



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKTERİYEL SELÜLOZDAN DOĞAL YÜZ MASKESİ ÜRETİMİ

Eyüp BİLGİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 04.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BAKTERİYEL SELÜLOZDAN
DOĞAL YÜZ MASKESİ ÜRETİMİ**

Eyüp BİLGİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 04.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

Eyüp BİLGİ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Bakteriyel Selülozdan Doğal Yüz Maskesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 04.08.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Raportör Üye : Prof. Dr. K. Özgen ÖZER

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ozan KARAMAN

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bakteriyel Selülozdan Doğal Yüz Maskesi Üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

04/08/2015

Eyüp BİLGİ

ÖZET

BAKTERİYEL SELÜLOZDAN DOĞAL YÜZ MASKESİ ÜRETİMİ

BİLGİ, Eyüp

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Ağustos 2015, 156 sayfa

Bakteriyel selüloz (BS) eşsiz özellikleri sayesinde kozmetik, medikal, biyomedikal, elektronik, gıda ve kağıt sektörlerinde kullanılabilen doğal bir polimerdir. Bu tez kapsamında, *Gluconacetobacter xylinus* suşu kullanılarak yeni geliştirilen besiyerinde BS üretimi istatistiksel olarak optimize edilmiş ve örnekler karakterize edilerek antioksidan madde yüklemesi sonrası yüz maskesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Sekiz parametre (karbon miktarı, protein miktarı, başlangıç pH, yüzey alanı/hacim, inokulum miktarı, inkübasyon süresi, sitrik asit, sıcaklık) Plackett-Burman Tasarımı ile elenmiş ve anlamlı üç parametre [inkübasyon süresi (%63,50), protein miktarı (%12,23), inokulum miktarı (%9,57)] Merkezi Bileşen Tasarımı ile optimize edilmiştir. Statik kültürde BS üretimi için optimum koşullar: 2,5 g/L karbon, 2,75 g/L protein, % 9,3 v/v inokulum oranı, 1,15 g/L sitrik asit, 2,7 g/L Na₂HPO₄, 30°C inkübasyon sıcaklığı, pH 5,5 ve 9 gün inkübasyon süresi olarak tespit edilmiştir. Elde edilen model, doğrulama deneyleri sonrasında CHb (Carob-Haricot bean) besiyeri ile BS üretiminin tahminlenmesi ve optimize edilmesi için kullanılmıştır. Bu tez, yeni geliştirilen CHb besiyerinin yüksek tamponlama kapasitesinde olduğunu ortaya koymuştur. Üretilen BS yüz maskesi örneklerinin karakterizasyonu X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) ve Texture Profile Analysis (TPA) ile gerçekleştirilmiştir. Taurin salım hızı ve stabilitesi (4 ay) Liquid Chromatography–Mass spectrometry (LC/MS) ile, koruyucu etkinliği ise challenge ve mikrobiyal stabilite testleri ile analiz edilmiştir. Bu tez kapsamında üretilen BS tabanlı yüz maskesi, yüksek su içeriği (>%99) ile nemlendirme ve 30 ±3,5 taurin/5 dakika salımı ile de antioksidan özellik göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyel selüloz, *Gluconacetobacter xylinus* optimizasyon, yüz maskesi, taurin, biyopolimer, yeni CHb besiyeri

ABSTRACT

PRODUCTION OF NATURAL FACIAL MASK FROM BACTERIAL CELLULOSE

BİLGİ, Eyüp

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ

August 2015, 156 pages

Bacterial cellulose (BC) can be used in cosmetic, medical, biomedical, electronic, food, and paper industries because of its unique properties. In the scope of this thesis, BC production was statistically optimized by *Gluconacetobacter xylinus* using novel medium and samples were characterised and their usage as facial mask was investigated after loading with antioxidant compound. Eight parameters (carbon source, protein, initial pH, surface area volume ratio, inoculum amount, incubation time, citric acid, temperature) were screened by Plackett-Burman Design and three parameters which were found to be significant [incubation time (%63.50), protein amount (%12.23), inoculum amount (%9.57)] were optimized using Central Composite Design. Optimal conditions for the production of BC in static culture were found as: 2.5 g/L carbon source, 2.75 g/L nitrogen source, 9.3 % inoculum ratio, 1.15 g/L citric acid, 2.7 g/L Na₂HPO₄, 30°C incubation temperature, 5.5 initial pH, and 9 days of incubation. Model obtained from this study was used to predict and optimize BC production yield using CHb (Carob-Haricot bean) medium after model validation experiment. This study reveals that CHb medium has high buffering capacity. Characterisation of BC facial mask samples were done by X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Texture Profile Analysis (TPA). Taurine release rate and stability (4 month) was determined with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC/MS) and effectiveness of preservative was analyzed by challenge and microbial stability tests. BC based as facial masks produced in the scope of this thesis show moisturizing feature with high water content (>%99) and antioxidant property with 30 ± 3,5 mg taurine release in 5 minutes.

Keywords: Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter xylinus*, optimisation, facial mask, taurine, biopolymer, novel CHb medium.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında benden hiçbir desteğini esirgemeyen, çalışma tarzını ve düzenliliği başta olmak üzere bir akademisyen olarak kendisini örnek aldığım, yaptığım çalışmalarda bana olan güvenini hiçbir zaman yitirmeyen ve bu tezin oluşmasında büyük emeği geçen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ'e, tez çalışmam boyunca değerli katkılarını, eleştirilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bazen soruların cevaptan önemli olduğunu öğrenmemi ve doğru planlama ile kısıtlı zamanlarda zor işlerin başarılabilmesini görmemi sağlayan sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, farklı bir alanda yaptığım çalışmalara adapte olmamda değerli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmam boyunca ihtiyacım olan dönemlerde yoğun programına rağmen bana zaman ayıran değerli hocam Sayın Prof. Dr. K. Özgen ÖZER'e ve Eczacılık Fakültesi'nde yapılan deneylerde laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan ve tez kapsamında elde edilen sonuçların yorumlanmasında sürekli katkısını aldığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Evren HOMAN GÖKÇE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Birçok sorunun mühendislik yaklaşımı ile kolaylıkla çözülebildiğini anlamamı sağlayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili abim ve hocam Sayın Doç. Dr. S. Suphi ÖNCEL'e ve her istediğimde yardımcı olan değerli dostum biyomühendis Serdar ÇAKAN'a teşekkür ederim.

Hayvan hücre kültürü çalışmalarında engin deneyimlerini sürekli bizimle paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a verdiği katkılar nedeniyle teşekkür ederim.

Tez çalışmam kapsamında ihtiyaç duyulan cihazların kullanılmasında E.Ü. Biyomühendislik Bölümü'nde bana laboratuvarlarının kapılarını açan Proses laboratuvarı, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Doğal Ürün Laboratuvarı, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı, Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı ve E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD Araştırma Laboratuvarı sorumlu hocalarıma ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Farklı boyutlarda özel ambalaj paketlerinin üretilmesini sağlayan başta şirket ortağı Nilay ARDA GÖKDAĞ olmak üzere tüm Arda Gıda Ambalaj ve Tem. Mad. San. ve Tic. Ltd. Şti. çalışanlarına, yüz maskesi çalışmalarında kullanılan koruyucunun temin edilmesini sağlayan başta Satış Müdürü Murat KAYA olmak üzere Ejder Kimya Danışmanlık San ve Tic. Ltd.Şti.'ne teşekkür ederim.

Son ürün karakterizasyonu için DSC ve LC/MS analizlerinin gerçekleştirildiği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarına (FABAL), Mikrobiyal stabilite çalışmalarının gerçekleştirildiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarına (MİKAL) teşekkür ederim.

SANTEZ projesi kapsamında yürütülen bu tezde proje rapor dönemlerinde sunumlarda verdiği katkı ve fikirlerden dolayı sayın Prof. Dr. Füsün EYİDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen adını burada tek tek yazamayacağım Biyomühendislik Bölümü yüksek lisans ve doktora öğrencisi olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisans bitirme tezinden itibaren çalışmalarına her aşamada yardımcı olarak, yorum ve eleştirileri ile katkı sağlayan, birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili Ar. Gör. Ece BAYIR'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her zaman bana güvenen ve inanan, tüm şartlar altında yanımda olan sevgili ve değerli annem ve babama, üniversite yaşamının büyük bölümünde kahrımı çeken ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili kardeşime ve her şeyi paylaşmaktan zevk aldığım her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli abime teşekkürlerimi sunarım.

0198-STZ-2013-1 nolu proje ile çalışmamı destekleyen T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na ve BioRed Laboratuvar Ürünleri ve Bilişim Sistemleri San. Tic. Ltd. Şti.'ne (Murat HAMEŞ), 2014/BIL/015 nolu proje ile çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	xix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Selüloz.....	5
2.2. Bakteriyel Selüloz.....	10
2.3. Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri Ve Üretimde Etkili Parametreler	14
2.3.1 Statik kültür	14
2.3.2 Çalkalamalı-havalandırılmalı kültürler	16
2.3.3 pH.....	17
2.3.4 Karbon kaynağı.....	18
2.3.5 Azot kaynağı.....	19
2.3.6 Sıcaklık.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.7 İnkübasyon süresi	20
2.3.8 Diğer parametreler.....	21
2.4. Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları	22
2.5. Fermentasyon Optimizasyonu	28
2.5.1 Plackett Burman Tasarımı (PBT).....	31
2.5.2 Merkezi Bileşen Tasarımı (Central Composite Design-CCD)	32
2.6. Deri ve Taurin	33
3. MATERYAL VE METOT.....	38
3.1. Mikroorganizma Aktivasyonu ve Stoklanması.....	38
3.1.1 Mikroorganizmaların stoklanması.....	39
3.2. En Uygun Karbon ve Azot Kaynaklarının Belirlenmesi	39
3.2.1 Karbon kaynağının belirlenmesi	39
3.2.2 Azot Kaynağının Belirlenmesi.....	40
3.3. Keçiboynuzu Özütlemesi.....	41
3.4. Kuru Fasulyenin Özütlenmesi.....	42
3.5. Toplam Şeker Tayini	43
3.6. Toplam Azot Tayini	44

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7. Fermentasyon Optimizasyonu	45
3.7.1 OVAT denemeleri.....	45
3.8. Deney Tasarımı ile İstatistiksel Optimizasyon Denemeleri	49
3.8.1 Plackett Burman Tasarımı (PBT)	50
3.8.2 Merkezi Bileşen Tasarımı (CCD) denemeleri	51
3.8.3 Doğrulama deneyleri.....	52
3.9. BS Yıkama İşlemi.....	53
3.9.1 Modifiye BS yıkama işlemi.....	53
3.10. Ölçek Büyütme	54
3.11. Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri	54
3.11.1 HS2 ve L929 hücreleri	54
3.11.2 HS2 hücrelerinin tutunma kinetikleri.....	56
3.11.3 HS2 hücrelerinin büyüme kinetikleri	57
3.11.4 Sitotoksisite denemeleri	58
3.12. BS Karakterizasyon Çalışmaları.....	60
3.12.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi.....	60
3.12.2 X-Işını Kırınımı (X-Ray Diffraction- XRD) analizi	61

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.12.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy -SEM) görüntüleme.....	62
3.12.4 Endotoksisite testi.....	62
3.13. Yüz Maskesi Ambalajlama Çalışmaları	65
3.14. Mikrobiyal Stabilité ve Challenge Testleri.....	66
3.14.1 Aerobik mezofilik bakteri sayımı.....	68
3.14.2 Maya-küf sayımı	68
3.14.3 <i>Candida albicans</i> aranması.....	69
3.14.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aranması	69
3.14.5 <i>Staphylococcus aureus</i> aranması.....	70
3.14.6 Challenge testi.....	70
3.15. Bakteriyel Selüloz Tabanlı Yüz Maskesinin Karakterizasyonu	72
3.15.1 Kesilebilirlik ve biyoadezyon çalışmaları	72
3.15.2 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri	73
3.15.3 Taurin salım denemeleri	74
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	75
4.1. Mikroorganizma Aktivasyonu ve Stoklanması.....	75

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2. Alternatif Karbon Kaynağının Belirlenmesi	76
4.3. Alternatif Azot Kaynağının Belirlenmesi	77
4.4. Toplam Şeker Tayini.....	78
4.5. Toplam Azot Tayini.....	79
4.6. Fermentasyon Optimizasyon Çalışmaları	80
4.6.1 OVAT denemeleri.....	80
4.7. Deney Tasarımı ile İstatistiksel Optimizasyon Denemeleri	81
4.7.1 Plackett Burman Tasarımı (PBT) denemeleri	81
4.7.2 Merkezi Bileşen Tasarımı (Central Composite Design –CCD) denemeleri	87
4.7.3 Doğrulama deneyleri.....	96
4.7.4 Ölçek büyütme.....	97
4.8. BS Yıkama İşlemleri.....	98
4.9. Endotoksisite Sonuçları.....	99
4.10. Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri	100
4.10.1 HS2 hücrelerinin karakterizasyonu	100
4.10.2 HS2 hücreleri büyüme kinetikleri	102
4.10.3 Hücre morfolojileri	103

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.10.4 Sitotoksisite denemeleri.....	104
4.11. BS Karakterizasyon Çalışmaları	111
4.11.1 FTIR analizi	111
4.11.2 XRD analizi	113
4.12. Ambalajlama Çalışmaları	115
4.13. Mikrobiyal Stabilite ve Challenge Testleri.....	116
4.14. BS Yüz Maskesi Özelliklerinin Belirlenmesi	118
4.14.1 BS yüz maskesi biyoadezyon testi	118
4.14.2 BS yüz maskesi kesilebilirlik testi	119
4.14.1 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri	120
4.14.2 BS yüz maskesi taurin salım testi.....	124
5. GENEL SONUÇLAR	132
6. ÖNERİLER.....	135
KAYNAKLAR.....	136
ÖZGEÇMİŞ.....	154

