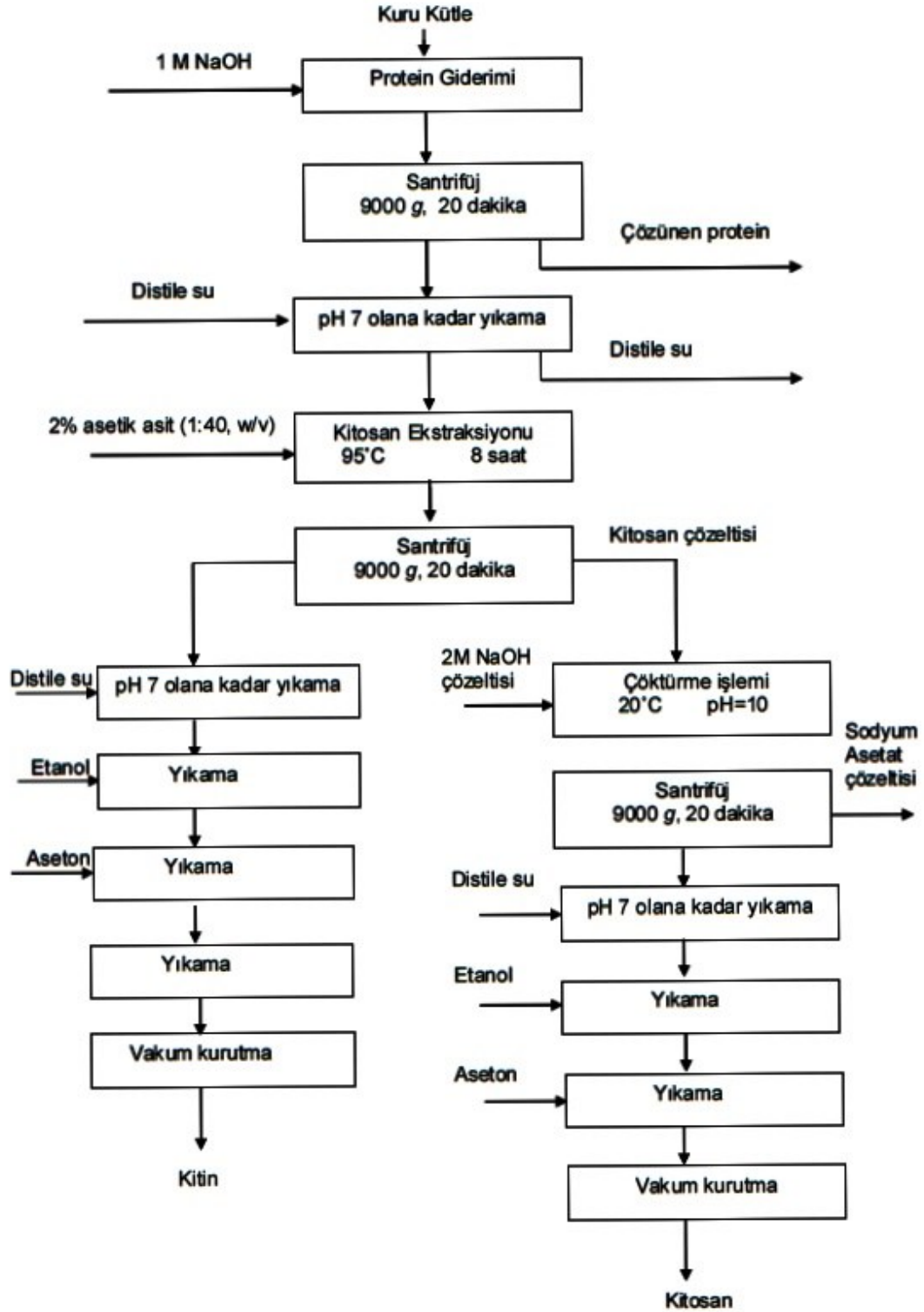
Mantarlardan kitin ve kitosan üretimi, mantar bazlı atık maddelerin iyi bir şekilde değerlendirilmesi sonucu düşük maliyetle elde edilebilmektedir (Wu *et al.* 2005). Dünya çapında her yıl *Agaricus bisporus* mantarından yaklaşık olarak 50.000 metrik ton atık materyal meydana gelmektedir. Öte yandan, her yıl sitrik asit üretimi için kullanılan *Aspergillus niger*'den yaklaşık olarak 80.000-ton misel atıkları meydana gelmektedir. Bu mantar atıkları ve diğer materyaller, ücretsiz bir şekilde kitin ve kitosan kaynağı olarak değerlendirilip kullanılabilir (Ali *et al.* 2002). Mantar türlerinde kitin ve kitosan içeriği, mantar yetiştirme yöntemine ve fermantasyon sistemine bağlı olarak değişebilmektedir (Gabiatti Jr *et al.* 2006; Pandey *et al.* 2000).

Fungal kitin ve kitosanın üretimi için temel olarak kimyasal yöntemler ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Casadidio *et al.* 2019). Kitin ve kitosanın ekstraksiyonu için şu adımlar takip edilir:

- ✓ İlk basamakta fungal biyokütleden protein, yağ, karbonhidrat gibi makromolekülleri uzaklaştırmak için alkali ile muamele gerçekleştirilir. Alkali için genelde 1N NaOH kullanılmaktadır ve 95°C için 1-6 saat, 121°C için 15dk-1saat süre alkali muamelesi yapılmaktadır.
- ✓ İkinci basamakta kitin ve kitosanı birbirinden ayırmak için seyreltik asit kullanılmaktadır. Genel olarak asetik asit ve hidroklorik asit kullanılmakta ve 95°C de 3-15 saat muamele edilmektedir.

- ✓ Son basamakta; alkali ortamda kitosan çöktürülerek elde edilirken, çözünmeyen kısımdan ise kitin elde edilmektedir.

Fungus türü, sıcaklık, ph, kültivasyon yöntemi gibi parametreler elde edilen kitosanın verimini etkilemektedir (Koçer 2015; Muslim *et al.*)



Şekil 3. Kitin ve kitosanın elde edilmesi (Koçer, 2015)

Fungusların Üretiminde Kullanılan Besin Ortamı

Günümüzde gelişen fermantasyon teknolojisi bizlere kitin ve kitosan üretiminde alternatif bir yol sağlamaktadır. Fermantasyon yöntemi ile hücre duvar yapısında kitin ve kitosan bulunan funguslar geniş ölçekte üretilmekte ve bu funguslardan bol miktarda kitin ve kitosan elde edilebilmektedir. Fermantasyonla üretimi yapılan funguslar diğer yöntemlerle kıyaslandığında basit besin ortamlarında hızlı çoğalabilmesi ve besin maddesinin temininin kolay ve ucuz olması nedeniyle avantaj sağlamaktadır (Teng *et al.* 2001; Wu *et al.* 2005). Funguslardan kitin ve kitosan üretmek için, hem katı hal fermantasyonu (SSF) yöntemi hem de batık fermantasyon (SMF) yöntemi kullanılabilir. Katı hal fermantasyonunda, mikrobiyal büyüme serbest suyun olmadığı nemli katı yüzeylerde gerçekleşirken, batık fermantasyonda mikrobiyal büyüme sıvı ortamda gerçekleşmektedir (Gabiatti Jr *et al.* 2006; Pandey *et al.* 2000).

Fungal kitosan üretiminin verimi; kullanılan mantar suşu, yetiştirilen kültür ortamı, pH, sıcaklık, karışım oranı, karıştırma hızı ve yetiştirme süresi gibi parametrelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Üretim veriminin artırılabilmesi için ya biyokütle miktarı artırılmalı ya da hücre duvarındaki kitosan içeriği artırılmalıdır (Jaworska and Konieczna 2001).

Funguslardan maksimum kitin ve kitosan verimi elde etmek için, genellikle geç üstel büyüme aşamasında hasat işlemi gerçekleştirilmektedir. Funguslar katı ortamda yetiştirilebilse de, kitin ve kitosan izolasyonu genellikle maya pepton glikoz sıvı besiyeri (YPG), patates dekstrozu sıvı besiyeri (PDB) veya pekmez tuz ortamı (MSM) içinde gerçekleştirilmektedir (Pochanavanich and Suntornsuk 2002). Ayrıca fungusların üretiminde kullanılan fermantasyon sürecinde melas, şilempe, peyniraltı suyu, malt ekstrakt, ypk broth gibi besin ortamları kullanılabilir. Melastan fermantasyon yoluyla alkol üreten fabrikalarda şilempe meydana gelmektedir. Şilempe kötü kokulu kahverengi sıvımsı bir atıktır. Üretimi yapılan 1 litre alkolden 12 litre şilempe meydana gelmektedir. Peyniraltı suyu ise, süt fabrikalarında peynir üretimi sırasında kazeinin çöktürülmesi sonucunda meydana gelen yeşilimsi bir sıvıdır (Kahyaoglu and Kivan 2007).

Melas şeker sanayiinde yan ürün olarak şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilir ve endüstride kolay ve ucuz temin edilebilmesinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra, içerdiği diğer maddeler sayesinde ortamı zenginleştirmekte ve mikroorganizmalar için oldukça elverişli bir substrat olarak kullanılmaktadır (Akbas *et al.* 2014; Canlı taşar 2015; Ediz 2004).

Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları

Kitin ve kitosan polisakaritlerinin; biyoyumluluk, biyobozunurluk, non-toksiste, adsorbsiyon gibi özelliklerinin oluşu biyomateryallerle kullanımı için mükemmel bir kaynak oluşturmaktadır. Bu biyopolimerler, iletkenlik, gözeneklilik ve geniş yüzey alanı gibi kullanışlı fiziksel özelliklere sahiptir (Croisier and Jérôme 2013; Shukla *et al.* 2013; Tan *et al.* 2009). Kitin ve kitosan birbirleriyle kıyaslandığı zaman kitinin zayıf çözünürlüğe sahip olması kullanımını sınırlandırmaktadır. Kitosan ise daha kolay çözünebilir olmasından dolayı geniş çapta kullanım alanı oluşturmaktadır.

Kitosanın atık su arıtımı, besin endüstrisi, tarım, biyoteknoloji, medikal, kozmetik gibi temel bir çok alanda kullanımı mevcuttur (Akila 2014).

Gıda alanında; doğal kıvamlaştırıcı, yiyecek katkı maddesi, filtreleme ve temizleme, boya maddelerini uzaklaştırmada kullanılmaktadır (Hirano 1996; Shahidi *et al.* 1999).

Medikal alanında; yara bandı, ilaç salım sistemleri, diş uygulamaları, pıhtılaşma etkeni, cerrahi uygulamalarda kullanılmaktadır (Dodane and Vilivalam 1998; Jayakumar *et al.* 2010).

Biyoteknoloji alanında; protein saflaştırma, enzim immobilizasyonu, hücre geri kazanımı, kromatografi uygulamalarında kullanılmaktadır (Hirano 1996; Spagna *et al.* 2001).

Kozmetik alanında; nemlendirici, saç ve cilt bakımı, banyo losyonu olarak kullanılmaktadır (Hirano 1996; Prashanth and Tharanathan 2007).

Atık su arıtımı alanında; metal iyonların, radyoaktif bileşiklerin ve boyaların uzaklaştırılması, koagülasyon ve flokülasyon uygulamalarında kullanılmaktadır (Felse and Panda 1999; Hirano 1996; No *et al.* 1996; Rinaudo 2006).

Ziraat alanında; bitki tohumu kaplaması, gübre yapımı, fungusit uygulamalarında kullanılmaktadır (Hirano 1996; Prashanth and Tharanathan 2007; Wu *et al.* 2005).

Kitinin deasetile edilmesi sonucu elde edilen veya bazı kaynaklardan direkt olarak elde edilmiş olan kitosanın, reaksiyona girme yeteneğinin kitine göre çok daha iyi olması, günümüzde kitosana olan ilgiyi arttırmıştır. Bunun sonucu olarak; kitosan stabilizatör, bağlayıcı, dağıtma ajanı, jelleştirici, kayganlaştırıcı, ilaç taşıma ajanı gibi birçok uygulama alanı bulmuştur (Özdemir 2014).

Kitosan, gıda kaynaklı patojenler de dahil birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakteriye karşı anti-mikrobiyal aktiviteye sahiptir. Ayrıca kitosanın serbest polimer formda bazı funguslara karşı anti-fungal etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Kitosanın bu antifungal aktivitesi; konsantrasyonuna, moleküler ağırlığına, kitosana eklenen fonksiyonel grupların türüne ve fungus türüne bağlı olabilmektedir (Jo *et al.* 2010; Renault *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010). Kitin ve kitosan ağır metallerin, boyaların adsorbsiyonu ve fiksasyonu için de kullanılmaktadır (Crini and Badot 2008). Ayrıca, su ve yağ bağlama kapasitelerinin yanında emülsifiye edici özellikleri de mevcuttur (Rabea *et al.* 2003). Tripolifosfat (TPP) gibi bir polianyonun sürekli olarak karıştırılması ve daha sonra kitosan çözeltisiyle muamele edilmesi sonucunda elde edilen kitosan nanopartikülü, ilaç iletimi ve gen terapisi gibi çok önemli ve kritik çalışmalarda kullanılmaktadır (Li *et al.* 2009; Qi and Xu 2004, 2006).

Tablo 3. Kitosanın Kullanım Alanları (İmamoğlu 2011)

Uygulama Alanları	Kullanımları
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı Gıda koruyucu Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi Yiyecek işlemede (örneğin şeker işleme) Filtreleme ve temizleme Hipokolestolemik madde (zayıflama maddesi) Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi
Ziraat	Bitki katkı maddesi Antimikrobiyal ve antifungal madde Bitki tohumu kaplanması Gübre yapımı İnsektisid ve nematositlerde
Medikal Alan	Hayvan ve insanlar için yara bandı yapımında Sargı bezi yapımında ve yara tedavisinde (yara tedavisini % 30 oranında hızlandırmaktadır.) Yanık tedavisinde acıyı dindirme ve iyileştirme etkisi Kanı pıhtılaştırıcı madde Hidrojel yapımı Antikoagülant ve antitrombojenik materyaller (sülfatlanmış-kitin türevleri olarak) Hemostatik madde Kontakt lens yapımı İlaç salımı
Kozmetik	Saç şekillendirici yapımı Cilt nemlendirmede (nemlendirici kremlerde) Antikolestrol ve yağ bağlayıcı olarak zayıflama maddesi Aftershave, deodorantlarda koku giderici madde
Biyoteknoloji	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
Su arıtımı	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon Atık sudaki metal iyonlarının uzaklaştırılması ve geri kazanımı

Kitin ve Kitosanin Biyolojik Aktiviteleri

Kitin ve kitosanın biyolojik özelliklerinin çoğu doğrudan fizikokimyasal özellikleri ile ilişkilidir. Bu fizikokimyasal özelliklere, deasetilasyon derecesi, moleküler kütle ve nem içeriği miktarı örnek verilebilir (Aranaz *et al.* 2009).

Kitin ve kitosan, antikanser, antiülser, antikolestrolemik, fungistatik, yara iyileştirici ajanlar, hemostatik, analjezik, antiasit, immunoadjuvan gibi çeşitli biyolojik özellikler göstermesinin yanı sıra patojenlere karşı da antibakteriyal, antifungal, antiviral özellikler göstermektedir (Casadidio *et al.* 2019; Struszczyk 2002).

Kitin ve kitosanın; maya, mantar, bakteri gibi mikroorganizmaların büyük bir kısmına karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca kitosan, gıda kaynaklı patojenler de dahil, hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Serbest polimer formunda kitosan, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifera* gibi funguslara karşı antifungal aktivite sergilemektedir. Kitosanın antifungal aktivitesi, konsantrasyonuna, moleküler ağırlığına ve fungus türünün yanı sıra kitosana eklenen fonksiyonel grupların türüne de bağlıdır (Casadidio *et al.* 2019; Jo *et al.* 2010; Muslim *et al.* ; Wang *et al.* 2010).

Kitin, kitosan ve onların oligomerleri üzerinde yapılan antikanserojenik çalışmaların çoğu, bu polimerlerin ağır metal kaynaklı genotoksisteyi inhibe ettiğini ve çeşitli kanser tümörlerine karşı büyüme inhibitörü ve antimetastatik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, kitosan oligosakkaritlerin (COS) tümör inhibitor etkisinin T hücre poliferasyonunu arttırması vasıtasıyla lenfosit sitokinlerinin başlatılması ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Basitçe ifade edilirse, COS'un antitümör mekanizması, T hücre aktivitesini sürdürmek ve sitotoksisteyi arttırmak için T hücre farklılaşmasını hızlandırarak edinilmiş bağışıklığı güçlendirmektedir (Akila 2014; Suzuki *et al.* 1986).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kitin, kitosan ve onların türevlerinin alkol, süperoksit, hidroksil gibi farklı oksijen radikal türlerini uzaklaştırabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Demetgül and Beyazit 2018; Je *et al.* 2004; Park *et al.* 2003).

Reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller, aerobik metabolizma sırasında vücutta doğal bir şekilde üretilmekte ve lipitlerin, proteinlerin, şekerlerin, sterollerin, nükleik asitlerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Yaşlanma sürecinde antioksidan savunma sistemlerinin zayıflaması, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla serbest radikallerin kontrolsüz bir şekilde oluşumu ve birikimi

kalp krizi, kanser, retina hasarı, diyabet gibi çok çeşitli patolojik duruma yol açan hücrel hasara neden oldukları için toksik etki göstermektedir.

Kitin, kitosan, askorbik asit, polifenoller, karotenoidler gibi antioksidan nutrasötikler, serbest radikaller ve ROS'un birikmesini önleyebilmekte ve yaşa bağlı hastalık riskini azaltarak oksidatif hasarı en aza indirmeye yardımcı olabilmektedir. Kitin ve kitosanın antioksidan özellikleri moleküler ağırlıklarına ve deasetilasyon derecelerine bağlı olarak değişebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın, yüksek moleküler ağırlıklı kitosana göre daha etkili antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Akila 2014).

Miura *et al.* (1995) tarafından ilk kez kitosanın antidiyabetik aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, %5 gıda karışımı olarak verilen kitosan, neonatal streptozotacin kaynaklı diyabetik farelerde ve normal farelerde tutarlı kan şekeri ve lipit düşürücü etkiler göstermiştir (Hayashi and Ito 2002; Miura *et al.* 1995).