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Selüloz kaynaklarından selüloz monomerlerine: selülozun detaylı yapısı	6
2.2. Selüloz zinciri üzerindeki hidrojen bağları:	7
2.3. Selüloz yapısı:.....	8
2.4. Bakteriyel selülozun üretim mekanizması:	12
2.5. Mikroorganizmaların oksijen ve substrat transfer limitini aşmaları için geliştirilmiş yöntem	15
2.6. BS üretiminde kullanılabilen çeşitli reaktör ve karıştırıcı tipleri.....	17
2.7. Bakteriyel selüloz ve bitkisel selüloz saflaştırma basamaklarının karşılaştırılması.....	23
2.8. Bakteriyel selüloz fiber boyutlarının diğer fiberler ile karşılaştırılması	24
2.9. Optimizasyon yaklaşımları; (a) OVAT ve (b) deney tasarımı (istatistiksel optimizasyon)	28
2.10. Deney tasarımında elde edilebilecek modeller ve optimum noktaya olan uzaklıkları.....	29
2.11. Taurinin moleküler yapısı	36
3.1 Keçiboynuzu özütleme basamakları	42
3.2 Kuru fasulye özütleme basamakları.....	43
3.3 TPA cihazı	73
4.1 (a) Agar üzerinde çizgi ekim sonrası oluşan <i>G. xylinus</i> kolonileri, (b) Statik kültürde elde edilen BS'nin yıkama sonrası görüntüsü ve (c) Çalkalamalı kültürde oluşan kürecikler.....	76
4.2 Alternatif karbon kaynakları ile BS üretimi;	77
4.3 Toplam şeker tayini standart grafiği ve elde edilen denklem.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.4 Faktörlerin bireysel etkileri; (a) inokulum miktarı, (b) protein miktarı ve (c) inkübasyon süresi.....	92
4.5 Faktörlerin birlikte etkileri, (a) inkübasyon süresi-inokulum miktarı, (b) protein miktarı-inkübasyon süresi ve (c) inokulum miktarı-protein miktarı.....	95
4.6 Yüz maskesi için yapılan üretimler. (a) İnkübatör içerisinde genel görünüm. (b) Standart HS besiyerinde ekim. (c) CHb besiyerinde üretim. (d) Standart HS besiyerinde üretilen BS'nin hasatı. (e) CHb besiyerinde üretilen BS'nin hasatı. ..	97
4.7 BS SEM görüntüleri (a) Standart yıkama yöntemi sonrası, (b) Modifiye yıkama yöntemi sonrası.	98
4.8 HS2 hücreleri tutunma kinetiği.....	102
4.9 HS2 hücrelerinin büyüme kinetiği	103
4.10 Denemelerde kullanılan hücrelerin morfolojileri; (a) L929 ve (b) HS2 hücreleri (10X büyütme).....	104
4.11 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 24. saat boyama öncesi mikroskop görüntüleri (10x).	105
4.12 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 24. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (10x).	106
4.13 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 72. saat boyama öncesi mikroskop görüntüleri (10x).	107
4.14 HS2 hücrelerinin 72. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (sol: 4X; sağ: 10X büyütme).	108
4.15 L929 hücrelerinin 72. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (sol: 4X; sağ: 10X büyütme).	109
4.16 FTIR analiz sonuçları; (a) HS ile üretilen BS ve (b) CHb besiyeri ile üretilen BS.....	112
4.17 XRD spektrumları; (a) CHb ile üretilen BS ve (b) HS ile üretilen BS	114
4.18 Ambalajlama çalışmaları	116

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.19. Saf taurin	121
4.20 CHb besiyeri ile üretilen ve 50 mM taurin içerisinde bekletilen BS	121
4.21 CHb besiyeri ile üretilen ve %1 oranında koruyucu (Phenostat) içeren BS	122
4.22 CHb besiyeri ile üretilen BS	122
4.23 CHb besiyeri ile üretilen 50 mM Taurin içerisinde bekletilen ve %1 Phenostat içeren BS	123
4.24. HS ile üretilen ve 50mM taurin içeren BS	123
4.25 HS ile üretilen ve %1 Phenostat içeren BS	123
4.26 HS ile üretilen BS	124
4.27 HS besiyeri ile üretilen 50 mM Taurin içerisinde bekletilen ve %1 Phenostat içeren BS	124
4.28 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (0. gün)	125
4.29. 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (1. ay)	126
4.30 50 mM taurin vve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (2. ay 25 °C)	126
4.31 50 mM taurin vve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (2. ay 40 °C)	127
4.32 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (4. Ay, 25°C)	127
4.33 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (4. Ay, 40°C)	128
4.34 Saf taurin ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	128

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Bazı bitkilerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri.	9
2.2 BS ve BS tabanlı malzemelerin biyomedikal uygulamaları	26
2.3 Geleneksel deney tasarım türleri, özellikleri, avantaj ve dezavantajları	30
2.4 Yaşlanmaya bağlı deri özelliklerindeki değişimler	34
4.1 Toplam şeker tayini standart absorbands verileri	78
4.2 PBT tasarımı, yanıtlar (Y) ve besiyerinin son pH değeri	82
4.3 PBT denemelerinde elde edilen BS örneklerinin görsel ve yapısal özellikleri	84
4.4 Her bir parametrenin BS üretimindeki yüzdesel etkisi	85
4.5 CCD matrisi, alt ve üst limitler, yanıtlar ve besiyeri son pH değerleri	88
4.6 CCD denemeleri ANOVA sonuçları	90
4.7. Doğrulama deneyleri	96
4.8 Tepsili üretim parametreleri ve elde edilen sonuçlar	98
4.9 Endotoksisite sonuçları	100
4.10 HS2 hücrelerinin zamana göre hücre sayıları	101
4.11 Mikrobiyal stabilite sonuçları	116
4.12 Challenge (tarama) testi sonuçları	116
4.13 TİTCK bitmiş ürün mikrobiyal kabul kriterleri	117
4.14 CHb ve HS ile üretilen BS'lerin Biyoadezyon sonuçları	119
4.15 CHb ve HS ile üretilen BS'lerin kesilebilirlik sonuçları	120
4.16 Hammadde spesifikasyonları	130
4.17 Bitmiş ürün spesifikasyonları	131

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
AGB	Anhidroglukoz birimleri
ATP	Adenozintrifosfat
BPA	Baird Parker Agar
BS	Bakteriyel selüloz
CA	Cetrimide Agar
CCAC	Chromogenic Candida Agar with Chloramphenicol
CCD	Central composite design-Merkezi bileşen tasarımı
CHb	Keçiboynuzu - kuru fasulye besiyeri
CSE	Kontrol standart endotoksin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsülfoksit
DSC	Differential scanning calorimetry- Diferansiyel taramalı kalorimetre
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGEMİKAL	Ege Üniversitesi Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarı
FABAL	Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı
FDA	Food and Drug Administration

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FR	Serbest radikaller
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GRAS	Generally recognized as safe
H ₂ O ₂	hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HS	Hestrin&Schramm sıvı besiyeri
HS2	İnsan keratinosit hücreleri
HSA	Hestrin&Schramm agar besiyeri
İM	İnokulum miktarı
İS	İnkübasyon süresi
İYTE-MAM	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü- Malzeme Araştırma Merkezi
K	Karbon miktarı
Kob	Koloni oluşturan birim
L929	Fare fibroblast hücreleri
LB	Letheen Broth
MDA	Malondialdehid
MEM	Minimum Essential Medium
OVAT	One variable at a time

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
P	Protein miktarı
PBS	Phosphate buffer saline
PBT	Plackett-Burman tasarımı
PD	Polimerizasyon derecesi
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSM	Response surface methodology-Yanıt yüzeyi metodolojisi
S	Sıcaklık
S/V	Yüzey alanı hacim oranı
SA	Sitrik asit miktarı
SDCA	Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar
SEM	Scanning Electron Microscopy-Taramalı Elektron Mikroskobu
TH	Toplam hacim
THS	Toplam hücre sayısı
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TPA	Yapı profil analizi- Texture profile analysis
TSA	Tryptic Soy Agar
XO	Ksantin oksidaz
XRD	X-ray difraksiyon, X-ray diffraction
Y	Yanıtlar

1. GİRİŞ

Büyük ve karmaşık bir doku olan deri, vücut için olumsuz olan zorlu çevre şartları için çok fazla sayıda işlevi yerine getiren bir arayüz olarak işlev görmektedir. Dış dünyanın neden olduğu problemlere karşı, altında kalan dokulara sağladığı olağan üstü korumanın ve direncin mekanizması günümüzde büyük oranda aydınlatılmıştır. Araştırmalar derinin barındırdığı yüksek su içeriğinin sürekli maruz kalınan dış travmalara karşı savunmada en önemli etken olduğunu göstermektedir (Stern and Maibach, 2008). Doğal bir süreç olan yaşlanmaya ek olarak güneş ışınları gibi etmenler de deriden yüksek miktarda suyun kaybolmasına ve doğal görünümünün bozulmasına, fonksiyonlarının zayıflamasına neden olabilmektedir. Bu nedenle derinin nemlendirilmesi cilt bakımının sağlanması açısından çok önemlidir. Günümüzde karşılaşılan en büyük problemlerden biri kozmetiklerin stabilitesinin ve istenilen fonksiyonu gerçekleştirilebilmesinde kullanılan kimyasalların vücutta iritasyon da dahil olmak üzere çeşitli yan etkilere neden olmasıdır. Bu durum göz önünde bulundurularak, derinin karşılaştığı problemlerin ortadan kaldırılmasına çalışılırken deriye fazladan zarar verecek işlemlerden kaçınılmalıdır (Draelos, 1995).

Kozmetik sektörü derinin yaşlanma etkilerinin ortadan kaldırılmasını veya yavaşlatılmasını da içeren cildin dış görünümünü iyileştirmeye çalışan ve her geçen gün büyümekte olan bir alandır. Yaşam tarzlarımız, stres, beslenme, artan hayat süresi ve daha birçok faktör cildimizin yıpranmasına ve doğal görünümünün bozulmasına neden olmaktadır. Yaşlanma ciltte yapısal ve moleküler değişiklikler ile birlikte gelişen karmaşık bir olaydır. Cildin hücre sayısı ve hacmi ile bazı fonksiyonlarının azaldığı, her bireyde farklı hızlarda ortaya çıkan, çok faktörlü,

kesintisiz ve geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Bu süreçte hücre yenilenmesi, yaralanmaya karşı geliştirilen tepki ve bariyer fonksiyon azalır. Yaşlanma, canlılığın devamı için gereken adenozintrifosfat (ATP) üretimi sırasında doğal olarak oluşan serbest radikallerin verdiği hasara bağlı olarak da gelişir. Bu süreç kaçınılmazdır fakat bir takım maddeler yardımı ile etkilerinin hafifletilebilmesi ve yavaşlatılabilmesi mümkün olabilmektedir.

Organizma yaşamsal faaliyetlerini yürütürken iki elektronundan birini kaybetmiş serbest radikaller (süperoksit, nitrik oksit, hidrojen peroksit gibi) üretir. Bu bileşikler eksik elektronlarını tamamlamak için sürekli başka moleküllere saldırırlar. Buna karşılık vücutta bu saldırılara karşı koruma sağlayan maddeler üretilebilmekte ve besinlerden alınan bazı vitaminler ve fitokimyasallar serbest radikalleri zararsızlaştırabilmektedirler. Normalde vücut bir ölçüde serbest radikal hasarına karşı koyar ancak yaşlanma ile antioksidan savunma sistemlerindeki azalmaya ve serbest radikal oluşumundaki artmaya bağlı olarak bu denge serbest radikallerin lehine kaymakta ve hücrelerde kalıcı hasarlar meydana gelmektedir. Derimiz yalnızca endojen oksidan maddelere değil ayrıca eksojen oksidan maddelerle de doğrudan temas eden bir organdır. Bu eksojen kaynaklar da doğrudan oksidatif strese neden olabilmektedir. Eksojen reaktif oksijen türlerinin kaynağı olarak hava kirliliği ve UV radyasyon verilebilir. Deri kronik olarak oksidanlara maruz kalınca eritem, ödem, kırıxıklık, foto-yaşlanma, inflamasyon, otoimmün yanıtlar, aşırı duyarlılık, keratinizasyon anormallikleri ve kanser gibi çeşitli deri bozuklukları tetiklenebilir. Organizmada serbest radikallerin oluşumunu ve yol açtığı hasarı önleyen maddelere antioksidan madde adı verilir. Normal koşullarda organizma kendini oksidatif stresten korumak için temelde antioksidanlara bağlı olan bir savunma mekanizmasına sahiptir. Bu sistem

antioksidan enzimler ve düşük moleköl ağırlıklı antioksidan maddelerden oluşur ve bu maddeler lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu durdurur. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve hücre yıkımını azalttıkları gibi yaşlılık etkilerinin minimize edilmesini sağlarlar. Taurin (2-aminoethane sulfonic acid) vücutta doğal olarak bulunan ve ozmoregülasyon, hücre proliferasyonu, inflamasyon kontrolü ve kollajen üretiminde antioksidan olarak işlev gören, metiyonin ve sisteinden türetilen sülfür türevi yarı esansiyel bir aminoasittir. Yaralarda oksidatif hasarın engellenmesinde kullanılabildiği gösterilmiştir. Taurin içeren jelin, derinin direncini arttırdığı, MDA ve HPX seviyelerini azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar histolojik bulgularla da desteklenmiştir. Tüm gözlemler taurinin hücre proliferasyonunda etkili olabileceğini göstermiştir. Taurin günümüzde enerji içeceklerinin içinde bulunan güvenilir bir maddedir.

Kişisel bakıma verilen önemin ve bu kalıcı hasarların giderilmesine yönelik farkındalığın artması nedeniyle her geçen gün cilt bakımı alanında çıkan ve yukarıda belirtilen kalıcı ve/veya geçici etkilerin azaltılmasında yardımcı olabilen antioksidan içeren ürünlere olan talep hızla artmaktadır.

Bakteriyel selüloz içeriğinde çok yüksek oranda su tutabilmekte ve %100 selüloz içeriğinden oluşmaktadır. Bu yüzden kimyasallara bağlı yan etkilere neden olmadan cildin nemlendirilmesinde kullanabilme potansiyeline sahiptir.

Doğada bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen BS kimyasal olarak bitkisel selülozdan daha yüksek saflıktaki nanofibril ağ yapısı ve farklı amaçlarla kullanılabilecek özellikleri nedeniyle ümit vericidir. BS saflığa ek olarak; yüksek mekanik dayanım, yüksek kristalinite, yüksek çekme dayanımı, yüksek

polimerizasyon derecesi ve yüksek saflıkta nanofibril ağ yapısı gibi özelliklere sahip olmasıyla, günümüzde en çok çalışılan doğal polimerlerden biri haline gelmiştir. BS, yüksek hidrojen bağı yapabilme kapasitesi ve üç boyutlu (3B) fiber ağ yapısı ile farklı etken maddelerin yüklenmesine olanak tanıdığı, hidrojeller gibi yüksek su içeriğine ve daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğu ve alerjen olmayan biyouyumlu bir polimer olduğu için medikal ve kozmetik alanlarında da potansiyel taşımaktadır. Genellikle BS üretiminin gerçekleştirildiği endüstriyel bir suş olan *Gluconacetobacter xylinus* Filipinler’de geleneksel bir yiyecek olan Natto yapımında kullanılan, patojen olmayan bir bakteridir ve yüksek verimde homojen BS üretebilmektedir.

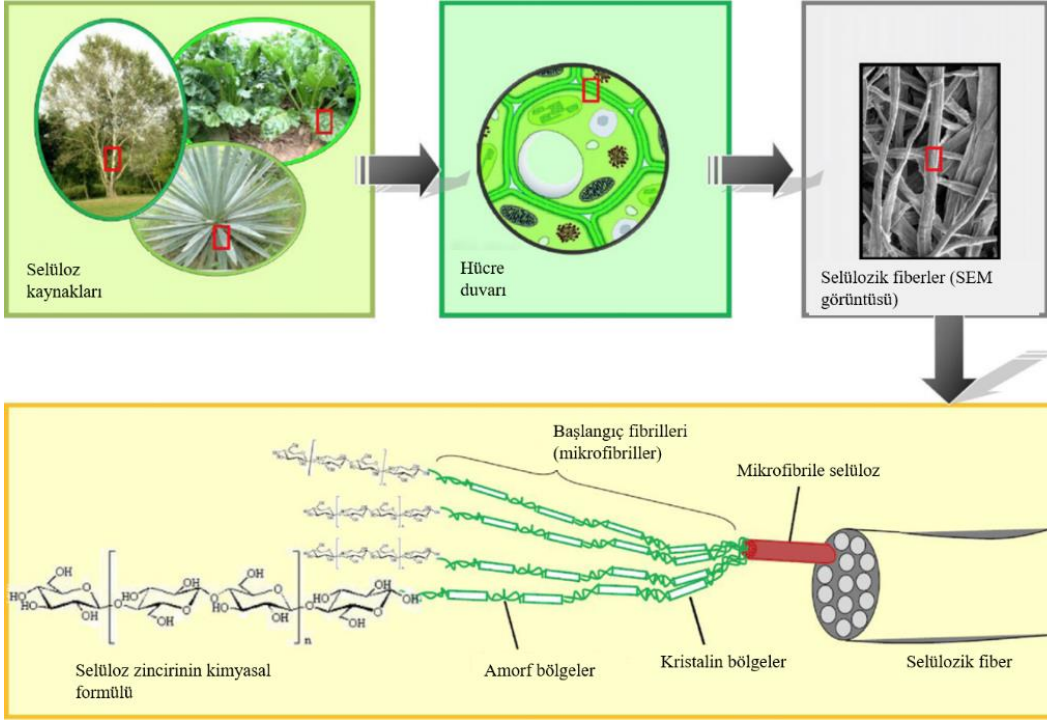
BS sıvı ortamda bulunduğunda içerisindeki su içeriğini sabit tutabilmekte ve bu ortamdan çıkartılıp farklı bir yüzeye (deri gibi) konulduğunda içerisindeki suyu belirli bir hızda salmaktadır. BS’nin antioksidan maddeler de dahil olmak üzere farklı bileşenler ile modifiye edilerek fonksiyonelliğinin arttırılabildiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Yüksek nemlendirme özelliği ile tek başına ideal bir yüz maskesi olan BS ilave olarak taurin yüklemesi ile antioksidan özelliği de taşıyan işlenmiş bir ürüne dönüştürülebilecektir.

Bu tez kapsamında bakteriyel selüloz üretiminin alternatif hammadde olarak keçiboynuzu ve fasulye kullanılarak gerçekleştirilmesi, üretimin istatistiksel yöntemlerle optimizasyonu, ürünün karakterizasyonu ve elde edilen BS’ye taurin yüklenerek antioksidan özellikli yüz maskesi üretimi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

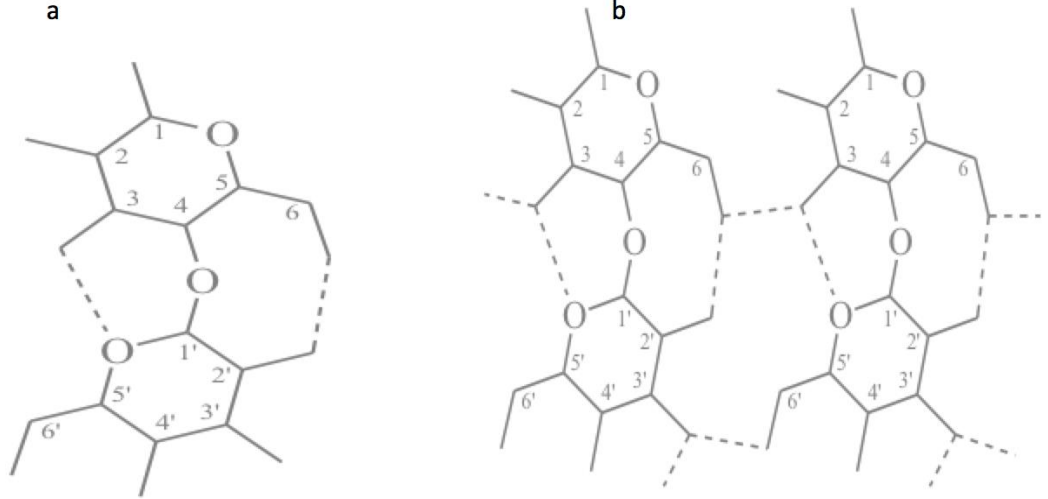
2.1. Selüloz

Bitki hücre duvarının ana bileşeni olan, bitki kütlesinin üçte biri ile yarısını oluşturabilen ve odun, pamuk, keten, haşhaş, buğday gibi tek yıllık ya da çok yıllık bitkilerde bulunan selüloz yıllık birkaç milyar tonluk biyosentezi nedeniyle doğada en çok üretilen ve bulunan biyolojik polimerdir (Mcnamara et al., 2015; Sun, 2004). Selülozun yeşil bitkilerden ilk izolasyonu 1850'li yılların öncesine dayanmaktadır (O'sullivan, 1997). Ancak 1838 yılında Payen tarafından tanımlanmadan veya ilk defa fiber olarak izole edilmeden çok önce dahi, kendine has fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri nedeniyle selüloz farklı alanlarda kullanılmıştır (Moran-Mirabal and Cranston, 2015). Kimyasal ham madde olarak son 150 yıldır kullanılan selüloz binlerce yıldır giyim eşyalarının yapımında, ısınma için enerji kaynağı olarak ve barınakların yapımında kullanılmaktadır (Klemm et al., 2005). Selülozun bitkinin yaprağında, meyvesinde ya da sap bölgelerinde olması oluşumunu ve yapısını (kokusuz, beyaz fiberler) değiştirmemektedir. Şekil 2.1 selüloz molekülünün oluşumunu şematize etmektedir (Lavoine et al., 2012).



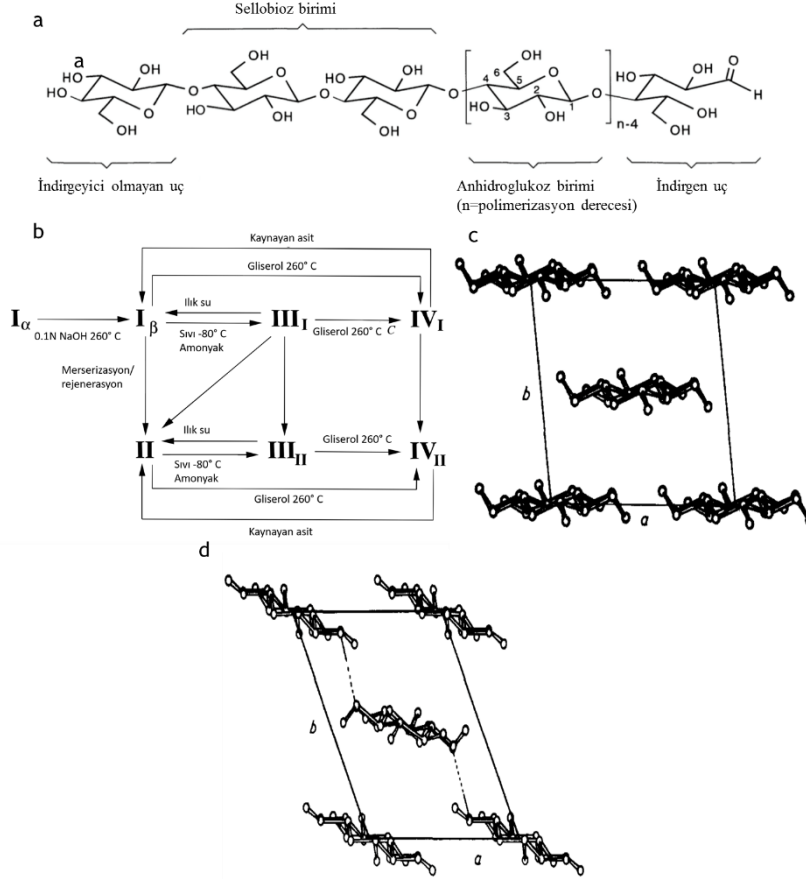
Şekil 2.1 Selüloz kaynaklarından selüloz monomerlerine: selülozun detaylı yapısı (Lavoine et al., 2012)

Selüloz D-glukopiranoz birimlerinin β -1,4-glikosidik bağları ile bağlanmasından oluşan yüksek moleküler ağırlığa sahip bir polimerdir. Selüloz, içerisinde bulunan hidroksil gruplarının iç (Şekil 2.2a) ve moleküller arası (Şekil 2.2b) yaptığı bağlar nedeniyle çok yüksek kristalin fiberler oluşturma eğiliminde olduğundan X-Ray difraksiyon (XRD) metodu kullanılarak kolaylıkla analiz edilebilmektedir (Park et al., 2010). İç molekül hidrojen bağları C3-OH ile endosiklik oksijen arasında ve C6-OH ile C2-OH arasında, moleküler arası hidrojen bağları ise C3-OH ile C6-OH arasında gerçekleşir.



Şekil 2.2. Selüloz zinciri üzerindeki hidrojen bağları: (a) iç hidrojen bağları ve (b) moleküller arası hidrojen bağları (uyarlanmıştır) (Hakeem et al., 2014)

Selüloz; selüloz I (doğal selüloz, paralel zincirli), selüloz II (doğal selülozun meriserizasyonu ya da rejenerasyonu ile elde edilmiş antiparalel zincirli), selüloz III ve IV (selüloz I ve II'nin modifiye edilmesi ile oluşturulan) olmak üzere farklı yapılarda bulunabilmektedir (Simon et al., 1988). Selülozun polimorfizmi, bu yapılar arasındaki dönüşüm Şekil 2.3b'de özetlenmiştir ve selüloz I ve II arasındaki yapısal fark Şekil 2.3c ve 2.3d'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Selüloz yapısı: (a) selüloz monomeri (anhidroglukoz birimi), sellobioz birimi, indirgen ve indirgen olmayan uçlar (Klemm et al., 2004), (b) farklı selüloz birimleri arasındaki geçişler (Kroon-Batenburg et al., 1996), (c) Selüloz I (paralel zincileri) ve (d) Selüloz II (antiparalel zinciler) (Kolpak et al., 1978)

Selüloz, anhidroglukoz birimlerinin (AGB) bir araya gelmesi ile oluşur. İki AGB'nin β -1,4-glikosidik bağı ile bir araya gelmesi ile oluşan yapıya sellobioz adı verilmektedir (Şekil 2.3a). n sayıda AGB bir araya geldiğinde indirgen ve indirgen olmayan iki uca sahip selüloz fiberi oluşmaktadır. n sayısı polimerin birçok özelliğini doğrudan etkileyen polimerizasyon derecesini (PD) ifade etmektedir. Bitkisel selülozda PD değeri çok değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin odun olması durumunda bu değer 300-1700 arasında pamuk olması durumunda ise 800-10000 arasında değişebilmektedir (Klemm et al., 2005).