Kitin ve kitosan, kesiklerin ya da yanıkların hızlı bir şekilde iyileşmesini sağlamak için yara bandı veya yara pansumanı yapımında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Benzer şekilde cilt ülserlerini iyileştirmede kullanılan ajanların, mide ülserleri ve mide mukozal yaralanmalarını önlemede etkili olabileceğinin bildirilmesi üzerine, kitin ve kitosanın da antiülser aktiviteler ve bazı koruyucu etkiler göstermesi beklenmiştir. Yapılan çalışmalarda, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın asitte daha iyi ve kolay çözünme özelliğinden dolayı daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Çözünmüş kitosanın antioksidan özelliğinden dolayı mide suyundaki pepsin ve H^+ 'yı nötralize edebileceği ayrıca ülserli bölgeyi kaplayarak koruyucu etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Akila and Priya 2012).

Literatür Araştırması

Kitin ve kitosan üzerine günümüze kadar birçok araştırma ve çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların kısa bir özeti aşağıda belirtilmiştir.

(Hang 1990) yaptıkları çalışmada, kitosanı, *Rhizopus oryzae*'den ikinci değerli ürün olarak başarıyla üretmişlerdir. Çünkü daha önce L (+) laktik asit yapmak için *oryzae* miselyasını kullanmışlardır. Ekstrakte edilebilir kitosanın en yüksek verimini 700 mg/L olarak elde etmişlerdir. Yine yapılan bu çalışmada; miselyum hasat zamanının, ekstrakte edilebilir kitosan verimi üzerinde derin bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Kitosan veriminin, fermentasyon süresi ile artış gösterdiğini gözlemlemişler ve 72 saatlik miselyal büyümeden sonra maksimum seviyeye ulaşmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca kültür ortamında, izole edilen kitosan miktarı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer koşullar altında, pirinç ortamında yetiştirilen *R. oryzae* miselyasının, mısır ortamında

yetiştirilenlerden daha fazla miktarda ekstrakte edilebilir kitosan üretmiş olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu araştırmanın bir diğer önemli sonucuda, *R. oryzae* kullanarak hem kitosanın hem de L (+) laktik asitin eş zamanlı bir şekilde üretilbilir olduğunu bildirilmesidir.

(Miyoshi *et al.* 1992) yaptıkları çalışmada; kitosan benzeri materyalleri, NaOH ve asetik asit ile beş farklı fungus hücresinden ekstrakte etmişlerdir. Verimin, biyokütlenin %1,2 ila %10,4 arasında değiştiğini saptamışlardır. Kolloidal titrasyon yöntemi ile ölçülen ekstraktların N-asetilasyon derecesinin, özgün türlere bağlı olarak önemli ölçüde değişmiş olduğunu belirtmişlerdir. IR (kızılötesi) ölçümleri ve Elson-Morgan yöntemi ile dört çeşit ekstraktı kitosan olarak karakterize etmişlerdir ve bir diğerinin bu özellikte olmadığını saptamışlardır. Fungal kitosanların N-asetilasyon derecesi ve Cu^{2+} adsorpsiyon kapasitesini ölçmüşlerdir ve bunları deniz kabuklularından elde edilen, çeşitli derecelerde N-asetilasyona sahip kitin ve kitosanla karşılaştırmışlardır. Fungal kitosanların Cu^{2+} adsorbsiyon kapasitesinin çeşitli kaynaklardan elde edilen, benzer N-asetilasyon derecelerine sahip kitosanların moleküler ağırlığından bağımsız bir şekilde daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

(Amorim *et al.* 2001) yaptıkları çalışmada, kitosan üretimini iki *Mucoralean* suşu olan, *Mucor racemosus* ve *Cunninghamella elegans* kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Kitosanı, YPD (Maya özütü Peptonlu Dekstroz) ortamında, *M. racemosus* ve *C. elegans*'ın miselyumundan farklı büyüme evrelerinde ekstrakte etmişlerdir. Her iki fungusta da kitosanı hızla üretilirken, en yüksek ekstrakte edilebilir kitosan verimini batık kültürde ekimden sonraki 24 saat içinde elde etmişlerdir. 24 saat içerisinde, *Mucor racemosus*'dan kuru miselyum ağırlığı olarak 35,1 mg /g kitosan verimi elde ederlerken, *Cunninghamella elegans*'dan kuru miselyum ağırlığı olarak 20,5 mg /g kitosan verimi elde etmişlerdir. *M. racemosus*'un kuru miselyumundan izole edilen kitosan veriminin *C. elegans*'tan elde edilene göre yaklaşık %40 daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Büyümenin sonunda, *C. elegans*'ın ve *M. racemosus*' un biyokütlesini (kuru ağırlık) sırasıyla 2,5 g/100 ml ve 1,5 g/100 ml olarak ölçmüşlerdir. Ancak, kitosan üretiminin daha fazla biyokütle ile artmadığını saptamışlardır. Kitosanın N-asetilasyon derecesi *M. racemosus*'ta %49 olarak *C. elegans*'ta %20 olarak tespit edilirken, D-glukozamin içeriği sırasıyla yaklaşık olarak %48 ve %90 olarak tespit edilmiştir.

(Wu *et al.* 2005) yaptıkları çalışmada; kitin materyalini, sırasıyla 15 ve 21 gün boyunca maya pepton dekstroz besiyerinde geliştirdikleri *Aspergillus niger* ve *Mucor rouxii*'nin miselyumundan ekstrakte etmişlerdir. Ekstrakte edilen materyalin saflık, asetilasyon derecesi ve kristallik durumlarını karakterize etmişlerdir. Ayrıca, antibakteriyel ve uyarıcı özelliklerini test etmişlerdir. *A. niger* miselyumunda belirlenen maksimum glukozamin seviyesini %11,10 dw (kuru ağırlık) ve *M. rouxii* miselyumundakini ise %20,13 dw olarak ölçmüşlerdir. Liyofilize

biyokütlenin kademeli olarak ekstraksiyonuna dayanarak, *M. rouxii* miselyasının hem kitin hem de kitosan içeriğine sahip olduğunu tespit ederlerken, *A. niger*'in sadece kitin içerdiğini tespit etmişlerdir. *A. niger* ve *M. rouxii*'nin ham kitin verimini sırasıyla %24,01 ve %13,25, *M. rouxii*'nin kitosan verimi ise %12,49 olarak ölçmüşlerdir. Glukanın önemli miktarlarının her iki türden kitin bileşikleriyle ilişkili olduğunu ve kullanılan ekstraksiyon yöntemiyle elimine edilemediğini bildirmişlerdir. Asetilasyon derecelerini sırasıyla *A. niger* ve *M. rouxii*'nin kitini için %76,53 ve %50,07 olarak, *M. rouxii*'nin kitosanı için %19,5 olarak belirlemişlerdir. Fungal kitin ve kitosanın kristalliliğinin, karides kabuklarından elde edilen materyallerle kıyaslandığında daha az yoğun olduğunu iddia etmişlerdir. Son olarak, üzerinde çalışılan tüm fungus kaynaklı kitin materyallerinin, hasat edilen elmalarda *Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum*'un neden olduğu lezyonları çok önemli ölçüde azaltmış olduğunu bildirmişlerdir.

(Jeihanipour *et al.* 2007) yaptıkları çalışmada, *Zygomycetes* mantarının hücre duvarının kitosan üretimi için alternatif bir kaynak olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, kitosan, filamentli fungus *Rhizopus oryzae*'nin hücre duvarından ekstrakte edilmiştir. Kitosanın antimikrobiyal özelliklerini, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* gibi üç tipik insan patojenine karşı incelemişlerdir. Bu bakterilerin canlılığının, çözeltilerde 200 ppm fungal kitosan mevcut olduğunda %60 oranından daha fazla azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, fungal kitosanının minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC); *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sırasıyla 300, 500 ve 700 ppm olarak saptanmıştır. Fungal kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin, yukarıda belirtilen bakteriler için 100 ppm'den daha az MBC'ye sahip olan kabuklu deniz canlılarındaki kitosandan daha düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, kabuklu deniz canlılarının kitosana benzer şekilde fungal kitosanın, gram-negatif bakterilere kıyasla gram-pozitif bakterilere karşı daha iyi inhibitör etki sergilediğini tespit etmişlerdir. Fungal kitosanın antimikrobiyal aktivitesi için olası mekanizmanın, hücrelerin dış zarının bozulması olabileceğini iddia etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, fungal kitosanın *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'e karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Ancak, kabuklu deniz canlılarında bulunan kitosanla kıyasladıkları zaman antimikrobiyal aktivitesinin daha az olduğunu saptamışlardır.

(Stamford *et al.* 2007) yaptıkları çalışmada, yeni bir ekonomik kültür ortamında geliştirdikleri *Cunninghamella elegans* tarafından kitin ve kitosan üretimi yapmak için, mikrobiyolojik süreçler kullanmışlardır. Testi, *C. elegans*'ın, 150 rpm'de bir orbital çalkalayıcıda 28°C'de inkübe edilen farklı büyüme zamanlarında (24, 48, 72 ve 96 saat) yam fasulyesi (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) ortamı kullanılarak büyümesini değerlendirmek için gerçekleştirmişlerdir. Liyofilize biyokütleyi gravimetri ile belirlemişlerdir. Polisakkaritleri

alkali-asit muamelesi ile ekstrakte etmişler ve kızılötesi spektroskopi, titrasyon ve viskozite ile karakterize etmişlerdir. *C. elegans*, yam fasulyesi ortamında yetiştirilmiş ve 96 saat içinde daha yüksek biyokütle verimi (24,3 g/ mL) üretmişlerdir. Yüksek seviyede kitosanı (66 mg/g) ve kitini (440 mg/g) sırasıyla büyümenin 48 ve 72 saatinde üretmişlerdir. Polisakkaritler, kitin için sırasıyla %6,2 ve 3,25x 10⁴ g/mol ve kitosan için %85 ve 2,72x 10⁴ g/mol olarak deasetilasyon derecesi ve viskozimetrik moleküler ağırlık gösterdiğini saptamışlardır. Elde ettikleri sonuçlar neticesinde, *C. elegans* tarafından kitin ve kitosan üretmek için kullanmış oldukları yam fasulyesinin yüksek biyoteknolojik potansiyel gösterdiğini bildirmişlerdir. Ek olarak, kitin ve kitosan üretimi için yam fasulyesi kullanılan yeni ortamın, fermantasyon süreçlerinin maliyetini azaltmak ve diğer birçok amaç için kullanılabilir olduğunu önermişlerdir.

(Di Mario *et al.* 2008) yaptıkları çalışmada, kitin materyalini yedi tür Basidiomycetes miselyumundan izole etmişlerdir. Kitinin saflığını, asetilasyon derecesini ve kristallliğini karakterize etmişlerdir. Kitin veriminin %8,5- %19,6 kuru ağırlık arasında değiştiğini saptamışlardır ve kitosan verimini yaklaşık %1 olarak tespit etmişlerdir. Fungal kitinlerin özelliklerinin ticari kitinlere benzer olduğunu belirtmişlerdir. Ticari kitosan ile karşılaştırılabilir düşük bir asetilasyon derecesine sahip olan kitosanların, fungal kitinlerin kimyasal deasetilasyonu ile elde edilmiş olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada, fungal büyüme 5 hafta boyunca izlenilmiş ve farklı fungus türlerinin büyüme oranının değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. En büyük biyokütlenin *Auricularia*'dan hasat edilmiş olduğunu, en düşük biyokütlenin ise *Lentinula*'dan elde edildiğini bildirmişlerdir. Verimin, *A. auricula-judae* ve *P. ostreatus*'tan elde edilen kuru ağırlığın %8,5 ila %19,6'sı arasında değiştiğini saptamışlardır. Fungal kitin örneklerinin saflığını değerlendirmek için glukozaminin miktarını, N-asetilglukozamini glukozamine dönüştüren kitinin asit hidrolizinden sonra belirlemiş olduklarını bildirmişlerdir. Bu konuyla ilgili mevcut bilgilere dayanarak çalışmanın sonucunda, *Basidiomycetes*'in miselyumunun iyi bir kitin kaynağı olarak kabul edilebilir olduğunu, sonradan deasetilasyon ile kitosan üretimi için kullanılabilir olduğunu ve kitosanın çeşitli pratik uygulamalar için yarar sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

(Wang *et al.* 2008) yaptıkları çalışmada, 5-10 kDa moleküler aralığındaki düşük molekül ağırlıklı kitosanı (lmw-kitosan) ilk olarak doğrudan *Absidia coerulea* miselyasından hazırlamışlardır. Lmw-kitosan üretimini iyileştirmek için, katı hal fermantasyon ortamını, substratı ve diğer bileşenleri LMW-kitosan üretimi üzerindeki etkisini araştırmak için optimize etmişlerdir. Katı hal fermantasyonunda, *A. coerulea*'dan LMW-kitosan üretmek için en iyi ortamın, 500 ml konik şişelerde, 1-1,5x 4-7 cm, 20 g patates parçaları, %1 üre, %1 süktroz, %0,10 MgSO₄.7H₂O, %0,15 K₂HPO₄, 20 ml su, doğal bir pH olarak belirtmişlerdir. LMW-

kitosanı, %2 NaOH ve %10 asetik asit ile yapılan işlemlerden sonra elde etmişlerdir. Maksimum LMW-kitosan üretimini 6,12 g / kg substrat olarak saptamışlardır. Lazer ışık saçılmasıyla kombine olan jel permeasyon kromatografisinin, M_w/M_n 1,09 değeri ile 6,4 kDa M_w sonucunu verdiğini bildirmişler. Ürünün; FT-IR, X-ışını kırınımı ve ^{13}C NMR spektrumları, standart kitosan ile aynı tipik tepe dağılımları gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmayla, geleneksel kitosan üretiminde oluşan güçlü alkali kirliliğinin azaltılabileceğini ve LMW-kitosan hazırlamanın iki adımlı yöntemlerin yerine yapılan bu tek adımlı yol ile avantaj sağlayacağını bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan bu yöntemle, *A. coerulea* miselyasından 5-10 kDa M_w ile LMW-kitosan hazırlanmasının, ticari olarak uygulanabilir olduğunu ifade etmişler ve doğrudan LMW-kitosan üretmek için yeni, basit ve temiz bir teknoloji sağlamış olduklarını bildirmişlerdir.

(Tayel *et al.* 2010) yaptıkları çalışmada, *Mucor rouxii* 'den dört fungal kitosan (CTS) türü hazırlamışlar ve bunların fiziko-kimyasal özellikleri incelemişlerdir. Kitosan tiplerinin antimikrobiyal aktivitesi, altı patojen de dahil olmak üzere 11 bakteri suşuna karşı araştırılmış ve en etkili tipin, en düşük viskozite ve moleküler ağırlık (sırasıyla 3,1 cP ve $2,1 \times 10^4$ Da) ile karakterize edilen, en yüksek deasetilasyon derecesine (%95) sahip ve nötr suda çözünebilme özelliği bulunan kitosan olduğunu belirlemişlerdir. Kitosanın antimikrobiyal etkisine karşı genellikle gram pozitif bakterilerin gram negatif suşlara göre daha duyarlı olduğunu bildirmişler ve bu etkinin özellikle çevresel büyüme koşullarıyla, yani inkübasyon sıcaklığı ve pH değerinden fazlasıyla etkilenebildiğini göstermişlerdir. Doğal bir alternatif olarak bakteriyel patojenlerin baskılanması için fungal kitosan uygulamalarının, riski azalttığını ve biyolojik olarak parçalanabilir biyosidal ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Özetle bu çalışmanın sonucunda, fungal kitosan uygulamalarının, patojen bakterilerin kontrolü için uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, özellikle düşük moleküler ağırlıklara ve yüksek deasetilasyon derecelerine sahip olan kitosanların; biyolojik olarak parçalanabilir olduğunu ve gıda endüstrisi, hijyenik tekstil, farmakoloji ve tıp alanlarında kullanılabilecek güvenli ajanlar olabileceğini önermişlerdir.

(Chhabra *et al.* 2014) gerçekleştirdikleri çalışmada, batık fermantasyondan doğal bir şekilde izole edilmiş olan *Aspergillus niger* 'den fungal kitosan üretimini incelemişlerdir. Kitosan veriminde etkili olan pH, sıcaklık ve azot kaynağı (maya özütü) gibi biyoproses değişkenlerinin etkisini batık fermantasyonda analiz etmişlerdir. Kitosan verimindeki (0,24 mg/ml) yaklaşık 10 kat artışı, 37 ° C'de 1 g maya özütü ve pH 4 ile elde etmişlerdir. Fungal kitosanın deasetilasyon derecesi ile ticari kitosanın deasetilasyon derecesi kıyaslandığı zaman; fungal kitosan için deasetilasyon derecesi %99,8 olarak tespit edilirken, ticari kitosan için bu

değer %81 olarak saptanmıştır. Fungal kitosanın fiziko-kimyasal özelliklerini daha kapsamlı bir şekilde tespit etmek amacıyla, DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) ve FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi) spektrometresi gibi analitik teknikler kullanmışlardır. FTIR analizi sonucunda, ekstrakte edilen fungal kitosanının ticari kitosan ile benzer bir bant profiline sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

(Yang *et al.* 2017) yaptıkları çalışmada, lignoselülozik prehidrolizat bakımından zengin ksilozun *Rhizopus oryzae* tarafından etkili bir şekilde fungal kitosan üretimi için kullanılabildiğini göstermişlerdir. 15 g/L ksiloz *R. oryzae* fermantasyonu için karbon kaynağı olarak kullanıldığı zaman, neredeyse tüm ksilozun hücre büyümesi için tüketilmiş olduğunu görmüşler (4,33 g/L biyokütle) ve kitosan ekstraksiyon verimini 0,11 g/g biyokütle olarak belirlemişlerdir. 30 g/L ksiloz ve 10 g/L glikoz içeren, seyreltik asit destekli buhar patlaması ön muamelesi ile mısır stover prehidrolizat, 72 saat boyunca *R. oryzae* tarafından fermente edilmiş ve bu çalışmanın sonucunda biyokütle ve kitosan ekstraksiyon verimini 10,96 g/L ve 0,09 g/g biyokütle olarak belirlemişlerdir. Doğal deniz kabuklularının dış iskeletinden (%87,25) ekstrakte edilen ticari kitosan ile mısır stover prehidrolizatından (%91,27) elde edilen fungal kitosanın deasetilasyon derecesi karşılaştırıldığı zaman, mısır stover prehidrolizatının deasetilasyon derecesinin daha yüksek olduğunu ve mısır stover prehidrolizatından (2,67 mPA-s) elde edilen fungal kitosanın viskozitesinin ticari kitosanla kıyaslandığı zaman büyük bir düşüşe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, ksilozla kıyaslandığı zaman glikozun çoğu mikroorganizma için daha uygun karbon kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak ksilozun *R. oryzae* tarafından fermente edilen kitosan preparatı için glikoza göre daha uygun olduğunu belirtmişlerdir.