Bitki hücre duvarı yapısında bulunan selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin gibi diğer polimerler ile birlikte bulunmaktadır. Bitkisel selüloz, bu polimerlerin varlığının sorun teşkil etmediği gıda, tekstil, kağıt, ambalaj gibi büyük endüstrilerde yaygın olarak kullanılabilir (Smole et al., 2013). En saf halde üretilen bitkisel selüloz olan pamuk dahi diğer polimerlerden bir miktar içermektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Bazı bitkilerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri (Klemm et al., 2005).

Kaynak	İçerik			
	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin	Ekstrakt
Sert ağaç	43-47	25-35	26-24	2-8
Yumuşak ağaç	40-44	25-29	25-31	1-5
Küspe	40	30	20	10
Hindistan cevizi lifi	32-43	10-20	43-49	4
Mısır koçanı	45	35	15	5
Mısır sapı	35	25	35	5
Pamuk	95	2	1	0,4
Keten	63	12	3	13
Kendir otu	70	22	6	2
Heneguen	78	4-8	13	4
Sabırotu lifi	73	4-8	17	2
Hint keneviri	71	14	13	2
Kenaf	36	21	18	2
Rami	76	17	1	6
Sisal	73	14	11	2
Buğday samanı	30	50	15	5

Selülozun kozmetik, biyomedikal ve tıp gibi alanlarda kullanılabilmesi için nanoboyutta kristallerinin oluşturulması ve safsızlıklarından arındırılması gerekmektedir. Nanoboyutta selüloz üretimi için gerçekleştirilen metodlar; asit hidrolizi, mekanik inceltme, TEMPO-aracılı oksidasyon ve mekanik uygulama ile desteklenmiş enzimatik hidroliz olarak sınıflandırılmaktadır (Zhao et al., 2015). Tüm bu yöntemler kendilerine has avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Günümüzde

nano boyutta selülozun belirtilen fiziksel ve kimyasal yöntemler ile elde edilmesinin maliyet ve performans açısından uygunluğu tartışma konusudur.

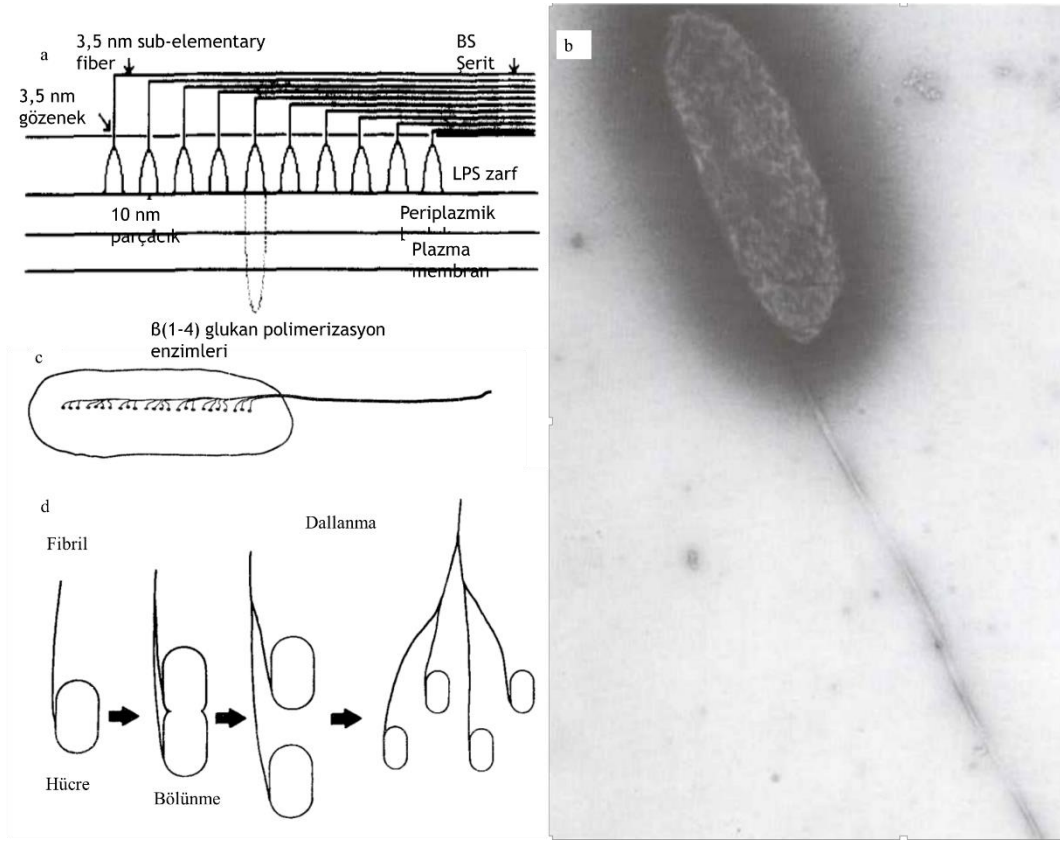
Bitkilere ek olarak bazı bakteri, mantar ve algler de selüloz üretimi gerçekleştirebilmektedirler. Bakteriler tarafından sentezlenen selüloz mikrobiyal selüloz ya da bakteriyel selüloz (BS) olarak adlandırılmaktadır. Üretimin %100 saf selüloz olarak gerçekleşmesi ve fiberlerin nanoboyutlarda olması BS'yi özellikle katma değeri yüksek saf ürünlerin kullanıldığı kozmetik ve biyomedikal alanda bitkisel selülozun önüne geçirmektedir.

2.2. Bakteriyel Selüloz

Selülozun dünya üzerinde en çok bulunan formu bitkilerin fotosentez ile ürettiği form olmasına rağmen (selüloz I) bazı alg, küf ve bakteriler hücre dışı olarak selüloz sentezleyebilmektedir (Trovatti et al., 2011). BS, glukopiranoz şeker monomerlerinin bitkisel selülozda olduğu gibi doğrusal olarak bağlanmasıyla oluşan $(C_6H_{10}O_5)_n$ formülüne sahip, yaygın olarak *Gluconacetobacter xylinus* olmak üzere *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Sarcina* türleri tarafından sentezlenebilen hücre dışı bir polimerdir (Şekil 2.4b) (Cheng et al., 2011; Vitta and Thiruvengadam, 2012; Wei et al., 2011). Üretim miktarı $(1,5 \times 10^{12}$ ton/yıl) ile neredeyse tükenmez bir kaynak olmasına rağmen selüloz sentezi model mikroorganizma olarak görülen *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus* olarak da geçer) üzerinde yapılan geniş çalışmalara kadar net olarak anlaşılamamıştır (Sunagawa et al., 2013; Wong et al., 1990). Özellikle X-ray difraksiyon gibi özel tekniklerin ortaya çıkması ve bu tekniklerin BS'nin bitki

orijinli selülozda olduğu gibi sellobiyoz birimlerinin bir araya gelmesi ile oluşan selüloz I -paralel zincir- (şekil 2.3c) yapısında olduğunu göstermesi selüloz üretiminin açıklanmasında mikroorganizmaların model olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Iguchi et al., 2000). Model mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalar selüloz üretimi hakkında birkaç on yılda bitki hücreleri üzerinde yapılan çalışmalardan daha çok bilgi elde edilmesine olanak tanıdığından selüloz sentezinin açığa çıkarılması ile ilgili çalışmalar bu organizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. *G. xylinus* model organizmasında *acs* (*acsAB*, *acsC* ve *acsD*) ya da *bcs* (*bcsA*, *bcsB*, *bcsC* ve *bcsD*) olmak üzere birkaç takım operon dizisi belirlenmiştir (Nakai et al., 2002).

Bakterilerin, bitkisel selülozun aksine yapıya katılmayan bir polimeri, primer metabolizma ile üretilip hücre dışına salgılamalarının sebebi tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan çalışmalarda ortamın viskozitesini arttıran hidrofilik selüloz üretiminin mikroorganizmaları istenmeyen değişimlere karşı (patojenik mikroorganizmalar, pH'daki dalgalanmalar, su içeriğinin değişmesi gibi) koruduğu, UV gibi çevresel faktörlerin olumsuz etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Bielecki et al., 2005b).



Şekil 2.4 Bakteriyel selülozun üretim mekanizması: a) *G. xylinus*'ta BS üretiminin şematize edilmiş hali, selüloz I ve II sentezi, b) BS'nin hücre dışı sentezi -negatif boyama (Brown, 1989) c) Hücre dışı sentez şematik görünüm (Yoshinaga et al., 1997), d) Dallanmış fiberlerin oluşumunun şematik görünümü (Yamanaka et al., 1989) ve e) Selüloz şeritlerinin düzenlenmesi (Jonas, et al., 1998)

Gelişen sentetik polimer teknolojisine rağmen üretilen cilt bakım ürünlerinin ve biyomedikal malzemelerin en büyük sorunu cilt hassasiyetine neden olması ve biyouyumluluklarının düşük olması nedeniyle cilde ve/veya kullanıldıkları doku/organlara zarar vermesidir (Goebel et al., 2012). Bu sorunun üstesinden gelinebilmesi için sentetik polimerler yerine en uygun adaylar biyouyumluluk problemlerini minimize eden uygun özelliklere sahip doğal polimerlerdir (Petersen and Gatenholm, 2011). Selüloz bu kapsamda sert ve yumuşak dokulara uyabilen mekanik özellikleri nedeniyle, polimerizasyon derecesine göre; ayarlanabilir biyobozunurluk, çözünürlük, sünger, mikroküre, şişen, şişmeyen, örülü yapı gibi farklı şekillere sokulabilen yapısı nedeniyle iyi bir aday olabilmektedir (Müller et al., 2006). Ancak, bitkisel selüloz tekstilden gıda sanayisine kadar geniş alanda

yaygın kullanıma sahip olmasına karşın lignin ve hemiselüloz gibi safsızlıkları nedeniyle sağlık ve kozmetik alanında kullanılamamaktadır (Vitta and Thiruvengadam, 2012). BS kimyasal olarak bitkisel selüloza eş olsa da yüksek saflıkta nanofibril ağ yapısı (<50 nm), yüksek kristalinite ve polimerizasyon derecesi, yüksek su emme ve tutma kapasitesi, yüksek çekme kuvveti ve biyouyumluluk başta olmak üzere fiziksel ve mekanik olarak ayırt edilebilir özelliklere sahip olması nedeniyle ümit vaat etmektedir (Hong and Qiu, 2008; Iguchi et al., 2000; Jonas1998; Klemm et al., 2001a; Shigematsu et al., 2005). Ayrıca saf selülozun biyoteknolojik yöntemlerle mikrobiyal üretimi bitkisel selülozun saflaştırılmasından daha kolay bir yöntemdir (White and Brown, 1989).

BS sentezinde öncelikle hücre membranına bağlı kompartmanlarda selüloz alt fibrilleri oluşturulur. Bu fibriller bir araya gelerek mikrofibrilleri oluşturarak hücre dışına salgılanır (Şekil 2.4a ve 2.4c) (Yoshinaga et al., 1997). Bu noktada hücreler bir ekstrüzyon makinesi gibi iş görürken nanoboyutta stabil selüloz üretimini gerçekleştirmektedirler (Şekil 2.4e) (Jonas1998). Hücre bölünmeye başladığında her iki mikroorganizma BS sentezine devam etmekte ve dallanmalar oluşturmaktadırlar (Şekil 2.4d) (Yamanaka et al., 1989). Bu sayede çok yüksek polimerizasyon derecelerine ulaşılabilir. BS üzerine yapılan çalışmalarda *Acetobacter* (*Gluconacetobacter*) patojen olmaması, meyve ve meyve ürünlerinde sıklıkla bulunması, laboratuvar ortamında kolaylıkla kültive edilebilmesi, görece yüksek verimde ve kararlı BS üretme kabiliyeti nedeniyle ön plana çıkan organizmadır (Klemm et al., 2006; Moosavi-Nasab and Yousefi, 2011; Nguyen et al., 2010; Shigematsu et al., 2005).

Mikro/nano boyutlardaki gözenekleri farklı çeşitte bileşikler için yükleme yapılabilecek taşıyıcı özelliği göstermektedir. BS üzerine üretim sonrası çeşitli biyoaktif bileşikler emdirilmesi ile işlevselliğinin geliştirilmesi ve yüz maskesi, yara örtüsü gibi farklı kullanım amaçlarına hizmet edecek bir ürün eldesi söz konusu olabilmektedir. BS yüzeyinin kolaylıkla işlevselleştirilebilmesi, yüksek çapraz bağ yapabilme kapasitesi gibi özellikleri nedeniyle birçok kompozitin sentezi için de yaygın olarak çalışılmaktadır (Grande et al., 2009; Gutierrez et al., 2012; Liu et al., 2012).

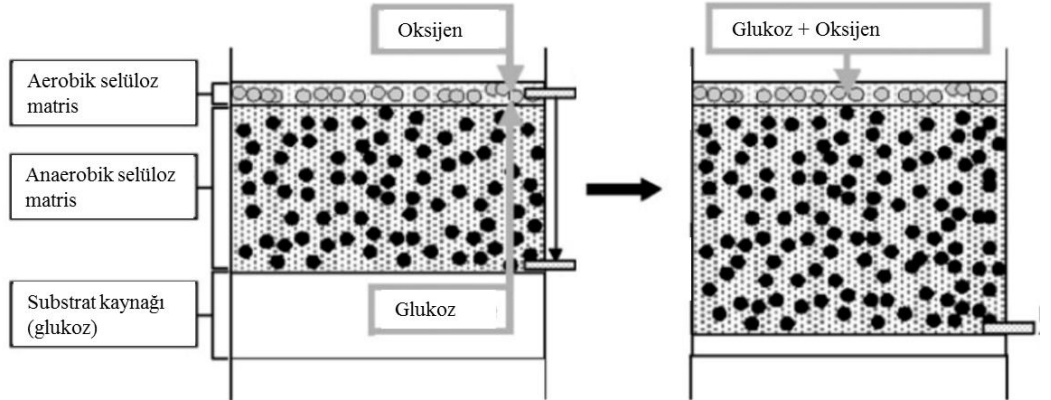
2.3. Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemleri Ve Üretimde Etkili Parametreler

BS üretim yöntemi, planlanan hedefe göre belirlenmelidir. Çünkü kültür metodu BS'nin yapısını, mekanik ve fiziksel özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Krystynowicz et al., 2002).