(Abdel-Gawad *et al.* 2017) yaptıkları çalışmada, *Aspergillus niger* biyokütlesinden kitosan elde etmişlerdir. Çalışmada elde edilen kitosanı, farklı alkali deproteinizasyon koşulları altında incelemişlerdir. Ayrıca, zamanın; kitosan verimi, deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlık üzerindeki etkisinin değerlendirildiği Box-Benhenken deney tasarımı kullanmışlardır. Farklı fiziko-kimyasal özellikleri bulunan kitosanı, ekstraksiyon faktörlerinin farklı kombinasyonları altında elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada bildirilen en uygun uzlaşma, tahmin edilen değerlere uygun bir şekilde kitosanın; verimi (7,0 % (w/w), deasetilasyon derecesi (83,64%) ve moleküler ağırlığı ($2,70 \times 10^4$ Da) olarak saptanmıştır. Elde edilen kitosanın, iyi bir şekilde hidroksil radikallerini uzaklaştırdığını ve demir iyonlarını şelatlama yeteneğinin sırasıyla %82,40 ve %87,23'e ulaştığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda; fungal miselyadan elde edilen, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli uygulamalarda kullanım için uygun önemli fiziko-kimyasal özelliklere sahip kitosanın, umut verici bir kaynak

olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, fungal miselyadan kitosan eldesinin, kabuklu deniz ürünleri atıklarından elde edilenden daha kontrol edilebilir bir yol sağladığını belirtmişlerdir. Çalışmada istenen en uygun koşulları; 1 M NaOH, 100 °C ve 1 saat olarak belirlemişlerdir. Bu şartlar altında, kitosan verimini %7,0 (w/w), deasetilasyon derecesini %83,64 ve moleküler ağırlığını $2,70 \times 10^4$ Da olarak ölçmüşlerdir. Elde edilen sonuçlar neticesinde; fungal kitosanın, çeşitli endüstrilerde (ilaç, gıda vb.) emülgatör olarak ve bunun yanı sıra doğal bir antioksidan olarak güvenli bir şekilde kullanılabileceğini de bildirmişlerdir.

(Aili *et al.* 2019) yaptıkları bu çalışmada, *Penicillium camembertii* hücre duvarından kitin ve kitosan polisakkaritlerinin ekstraksiyonunu sağlamışlardır. Katı bir ortam üzerinde, miselyuma uygun özenle seçilmiş koşullar altında (kültür ortamında büyüme süresi 6 gün, YPGA medium ve pH=5) çalışmalarını yürütmüşlerdir. Sıcaklığı 20 °C ila 28 °C ye ayarlamışlar ve sıcaklığın kitin ve kitosan üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Biyokütleyi 20 °C'de 13 g/L ve 28 °C'de 11,6 g/L olarak ölçmüşlerdir. Dolayısıyla, artan sıcaklıkların biyokütleyi düşürdüğünü saptamışlardır. Test edilen tüm sıcaklıklar için, çözünmeyen alkali fraksiyonların (AIM) veriminin hemen hemen aynı olduğunu belirlemişlerdir. %2'lik asetik asit içerisinde fraksiyonların çözünürlüğünü incelediklerinde; çözünmeyen bir fraksiyon (AcIM) için maksimum verimi %18 olarak, çözünür fraksiyon (AcSM) için ise maksimum verimi %1 olarak belirlemişlerdir. AcIM fraksiyonlarının SEM mikrograflarının AIM fraksiyonlarına benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Bunların ticari kitinden farklı kompakt bir yapı göstermiş olduğunu belirtmişlerdir. YPGA ortamında kültürlen *Penicillium camemberti*'de kitin varlığını ATR spektroskopisi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmadaki deneysel testler sonucunda; Ascomycota hücre duvarının denizsel kaynaklı biyokütlenin aksine, karmaşık bir biyopolimer (kitin-glukanlar-kitosan) içerdiğini belirtmişlerdir. Katı kültürün eş zamanlı bir şekilde kitin ve kitosan ekstraksiyonu için kullanılan miselyumu, önemli miktarda üretmiş olduğunu bildirmişlerdir. Hem alkalın hem de asit ortamında çözünmeyen glukanların varlığını gözlemlemişlerdir. Mikroorganizmanın, 28°C'de maksimum kitin (18%) içerdiğini tespit etmişlerdir. Bunun aksine kitosan miktarının ise çok düşük kaldığını saptamışlardır.

(Kumar and Malik 2020) yaptıkları bu çalışmada morfolojik olarak farklı 18 fungus izolatu, 17 bakteri ve 3 aktinomiseti, toprak ve su örneklerinden izole etmişlerdir. Bu 38 suşun arasından 6 mantar izolatu, 2 bakteriyel izolat ve 1 aktinomisetin; gösterge olarak p-nitroasetanilid ile desteklenen kitin agar ortamında sarı renk üreterek olumlu sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın amacı olarak; kitinin kitosana dönüştürülmesinde kullanılan yöntemlere alternatif bir yol bulunması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda olumlu

sonuçlar veren mikroorganizmaların kitin deasetilaz üretimi gösterdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla kitinin kitosana dönüştürülmesinde bu mikroorganizmaların alternatif bir biyolojik yol olarak kullanılabileceklerini belirtmişlerdir.

(Habibi *et al.* 2020) yaptıkları çalışmada, *Aspergillus terreus*'un batık fermantasyonu yoluyla, tek karbon kaynağı olarak elma atık ekstraktı ortamını kullanarak kitosan üretimini araştırmışlardır. Yapılan denemelerde, 30 C sıcaklıkta, başlangıç pH 5,98 ve Amonyum Nitrat konsantrasyonu 5,0 g L⁻¹ olarak ayarlanan ortamda fungal biyokütlenin en yüksek kitosan verimini göstermiş olduğunu bildirmişlerdir. Optimum koşullarda üretilen kitosanı, FTIR (Fourier dönüşümlü kızılıtes), TGA (Termogravimetrik Analiz) ve DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) analizi ile karakterize etmişlerdir ve deasetilasyon derecesini %88,2 olarak saptamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda; yüksek biyokütle konsantrasyonuna ulaşılabilmesi için, ek bir azot kaynağı olarak amonyum nitrat eklenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, RSM (Yüzey sertlik testi) ile yapılan farklı testlerle; bu işlemi etkileyen diğer faktörler olarak sıcaklık, başlangıç pH'sı ve amonyum nitrat konsantrasyonunun önemini göstermişlerdir. Elma atık ekstresi zerindeki *A. terreus* retiminin, kitosan üretimi için evre dostu bir teknoloji olarak yüksek bir potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Tez çalışmasında kullanılan küf izolatları, Türkiye'nin çeşitli il ve ilçelerinden temin edilen toprak örneklerinden elde edildi.

Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Buzdolabı	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	ZHWY 2102C
Etüv	BINDER
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikroskop	BOECO
Otoklav	HMC Hirayama
Otomatik pipet	Eppendorf
PCR cihazı	Sensoquest Labcycler
PH metre	Mettler-Toledo
Saf su cihazı	MP Minipure
Santrifüj	Hettich
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
UV-Spektrofotometre	Beckman Coulter
Vortex	Wisemix VM-10
Fourier Transform İnfrared	The VERTEX 70v
Spektroskopisi (FT-IR) cihazı	

Deneyisel Çalışmalarda kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve besiyerleri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler: Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄, (Sigma)), Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄ (Sigma)), Magnezyum sülfat (MgSO₄.7H₂O (Sigma)), Demir II sülfat (FeSO₄.7H₂O (Sigma)), Sodyum Klorür (NaCl (Sigma)), Kalsiyum Klorür

(CaCl₂ (Sigma)), Hidroklorik asit (HCl (Sigma)), Sodyum hidroksit (NaOH (Sigma)), Sülfürik asit (H₂SO₄ (Sigma)), Etanol (C₂H₅OH (Sigma)).

Melas: Erzurum Şeker Fabrikası'ndan (Erzurum, Türkiye) temin edilmiş olan melas, hazırlanan özel besiyeri içerisine deney için belirlenen oranlarda ilave edilerek kullanıldı.

Küf izolasyonu için kullanılan %0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi: 9 g sodyum klorür (NaCl (Sigma)) 1000 ml distile suda çözündürülüp otoklavda steril edildi.

Seçilen küflerin yetiştirildiği melas agar besiyerinin hazırlanışı: 1000 ml için; 20 ml/L melas, 1g KH₂PO₄, 1g MgSO₄.7H₂O, 0,5g NaCl, 0,3g FeSO₄.7H₂O, 0,1g CaCl₂, 1g (NH₄)₂SO₄, 20g/L Agar manyetik karıştırıcıda homojen bir şekilde karıştırıldı. Daha sonra pH metre aracılığıyla pH 5 olarak ayarlandı. Elde edilen karışım otoklav ile steril edildi.

Seçilen küflerin yetiştirildiği melas sıvı besiyerinin hazırlanışı: 1000 ml için; 20ml/L melas, 1g KH₂PO₄, 1g MgSO₄.7H₂O, 0,5g NaCl, 0,3g FeSO₄.7H₂O, 0,1g CaCl₂, 1g (NH₄)₂SO₄ manyetik karıştırıcıda homojen bir şekilde karıştırıldı. Daha sonra pH metre aracılığıyla pH 5 olarak ayarlandı. Daha sonra sıvı besiyeri eşit bir şekilde erlenlere aktararak otoklav ile steril edildi ve küf ekimi için hazır hale getirildi,

Küfün moleküler analizi için kullanılan çözeltiler

2X CTAB Buffer: %2'lik CTAB çözeltisi, 1,4 M NaCl çözeltisi, 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH:8), 20 mM EDTA çözeltisi (pH:8), %1'lik PVP çözeltisi, %0,2'lik 2-mercaptoetanol çözeltileri hazırlandı ve kullanıldı.

50 mM, pH:8 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi: 1,46 g EDTA 90 ml distile suda çözündürüldü. pH 8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%70'lik Etanol: 70 ml EtOH, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

100 mM Kalsiyum Klorür (CaCl₂) Solüsyonu: 1,11 g CaCl₂ 100 ml distile suda çözündürüldü. Ardından ağzı pamukla kapatılarak otoklavda steril edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Amfisilin Solüsyonu: Solüsyon, distile su ile 20 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Ardından hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

X-Gal Solüsyonu: 40 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan çözelti -20°C'de ışık almayacak şekilde saklandı.

IPTG Solüsyonu: Solüsyon distile su ile 23,8 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Ardından hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu: 20 ml 50X TAE (Sigma) tamponu üzerine 980 ml distile su eklendi.

%1’lik agaroz jel hazırlanışı: 0,9g agaroz (Sigma) 90 ml 1X TAE’de çözdürüldü ve 2 µl Etidyum bromür (Sigma) eklendi.

DPPH serbest radikal giderme tayini ile ilgili çözeltiler

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH 100 mL etanol içerisinde çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile 12 saat boyunca karıştırıldı.

Yöntemler

Çalışma boyunca kullanılan tüm cam malzeme, pipet ve besiyerleri için otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilizasyon işlemi uygulandı.

Toprak örneklerinin toplanması

Türkiye’nin çeşitli il ve ilçelerinden toprak örnekleri temin edildi. Örnekler; Adana, Adıyaman, Afyon, Artvin-Yusufeli, Ağrı, Aydın, Ankara-Keçiören, Bursa, Bayburt-Kop dağı, Bilecek, Bingöl, Balıkesir, Elazığ, Erzincan, Erzurum-Ev saksı toprağı, Eskişehir, Erzurum-Yenişehir, Erzurum-Yıldızkent, Erzurum-Çat, Erzurum-Hınıs, Erzurum-Üniversite, Erzurum-İspir, Giresun, Gümüşhane-Limni gölü, Hatay, İstanbul, İzmir- Eski Foça, Kars, Konya, Kayseri, Malatya, Manisa, Niğde, Rize, Samsun, Sinop-Ayancık, Sivas, Trabzon-Yeşiltepe, Trabzon-Yavuz köyü, Trabzon-Yıldızlı, Trabzon-Maçka, Tokat, Van, Yozgat şehirlerinden temin edildi. Toprak örnekleri toprak yüzeyinden 10 cm aşağıdan olacak şekilde alınıp, örnek torbalarına doldurularak analiz için saklandı.



Şekil 4. Toprak örneği alınan yerler

Toprak örneklerinden küf izolasyonu

Farklı şehirlerden temin edilen toprak örneklerinden küf izolasyonu için; steril fizyolojik su ile 5 kat seyreltme işlemi uygulandı ve toprak örneğinin son seyreltme tüpünden 800 µl örnek alınarak daha önceden hazırlamış olduğumuz agar melas besiyerine ekim yapıldı. Daha sonra petriler 6 gün boyunca, 25°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından melas besiyerinde gelişen mikroorganizmalar morfolojik olarak incelendi ve küf olduğu düşünülenler saflaştırıldı. Daha sonra petriler 25°C’lik etüvde 6 gün inkübasyona bırakılarak kolonilerin gelişmesi sağlandı. Yeterli inkübasyondan sonra saf olan petrilerden yatık agara ekim yapılarak +4°C’de daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

Kitin üretme yetenekleri açısından izolatların taranması

Bu aşamada melas içeren sıvı besiyerinde küflerin kitin içerikleri analiz edildi. Bunun için, izole edilen küf strainler ilk önce yatık agarlarda geliştirildi. Geliştirilen yatık agarlara 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda 10’ar ml steril fizyolojik su (%0,9 NaCl) ilave edildi. Fizyolojik su ilave edilen yatık agarlar spor homojenizasyonu için 5 dk boyunca vorteks işlemine tabi tutuldu. Ardından her izolat için spor sayısı ml’de 10^{-6} olacak şekilde süspansiyon konsantrasyonu ayarlandı. Bu süspansiyonun daha sonra 1 ml’si üretim besiyerlerinin aşılmasında kullanıldı. Üretim besiyerlerine her izolat ilave edildi ve izolatlar 25°C ve 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 6 gün inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürler

santrifüj edilerek katı fraksiyon alındı. Ardından katı fraksiyondaki toplam kütle miktarı belirlendi. Daha sonra her izolatın toplam biyokütlesinden kitin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Maksimum miktarda kitin içeren izolat daha sonraki deneyler için seçildi ve bu izolatın 18s rRNA analizine göre identifikasyonu yapıldı.



Şekil 5. Sıvı besiyerinde gelişimi tamamlanan farklı küf örnekleri

Seçimi yapılan küf izolatının DNA izolasyonu ve klonlanması

Seçimi yapılan küfün tanımlanabilmesi için ilk olarak DNA izolasyonu, ardından da elde edilen DNA ile klonlanma işlemi yapılmalıdır.

Seçimi yapılan küften DNA izolasyonu yapılması

Kitin üretme yetenekleri açısından izolatların taranması sonucunda seçimi yapılan küf izolatından DNA izolasyonu için şu basamaklar takip edilmiştir:

İlk olarak daha önceden hazırlanan 2X CTAB tampon 65°C' ye alınarak ısıtıldı. Ardından elde edilen küf biyokütlesinden 50-70 mg alınarak havan içerisine konuldu ve üzerine sıvı nitrojen eklenerek toz haline gelene kadar iyice ezildi. Daha sonra 1,5 cc'lik ependorf tüpün içerisine toz haline getirilen küf biyokütlesi konuldu ve üzerine daha önceden ısıtılan 2X CTAB tamponundan 600 µl eklenerek homojen hale getirildi. Ardından, 62°C'de 30 dakika inkübe

edildi. İnkübasyonun sonunda tüpe 20 mg/mL proteinaz K'dan 1 µl eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpün içerisine 600 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) eklendi ve 10 dakika boyunca ters-düz edildi. 13,000 rpm'de 10 dakika boyunca, 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatanttan 300 µl alınarak yeni tüpe aktarıldı. Alınan süpernatant üzerine 2 µl RNase eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpe eşit hacimde 300 µl kloroform-izoamil alkol eklenerek 5 dakika boyunca ters-düz edildi. 13,000 rpm'de 10 dakika boyunca, 4°C'de santrifüj edildi süpernatanttan 250 µl alınarak yeni tüpe aktarıldı. Ardından, üzerine 180 µl soğuk izopropanol eklenerek birkaç kez ters-düz edildi ve 20°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 13,000 rpm'de 10 dakika boyunca, 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Geriye kalan DNA peletinin üzerine %70'lik 500 µl etanol ilave edildi ve 20 kez ters-düz edildi. Daha sonra 13,000 rpm'de 5 dakika boyunca, 4°C'de santrifüj edildi (2 kez). Etanol uzaklaştırıldı ve DNA peleti 37°C'de 30 dakika boyunca kurutuldu. DNA peleti 50 µl steril distile suda çözdürüldü ve 4°C'de 1 gece bekletildi.