2.3.1. Statik kültür

BS üretimi gerçekleştirebilen mikroorganizmalar zorunlu aerob olduklarından statik kültürde üretim sıvı hava arayüzeyinde gerçekleşmektedir (Watanabe and Yamanaka, 1995). Böylelikle mikroorganizmalar oksijene ulaşabilirken aynı zamanda besiyeri ile bağlantılarını koruyabilmektedirler. Statik kültür ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki; BS üretiminde ideal oksijen transferi BS tabakası ince olduğu durumlarda gerçekleşmektedir. Kalınlık arttıkça özellikle tabakanın alt tarafında bulunan hücrelerin oksijene ulaşması kolay olmamaktadır. Bu nedenle bir süre sonra ortamdaki besiyeri miktarından bağımsız olarak selüloz

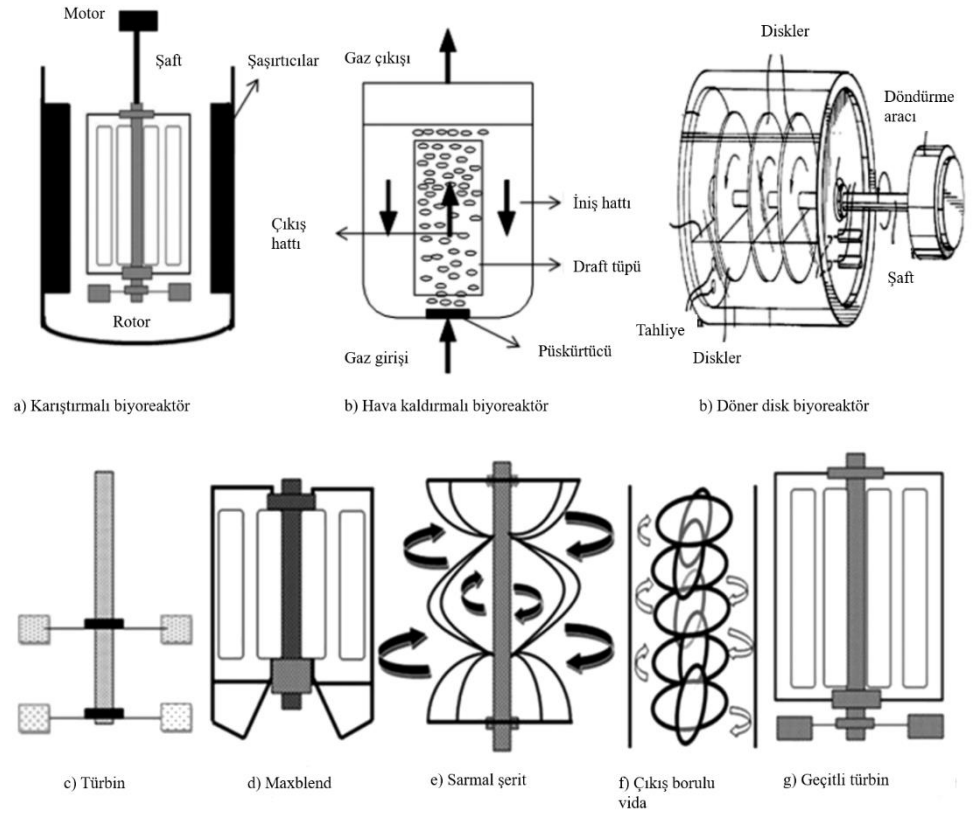
üretimi sınırlanmaktadır. Glukoz, oksijen transferi, ürünün uzaklaştırılması ve hücre canlılığının parametre olarak belirlendiği bir çalışma bu bulguyu desteklemektedir. Araştırmacılar, tabakanın ince olduğu durumlarda besiyerinin üst yüzeyinde uygun aerob koşulların sağlandığı, ancak kalınlık arttıkça bu durumun değiştiği ve 15. gün sonunda canlı mikroorganizmalar –glukoz tüketimi devam ediyor- olmasına karşın BS üretiminin anlamlı şekilde artmadığını göstermişlerdir (Hornung et al., 2006). Bu sorunun üstesinden gelinebilmesi için substrat beslemesinin de oksijenin verildiği taraftan yapılması üretim verimini arttırabilmektedir (Şekil 2.5) (Hornung et al., 2007). Oksijen geçirgen membran ile gerçekleştirilecek üretim de statik kültürdeki en önemli kısıtlardan biri olan yüzey alanı/ hacim oranının dezavantajlarını ortadan kaldırabilmektedir (Yoshino et al., 1996). Ancak bu sistemin endüstriyel boyutta üretimlere uygulanabilirliği tartışma konusudur.



Şekil 2.5 Mikroorganizmaların oksijen ve substrat transfer limitini aşmaları için geliştirilmiş yöntem (Hornung et al., 2007)

2.3.2. Çalkalamalı-havalandırma kültürler

BS  retiminde çeşitli çalkalamalı kültür teknikleri ve çalkalayıcı tipleri kullanılabilmektedir ( ekil 2.6). Üretimde çalkalamalı kültür kullanılması karşılaşılan oksijen transfer kısıtının ortadan kaldırılmasına imk n tanımaktadır (Sani and Dahman, 2010). Ancak mikroorganizmaların bu şartlara karşı dayanıksız olması, mutasyona yönelebilmeleri veya selüloz üretebilme kabiliyetlerini kaybetmeleri bu kültür sistemlerinde karşılaşılabilen en önemli problemlerdendir. Bu sistemlerde mutasyona ve çalkalama şartlarına dayalı kültürlerin seçimi bu nedenle büyük önem arz etmektedir (Hestrin and Schramm, 1954; Yoshinaga et al., 1997). Reaktör kullanılması durumunda üretim esnasında, örnek alınarak besiyeri analiz edilebilmekte, eş zamanlı olarak oksijen transferi, pH, canlı hücre miktarı, çözünmüş oksijen miktarı ölçülebilmekte ve istenilmesi durumunda kontrol edilebilmektedir (Chao et al., 2000). Böylelikle verim artışı sağlanabilmektedir. Verimliliğin arttırılması durumunda karşılaşılan problemler ise Non-Newtonian yüksek viskozite nedeniyle karıştırma etkinliğinin iyi şekilde sağlanamaması, oksijen transferinin ve pH düzenlenmesinin istenilen şekilde gerçekleştirilememesi ve üretilen selülozun özelliklerinin statik kültürdeki gibi tekdüze olmaması ve yüksek mekanik özelliklerin elde edilememesidir (Kouda et al., 1997). Yapılan araştırmalar çalkalamalı kültürde üretilen selülozun daha düşük polimerizasyon derecesine ve kristaliniteye sahip olduğunu göstermektedir (Watanabe et al., 1998). Bu nedenle endüstriyel boyuta uyarlanabilse dahi çalkalamalı kültür tercih edilirken elde edilecek ürünün kullanılacağı alanda beklenen özellikleri taşıyıp taşımadığı iyi irdelenmelidir.



Şekil 2.6 BS üretiminde kullanılabilen çeşitli reaktör ve karıştırıcı tipleri (Sani and Dahman, 2010)

2.3.3. pH

BS üretiminde optimum pH 5,5 olarak belirtilmektedir. Ancak selüloz üretimi sırasında pH'nın 3,5 ve altına düşebildiği bilinmektedir (Kojima et al., 1997; Vandamme et al., 1998). Selüloz üretimi sırasında bakterinin glukozu, glukonik ya da ketoglukonik aside dönüştürmesi pH'yı en önemli fermentasyon parametrelerinden biri haline getirmektedir (Keshk et al., 2005). Ortamdan karbon kaynağının uzaklaşmasının yanı sıra pH düşüşü selüloz üretim verimliliğini düşürmektedir (Hwang et al., 1999). Çünkü pH, bakterilerin canlılıklarını koruyabildikleri ancak selüloz üretimi gerçekleştiremedikleri 3,5 değerinin altına düşebilmektedir (Klemm et al., 2001a). pH düşüşü sadece pH kontrolünün gerçekleştirilmediği statik kültürde değil aynı zamanda çalkalamalı kültürlerde de

önemli bir problemdir. Genetik kararsızlık ve bakterilerin selüloz üretebilen formlarından selüloz üretemeyen formlarına dönüşmesi genellikle çalkalamalı kültürde karşılaşılan en önemli sorun olarak belirtilmektedir. Ancak üretilen selüloz nedeniyle parametrelerin ölçümünü yapan problemlerin üzerinin viskoz yapı ile çevrilmesi eşzamanlı kontrolün gerçekleşmesine olanak vermemektedir. Bu nedenle iyi bir pH kontrolü yapılamadığından üretim verimi düşebilmektedir (Shoda and Sugano, 2005). Sadece pH probu değil, çözülmüş oksijen probu, sıcaklık probu ve karıştırıcı da bu durumdan olumsuz etkilenmektedir (Zhou et al., 2007). Bu nedenle araştırmacılar besiyerine sitrik aside ek olarak tri-sodyum sitrat ve mısır maserasyon sıvısı gibi ek kimyasallar eklemektedirler (Noro et al., 2004).

2.3.4. Karbon kaynağı

BS üretimi için temel besiyeri bileşeni karbon kaynağıdır. *G. xylinus*'un farklı karbon kaynaklarını kullanarak BS ürettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Bielecki et al., 2005a). BS üretimi için tanımlanmış ilk besiyeri Hestrin & Schramm tarafından geliştirilen %2 glukoz içeren besiyeridir (Masaoka et al., 1993). Yapılan çalışmalar BS üretiminde fruktoz, sükroz ya da bu iki şekerin kombinasyonlarının kullanılmasının, tek başına glukoz kullanımından daha yüksek verimde BS üretimini sağladığını göstermektedir. Ortamda glukozun bulunmaması bu sayede, glukozun glukonik aside dönüşmemesi ve dolayısı ile pH düşüşünün üretimi kısıtlamaması bunun nedenidir (Embuscado et al., 1994). Glukoz konsantrasyonunun belirli bir başlangıç değerinin üstünde olması da BS üretim verimini doğrudan etkileyebilmektedir. Bu nedenle başlangıç derişimi iyi ayarlanmalıdır (Masaoka et al., 1993). Ancak biyoteknolojik üretimlerde üretim maliyetinin ucuz hammadde kullanılarak düşürülmesi ürünün ticarileşme

potansiyelini arttırmaktadır. Bu nedenle yüksek miktarda yapılan üretimin uygun maliyette sağlanabilmesi; kolay bulunan ve uygun maliyet ile elde edilebilen hammadde varlığına bağlıdır.

BS üzerine her yıl birçok akademik yayın yapılmaktadır. Geniş kullanım potansiyeli nedeniyle farklı uygulamalar için çoğunlukla Çin ve Kore kaynaklı patentler alınmış ancak yeterince ticarileştirilememiştir. Ticarileştirmenin yaygınlaştırılması için BS'nin ekonomik olarak üretilebilmesi gerekmektedir. Bunun için; bulunması kolay ve ucuz hammadde ile üretim yapılmalı, diğer kültür ortamı parametreleri optimize edilmeli ve en uygun üretim metodu seçilmelidir. Tüm bu parametreler göz önüne alındığında biyomedikal uygulamalar için kullanılabilecek saflık ve kalitede ve aynı zamanda yüksek miktar ve verimde BS üretimi gerçekleştirilebilecektir (Petersen and Gatenholm, 2011).

2.3.5. Azot kaynağı

Besiyerinin diğer önemli bileşeni metabolizma için gerekli olan, bakteri kuru ağırlığının %8-14'ünü oluşturan proteinlerin temel taşlarından olan azot kaynağıdır (Chawla et al., 2009). Literatürdeki çalışmalar en uygun azot kaynağı hakkında farklı sonuçlar vermektedir. Örneğin; Çoban ve Bıyık'ın çalışmasında karbon kaynağının glukoz, azot kaynağının ise maya özütü olarak kullanılması durumunda en iyi üretimin gerçekleştirildiğini belirtilmektedir (Çoban and Bıyık, 2013). Başka bir çalışmada ise besiyerinin %8 mısır şurubu (corn steep liquor- CSL), %4 glukozdan oluşmasının ideal olarak kullanılabileceğini belirtilirken (Rani and Appaiah, 2011), bir diğerinde glukoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında kazein hidrolizatı/pepton/glutamat ya da amonyum sülfat kullanılabileceğini, karbon

kaynağının süroz olması durumunda ise amonyum süfatın etkin bir azot kaynağı olmadığı belirtilmektedir (Ramana et al., 2000). Bu değerlendirmeler ışığında uygun besiyeri bileşenlerinin seçiminde kullanılan bakterinin ve diğer besiyeri bileşenlerinin de irdelenmesi gerektiği kanısına varılabilir. BS'nin endüstriyel boyutta üretilmesine yönelik çalışmalarda buna ek olarak azot kaynağının maliyetinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

2.3.6. Sıcaklık

Canlı sistemlerde sıcaklık her zaman etkili parametre olmuştur. Sıcaklıktaki değişimler mikroorganizmanın metabolik yol izlerinde farklılıklara ve dolayısıyla üretilen birincil ve ikincil metabolitlerin veya bu metabolitlerin üretim miktarlarının değişmesine neden olabilmektedir. Bakteriyel selüloz üretiminde sıcaklığın etkili parametre olup olmadığı da çeşitli çalışmalar ile incelenmiştir (Zeng et al., 2011). BS üretiminde 25-30°C aralığındaki sıcaklıklar optimum değerler olarak görünürken 24°C gibi daha spesifik değer bulan araştırmacılar da mevcuttur (Jonas et al., 1998).

2.3.7. İnkübasyon süresi

İnkübasyon süresi BS üretimindeki en önemli parametrelerden biridir. Süre arttıkça BS kalınlığı ve miktarı artmaktadır (Goh et al., 2012). Yapılan çalışmalar belirli bir inkübasyon süresi sonrasında canlı hücre sayısında artış olsa da BS üretiminin anlamlı bir şekilde artmadığını göstermektedir (Nakagaito et al., 2005; Pourramezan et al., 2009). Endüstriyel süreçlerde süre en önemli maliyet parametrelerinden biri olduğundan verim ile verimliliğin doğru şekilde analiz edilmesi ve buna göre karar verilmesi gerekmektedir.

2.3.8. Diğer parametreler

BS sentezi oksijence zengin sıvı/hava arayüzeyinde gerçekleştiğinden, yüzey/hacim oranı üretim verimliliğinin en önemli parametrelerinden biridir. Yüksek hacimlerde bakteriler, selüloz üretimi için mevcut besiyeri bileşenlerinden çok azını kullanırken, düşük hacimlerde istenilen kalınlıkta ve ağ yapısında BS üretimi gerçekleşmeden besiyeri içeriği üretime zarar verecek şekilde değişebilmektedir. Bu olumsuzlukların engellenmesi için üretim kaplarında farklı yüzey/hacim oranları denenerek optimizasyon sağlanmalıdır. Literatürde bazı kaynaklar ideal yüzey/hacim oranını $2,2 \text{ cm}^{-1}$ olarak belirtmesine rağmen (Jonas et al., 1998) $0,57-0,71 \text{ cm}^{-1}$ 'de maksimum (Ruka et al., 2012) verimliliğin elde edilebildiğini ve $3,5 \text{ g/L}$ üretim veriminin gerçekleştiğini belirten çalışma da mevcuttur.

Tamponlar ve katkı maddeleri de BS üretimini doğrudan etkileyebilmektedir. Katkı maddeleri BS polimerizasyon derecesini, üretim miktarını ve mikrofibrillerin çaplarını değiştirebilmektedir (Tokoh et al., 1998). Üretim sırasında pH düşüşü üretim verimliliğini doğrudan etkileyebilen bir parametre olduğundan tamponlar büyük önem arz etmektedir. Kullanılacak besiyeri maddelerinin de tamponlama kapasitesinin bulunması üretim verimliliği ve süreç optimizasyonu açısından değerlendirmeye alınmalıdır (Noro et al., 2004). Tamponlama kapasitesi olan besiyeri bileşenleri ekstra tampona gerek duyulmamasını sağlayacağından endüstriyel süreçlerde avantaj sağlayacaktır.

Aşının yaşı ve miktarı da BS üretiminde etkili parametrelerdendir. Bu yüzden kullanılan aktif kültürün dikkatle seçilmesi gerekmektedir. Aşının içerdiği selüloz

üretmeyen mutant hücre miktarının çok olması verimi düşürecektir (Park et al., 2003).

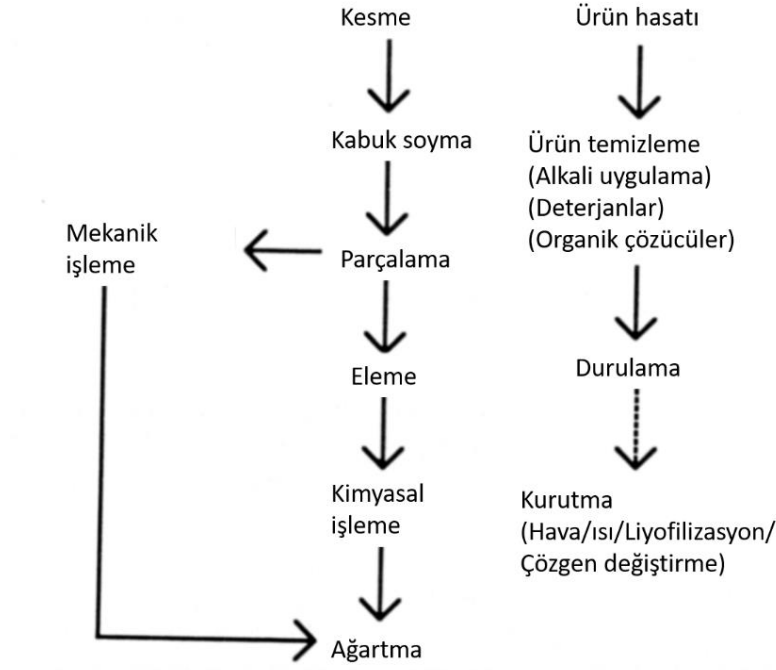
2.4. Bakteriyel Selülozun Kullanım Alanları

Bilim ve teknolojiadaki gelişmeler son yıllarda yenilenebilir, sürdürülebilir ve çevre dostu materyallerin önem kazanmasını sağlamıştır. Selüloz doğada neredeyse tükenmez miktarda bulunuşu, yenilenebilirliği, yüksek mekanik dayanıklılık ve koruyucu bariyer görevi yerine getirebilmesi gibi özellikleri ile bu bağlamda dikkat çeken polimerlerin başında gelmektedir (Zhao et al., 2015). Ancak bitkilerde selüloza sıkıca bağlı lignin, hemiselüloz ve pektin gibi polimerler bulunmakta, BS ise bu polimerler olmadan saf olarak sentezlenmektedir (Chen et al., 2013; Keshk, Sm, 2014).

Mikrobiyal polimer üretiminin sentetik ya da bitkisel polimerlere olan üstünlükleri;

- İklimsel ve bölgesel kısıt bulunmaması,
- Çok daha kısa süreli aralıklar ile ürün elde edilmesi (saatler ya da günler)
- Rekombinant teknolojiler kullanılarak istenilen ürünlerin yüksek verimde üretilebilmesi,
- Mikrobiyal büyüme ve sentez için tehlikeli kimyasalların kullanılmaması,
- Yiyecek atıklarının mikrobiyal üretimlerde kullanılması ile ucuz üretim yapılabilmesi ve atıkların değerlendirilmesinin sağlanabilmesi,
- Saflaştırma basamaklarının daha kolay olması (Şekil 2.7)

olarak özetlenebilir (Khan et al., 2007).

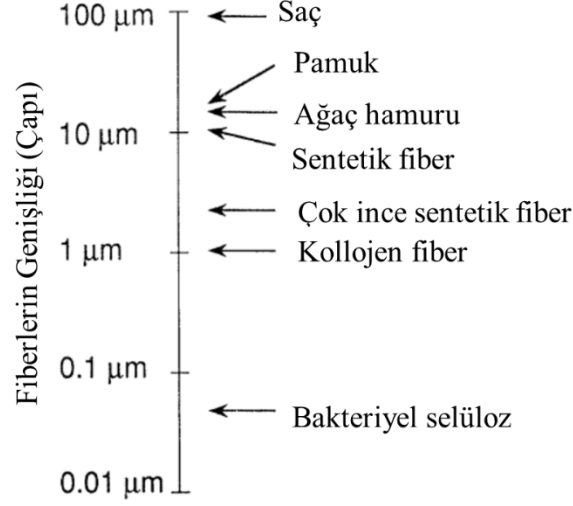


Şekil 2.7 Bakteriyel selüloz ve bitkisel selüloz saflaştırma basamaklarının karşılaştırılması (White and Brown 1989)

Mikrobiyal bir üretim olan BS yukarıda belirtilen avantajlara ek olarak;

- Yüksek çekme dayanımı (2 Gpa),
- Yüksek Young modülü (138 Gpa),
- Yüksek su tutma kapasitesi (kendi ağırlığından 100 kat fazla),
- Odundan elde edilen selülozdan 200 kat daha fazla yüzey alanı,
- Yüksek kristalinite,
- İstenilen şeklin verilebilmesi,
- Yüksek biyouyumluluk,
- Bitkisel selülozdan yüz kat ince (<130nm) nanofiber ağ yapısı (Şekil 2.8)

gibi özellikleri ile bitkisel selülozdan ayırt edilmektedir (Fu et al., 2013; Yamanaka et al., 1989).



Şekil 2.8 Bakteriyel selüloz fiber boyutlarının diğer fiberler ile karşılaştırılması (Yoshinaga et al., 1997)

Bu özellikleri BS'nin katma değeri yüksek alanlarda farklı amaçlarla kullanılmasına imkan tanımaktadır.

Doku mühendisliği

BS'nin endüstriyel olarak kullanılabilirliği çok geniştir. Bitkisel selülozun kullanılabilirdiği bütün alanlar için uygun olmasına ek olarak yüksek kristalinite ve saflığı ile daha farklı alanlarda da kullanılabilmektedir. Dünya çapında çok sayıda patent bulunmasına karşın BS'nin ticarileştirildiği örnek sayısı azdır (Yoshinaga et al., 1997). Biofill®, Gengiflex® ve Bioprocess® BS'nin sağlık alanındaki ticarileştirilmiş örnekleridir (Brown et al., 2015). Bu ürünlerin yara tedavisinde kullanılması durumunda (300'ün üzerinde tedavi sonucuna göre) BS;

- Acının kullanımdan hemen sonra hafiflemesini ve azalmasını,
- Yaranın iyi şekilde kapanmasını
- Enfeksiyon olasılığının azalmasını
- Yara için koruyucu bir örtü oluşturmaya rağmen saydamlığı sayesinde izlenebilmesini
- Hızlı epitel oluşumunu sağlamasını ve böylece çabuk iyileşmeyi sağlayarak, tedavi maliyetinin azalmasını

sağladığı gösterilmiştir (Keshk, Sm, 2014).

İdeal yara örtülerinin;

- Nemli ortam sağlaması,
- Yarayı ikincil enfeksiyondan koruması,
- Yara akıntılarını absorbe etmesi,
- Yara yüzeyinde hücre ölümünü azaltması
- Yaranın kurumasını engellemesi
- Biyouyumlu olması
- Antijenik olmaması
- Biyouyumlu olması (Kokabi et al., 2007)
- Acısız bir şekilde yaradan uzaklaştırılabilmesi,
- Antibakteriyel ilaç yüklemesine olanak tanınması
- Gaz alışverişine izin vermesi (Lin et al., 2001)

beklenmektedir.

Atherosiklerotik damar hastalıkları günümüzde en büyük ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Sentetik polimer teknolojisinin gelişmesi ile polietilenterepihalate tabanlı Dacron ve politetrafloroetilen tabanlı Teflon sıklıkla bu hastalıkların tedavisinde damar grefti olarak kullanılmışlardır. Ancak damarların implantasyon sonrasında tromboz hızında %40'tan fazla artış göstermesi bu ürünlere karşı tedirginlik ile yaklaşılmasına neden olmuştur (Schumann et al., 2009). Yapılan bir çalışmada BS'den üretilen BSAYC damar greftinin hayvan denemelerinde çok başarılı sonuçlar verdiği ve vücut içindeki hücrelerin kolaylıkla tutunup büyümesini sağladığı gösterilmiştir (Klemm et al., 2001b). Aynı şekilde apirojenize edilmiş BS şeritlerinin yanık, ülser gibi hastalık ve yaralanma durumlarında geçici deri olarak kullanılabileceği de belirtilmektedir (Fontana et al.,

1990). BS'nin veya BS'ye dayalı ürünlerin biyomedikal alanda hangi amaçlar ile kullanılabileceği Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 BS ve BS tabanlı malzemelerin biyomedikal uygulamaları (Fu et al., 2013)

Uygulama	Materyal
Deri dokusu yenileme materyali	Bakteriyel selüloz Poli(vinil alkol) (PVA)-BS nanokompozit Kollajen modifiye BS Gümüş yüklenerek modifiye edilmiş BS Nano-gümüş kompozit yüklü BS / hiyaluronik asit Fotokatalitik parçacık yüklü BS
Yapay beyin zarı	PVA-BS BS
Kan damarları	Karboksimetil selüloz-BS BS-heparin kompoziti
Kemik ve bağ doku onarım materyali	Emilebilir BS, kollajen ve hidroksiapatit kompozitleri
Biyomedikal doku iskelesi materyalleri	Hidroksiapatit ile modifiye BS BS membran
Antiviral maske	BS-nano gümüş BS ve gümüş bileşikleri PVA ve BS
Makyaj malzemesi	BS ağ yapısına emdirilmiş katyonik polimerler BS membran BS-gliserin
Buz kesesi	BS hidrojel

BS sahip olduğu eşsiz özellikleri nedeniyle biyomedikal ve doku mühendisliği alanındaki uygulamalarına ek olarak (Petersen and Gatenholm, 2011);

- Çalkalamalı kültürde üretilen BS boncukları ile glukoamilaz gibi enzimlerin immobilizasyonunda (Wu and Lia, 2008),
- Düzlemsel ağ yapısı sayesinde, silikon kristalleri ile karşılaştırıldığında termal genişmesi çok düşük olan saydam nanokompozitlerin eldesinde (Nogi and Yano, 2008),