İzole edilen DNA'nın PCR ve agaroz jel elektroforezi işlemleri

Küften izole edilen DNA, funguslarda filogenetik analiz için kullanılan ITS1- ITS4 primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Yapılan PCR işleminin basamakları ve kullanılan reaksiyon karışımı aşağıda verilen şekildedir:

Tablo 4. PCR Analizinde Kullanılan Reaksiyon Karışımları

REAKTİFLER	KULLANILAN MİKTARLAR (µl)
ddH ₂ O	12,1
PCR tamponu	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
(ITS1) P1	2,5
(ITS4) P2	2,5
Taq DNA pol.	0,3
DMSO	1,2
DNA	6

Tablo 5. PCR Programı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk)	DÖNGÜ
Ön denatürasyon	95	4	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	53	1	36
Uzama	72	2	36
Son uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	-

PCR işleminin gerçekleştirilmesiyle spesifik primerlerle hedef bölgeleri çoğaltılmış olan DNA, jel elektroforezi yöntemi kullanılarak yürütülmüştür. Bu yöntemin aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

İlk olarak 1-gram agaroz 100 ml 1X TBE içerisinde agaroz çözünene kadar ısıtıldı ve bu işlem 2-3 dakika mikrodalga fırın kullanılarak gerçekleştirildi. Agarozun iyice çözündürülmesinin ardından karışım soğumaya bırakıldı. Karışım soğuduktan sonra son karışım 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve tarakların yerleştirilmiş olduğu elektroforez tankına dökülerek donması beklenildi. Ardından elektroforez tankı uygun seviyeye kadar 1XTAE ile dolduruldu. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve jelin ilk kuyusuna 10 kb'lık DNA markırı(3µl) yüklenildi. Daha sonra örneklerin her biri için 1µl 6X yükleme tamponu ve 5µl ITS1-4 ürünü karıştırılarak geriye kalan kuyulara yüklenildi. Bu işlemlerin ardından elektroforez cihazı 90 volta ayarlanarak örnekler 45-60 dakika yürümeye tabi tutuldu. Yürüme süresinin sonunda DNA'nın görüntülenmesi için Quantum Vilber Lournat cihazı kullanıldı ve DNA bantları incelenerek not edildi.

Klonlama

Seçilen fungustan elde ettiğimiz DNA'nın PCR ve jel elektroforezi işlemlerinden sonra klonlama işlemi gerçekleştirildi. Klonlama işlemi birçok basamaktan oluşmaktadır bu basamaklar aşağıda verilen şekilde gerçekleştirildi.

Kompetent hücrenin hazırlanması

Kompetent hücre hazırlamak için ilk olarak *Escherichia coli* JM101 suşu stok kültürden alınarak canlandırıldı. Geliştirilen kültürden tek bir koloni seçilerek LB besiyerine aktarım gerçekleştirildi ve 37°C'ye ayarlanan çalkalayıcı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda gelişen kültürden 300 µl alınarak 2700 µl steril saf su ile seyreltilti. Daha sonra 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı (OD₆₀₀). Hazırlanan kültürden alınması gereken miktarın hesaplanması için aşağıda verilen denklem kullanıldı:

$$(30 \times 0,1) / (\text{Absorbans Değeri} \times 10)$$

Bu eşitlikte; 30= hazırlanacak miktarı (ml), 0,1= sabit değeri, 10= seyreltme faktörünü temsil etmektedir. Bu denklemin sonucunda çıkan rakam ml cinsinden alınması gereken kültürü vermektedir.

30 ml LB broth üzerine hesaplamadan çıkan değer kadar kültür eklenildi ve optik yoğunluk (600 nm’de) değerleri 0,4-0,5’e oluncaya kadar kültür 37°C’de 60-90 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından yeterli yoğunluğa ulaşan kültür 4 °C’de 4400 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

Hücre peletinin üzerine soğuk 100 mM CaCl₂ çözeltisinden 10 ml eklendi ve tüpe hafif bir şekilde vurularak çözünmesi sağlandı. Ardından 30-45 dakika buzda bekletildi.

Bekleme süresinin takibinde 4400 rpm 4°C’de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Elde edilen peletin üzerine soğuk 100 mM CaCl₂’den 2 ml eklenmesinin ardından hafifçe vurularak çözünmesi sağlandı ve buzdolabında 1 gece bekletildi.

Ligasyon işlemi:

Ligasyon basamağı, 0,2 ml’lik tüplerin içerisinde ligasyon karışımının bir araya getirilmesi ve 16°C’de 13-15 saat boyunca inkübasyona bırakılması aşamalarını içermektedir.

Tablo 6. Ligasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar

KULLANILAN KİMYASALLAR	MİKTARLAR (µl)
2X ligasyon tamponu	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA ligaz	1

Transformasyon işlemi

Transformasyon işlemi için daha önceden hazırladığımız ve buzdolabında bekletilen kompotent hücrelerden ependorf tüplere 200 µl ilave edildi. Ardından tüplerin üzerine 5’er µl ligasyon ürünü eklenerek 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Daha sonra buzda bekletilen örnekler 42°C’ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından ependorf tüplere 900 µl LB besiyeri eklenildi ve 37°C’de 1 saat 40 dakika bekletildi. Bekleme süresinde, oda sıcaklığında steril bir şekilde bekletilen ve içerisinde amfisilin bulunan katı besiyerlerine steril kabinde X-Gal ve IPTG’den 40’ar µl eklenilerek ekim için hazır hale

getirildi. İnkübasyon süresinin sonunda ligasyon ürünü ve kompetent hücre karışımını içeren örneklerden 150 µl alınarak ekim için hazırladığımız petrilere steril bir şekilde ekim yapıldı. Ardından drigalski yardımıyla karışım petriye iyice yayıldı. Daha sonra örnekler 37°C’de yaklaşık 14 saat boyunca inkübe edildi.

Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

14 saatlik inkübasyonun sonucunda petrilere mavi ve beyaz kolonilerin gelişmesi gözlemlendi. Elde edilen beyaz koloniler steril bir pipet yardımıyla alınıp, içinde 3 ml amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere aktarımı gerçekleştirildi. Ardından 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR için hazırlık ve koloni PCR işlemi

Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde inkübasyonu tamamlanan kültür içerisinde

4 µl alındı ve içerisinde 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı. Daha sonra tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi ve ardından 2 dakika buz üzerinde bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Isı şokunun ardından tüpler 12,000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatant kısım yeni tüplere aktarıldı ve PCR işlemine geçildi. PCR işlemi için hazırlanan karışım aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. Koloni PCR’da Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

BİLEŞENLER	MİKTARLAR (µl)
Süpernatant	3
Taq DNA polimeraz	0,3
MgCl ₂ ’li Tampon	3
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dH ₂ O	16,1
dNTP mix	0,6
DMSO	1,2
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
T7 Primer: 5’-AATACGACTCACTATAG-3’	
SP6 Primer: 5’- ATTTAGGTGACACTATAG-3’	

Tablo 8. Koloni PCR Programı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ
Ön denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	-

PCR işleminin tamamlanmasının ardından %1'lik agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan jele; istenen genin bulunduğu pozitif kontrol, istenen genin bulunmadığı negatif kontrol, markır ve PCR ürünü yüklendi. Ardından 90 voltta 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işleminin ardından jel görüntüleme sistemi yardımıyla bantlar görüntülendi. İstenilen aralıkta bant veren koloniler belirlendi ve plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth sıvı besiyerine inoküle işlemi gerçekleştirildi.

Plazmit İzolasyonu

Bu aşamada yapılan plazmit izolasyonu kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonu basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

İlk olarak 4 ml amfisilinli LB Broth besiyerinde geliştirilmiş olan kültürler 12,000 rpm'de 10 dk. olacak şekilde santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atılarak hücre peleti elde edildi. Daha sonra peletin üzerine 250 µl Cell Resuspension Solution eklendi ve pipetlenerek homojen bir şekilde karışması sağlandı. Ardından 250 µl Cell Lysis Solution eklendi. Alt-üst edilerek karışması sağlandı ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi. Ardından 10µl Alkaline Protease Solution ilave edildi. Alt-üst edilerek karışması sağlandı ve 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 350 µl Neutralization Solution ilave edildi. Alt-üst edilerek iyice karıştırıldı. 12,000-14,000 rpm'de oda sıcaklığında 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. 700µl- 750µl süpernatant, kolon yerleştirilmiş tüpe aktarıldı. 1dk. boyunca 12,000-14,000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj işlemi uygulandı. Alt kısma geçen sıvı uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 750µl etanol ilave edilmiş wash solution eklendi ve 1 dk boyunca oda sıcaklığında 12,000-14,000 rpm'de santrifüj işlemi uygulandı. Alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Tekrardan 250µl etanol ilave edilmiş wash solution eklendi ve yeniden 2 dk. boyunca oda sıcaklığında 12,000-14,000 rpm'de santrifüj işlemi uygulandı ve alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Ardından 1dk. boyunca 12,000-14,000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kolon yeni bir tüpün içerisine alındı ve kolonun üzerine 100 µl Nuclease-free water ilave edildi. 1dk. 12,000-14,000 rpm'de oda

sıcaklığında santrifüj edildi. Son aşamada kolon çıkarıldı ve uzaklaştırıldı. Daha sonra ölçüm yapılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Plazmitlerin kontrol edilmesi

Bu basamakta plazmitler *EcoRI* ile kesildi (7 µl plazmit, 2 µl 5X tampon, 0,5 µl enzim ve 0,5 µl su ile 37°C’de 3–12 saat) ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jelin görüntülenmesi sonucunda uygun bant ve plazmit görülerek işlem tamamlandı.

Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

Bu basamakta aşağıda verilen adımlar izlenilmiştir:

İlk olarak 998 µl saf su ve 2 µl plazmit karışımı spektrofotometrede OD₂₆₀ ile ölçüldü. Ardından $A_{260} \times 50$ (sabit) $\times 500$ (dilüsyon oranı) denklemi kullanılarak hesap yapıldı ve çıkan sonucun 100 – 200 ng aralığında olduğu teyit edildi. Son olarak 30 – 50 µl uygun konsantrasyondaki plazmit analiz için gönderilmeye hazırlandı.

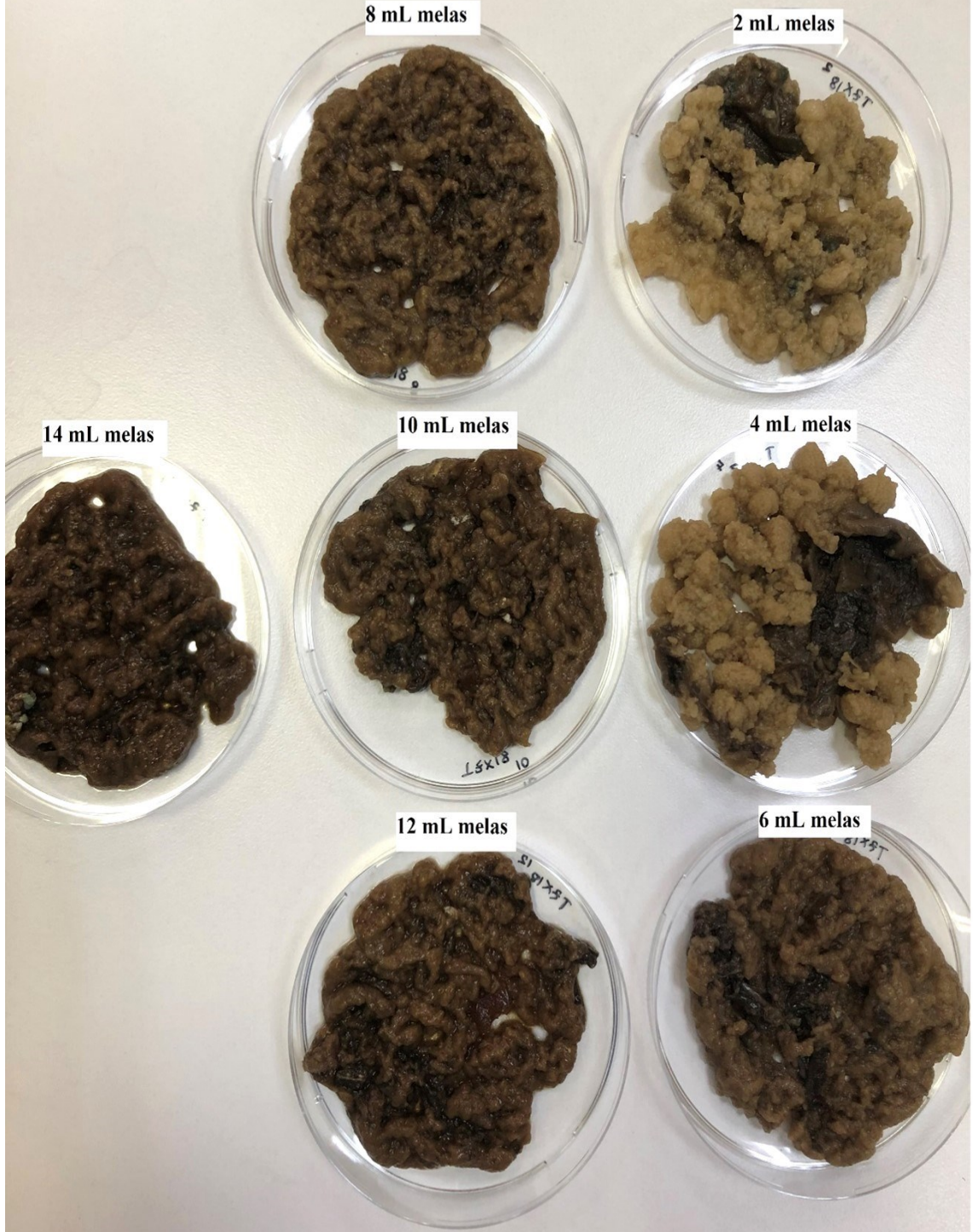
Seçimi yapılan küf izolatının optimizasyon çalışmaları

Bu aşamada üretim çalışmaları melas içeren sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Üretim sırasında maksimum kitin içeriği elde etmek için farklı pH’lar, farklı melas konsantrasyonları, farklı sıcaklıklar ve farklı inkübasyon süreleri test edilmiştir.

Optimal melas konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimal melas konsantrasyonunun belirlenmesi aşaması, seçimi yapılan izolatın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melas içerikli besiyerlerine aktarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla litrede 20 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml, 100 ml, 120 ml ve 140 ml melas konsantrasyonu içeren melaslı besiyeri hazırlanmıştır. Melas konsantrasyonu dışında tüm kimyasallar daha önce belirtilen oranlarda kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH’sı yine 5’ e ayarlanmıştır. Otoklav işlemi ile sterile edilen besiyerine izolat aktarılmıştır. Ardından 25°C’de 150 rpm’de 6 gün çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 6. günün sonunda kültürler santrifüj edilmiştir. Daha sonra, elde edilen katı fraksiyonlar 80°C’de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Kurutulmuş olan küflerin kitin içerikleri hesaplanmış ve sonuçlara göre uygun olan optimal melas konsantrasyonu belirlenmiştir.

100 mL için;

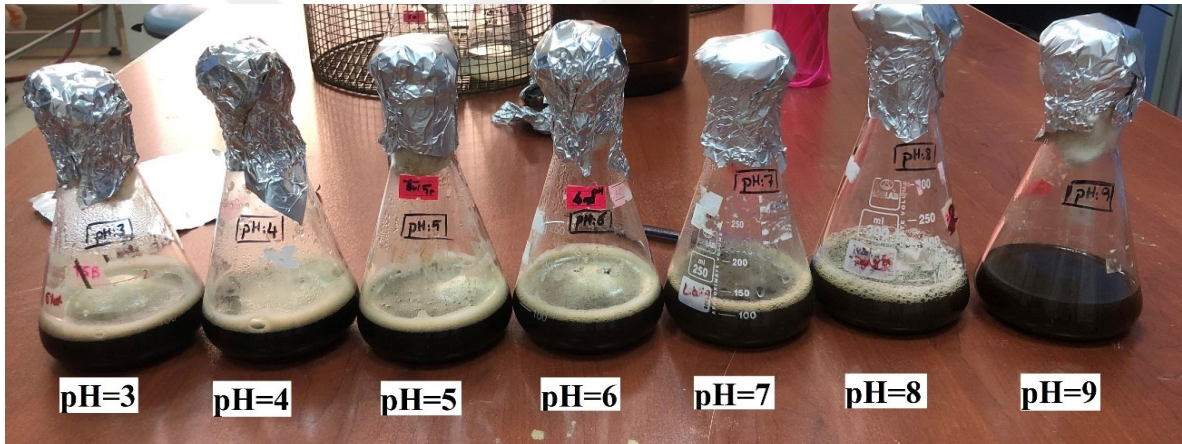


FARKLI MELAS KONSANTRASYONLARDA GELİŞTİRİLEN
KÜFLERİN KURUTULMADAN ÖNCEKİ GÖRÜNÜMLERİ

Şekil 6. Farklı melas konsantrasyonlarında geliştirilen küflerin kurutulmadan önceki görünüşleri

Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimal pH konsantrasyonunun belirlenmesi aşamasında, seçimi yapılan izolat farklı pH'lara sahip melas besiyerine aktararak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 7 farklı pH denemesi yapılmıştır ve daha önceden seçimi yapılmış, en uygun olan 120 ml/L'lik melas konsantrasyonu kullanılmıştır. Yine tüm kimyasallar daha önce belirtilen oranlarda kullanılmıştır. Optimal pH'nın tespit edilebilmesi amacıyla besiyerlerinin pH'ları sırasıyla 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerinin otoklav ile steril edilmesi aşamasından sonra izolat steril şartlarda besiyerlerine aktarılmıştır. Ardından 25°C'de 150 rpm'de 6 gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilen santrifüj işlemlerinden sonra elde edilen katı fraksiyonlar 80°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulmuş olan küflerin kitin içerikleri hesaplanmış ve optimal pH konsantrasyonu belirlenmiştir.



Şekil 7. Farklı pH konsantrasyonlarında hazırlanan melas besiyeri

Optimal sıcaklığın belirlenmesi

Optimal sıcaklığın belirlenmesi için melas konsantrasyonu 120 ml/L olan besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri içerisindeki tüm kimyasallar daha önce belirtilen oranlarda kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı 6'ya ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerlerinin otoklav ile steril edilmesi aşamasından sonra izolat steril şartlarda besiyerlerine aktarılmıştır. Hazırlanan besiyerleri sırasıyla 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 7. günün sonunda gerçekleştirilen santrifüj işlemlerinden sonra elde edilen katı fraksiyonlar 80 °C'de kurutulmuştur. Kurutulmuş olan küflerin kitin içerikleri hesaplanmış ve optimal sıcaklık belirlenmiştir.

Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi aşamasında melas konsantrasyonu 120ml/L olan besiyeri hazırlanmıştır. Tüm kimyasallar daha önce belirtilen oranlarda kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı 6'ya ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin otoklav ile sterile edilmesi aşamasından sonra izolat steril şartlarda besiyerlerine aktarılmıştır. Ardından 25°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sırasıyla 1. günün sonu, 2. günün sonu, 3. günün sonu, 4. günün sonu, 5. günün sonu, 6. günün sonu ve 7. günün sonu olacak şekilde gerçekleştirilen santrifüj işlemlerinden sonra küflerin kuru ağırlıkları hesaplanmıştır. Kurutulmuş olan küflerin kitin içerikleri hesaplanmış ve optimal inkübasyon süresi belirlenmiştir.

Fermentasyon parametrelerinin analizi

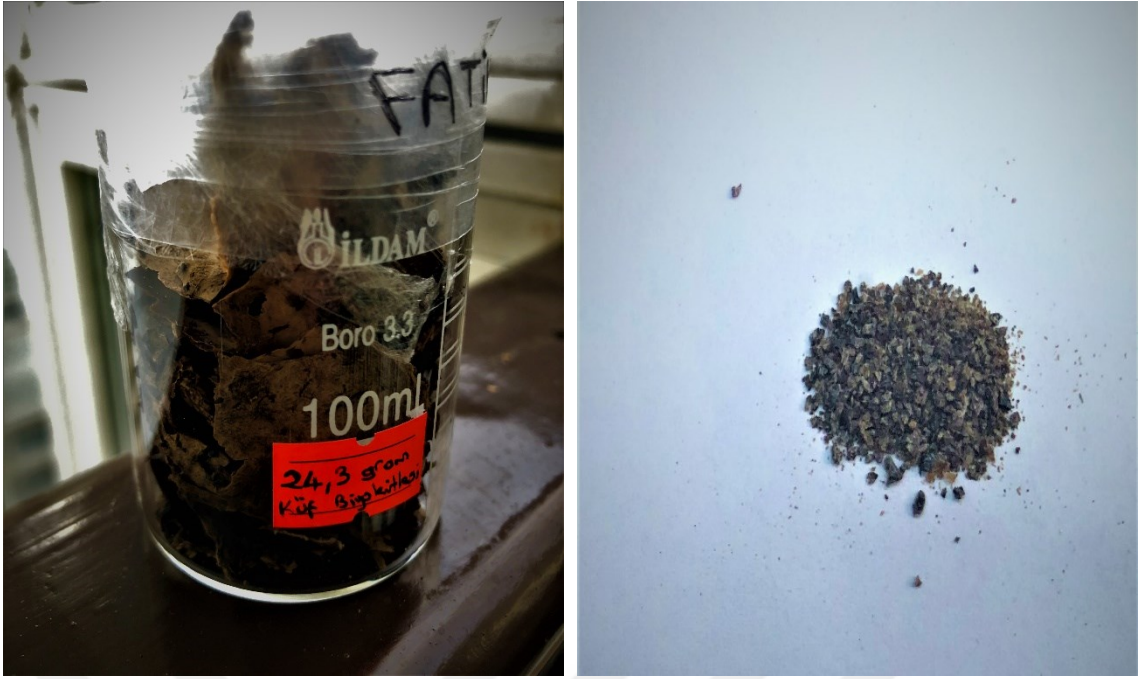
Çalışma boyunca fungal biyokütlenin belirlenmesi için kültürler, belirlenen optimal parametrelerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodunun sonunda kültürler santrifüj edilmiştir. Elde edilen katı fraksiyon (ıslak hücreler) kuru ağırlığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Bunun için de ıslak hücreler 80°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur.

Seçimi yapılan küften kitin ekstraksiyonu ve elde edilen kitinin kitosana dönüştürülmesi

Bu basamakta seçimi gerçekleştirilen küf izolatından kitin ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından elde edilen kitinin kitosana dönüşümü sağlandı. Bu işlemler aşağıda belirtilen adımlar takip edilerek yapıldı.

Kitin ekstraksiyonu için uygulanan işlemler

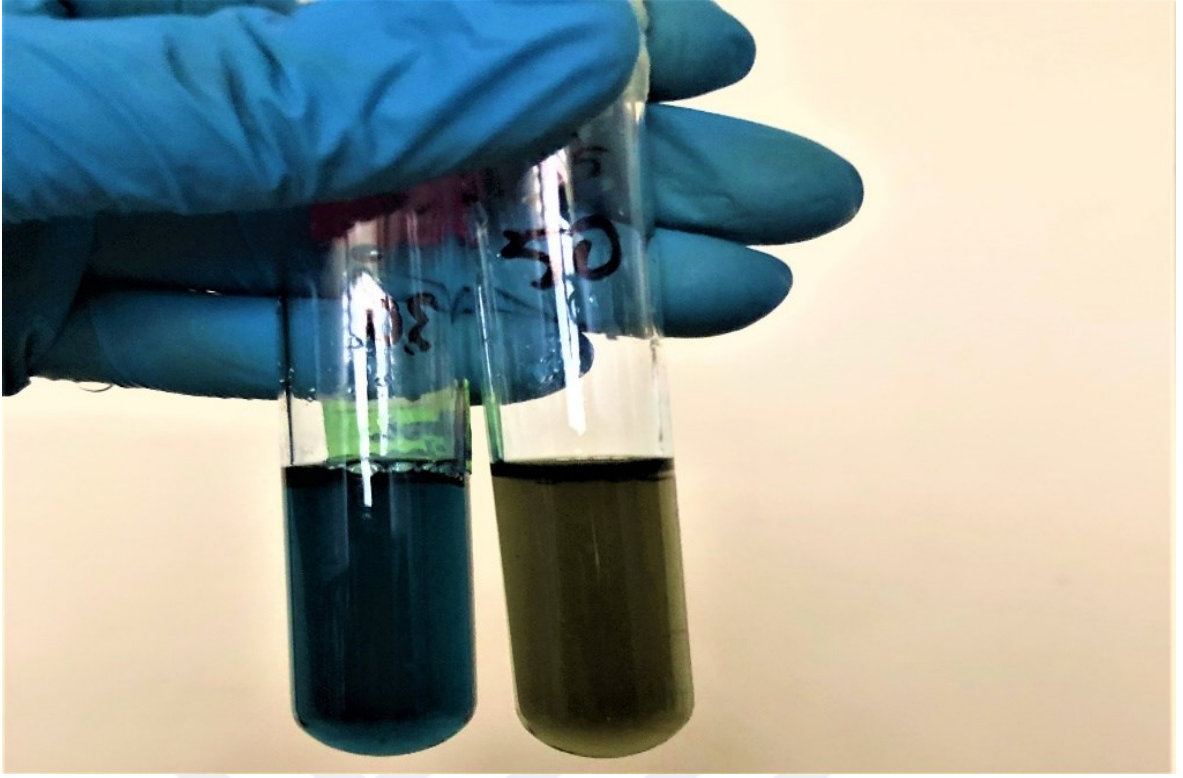
Bu aşamada sıvı melas besiyerinde gelişimi tamamlanmış olan küf örneği santrifüj edildi ve kurutma işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından elde edilen kurutulmuş hücreler parçalandı ve toz haline getirildi. Ardından aşağıda belirtilen yöntemlerle kitin ekstraksiyonu sağlandı.



Şekil 8. Kuru k f biyokütlesi ve toz haline getirilmiş görüntüsü

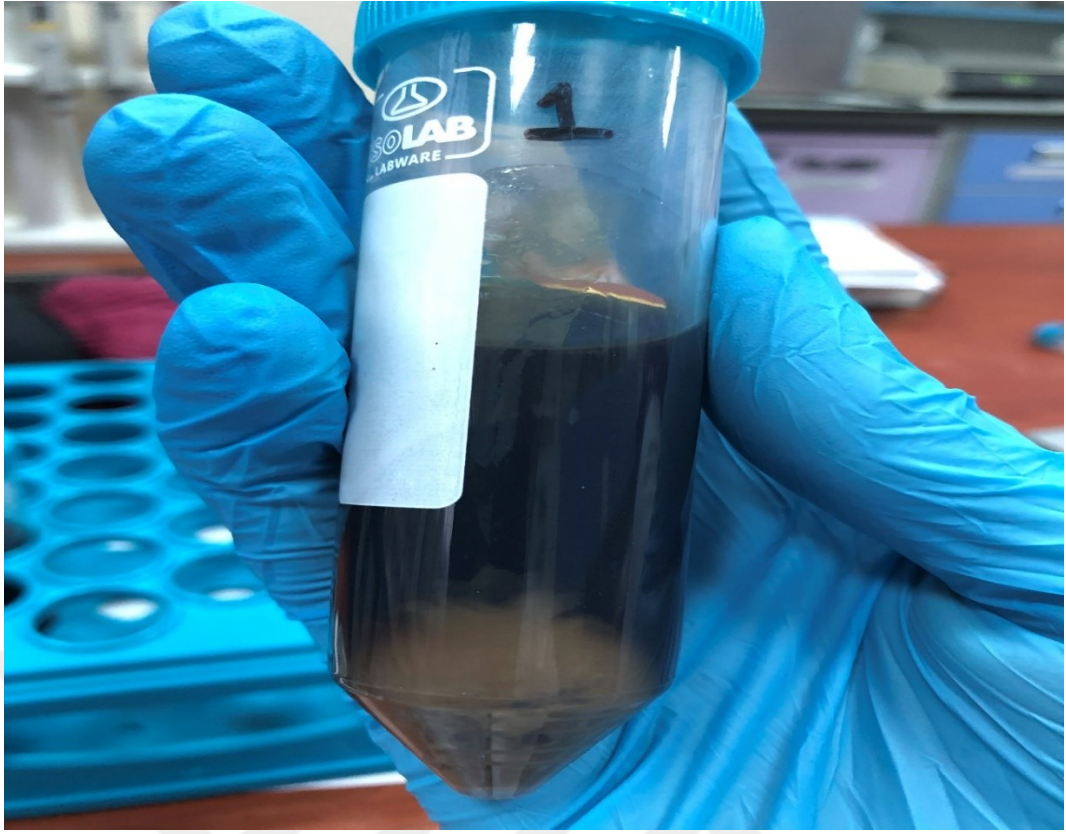
 lk olarak toz haline getirilmiş kuru k f biyokütlesi 1M NaOH ile 90 C’de 2 saat muamele edildi. Bu basamakta proteinlerin giderilmesi amaçlandı. Ardından 9000 g’de 20dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.

Süpernatant kısmın protein içeriğine sahip olduğunu teyit etmek amaçıyla Bradford yöntemi uygulandı ve deproteinizasyon işlemi teyit edilmiş oldu.



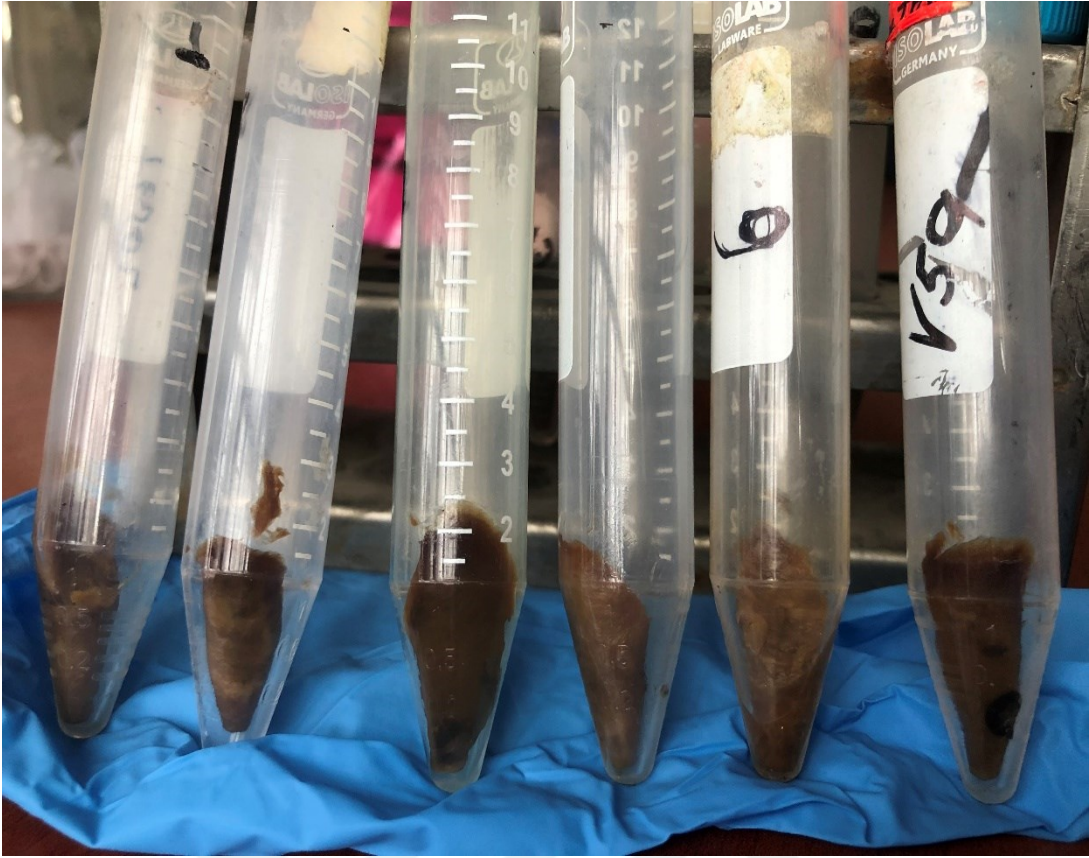
Şekil 9. Bradford ile protein tayini

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan peletin bazikliğini gidermek amacıyla saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem pH 7 olana kadar devam ettirildi. Nötralize edilen kısım 1 gün boyunca 60°C’de kurumaya bırakıldı. Bu sayede uzaklaştırılan protein ve elde kalan alkali çözünmeyen materyalin (AIM) miktarı hesaplandı.



Şekil 10. Alkali çözünmeyen materyalin santrifüj ile çöktürülmesi

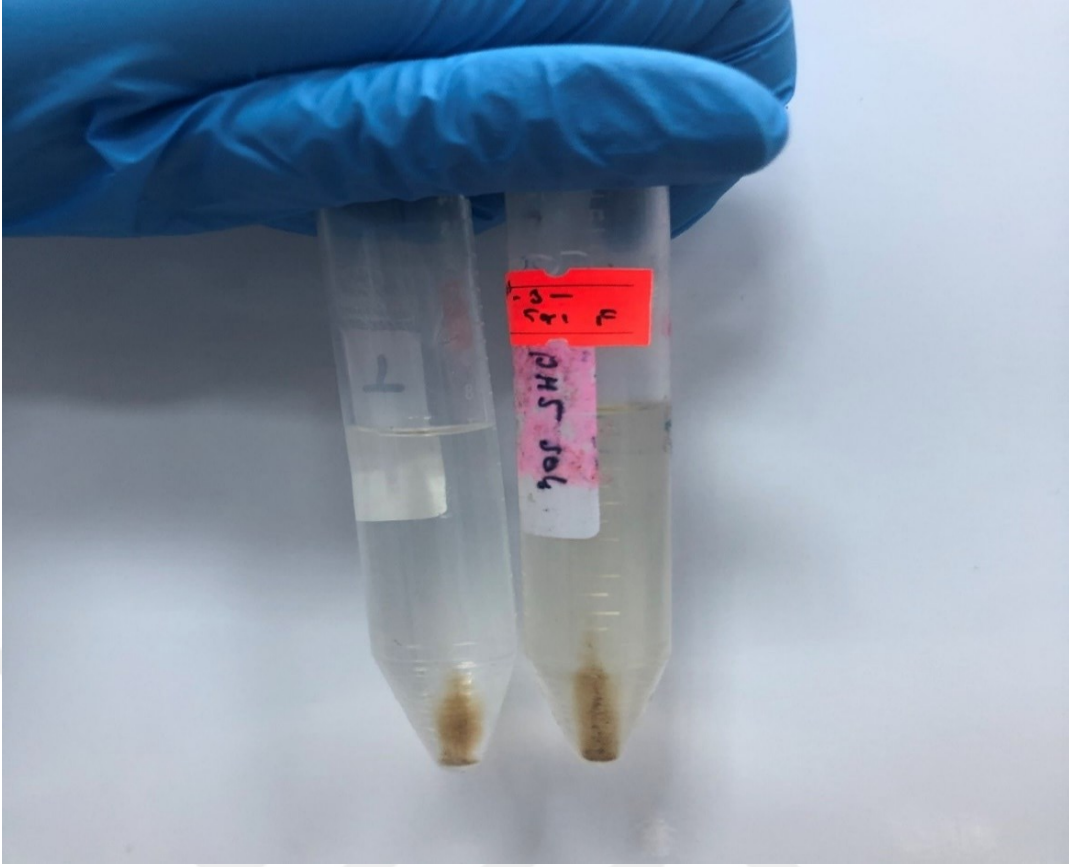
Daha sonra AIM, içerisinde bulunan fosfat gruplarının uzaklaştırılması amacıyla Sülfirik asitle (0,1 N, 100 mL/g-AIM) oda sıcaklığında 30dk muamele edildi. Ardından 4000 g’de 10 dk santrifüj işlemi uygulandı ve içerisinde fosfat gruplarının bulunduğu süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken kısım, asitliğinin giderilmesi amacıyla pH 7 olana kadar NaOH ile yıkamaya tabi tutuldu. Nötralize edilen katı kısım (AIM) içerisinde bulunan kitin ve kitosanın miktarının belirlenebilmesi amacıyla; katı kısım %5’lik asetik asit (1:40) çözeltisiyle 95°C’de 8 saat muamele edildi. Bu muamele sonucunda kitin ve kitosan birbirinden ayrıldı. Elde edilen karışım 9000 g’ de 20 dk santrifüj edildi. Çöken kısım asitte çözünmediğinden dolayı kitin içeriğine sahip iken, içerisinde kitosanın mevcut olduğu düşünülen süpernatant kısım ayrı bir tüpe alındı. Elde edilen katı kısmın asitliğinin giderilmesi için saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve bu işlem pH 7 oluncaya kadar devam ettirildi. Ardından etanol (10:1) ile 3 kez olacak şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra aseton (10:1) ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen kısım 60°C’de kurutuldu.



Şekil 11. Elde edilen kitinin kurutulmadan önceki görünüşleri

Diğer tüpe aldığımız ve içerisinde kitosan içeriği mevcut olduğunu düşündüğümüz süpernatant kısım 2M NaOH ile 20°C’de pH=10’ da çöktürülme işlemine tabii tutuldu. Elde edilen karışım 9000 g’ de 20dk. santrifüj edildi. Bu aşamada çöken kısım kitosanı oluştururken, içerisinde sodyum asetat bulunan süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Elde edilen katı kısım saf su ile pH 7 olana kadar yıkandı. Ardından etanol (20:1) ile 3 kez yıkandı. Son olarak aseton (20:1) ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen kısım kurumaya alındı (Koçer 2015).