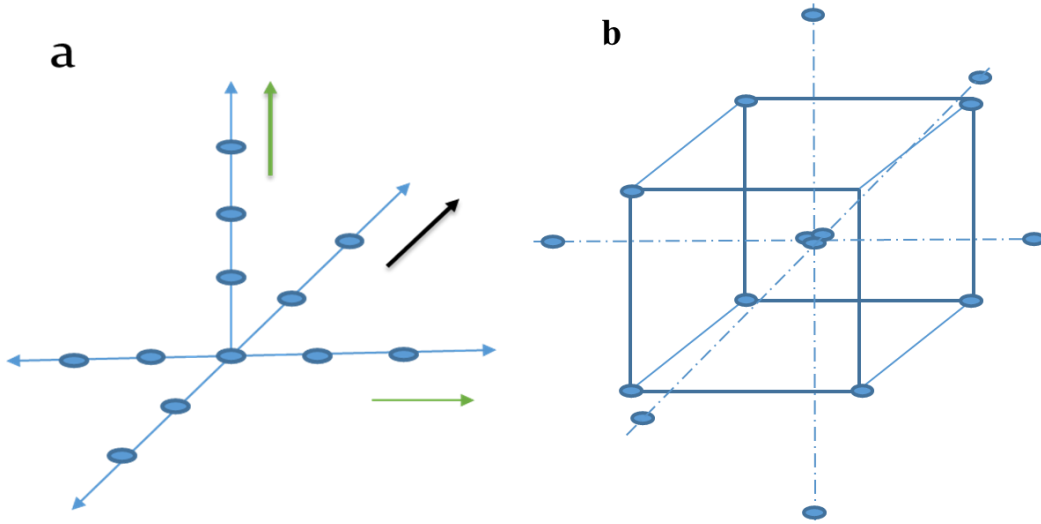
- Sahip olduğu çok sayıda hidroksil grubu sayesinde gümüş nanopartikül (AgNP) oluşumu için gerekli ajanların indirgenmesini ve stabilize edilmesini sağlayarak antibakteriyel BS/AgNP kompozitlerinin sentezinde (Yang et al., 2012),
- Metallerin çöktürülmesini katalizleyebilmesi, termal kararlılığı ve kimyasal yapısının yumuşatılabilmesi gibi özellikleri ile polielektrolit membranların geliştirilmesinde (Evans et al., 2003),
- Kristalin kadmiyum sülfid/BS kompozitinin elde edilerek metil turuncusu gibi organik boyaların degradasyonu ile fotokataliz sağlanmasında (Yang et al., 2011),
- Düşük kalori içeriğı nedeniyle salata sosu gibi gıda katkı maddelerinin, kalorisiz kabartma ve gıda stabilizasyon ajanlarının üretilmesinde (Okiyama et al., 1993),
- Süperkritik karbondioksit kullanılarak ıslak BS'ye göre çok daha yüksek por hacmine, $8,25 \text{ mg.cm}^{-3}$ gibi çok düşük yoğunluğa ve farklı amaçlarla kullanım potansiyeline sahip BS-aerogellerin eldesinde (Liebner et al., 2010),
- UV-graft polimerizasyon kullanılarak katyon değişim kapasitesine, akrilik asit ile modifiye edilerek iyon değişim kapasitesine sahip BS membranlarının üretilmesinde (Choi et al., 2004) ve
- Çeşitli yöntemlerle askeri veya eğitim amaçlı için yeniden yazılabilir elektronik kağıtların üretilmesinde (Shah and Brown, 2005)

olmak üzere çok farklı amaçlar ile kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Bu tez kapsamında BS, yüksek yüzey alanı ve por hacmi sağlayan 3B nanofibril ağ yapısı ve yüksek su tutma kapasitesi nedeniyle nemlendirme özelliğine sahip BS yüz maskesi ve farklı bileşenleri içinde tutabilme ve/veya onlar ile bağ yapabilme özelliklerinden faydalanılarak nemlendirici ve antioksidan özelliğe sahip BS-taurin yüz maskesi üretilmesi amacıyla kullanılmıştır.

2.5. Fermentasyon Optimizasyonu

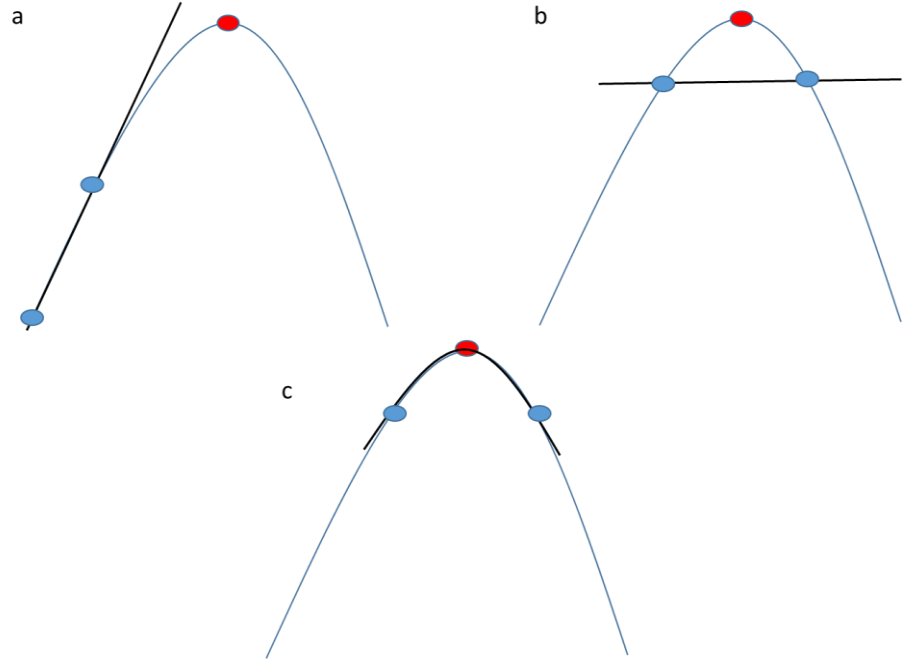
Mikrobiyal fermentasyon süreçlerinin optimizasyonu çalışmalarının laboratuvar ölçeğinden endüstriyel ölçeğe aktarılmasında büyük önem arz etmektedir. Mikrobiyal üretimler besiyeri bileşenlerinin kompozisyonu, başlangıç ve son pH, sıcaklık, iyonik konsantrasyon dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir (Nagata and Chu, 2003). Bu süreçlerin optimizasyonunda genellikle her seferde bir değişken (one variable at a time- OVAT) ve deney tasarımı olmak üzere iki yaklaşım kullanılmaktadır. OVAT yaklaşımında bir değişkenin limitleri değiştirilirken diğer değişkenler sabit tutulmaktadır (Wang and Wan, 2009). Çok iş yükü gerektiren, zaman alan ve tek boyutlu (Şekil 2.9a) analize imkan tanıyan bu yöntem genellikle optimum noktanın tespit edildiğini garanti edememektedir.



Şekil 2.9 Optimizasyon yaklaşımları; (a) OVAT ve (b) deney tasarımı (istatistiksel optimizasyon)

Bütün olasılıkların denenmesi pratik olmadığından OVAT yaklaşımı çok parametrenin bulunduğu mikrobiyal süreçler için yeterli olmayabilmektedir (Rodrigues et al., 2006). Çok fazla deneye ihtiyaç duymasının yanı sıra yöntem

başarı için; tahmin, sezgi, deneme yanılma ve ilgili alanda deneyim gerektirdiği ve çoğu zaman güven vermeyen sonuçlar elde edilmesine neden olduğundan rekabetçi olan günümüz endüstrisi için uygun değildir (Wahid and Nadir, 2013). Limitler doğru seçilmez ise elde edilecek birinci dereceden denklem optimum noktadan çok uzakta değerler elde edilmesine (Şekil 2.10a), doğru seçilmesi durumunda ise çoğu zaman gerçek optimum noktaya sadece yaklaşılmasına (Şekil 2.10b) izin vermektedir. Biyoteknolojik süreçlerde kullanılan diğer geleneksel tasarım türleri avantaj ve dezavantajları ile birlikte Tablo 2.3'te özetlenmiştir (Kennedy and Krouse, 1999).



Şekil 2.10 Deney tasarımında elde edilebilecek modeller ve optimum noktaya olan uzaklıkları; (a) birinci dereceden yanlış limitler ile elde edilen model, (b) doğru limitler kullanılarak optimum noktaya yaklaşılan birinci dereceden model ve (c) istatistiksel deney tasarımı ile elde edilen ikinci dereceden denklem

Tablo 2.3'ten de görüldüğü gibi geleneksel yöntemler çeşitli avantajlara sahip olmasına karşın optimum noktanın tespit edildiğini garanti edememektedir. İstatistiksel deney tasarımı, faktöriyel tasarım veya deney tasarımı (experimental

design ya da design of experiment) olarak bilinen ve 19. yüzyılın başında geliştirilmiş olmasına rağmen yakın geçmişe kadar biyoteknolojide sık kullanılmayan ikinci yaklaşım ise parametre sayısına göre 2 veya üç boyutlu (2B-3B) (Şekil 2.9b) analize imkan tanımakta ve aynı anda birden fazla parametrenin eş zamanlı değişimine izin vermektedir (Mandenius and Brundin, 2008; Wang and Wan, 2009).

Tablo 2.3 Geleneksel deney tasarım türleri, özellikleri, avantaj ve dezavantajları (uyarlanmıştır) (Kennedy and Krouse, 1999)

Tasarım Türü	Tasarım Özellikleri	Avantajlar	Dezavantajlar
En iyi tahmin (Deneme-yanılma)	Parametreler hakkında tahminler yapılarak sonucun ne olacağı hakkında denemeler yapılır.	• Basit • Kolay • Matematiksel beceri gerektirmez	• Sonsuza kadar sürebilir • Hiçbir zaman en iyi sonucun alındığı garanti edilemez.
Borrowing (ödünc alma)	Aynı tür ile yapılan çalışmalardan elde edilen besin ortamı bileşenleri ve proses koşulları kullanılır.	• Basit, • kolay ve • matematiksel beceriler gerektirmez	Belirlenen proses için literatürde çok fazla seçenek olacaktır.
Bileşen yer değiştirme	Besin ortamındaki sadece bir bileşen türünün aynı türden farklı bir kaynak ile değiştirilmesi esasına dayanır.	• Görüntüleme için kullanışlıdır. • Farklı karbon, azot ve diğer kaynakların optimizasyonunda kullanılabilir.	Bileşenler arasındaki etkileşimleri göz önüne almaz.
Biyolojik taklit (Biological mimicry)	Hücrelerin ihtiyacı olan bütün bileşenlerin doğru oranlarda bulunduğu bir besin ortamında hücre büyümesi üzerine çeşitli bileşenlerin optimizasyonuna dayalı bir yöntemdir.	• Gerekli olan farklı mikro ve makro elementler hakkında bilgi verir.	Bileşenler arasında etkileşimler olabileceğini hesaba katmaz
One factor at a time	Bir bağımsız değişken diğer bütün değişkenlerin sabit tutulması esasına dayalıdır.	• Basit, • Kolay • Faktörlerin bireysel etkilerinin ortaya konabildiği bir yöntemdir.	• Faktörler arasındaki etkileşimler göz ardı edilir. • Fazla zaman alıcıdır • Bağımsız değişken sayısının yüksek olduğu durumlarda maliyeti ve deneme sayısı yüksektir.

İkinci ve daha yüksek dereceden modeller oluşturulabildiği için istatistiksel deney tasarımı yaklaşımları optimum noktaların doğru bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.10c).

Bu özelliklerine ek olarak deney tasarımı yaklaşımı;

- Süreç veriminin, stabilitesinin ve elde edilen kârın artırılması,
- Yatırımın geri dönüş süresinin kısaltılması,
- Tekrarlanabilirliği yüksek süreçlerin geliştirilmesi,

- Süreç geliştirme için harcanan süre ve kaynağın azaltılması,
- Süreç girdi ve çıktıları arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması ve
- Hurda oranı, kusurlu ürün oranı, üretimin tekrarlanması, ürünün yeniden test edilmesi gibi olumsuzlukların giderilmesi

amacıyla kullanılabilmektedir (Antony, 2014).

Bu tez kapsamında süreç üzerinde etkisi olabilecek parametreler ve bu parametrelerin alt ve üst limitleri OVAT denemeleri ile belirlenmiştir. Ardından istatistiksel deney tasarımı yöntemlerinden olan Plackett Burman Tasarımı (PBT) ile parametrelerin BS üretimi üzerindeki yüzdesel etkileri belirlenmiştir. Etki değerleri en yüksek olan parametreler kullanılarak merkezi bileşen tasarımı (central composite design-CCD) denemeleri gerçekleştirilmiş ve BS üretimi için optimum üretim şartları tespit edilmiştir. BS üretiminin tahminlenmesinde kullanılmak üzere CCD ile oluşturulan modelin doğrulama denemeleri gerçekleştirilerek istatistiksel optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

2.5.1. Plackett Burman Tasarımı (PBT)

PBT yüksek miktarda parametre bulunduğu durumlarda bu parametreler arasında üretimde etkili olmayan parametrelerin, çok sayıda deney yapılmasına gerek kalmadan, güvenilir ve pratik şekilde elimine edilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Plackett and Burman, 1946). Plackett-Burman yüksek sayıda değişkenlerin (7, 11, 15, 19, 23 gibi) etkilerinin incelendiği ancak bu değişkenlerden sadece bazılarının gerçekten etkili olduğunun düşünüldüğü durumlarda çok kullanışlı olan bir yöntemdir. Klasik faktöriyel tasarımlarda n 'nin 2'nin kuvveti olması gerekmektedir. Ancak PBT'de n 'nin 4'ün katı olması gerekmektedir (Draper and Lin, 1988). Bu yöntem $(n-1)$ adet değişkenin n sayıda

deneme yapılarak proses üzerindeki etkilerinin iki-seviye fraksiyonel faktöriyel (two-level fractional factorial) tasarım ile tespit edilmesine olanak tanımaktadır. Girilen değişken sayısı $n-1$ değerinden düşük olduğunda kullanılan program gerçek olmayan değişkenler (dummy factors) ekleyerek tasarımı tamamlamaktadır (Lin, and Draper, 1992). Yöntem parametreler arasındaki etkileşimi göz ardı etmesine karşın çok sayıda değişkenin içerisinde az sayıda gerçekten etkili parametrenin güvenilir bir şekilde seçilmesine olanak tanımaktadır (Srinivas et al., 1994). Yapılan bir çalışmada üçlü veya daha yüksek seviye etkileşimin ve 5'ten fazla ikili etkileşimin bulunduğu durumlarda PBT_{12+12} tasarımının ikili etkileşimlerin tespitinde dahi kullanılabileceği belirtilmektedir (Miller and Sitter, 2001). Bu tez kapsamında BS üretiminde etkili olabileceği düşünülen sekiz parametreden etkili olmayanların elenmesi amacıyla PBT kullanılmıştır.