Yapılan bu çalışmanın sonucunda TZ18 kodlu fungusun, beklenildiği şekilde yüksek kitin içeriğine sahip olduğu tespit edildi. Kitin içeriğinin yanısıra çok düşük miktarda kitosan içeriğine de sahip olduğuda tespit edildi. Ancak kitosan miktarının çok düşük olması nedeniyle kitosanı direkt olarak elde etmek yerine fungusta bulunan yüksek miktardaki kitinin kimyasal yolla kitosana dönüştürülmesi işlemi ana hedef olarak belirlendi.



Şekil 12. Az miktarda elde edilen kitosanın görünümü

Elde edilen kitinin kitosana dönüştürülmesi işlemi

TZ18 kodlu *Penicillium crustosum*'dan elde edilen kitinin kimyasal yolla deasetilasyon işlemi için ilk olarak %50 (w/v) NaOH çözeltisi hazırlandı. Ardından elde edilen kitinin üzerine 1:10 (katı: çözücü) oranında hazırlanmış olan %50 (w/v) NaOH çözeltisi ilave edildi. Daha sonra elde edilen karışım 100°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi içerisinde ara sıra ters düz edilerek NaOH' in tüm alanlara daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Inkübasyon süresinin sonunda elde edilen karışım süzüldü. Süzme işlemi boyunca katı kısım distile su ile yıkanarak pH'nın nötr hale gelmesi sağlandı. Süzme işleminden sonra elde edilen katı kısmın 60 °C'de bir gün boyunca kurutulması sağlandı. Elde edilen kitosan toz haline getirildi ve daha sonra gerçekleştirilecek analiz işlemleri için uygun şartlarda saklandı.

Elde edilen kitosanın kimyasal karakterizasyonu

Elde edilen kitosanın kimyasal gruplarının belirlenmesi için Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi yapılmıştır.

Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile kitosan örneklerinin fonksiyonel gruplarının analizi

FT-IR analizi, The VERTEX 70v FT-IR Spektrometre cihazı kullanılarak, Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler elmas kristalinin kullanıldığı ATR (azalan tam yansıma) metodu kullanılarak yapılmıştır.

Ticari kitosan (TK) ve *Penicillium* kitosan (PK)' ın fonksiyonel grupları, Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile analiz edildi. Bunun için kitosan örneklerinin 3 miligramı ve Potasyum bromür (KBr)' ün 5 gramı 12 saat sırasıyla 60 ° C ve 120 ° C'de 12 saat boyunca düşük basınç altında kurutuldu. Kurutulan her kitosan numunesi 100 mg KBr ile homojenize edildi ve ardından yaklaşık 0,2 mm kalınlığında çok ince diskler oluşturmak için sıkıştırıldı. Daha sonra numunelerin FT-IR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ aralığında incelenmiştir. Referans olarak bir KBr diski kullanılmıştır.

PK ve TK için deasetilasyon derecesi (DD), Sabnis ve Block' un aşağıdaki denklemine göre belirlendi.

$$DD (\%) = 97,67 - [26,486 \times (A_{1655}/A_{3450})]$$

A₁₆₅₅; 1655 cm⁻¹ 'deki amid-I bandının absorbansıdır. A₃₄₅₀; kitosan için standart olarak tanımlanan hidroksil bandının 3450 cm⁻¹ 'indeki absorbansıdır (Sabnis Block 1997).

Hazırlanan kitosan örneğinin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi

Penicillium crustosum 'dan elde edilen kitinin kimyasal yolla kitosana dönüştürülmesi işlemi sonucunda elde edilen kitosanın, antimikrobiyal aktivite tayininde disk difüzyon testi kullanılmıştır. Bu test için 2-gram negatif ve 2-gram pozitif bakteri suşu; *Escherichia coli* (Gram negatif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negatif), *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif), *Listeria monocytogenes* (Gram pozitif) ve antifungal aktiviteyi incelemek amacıyla *Candida albicans* mayası dahil olmak üzere toplam 5 adet mikroorganizma kullanıldı. Deneyin ilk aşamasında TSA besiyerinde geliştirilen bakteriler, TSB sıvı besiyerine alındı ve bir gece inkübasyona bırakıldı. *Candida albicans* 'ı geliştirmek için ise, PDA (Potato Dextrose agar) besiyeri kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda OD ölçümü işlemi yapılarak OD₆₀₀: 0,4 olacak şekilde fizyolojik su ile süspanse edilerek solüsyondan 100'er µl alındı ve petrilere aktarım işlemi sağlandı. Ardından drilgalski yardımıyla petrilere tüm yüzeyine tamamen yayılarak dağıtıldı. Daha sonra besiyerlerinin üzerine boş diskler steril bir şekilde yerleştirildi. Bu işlemin sonrasında kimyasal yolla elde edilen kitosan ve ticari kitosan 5 mg/ml, 10 mg/ml ve 20 mg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Takibinde petrilere yerleştirilen disklerle

emdirme işlemi sağlandı. Ardından petriler, madde ilavesinden sonra bakteri için 24 saat ve maya için ise 24-48 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları incelenmiştir.

Hazırlanan kitosan örneğinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi

DPPH radikal giderme aktivitesi ölçümü Blois yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi(Blois 1958). Serbest radikal olarak DPPH’ın 0,1 mM’lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak önceden hazırlanan 0,25, 0,50, 0,75, 1 mg/mL derişimlerdeki stok çözeltiiler kullanıldı. Deney tüplerine farklı derişimlerde ayarlanan stok çözeltiilerden 1 mL eklendi. Sonra her tüpe stok DPPH çözeltisinden 1 mL ilave edildi ve toplam hacimlerini 4 mL’ye tamamlamak için etanol kullanıldı. Vortex ile tüplerin iyice karışması sağlandı. Kontrol olarak kullanılacak tüplere 1 mL DPPH çözeltisi, 1 mL asetik asit çözeltisi ve 2 mL etanol konuldu. Kör olarak etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletildi. Sonra köre karşı 517 nm’de absorbans değeri ölçüldü.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Melasın Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi

Melasın kimyasal içeriğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, melasın içeriğinde 457 g/L şeker ve 76,1 g/L protein olduğu belirlenmiştir.

Topraktan Küf İzolasyonu

Çeşitli illerden alınan toprak örneklerinden, birbirinden farklı saf küf izolatları elde edilmiştir. Bu küf izolatlarının gerekli analizleri yapılmış ve yüksek verimde kitin üretimi için en uygun olan küf izolatı seçilmiştir.



Şekil 13. Elde edilen farklı tür küfler ve seçilen TZ18 kodlu küf izolatı

Kitin Verimine Göre Uygun Küf İzolatının Seçimi

Saflaştırılmış olan küf izolatlarının içerisinde çalışma için uygun olduğu düşünülen küf izolatlarının kitin içeriği analiz edilmiş ve bizim için en iyi sonucu veren izolat kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda kuru küf biyokütlesiyle de bağlantılı olacak şekilde en ideal kitin içeriğine sahip olan küf izolatının TZ18 kodlu küf olduğu belirlenmiştir.

Tablo 9. Çeşitli Küf İzolatlarının Biyokütleleri ve Kitin İçerikleri

KÜF ÖRNEKLERİ	HÜCRE AĞIRLIĞI(KURU)(g/L)	KİTİN MİKTARI(g)
TZ1	3	0,75
TZ2	8	2,16
TZ3	7,5	1,95
TZ4	5,7	1,48
TZ5	4,2	1,16
TZ6	5,7	1,59
TZ7	7,6	2,11
TZ8	3	0,75
TZ9	8,2	2,21
TZ10	8,7	2,35
TZ11	8,4	2,18
TZ12	6	1,51
TZ13	10,9	2,82
TZ14	9	2,35
TZ15	4,1	1,12
TZ16	7,6	2,05
TZ17	7,2	1,92
TZ18	12,4	3,28
TZ19	2,7	0,85

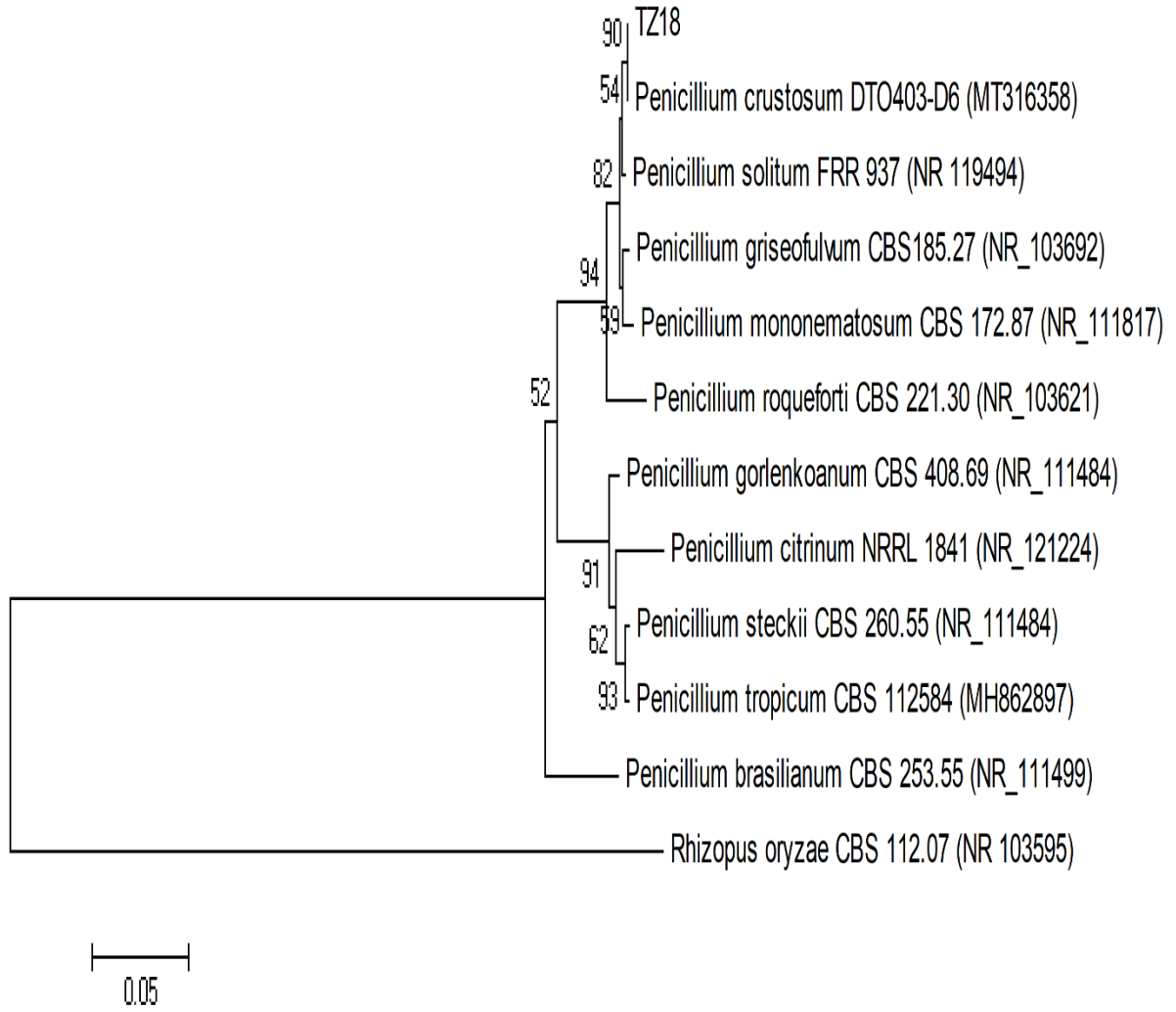
KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 25°C; pH:5; İnkübasyon süresi: 6 gün; Melas konsantrasyonu: 20 mL/L

Seçimi yapılan küf izolatı kırmızı renk ile belirtilmiştir.

Sekans Analiz Sonuçları

Macrogen firması tarafından analiz edilen 18S rRNA sekans verileri sonucu NCBI'dan elde edilen benzerliğe göre izolatımızın türü *Penicillium crustosum* (Gen Bank) olarak belirlenmiştir.

Organizmanın filogenetik ağacı Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. *Penicillium crustosum* izolatının filogenetik ağacı

Seçilen Küf İzolatı

Tüm farklı küf izolatlarının kitin içeriği bakımından analiz edilmesi sonucunda en fazla verim alınan TZ18 kodlu *Penicillium crustosum*' un petrideki görüntüsü Şekil 15'de belirtilmiştir. Çalışma boyunca, seçilen bu izolat ile araştırmalar ve analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 15. Seçimi yapılan TZ18 kodlu küf izolatı (*Penicillium crustosum*)

Optimizasyon Denemeleri

Elde edilen küf izolatının optimal şartlarının belirlenerek maksimum kazanç sağlanması açısından aşağıda belirtilen parametrelerde analizler yapılmıştır.

Kitin Üretimi İçin Optimal Melas Konsantrasyonunun Belirlemesi

İzolat için farklı melas konsantrasyonları denenerek optimal melas konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu aşamada 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ml/L melas konsantrasyonları pH=5

olacak şekilde denenmiştir. Yapılan analiz sonucunda en iyi verimin elde edildiği 120 ml/L olan melas konsantrasyonu seçilmiştir.

Tablo 10. İzolatın Melas Konsantrasyonuna Göre Optimal Şartlarının Belirlenmesi

KÜF İZOLATI	MELAS KONSANTRASYONU (ml/L)	KURU AĞIRLIK (g/L)	KİTİN MİKTARI (g)
<i>Penicillium crustosum</i>	20	12,9	3,54
	40	18,5	5,11
	60	19,5	5,16
	80	20,4	5,40
	100	23	6,09
	120	26,1	6,91
	140	24	6,28
KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 25°C; pH:5; İnkübasyon süresi: 6 gün			
Seçimi yapılan melas konsantrasyonu kırmızı renkle belirtilmiştir			

Kitin Üretimi İçin Optimal pH Belirlenmesi

İzolatın optimal pH konsantrasyonun belirlenmesi aşamasında pH konsantrasyonu 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 olacak şekilde ayarlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda en iyi verimin elde edildiği pH konsantrasyonunun pH=6 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 11. İzolatın pH Konsantrasyonuna Göre Optimal Şartlarının Belirlenmesi

KÜF İZOLATI	pH KONSANTRASYONU	KURU AĞIRLIK (g/L)	KİTİN MİKTARI (g)
<i>Penicillium crustosum</i>	3	0,5	0,13
	4	22,1	5,85
	5	26,7	7,07
	6	28,9	7,64
	7	25,3	6,70
	8	23,3	6,17
	9	21,8	5,77
KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 25°C; İnkübasyon süresi: 6 gün; Melas konsantrasyonu: 120 mL/L			
Seçimi yapılan pH konsantrasyonu kırmızı renk ile belirtilmiştir			

Kitin Üretimi İçin Optimal Sıcaklığın Belirlenmesi

İzolat için farklı sıcaklıklarda denenerek optimal sıcaklığı belirlenmiştir. Bu aşamada sıcaklıklar 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C olacak şekilde pH=6' da denenmiştir. Yapılan analiz sonucunda en iyi verimin elde edildiği sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 12. İzolatın Farklı Sıcaklıklara Göre Optimal Sıcaklığının Belirlenmesi

KÜF İZOLATI	SICAKLIK (°C)	KURU AĞIRLIK(g/L)	KİTİN MİKTARI(g)
<i>Penicillium crustosum</i>	5	8,43	2,23
	10	23,8	6,30
	15	25,6	6,78
	20	27,4	7,26
	25	29	7,71
	30	25,9	6,86
	35	14,7	3,89

KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm; pH:6; İnkübasyon süresi: 6 gün; Melas konsantrasyonu: 120 mL/L

Seçimi yapılan sıcaklık kırmızı renk ile belirtilmiştir

Kitin Üretimi İçin Optimal İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

İzolat için farklı inkübasyon sürelerinde optimal inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu aşamada inkübasyon süreleri 1. günün sonu, 2. günün sonu, 3. günün sonu, 4. günün sonu, 5. günün sonu, 6. günün sonu, 7. günün sonu olacak şekilde pH=6' da denenmiştir. Yapılan analiz sonucunda en iyi verimin elde edildiği inkübasyon süresi 5. günün sonu olarak belirlenmiştir.

Tablo 13. İzolatın Farklı İnkübasyon Sürelerine Göre Optimal İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

KÜF İZOLATI	İNKÜBASYON SÜRESİ(Gün)	KURU AĞIRLIK(g/L)	KİTİN MİKTARI(g)
<i>Penicillium crustosum</i>	1	10,2	2,70
	2	24,7	6,54
	3	25,9	6,86
	4	27,5	7,28
	5	29,5	7,79
	6	28,8	7,58
	7	26,3	6,96

KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm; Sıcaklık: 25°C; pH:6; Melas konsantrasyonu: 120 mL/L

Seçimi yapılan inkübasyon süresi kırmızı renk ile belirtilmiştir

Fermentasyon Parametrelerinin Analizi

Tablo 14. İzolat İçin Belirlenen Tüm Optimal Parametrelerin Denenmesi

KÜF İZOLATI	MELAS KONSANTRASYONU (ml/L)	pH KONSANTRASYONU	SICAKLIK (°C)	İNKÜBASYON SÜRESİ(Gün)	KURU AĞIRLIK(g/L)	KİTİN MİKTARI(g)
Penicillium crustosum	120 mL	6	25	5	29,7	7,87
KÜLTÜR KOŞULLARI; Çalkalama hızı: 150 rpm						

Kitin Ekstraksiyon İşlemi

Penicillium crustosum'dan kitin ekstraksiyonu işlemi için uygulanan kimyasal deasetilasyon yöntemiyle yüksek seviyede kitin içeriğine ulaşıldı. Ayrıca, *Penicillium crustosum*' da çok düşük miktarda kitosan içeriğinin de mevcut olduğu tespit edilmiştir. Toz haline getirilmiş 10 gramlık kuru küf biyokütlesinden 2,65-gram kitin ekstraksiyonu yapılmıştır. Bunun yanı sıra 0,085-gram seviyesinde düşük miktarda kitosan üretimi de sağlanmıştır. Ancak hedeflenen kitosan seviyelerinde üretim için elde edilen bu kitosan miktarı çok az olduğundan, üretilmiş olan kitinin kimyasal yöntemlerle kitosana dönüştürülmesi hedeflenmiştir.

Elde Edilen Kitosanın Analiz Ve Biyolojik Aktivite Sonuçları

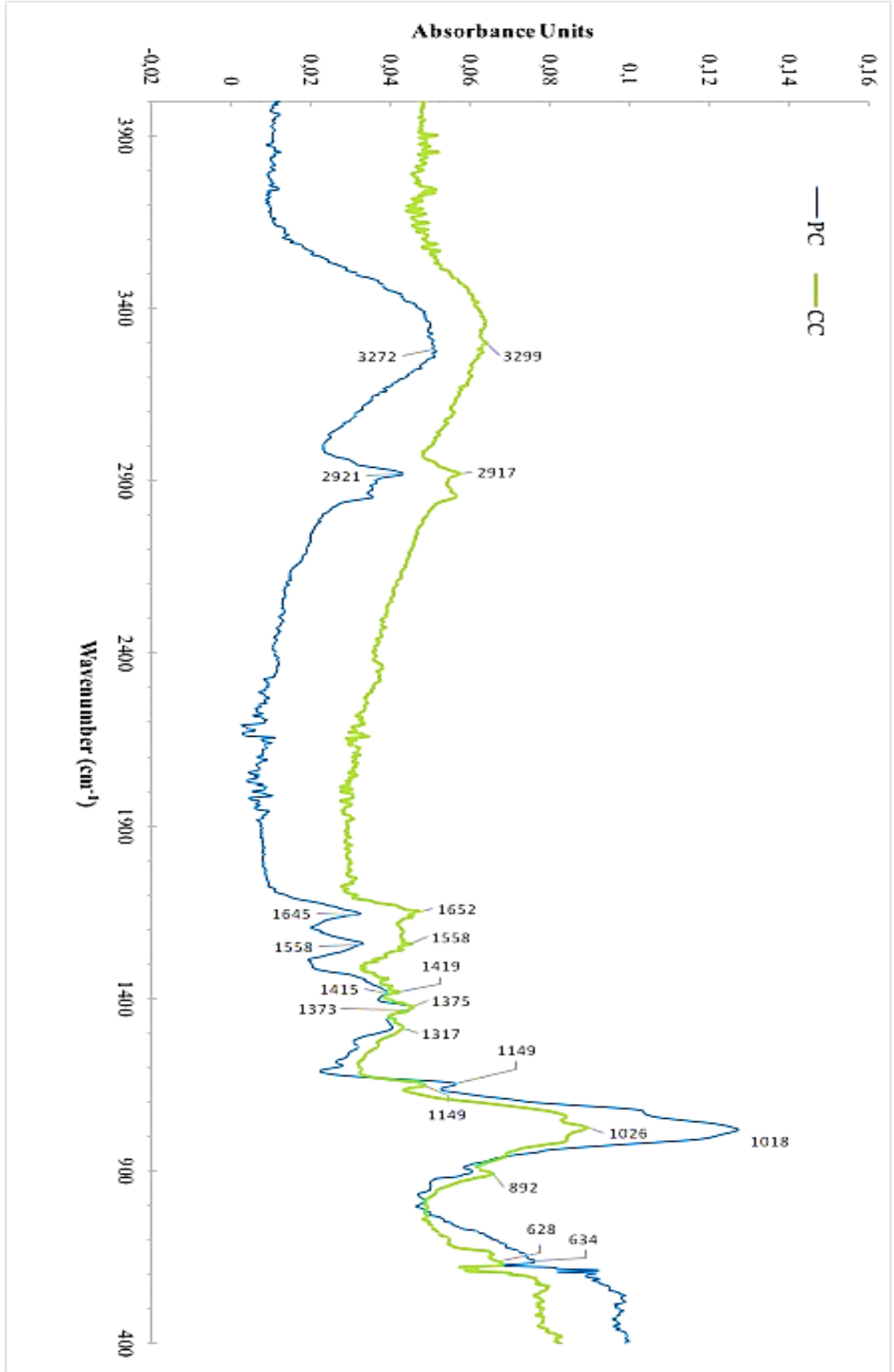
Elde edilen kitosan için yapılan analizler ve biyolojik aktivite tayini aşağıdaki başlıklar altında detaylı olarak verilmiştir.

Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile kitosan örneklerinin Fonksiyonel grupların analizi

FTIR spektrofotometrisi organik yada inorganik moleküllerin fonksiyonel gruplarının analizinde sıklıkla kullanılmaktadır(Büyüksint Kuleaşan 2014)

FTIR sonuçlarına göre, PK' nın 3272, 2921, 1645, 1588, 1419, 1375, 1315, 1149, 1018, 898, ve 634 cm^{-1} de belirgin bantlar verdiği belirlenmiştir. TK' nın belirgin bantları ise 3299, 2917, 1652, 1558, 1419, 1375, 1317, 1149, 1026, 892 ve 628 cm^{-1} de tespit edilmiştir. Her iki kitosan örneğinin FTIR spektrumlarının birbirine son derece benzediği ve hatta 1419, 1375 ve 1149 cm^{-1} de bantların çakıştığı görülmüştür. PK için en güçlü bandın 1018, TK içinse 1026 cm^{-1} de olduğu tespit edilmiştir. Şekil 16'da yapılan FT-IR sonucu gösterilmiştir. Şekil 16'da

belirtildiği üzere mevcut absorpsiyon pikleri elde edilen kitosanın doğruluğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 16. FTIR analizi sonucu

FTIR sonuçlarına göre, PK' nın 3272 cm^{-1} ' de, TK' nın ise 3299 cm^{-1} ' de bant verdiği belirlenmiştir. Bu bantlar, önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi(El-Hefian *et al.* 2010; Guan *et al.* 1998), moleküller arası hidrojen bağlarının ve $-\text{OH}$ gerilme titreşiminin varlığıyla açıklanmıştır. TK ve PK için sırasıyla 2917 ve 2921 cm^{-1} 'de elde edilen bantlar ise simetrik CH_3 germe ve asimetrik CH_2 germe kuvvetlerine, 1375 ve 1373 cm^{-1} 'deki bantlar ise CH_2 bükülme ve CH_3 simetrik deformasyonlara bağlanmıştır(ODILI *et al.*). Amid bantları (I, II ve III), bir numunede proteinlerin varlığını gösterir. Amide I, proteinlerin sekonder yapısıyla ilişkili en hassas spektral bölge olarak bilinir. FTIR spektrumlarında, amide I, 1600 ve 1700 cm^{-1} aralığında absorbands bantlarına sahiptir. Amide I bandı, $\text{C}=\text{O}$ (yaklaşık %80) ve $\text{C}-\text{N}$ gruplarının gerilme titreşimi ile ilişkilidir. Amid II bandı $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunur ve $\text{N}-\text{H}$ bükme (%40-60) ve $\text{C}-\text{N}$ germe titreşimi (%18-40) ile ilgilidir(Aboul-Enein *et al.* 2014; Kong Yu 2007; Tuysuz *et al.*). Bu bilginin ışığında, PK ve TK için sırasıyla 1645 ve 1652 cm^{-1} 'deki absorbandslar Amid I bandı ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte PK ve TK için 1558 cm^{-1} ' deki absorbandslar ise Amid II bandıyla ilişkilendirilmiştir. TK için 1317 ve PK içinse 1315 cm^{-1} 'deki bantlar, daha önceki çalışmalarda da açıklandığı gibi kitosan örneklerindeki N-asetilglukozamin varlığına atfedilmiştir(Brugnerotto *et al.* 2001; Taser *et al.* 2021). Önceki çalışmalarda da belirtildiği(Abdou *et al.* 2008; Liu *et al.* 2012; Povea *et al.* 2011; Taser *et al.* 2021) gibi, hem TK hemde PK için 1419 cm^{-1} ' deki bant CH germe titreşimi, TK için 1026 ve PK için 1016 cm^{-1} ' deki bantlar glukozamin halkasındaki $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ köprüsünün anti-simetrik gerilme kuvveti, TK için 892 ve PK için 898 cm^{-1} ' deki bantlar ise $\beta\text{-}1,4$ glikosidik bağların halka gerilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak PK ve TK' nın FTIR bantlarının birbirine son derece benzediği ortaya çıkarılmıştır.

Kitosanın deasetilasyon derecesi onun çözünürlük, kimyasal reaktivite ve biyolojik aktivite gibi özelliklerini etkilemektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesinde ninhidrin testi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, kızılötesi spektroskopi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlerinin yanısıra FTIR spektroskopisinde kullanılmaktadır(Aiba 1992; Akila 2014; Khan *et al.* 2002). FTIR ile deasetilasyon derecesi belirlenirken özellikle 3450 ve 1655 cm^{-1} ' deki bantların absorbands değerlerinden faydalanılmaktadır(Casadidio *et al.* 2019; Zainol *et al.* 2009). Bu yüzden, mevcut çalışmada deasetilasyon derecesinin belirlenmesinde FTIR ile elde edilen 1655 ve 3450 cm^{-1} ' deki bant absorbands değerlerinden faydalanılmış ve yöntemler kısmında belirtilen formüle göre deasetilasyon derecesi belirlenmiştir. Kullanılan formüle ve ilgili spektrumdaki FTIR sonuçlarına göre PK' nın deasetilasyon derecesi %78,3 TK' nın deasetilasyon derecesi ise %76,9 olarak belirlenmiştir.

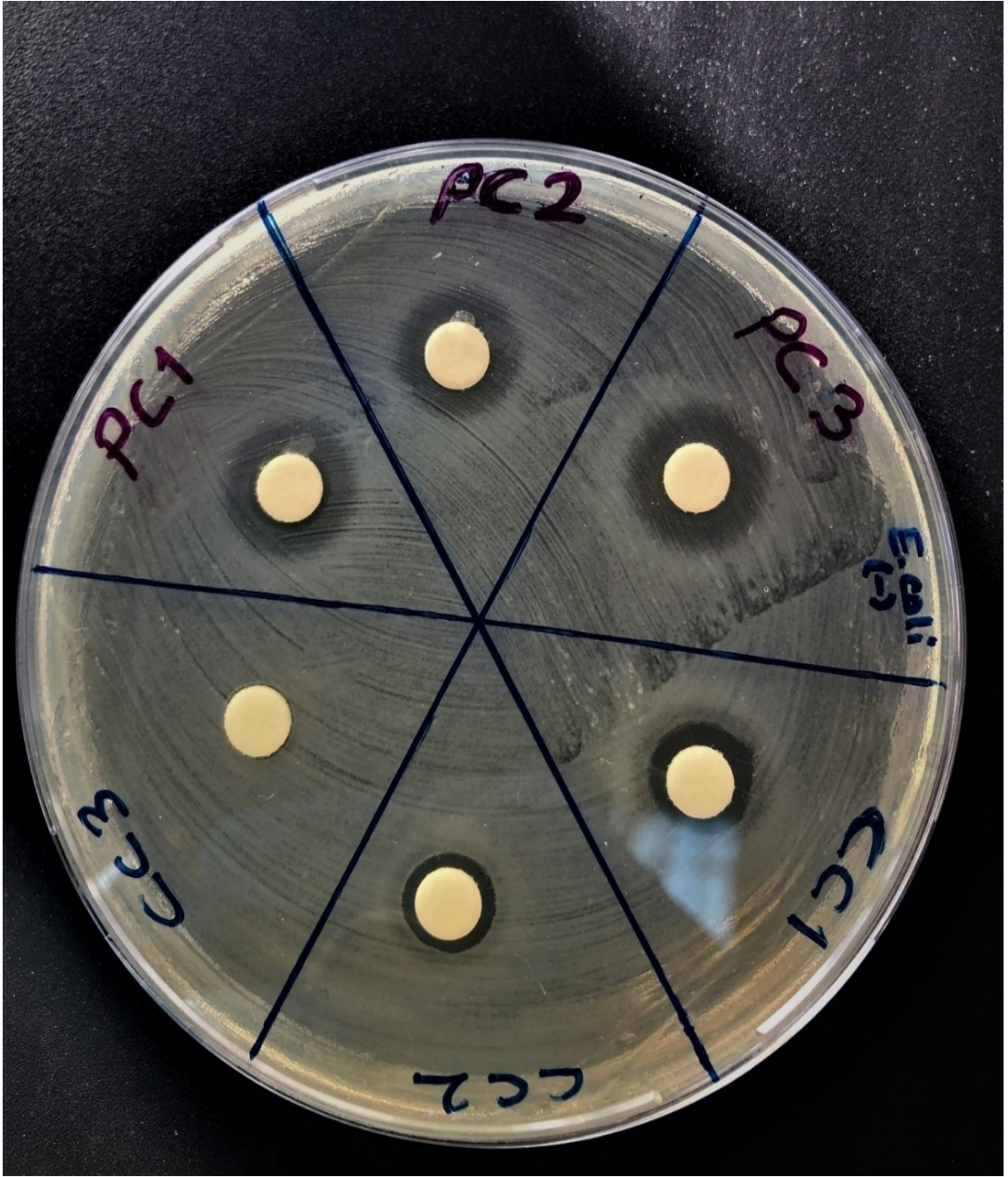
Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi

Düşük moleküler ağırlığa ve yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan, bakteri zarına elektrostatik olarak daha iyi bağlanma ve bakteri zarının geçirgenliğini artırma yeteneğiyle antimikrobiyal aktiviteyi arttırmaktadır(Casadidio *et al.* 2019).

Kitosan, proteinlerin ve mRNA'nın sentezine müdahale edebilmektedir. Bu müdahale için, mikroorganizmaların çekirdeklerine nüfuz ederek DNA'ya bağlanır ve mRNA sentezini inhibe eder (Raafat Sahl 2009; Shahidi *et al.* 1999).

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerine deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlığı, viskozitesi, konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve iyonik güç gibi ortam koşullarının yanısıra hedef mikroorganizma, hedef mikroorganizmanın yaşı ve kitosanla temas halinde olan aktif bileşenlerin konsantrasyonu gibi birçok faktör etkilidir(Aider 2010; Raafat Sahl 2009; Vinsova Vavrikova 2011).

Elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi *Escherichia coli* (Gram negatif), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negatif), *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif), *Listeria monocytogenes* (Gram pozitif) ve *Candida albicans*'ta incelenmiştir. Bu suşlar içerisinde; *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* etrafında belirgin şekilde oluşan inhibisyon zonları, elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 17. Üretilen kitosanın *Escherichia coli* (Gram negatif) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi

(CC: Ticari kitosan; PC: *Penicillium crustosum* kitininden kimyasal yolla elde edilen kitosan)



Şekil 18. Üretilen kitosanın, *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi
(CC: Ticari kitosan; PC: *Penicillium crustosum* kitininden kimyasal yolla elde edilen kitosan)

Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi

Tablo 15. Hazırlanan Örneklerin 517 nm'deki Absorbans Değerleri

	0,25 mg/ml	0,50 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
PK	0,194	0,269	0,281	0,293
TK	0,230	0,220	0,206	0,178
AA	0,014	0,014	0,013	0,013
Kör: -0,040 Kontrol: 0,244				

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı

$$\text{DPPH}^\cdot \text{ radikal süpürme kapasitesi (\%)} = (\text{A}_{\text{kontrol}} - \text{A}_{\text{örnek}}) \times 100 / \text{A}_{\text{kontrol}}$$

Aörnek: örneğin absorbansı,

Akontrol: kontrolün absorbansı

Tablo 16. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Yüzdeleri

	0,25 mg/ml	0,50 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
PK	-	-	-	-
TK	%5,7	%9,8	%15,5	%27
AA	%94,2	%94,2	%94,6	%94,6

DPPH radikal giderme aktivitesi standart olarak kullanılan Askorbik Asit (AA), Ticari Kitosan (TK) ve *Penicillium* Kitosan (PK) için 0,25-1 mg/mL konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. Ticari kitosanın standart antioksidana göre % DPPH giderme aktivitesi son derece düşük bulundu. *Penicillium* kitosan (PK)'ın ise DPPH giderme aktivitesi göstermediği tespit edildi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir ve çeşitli alanlarda yüksek kullanım potansiyeline sahiptir. Günümüzdeki araştırmalar ve mevcut ürünlere dayanarak, bu alanda bazı yeni ve gelecek vadeden yaklaşımlar kapsamlı bir şekilde tartışılmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi, kitinin deasetilasyonu sonucu üretilen kitosandır.

Kitinin zayıf çözünürlüğü nedeniyle, kitin materyalleri genellikle daha yüksek çözünürlüğe ve daha iyi biyolojik uygulamaya sahip olan kitosan'a dönüştürülmektedir(Manni *et al.* 2010; Younes Rinaudo 2015). Kitosan çok yönlülüğü, kimyasal reaktif amino gruplarının derecesine bağlı olduğundan, asetil grubunu kitinin moleküler zincirinden çıkarmak ve geride tam bir amino grubu (-NH₂) bırakmak için deasetilasyon işlemi gerçekleştirilir(Hussain *et al.* 2013)

Kitinin kitosan'a dönüşümü için ana prosedür, kitinin güçlü alkali solüsyonlarla deasetilasyonuna dayanır(Manni *et al.* 2010). Bu nedenle, bu çalışmada, ekstrakte edilen kitin daha sonra NaOH uygulaması ile kitosan haline dönüştürülmüştür. Hazırlanan kitosan *Penicillium* Kitosanı (PK) olarak kodlanmıştır.

Mevcut çalışmada yüksek kitin içeriğine sahip olan *Penicillium crustosum* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatla kitin üretimi melas ortamında gerçekleştirilerek üretim maliyetinin azaltılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kitin üretimini arttırmaya yönelik olarak kültür şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiş, üretilen yüksek biyokütleden kitin ekstraksiyonu yapılmıştır. Melas konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi kültür parametrelerinin kitin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Ekstrakte edilen kitin daha sonra kimyasal yöntemler ile kitosana dönüştürülmüştür.

Kitosanın; yara bantlarının imalatı, gıdaların korunması gibi kullanım alanlarına sahip olması yüksek antimikrobiyal özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Elde edilen *Penicillium* kitosanının ticari kitosana oranla daha yüksek deasetilasyon derecesine ve konsantrasyona bağlı olarak daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada hazırlamış olduğumuz kitosan, daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu için medikal amaçlar için etkili bir şekilde kullanılabilir.

Daha sonraki çalışmalarda kitin üretimini arttırmaya yönelik olarak melas yerine farklı substratlar ya da organik atıklar kullanılarak kitin üretim verimi araştırılabilir.

Üretilen kitosan gıda endüstrisi, kozmetik, enzim immobilizasyonu, tarım, kâğıt yapımı, atık su arıtımı, ilaç endüstrisi ve tekstil endüstrisi gibi birçok alanda test edilebilir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Gawad, K. M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Gomaa, M.,(2017). Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocolloids*, **63**: 593-601.
- Abdou, E. S., Nagy, K. S., & Elsabee, M. Z.,(2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource technology*, **99**(5): 1359-1367.
- Aboul-Enein, Y., Bunaciu, A., & Fleschin, S.,(2014). Evaluation of the protein secondary structures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Gazi University Journal of Science*, **27**(1): 637-644.
- Agboh, O., & Qin, Y.,(1997). Chitin and chitosan fibers. *Polymers for Advanced Technologies*, **8**(6): 355-365.
- Aiba, S.-i.,(1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International journal of biological macromolecules*, **14**(4): 225-228.
- Aider, M.,(2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *LWT-food science and technology*, **43**(6): 837-842.
- Aili, D., Adour, L., Houali, K., & Amrane, A.,(2019). Effect of temperature in Chitin and Chitosan production by solid culture of *Penicillium Camembertii* on YPG medium. *International journal of biological macromolecules*, **133**: 998-1007.
- Akbas, M. Y., Sar, T., & Ozcelik, B.,(2014). Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla hemoglobin* expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **78**(4): 687-694.
- Akila, R.,(2014). Fermentative production of fungal Chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). *Adv Appl Sci Res*, **5**(4): 157-170.
- Akila, R., & Priya, N.,(2012). Screening of gastric antiulcer potential of chitosan extracted from white button mushroom wastes in wistar rats. *Advances in Applied Science Research*, **3**(5): 3160-3164.
- Aksu, Ş., Işık, S., & Erkal, S.,(1996). Türkiye ‘de kültür mantarcılığının gelişimi ve mantar işletmelerinin genel özellikleri. *Türkiye*, **5**: 1-14.
- Aksu, Ş., Işık, S., Erkal, S., Günay, A., & Uysal, E.,(2006). *Kültür Mantarı Üretim Teknikleri*. Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Ali, S., Haq, I.-u., Qadeer, M., & Iqbal, J.,(2002). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology*, **5**(3): 19-20.
- Alper, S. (2003). Production and isolation of fungal chitosan by submerged fermentation [İzmir Institute of Technology].
- Amorim, R. V. d. S., Souza, W. d., Fukushima, K., & Campos-Takaki, G. M. d.,(2001). Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**(1): 20-23.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., & Heras, Á.,(2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, **3**(2): 203-230.

- Arcidiacono, S., & Kaplan, D.,(1992). Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**(3): 281-286.
- Aşkun, T., & Işıloğlu, M.,(1997). Macrofungi of Balya (Balıkesir) County. *Turkish Journal of Botany*, **21**(5): 279-284.
- Ataman, E. (2006). *Biyolojik Jellerde Difüzyon Mekanizmaları Fen Bilimleri Enstitüsü*].
- Bartnicki-Garcia, S.,(1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, **22**(1): 87-108.
- Blois, M. S.,(1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**(4617): 1199-1200.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., & Nising, C. F.,(2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical reviews*, **109**(9): 3903-3990.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M.,(2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **42**(8): 3569-3580.
- Büyüksint, T., & Kuleaşan, H.,(2014). Fourier dönüşümlü kızılötesi (ftır) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. *GIDA/The Journal of FOOD*, **39**(4).
- Canlı taşar, Ö. (2015). Batık kültürde steril olmayan koşullarda fungal kitosan üretimi
- Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P.,(2019). Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine drugs*, **17**(6): 369.
- Castro, S. P. M., & Paulín, E. G. L.,(2012). Is chitosan a new panacea? Areas of application. *The complex world of polysaccharides*, **1**: 3-46.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W.-R.,(1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate research*, **303**(3): 327-332.
- Chang, S., & Buswell, J.,(1996). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, **12**(5): 473-476.
- Chaussard, G., & Domard, A.,(2004). New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules*, **5**(2): 559-564.
- Cheba, B. A.,(2011). Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, **6**(3): 149-153.
- Chhabra, R., Sachdeva, A., Mathur, G., Sharma, P., Goswami, N., Jain, C. K., Sharma, S. K., & Mathur, A.,(2014). Enhanced Production of Fungal Chitosan from *Aspergillus Niger* Using Statistical Optimization. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, **2**(1): 70-74.
- Cooney, D. G., & Emerson, R.,(1964). Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification. *Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification*.
- Crini, G., & Badot, P.-M.,(2008). Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in polymer science*, **33**(4): 399-447.
- Croisier, F., & Jérôme, C.,(2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European polymer journal*, **49**(4): 780-792.
- Demetgül, C., & Beyazit, N.,(2018). Synthesis, characterization and antioxidant activity of chitosan-chromone derivatives. *Carbohydrate Polymers*, **181**: 812-817.

- Demir, A., & Seventekin, N.,(2009). Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **3**(2): 92-103.
- Deniz, M. U., Tütüncü, Ş., & Eren, E.,(2016). The Problems Detected in Mushroom Cultivation in Ankara. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **4**(3): 182-188.
- Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., & Galli, E.,(2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International journal of biological macromolecules*, **43**(1): 8-12.
- Dodane, V., & Vilivalam, V. D.,(1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **1**(6): 246-253.
- Dursun, S., Erkan, N., & Yesiltas, M.,(2010). Dogal biyopolimer bazli (biyobozunur) nanokompozit filmler ve su ürünlerindeki uygulamalari. *Journal of FisheriesSciences.com*, **4**(1): 50.
- Dutta, P. K., Viswanathan, P., Mimrot, L., & Kumar, M. R.,(1997). Use of chitosan amine oxide gel as drug carriers. *Journal of Polymer Materials*, **14**(4): 351-355.
- Ediz, N. (2004). Bazı Bacillus Cinsi Bakterilerin Melas Besi ortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara].
- Einbu, A., & Vårum, K. M.,(2008). Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules*, **9**(7): 1870-1875.
- El-Hefian, E. A., Nasef, M. M., & Yahaya, A. H.,(2010). The preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) blended films. *E-journal of chemistry*, **7**(4): 1212-1219.
- Elsoud, M. M. A., & El Kady, E.,(2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, **43**(1): 59.
- Felse, P. A., & Panda, T.,(1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, **20**(6): 505-512.
- Flannigan, B., McCabe, E. M., & McGarry, F.,(1991). Allergenic and toxigenic micro-organisms in houses. *Journal of Applied Bacteriology*, **70**: 61S-73S.
- Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N., & Tokura, S.,(1996). Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, **29**(1): 29-34.
- Gabiatti Jr, C., Vendruscolo, F., Piaia, J. C. Z., Rodrigues, R., Durrant, L., & Costa, J. A. V.,(2006). Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**: 29-34.
- Gardner, K., & Blackwell, J.,(1975). Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **14**(8): 1581-1595.
- George, T. S., Guru, K. S. S., Vasanthi, N. S., & Kannan, K. P.,(2011). Extraction, purification and characterization of chitosan from endophytic fungi isolated from medicinal plants. *World Journal of Science and Technology*, **1**(4): 43-48.
- Guan, Y., Liu, X., Zhang, Y., & Yao, K.,(1998). Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. *Journal of Applied Polymer Science*, **67**(12): 1965-1972.
- Habibi, A., Karami, S., Varmira, K., & Hadadi, M.,(2020). Key parameters optimization of chitosan production from *Aspergillus terreus* using apple waste extract as sole carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*: 1-13.

- Hang, Y.,(1990). Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnology letters*, **12**(12): 911-912.
- Hayashi, K., & Ito, M.,(2002). Antidiabetic action of low molecular weight chitosan in genetically obese diabetic KK-Ay mice. *Biological and pharmaceutical bulletin*, **25**(2): 188-192.
- Hirano, S. (1996). Chitin biotechnology applications. In *Biotechnology annual review* (Vol. **2**, pp. 237-258). Elsevier.
- Hussain, M. R., Iman, M., & Maji, T. K.,(2013). Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules. *International Journal of Advanced Engineering Applications*, **6**(4): 4-12.
- İmamoğlu, Ö.,(2011). Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, **68**(4).
- Jaworska, M., & Konieczna, E.,(2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *Applied microbiology and biotechnology*, **56**(1-2): 220-224.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S., & Tamura, H.,(2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology advances*, **28**(1): 142-150.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., & Kim, S.-K.,(2004). Free radical scavenging properties of hetero-chitoooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology*, **42**(3): 381-387.
- Jeihanipour, A., Karimi, K., & Taherzadeh, M.,(2007). Antimicrobial properties of fungal chitosan. *Research journal of biological sciences*, **2**(3): 239.
- Jo, G.-H., Park, R.-D., & Jung, W.-J.,(2010). Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*: 37-45.
- Kahyaoğlu, M., & Kivan, M.,(2007). *Phycomyces nitens* ve *mucor mucedo*'dan fermentasyon yoluyla beta karoten elde edilmesi. *Afyon Kocatepe University Journal of Science*, **7**(1).
- Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S.,(2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci*, **5**(3): 205-212.
- Koçer, İ.,(2015). Farklı Yöntemlerle Kitosan Eldesi ve Karakterizasyonu.
- Kong, J., & Yu, S.,(2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, **39**(8): 549-559.
- Kučera, J.,(2004). Fungal mycelium—the source of chitosan for chromatography. *Journal of Chromatography B*, **808**(1): 69-73.
- Kumar, A. S., & Malik, K.,(2020). Isolation and screening of microorganisms for chitosan production. *IJCS*, **8**(1): 1408-1410.
- Kumar, M., Singh, P., & Dutta, P.,(1999). Effect of swelling on chitosan–amine oxide gel in extended drug delivery. *Indian Drugs*, **36**: 393.
- Kurita, K. (1986). Chemical modifications of chitin and chitosan. In *Chitin in nature and technology* (pp. 287-293). Springer.
- Kurita, K.,(1997). β -Chitin and the reactivity characteristics. *Applications of Chitin and Chitosan*.
- 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*, **8**(3): 203-226.
- Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Sun, X., Nie, S., & Pan, W.,(2009). Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, **379**(1): 131-138.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q.,(2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, **17**(4): 4604-4611.
- Madhavan, P.,(1992). Chitin, chitosan and their novel applications. Popular Science Lecture Series, Central Institute of Fisheries Technology, Cochin.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M.,(2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **162**(2): 345-357.
- McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., Spatafora, J. W., & Vilgalys, R.,(2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in microbiology*, **17**(11): 488-497.
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (1997). *Mushroom biology: concise basics and current developments*. World Scientific.
- Miller, J. D.,(1992). Fungi as contaminants in indoor air. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, **26**(12): 2163-2172.
- Miura, T., usami, M., Tsuura, Y., Ishida, H., & Seino, Y.,(1995). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biological and pharmaceutical bulletin*, **18**(11): 1623-1625.
- Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K., & Onodera, K.,(1992). Characterization of some fungal chitosans. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **56**(12): 1901-1905.
- Muslim, S. N., AL-Kadmy, I. M., Ali, A. N. M., & Sahi, A. *Advances in Biotechnology*.
- Muzzarelli, R. A., & RAA, M.,(1973). Natural chelating polymers. Alginic acid, chitin and chitosan.
- Nadarajah, K., Kader, J., Mazmira, M., & Paul, D.,(2001). Production of chitosan by fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **4**(3): 263-265.
- No, H. K., Cho, Y. I., & Meyers, S. P.,(1996). Dye binding capacity of commercial chitin products. *Journal of agricultural and food chemistry*, **44**(7): 1939-1942.
- Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W. F., Maw, T., Tan, T. K., Khor, E., & Wong, S. M.,(2002). Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, **49**(2): 235-237.
- Odili, C., Sekunowo, O., Gbenedour, P. O., & Adeosun, O. S. Characterization and Properties Comparison of Nigerian Crab-shell Extracts. *Usak University Journal of Engineering Sciences*, **3**(1): 1-12.
- Oyar, P.,(2015). Titantium ve Özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **11**(11): 151-159.
- Özdemir, Z.,(2014). Kitin, kitosanın fonksiyonel özellikleri ve kullanım alanları. *Türkiye Kimya Derneği*,(October 2014): 104-117.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D.,(2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, **35**(10): 1153-1169.

- Pareek, N., Vivekanand, V., Agarwal, P., Saroj, S., & Singh, R. P.,(2013). Bioconversion to chitosan: A two stage process employing chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51. *Carbohydrate Polymers*, **96**(2): 417-425.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., & Kim, S.-K.,(2003). Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**(16): 4624-4627.
- Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V.,(2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, **26**(7): 473-483.
- Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W.,(2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in applied microbiology*, **35**(1): 17-21.
- Polat, R., & Selvi, S.,(2011). Edible macrofungi of Edremit Gulf (Balıkesir) in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **10**(51): 10431-10436.
- Povea, M. B., Monal, W. A., Cauich-Rodríguez, J. V., Pat, A. M., Rivero, N. B., & Covas, C. P.,(2011). Interpenetrated chitosan-poly (acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels. Synthesis, characterization and sustained protein release studies. *Materials Sciences and Applications*, **2**(06): 509.
- Prashanth, K. H., & Tharanathan, R.,(2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science & technology*, **18**(3): 117-131.
- Qi, L., & Xu, Z.,(2004). Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **251**(1-3): 183-190.
- Qi, L., & Xu, Z.,(2006). In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**(16): 4243-4245.
- Raafat, D., & Sahl, H. G.,(2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, **2**(2): 186-201.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W.,(2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, **4**(6): 1457-1465.
- Rebelo, R., Fernandes, M., & Figueiro, R.,(2017). Biopolymers in medical implants: a brief review. *Procedia engineering*, **200**: 236-243.
- Renault, F., Sancey, B., Badot, P.-M., & Crini, G.,(2009). Chitosan for coagulation/flocculation processes—an eco-friendly approach. *European polymer journal*, **45**(5): 1337-1348.
- Rinaudo, M.,(2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, **31**(7): 603-632.
- Rudall, K. (1963). The chitin/protein complexes of insect cuticles. In *Advances in insect physiology* (Vol. **1**, pp. 257-313). Elsevier.
- Sabnis, S., & Block, L. H.,(1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer bulletin*, **39**(1): 67-71.
- Sato, H., Mizutani, S.-i., Tsuge, S., Ohtani, H., Aoi, K., Takasu, A., Okada, M., Kobayashi, S., Kiyosada, T., & Shoda, S.-i.,(1998). Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-gas chromatography in the presence of oxalic acid. *Analytical Chemistry*, **70**(1): 7-12.

- Sbrana, C., Avio, L., & Giovannetti, M.,(1995). The occurrence of calcofluor and lectin binding polysaccharides in the outer wall of arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycological Research*, **99**(10): 1249-1252.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y.-J.,(1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, **10**(2): 37-51.
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B.,(2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, **59**: 46-58.
- Song, J., Murphy, R., Narayan, R., & Davies, G.,(2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences*, **364**(1526): 2127-2139.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Casarini, D., & Pifferi, P. G.,(2001). A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme and microbial technology*, **28**(4-5): 427-438.
- Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Barros Neto, B. d., & Campos-Takaki, G. M. d.,(2007). Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, **10**(1): 61-68.
- Struszczyk, M. H.,(2002). Chitin and chitosan. Part III. Some aspects of biodegradation and bioactivity. *Polimery*, **47**: 619-629.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., & Suzuki, M.,(1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate research*, **151**: 403-408.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A.,(2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.
- Tan, M. L., Choong, P. F., & Dass, C. R.,(2009). Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**(1): 3-12.
- Taser, B., Ozkan, H., Adiguzel, A., Orak, T., Baltaci, M. O., & Taskin, M.,(2021). Preparation of chitosan from waste shrimp shells fermented with *Paenibacillus jamilae* BAT1. *International journal of biological macromolecules*.
- Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A.,(2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International journal of biological macromolecules*, **47**(1): 10-14.
- Teng, W. L., Khor, E., Tan, T. K., Lim, L. Y., & Tan, S. C.,(2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate research*, **332**(3): 305-316.
- Tuysuz, E., Ozkan, H., Arslan, N. P., Adiguzel, A., Baltaci, M. O., & Taskin, M. Bioconversion of waste sheep wool to microbial peptone by *Bacillus licheniformis* EY2. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.
- Ulziijargal, E., & Mau, J.-L.,(2011). Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. *International journal of medicinal mushrooms*, **13**(4).
- Üçgül, İ., Sultan, A., & Küçükçapraz, D. Ö. Farklı Hammadde Kaynaklarından Kitinin Saflaştırılması ve Tekstil Uygulamaları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **9**(1): 46-56.
- Vinsova, J., & Vavrikova, E.,(2011). Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. *Current pharmaceutical design*, **17**(32): 3596-3607.

- Wang, S.-L., Chang, T.-J., & Liang, T.-W.,(2010). Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. *Biodegradation*, **21**(3): 321-333.
- Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Cai, J., & Kennedy, J. F.,(2008). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **74**(1): 127-132.
- Winterowd, J. G., & Sandford, P. A.,(1995). Chitin and chitosan. Food science and technology-new york-marcel dekker-: 441-441.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., & Sams, C. E.,(2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**(10): 3888-3894.
- Yang, L., Li, X., Lai, C., Fan, Y., Ouyang, J., & Yong, Q.,(2017). Fungal chitosan production using xylose rich of corn stover prehydrolysate by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **31**(6): 1160-1166.
- Yıldız, P. O., & Yangılar, F.,(2014). Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, **30**(3): 198-206.
- Younes, I., & Rinaudo, M.,(2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, **13**(3): 1133-1174.
- Zainol, I., Akil, H. M., & Mastor, A.,(2009). Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder. *Materials Science and Engineering: C*, **29**(1): 292-297.
- Zikakis, J. (2012). Chitin, chitosan, and related enzymes. Elsevier.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Fatih KAYAR
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Faks:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Cemil Midilli Lisesi, İzmir
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalı
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Masa Tenisi, Kayak, Yüzme, Futbol, Bilardo, Bowling	