2.5.2. Merkezi Bileşen Tasarımı (Central Composite Design-CCD)

Yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology-RSM) yeni süreçlerin oluşturulması, mevcut süreçlerin geliştirilmesi veya optimizasyonu için kullanılan; parametreler arasındaki etkileşimi, parametrelerin süreç üzerindeki ikili veya bireysel etkilerini ikinci veya daha yüksek dereceden denklemler ile ortaya koymak amacıyla matematiksel ve istatistiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir (Carley et al., 2004; Khuri and Mukhopadhyay, 2010). Lineer modeller yerine ikinci dereceden denklemlerin kullanılmasının optimum noktanın tespitinde sağladığı avantaj Şekil 10'da gösterilmektedir. CCD, RSM teknikleri arasında ikinci dereceden model oluşturmak için kullanılan en yaygın yöntemdir (Khuri and Mukhopadhyay, 2010). Yöntemde F faktöriyel (± 1), $2k$ aksiyel ($\pm \alpha$) ve n_c merkez (0) olmak üzere 5 adet tasarım noktası bulunmaktadır (Şekil 2.9b) (Myers et al.,

2009). Faktör sayısı ikinin üzerine çıktığında tasarım noktalarının dört veya daha fazla boyut içeren küre ya da benzeri bir şekil üzerine yerleşmesi ve tasarımın döndürülebilir olması için tasarım noktalarının küp gibi düzgün geometrili şekiller oluşturması gerekmektedir (Şekil 2.9b) (Mason et al., 2003). Yapılan denemelerde kavislilik (çan eğrisi benzeri) tespit edilmesi durumunda CCD oluşturulan modelde eklenen aksiyel noktalar sayesinde ikinci derece terimlerin etkin bir şekilde tahminlenmesi mümkün olabilmektedir (Myers et al., 2009). Derecesine bakılmaksızın (birinci veya ikinci), model kullanılmadan önce yanıtlar ile modelin tahmin ettiği değerlerin uyuşup uyuşmadığının test edilmesi gerekmektedir (Carley et al., 2004).

Bu tez çalışmasında PBT ile elenen parametrelerin BS üretimi üzerinde etkisinin incelenmesi amacıyla 5 seviye CCD denemeleri gerçekleştirilmiş, ardından elde edilen ikinci dereceden model doğrulama deneyleri ile test edilmiştir.

2.6. Deri ve Taurin

Deri, organları dış çevreden ayıran arayüz olarak görev yapan karmaşık bir organdır ve vücudun içyapısının birçok özelliğini yansıtabilme özelliği bulunmaktadır (Tur, 1997). Deri organizmayı dış çevreden gelen olumsuzluklara karşı korumakta, homeostazisi ve çevreye adaptasyonu sağlamakta ve çekici veya itici olmak için salgılar salgılamaktadır. Bu özelliklerine ek olarak günümüzde dış görünüm açısından da büyük önem taşımaktadır (Montagna, 1967). Nüfus yaşlanması ile yaygınlaşan cilt bozukluklarının giderilmesi çalışmaları günümüzde daha fazla önem kazanmıştır. Klinik, histolojik ve fizyolojik çalışmalar yaşlanan derinin çevresel etkilere karşı savunmasız kaldığını ve bunun da birçok hastalığa

sebepe verebildiğini göstermektedir (Gilchrest, 1989). Bu nedenle sağlıklı ve güzel görünen bir cilt sadece estetik açıdan değil aynı zamanda genel sağlık durumunu etkileyebilmesi açısından önemlidir. Derinin içerdiği yüksek su içeriğinin çevreye karşı vücudun savunulmasında en önemli özellik olduğu bilinmektedir (Stern and Maibach, 2008). Yaşlanmaya bağlı derideki değişimler ve bu değişimlerin klinik sonuçları Tablo 2.4'te özetlenmiştir. Kendinden gerçekleşen, etkilerinin hafifletilmesi ve geciktirilmesi mümkün olan yaşlanmaya ek olarak deri, gün ışınları ve yanlış beslenme (obezite) gibi faktörler nedeniyle, bariyerlik fonksiyonunu, kollajen içeriği, mikro ve makro sirkülasyonu gibi özellikleri kaybolabilmekte veya azalabilmektedir (Yosipovitch et al., 2007).

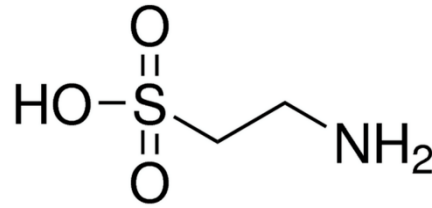
Tablo 2.4. Yaşlanmaya bağlı deri özelliklerindeki değişimler (Gilchrest, 1989)

Fonksiyon azalması	Anatomik ilişki	Spekülatif klinik bulgular
Epidermal iş yükü	Çoğalabilen keratinositlerde azalma	Zayıf yara iyileşmesi
Bariyer fonksiyonu / Kimyasal aralık	Azalan damarlanma	Bazı hiperplastik hastalıkların gelişmesi, iritasyon veya alerji riskinin artması, topikal medikal uygulamalarda istenilen yanıtın alınamaması
Algı (sensör)	Algılama kapasitesinde azalma	Basınç, sıcaklık ya da kimyasal yaralanma risklerinin artması
Vitamin D üretimi	-	Osteomalasi ve kemik kırılmaları riski
İmmün takip	Daha az Langerhans ve T hücreleri	Deri kanseri ve viral enfeksiyonların artması
Yangısal yanıt	Perivasküler mast hücrelerinde azalma	Alerjik, iritasyon ve enfeksiyöz süreçlerde değişim
Termoregülasyon	Daha az ter salgısı, azalmış damarlanma, deri altı yağın azalması	Isı şoku ve hipotermi riski
Mekanik koruma	Düzleşmiş dermoepidermal birleşim noktası, azalmış deri altı yağı	Kolay yırtılma ve derinin sertleşmesi,

En büyük organ olan deri, yapısını ve fonksiyonlarını değiştirebilecek geniş çaptaki fiziksel (UV gibi) ve kimyasal (ksenebiyotik) ajanların toksik hasarına maruz kalabilmektedir. Vücutta birincil olarak mitokondrinin aktivitelerinden olmak üzere hücrel metabolizma nedeniyle rektif oksijenler (ROS) üretilmektedir. ROS üretimi vücudun antioksidan kapasitesinin üzerine çıktığında DNA, lipid ve proteinler gibi makromoleküller zarar görebilmektedir. Bu nedenle cilt hastalıkları oluşabilmektedir. Bunun engellenebilmesi için resveratrol, koenzim Q10 gibi çeşitli moleküllerin antioksidan kapasiteleri araştırılmaktadır (Gokce Homan et al., 2012; Gokce Homan et al., 2012). Vücudun kendi ürettiği ROS türlerine bu çevresel ajanların (kendiliğinden içerdikleri ve/veya sebep oldukları) ortaya çıkardıkları ROS eklendiğinde vücudun kendinde var olan ve bu zararlı bileşenleri ortadan kaldırmaya yarayan antioksidan sistemlerinde bozulma meydana gelebilmekte ve böylece yaşlanma süreci etkileri daha hızlı ortaya çıkabilmektedir (Bickers and Athar, 2006; Fonseca et al., 2010). Bu noktada bu etkilerin azaltılması için antioksidan maddeler ön plana çıkmaktadır. Antioksidan, okside edilebilir substratlara nazaran düşük konsantrasyonda bulunduğu bu substratların oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır. Bu maddeler yaşlanma ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, immun sistem zayıflaması ve beyin fonksiyon bozukluğu gibi yaşlanmaya bağlı hastalıklara katkı sağlayan ROS ve serbest radikalleri (FR) ile savaşmada yardımcı olmaktadır (Atoui et al., 2005).

Ksantin dehidrogenaz pürin degradasyonundan ürik asit oluşumunda önemli rolü bulunan bir enzimdir ve hipoksik dokularda ksantin oksidaza (XO) dönüşebilmektedir (Finaud et al., 2006). XO, hipoksantin ve ksantin arasındaki oksijeni kofaktör olarak kullanarak reaksiyonu katalizlemekte ve doğal sonuç

olarak serbest radikallerin ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmasına neden olabilmektedir (Quinlan et al., 1997). Lipid oksidasyonu malondialdehid (MDA) gibi bileşiklere bağlı $ROO^{\cdot}$ ve $ROOH^{\cdot}$ gibi FR oluşumuna neden olan bir reaksiyondur (Finaud et al., 2006). Vücutta ROS ve FR oluşumu ve bu radikallerin etkisinin ortadan kaldırılması doğal olarak gerçekleşen bir süreçtir. Oksidatif stresin artmasıyla bu denge ROS ve FR'ler yönüne kaymaktadır. Sisteinin yaygın metabolitlerinden biri olan taurinin (2-aminoetansülfonik asit) (Şekil 2.11) nörotransmitter olarak davrandığı bilinmektedir ve MDA seviyesini azaltabildiği gösterilmiştir (Devamanoharan et al., 1997). İnsan sütünde inek sütünden on kat daha fazla olduğu belirlenen ve neredeyse vücutta her yerde bulunabilen taurin nörit uzamasını destekleyen ve hücreler için besleyici ve destekleyici olabildiği gösterilen bir aminoasit olan taurin (Chen et al., 1998) farklı amaçlar için güvenle kullanılabilir. Taurin ayrıca, peroksidasyon kaskat reaksiyonu ürünü olan sitotoksik aldehytleri nötralize ederek ROS'nin zararlı etkilerini sınırlandırabilmekte ve FR'lerin temizlenmesinde yardımcı olarak doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellik gösterebilmektedir (Guerin et al., 2001).



Şekil 2.11 Taurinin moleküler yapısı

Kozmetik sektörü günümüzde yaşlanmanın ortaya çıkardığı olumsuz etkilerin giderilmesi veya etkilerin yavaşlatılması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla kullanıla antioksidanların sergilemesi UV ışınlarını yakalama, nemlendirme, serbest radikalleri yakalama, hücre bölünmesini hızlandırma

özelliklerinden en az birini taşıması gerekmektedir (Özer, 2009b). Bu tez çalışması kapsamında yüksek nemlendirme kapasitesi ile tek başına ideal bir yüz maskesi olabileceği düşünülen BS'ye üretim sonrasında taurin yüklemesi yapılmış ve böylece hem nemlendirme özelliği hem de hücre büyümesini teşvik debilen antioksidan özelliği olan bir yüz maskesi üretilmesi hedeflenmiştir. Literatürde yapılan bir çalışma yara modelinde kitosan-taurin jelinin yarada kullanılmasının yara iyileşmesini hızlandırdığını ve epitelyal hücre çoğalmasını arttırdığını ifade etmektedir (Değim et al., 2002). Antioksidan maddelerin üründe bulundukları konsantrasyon ve bu üründen salınım miktarları beklenen etkilerin gözlenmesi için önem arz etmektedir (Özer, 2009a).Histolojik bulgular ile de desteklenen çalışma nedeni ile üretilecek yüz maskesindeki taurinin deri hücrelerinin yenilenmesine de yardımcı olacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, BS'den doğal yüz maskesi üretimi için kullanılan yöntemler hakkında bilgi verilecektir.

3.1. Mikroorganizma Aktivasyonu ve Stoklanması

Bu tez çalışmasında BS üretimi için, *Acetobacter xylinum* ATCC 700178 suşu kullanıldı. Çalışma kapsamında mikroorganizmanın aktivasyonu için aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi:

- Hestrin&Schramm Agar (HSA) ve Hestrin&Schramm (HS) sıvı besiyerleri hazırlandı.

HSA (Hestrin & Schramm, 1954)

100 ml destile su

2 g Glukoz

0,5 g Maya özütü

1,5 g Agar

HS (Hestrin & Schramm, 1954)

100 ml destile su

2-5 g Glukoz

0,5 g Maya özütü

0,5 g Bakteriyolojik pepton

0,115 g Sitrik asit

0,27 g Na₂HPO₄

pH 5-5,5

- Besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
- HSA katılaşmaya yakın bir sıcaklıkta petri kaplarına 15-20 ml/petri olacak şekilde aktarıldı ve soğuması beklendi.

- *A. xylinum* stoktan (-20°C) alınarak tek koloni düşecek şekilde çizgi ekim yöntemi kullanılarak petri kaplarına inoküle edildi ve 30°C’de 3-6 gün inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası tek kolonilerden öze yardımıyla alınan bakteriler fermentasyon çalışmalarında kullanılmak üzere aşağıda içeriği verilen HS sıvı besiyerine aktarıldı.
- 30°C’de 150 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan pelletler kullanılarak fermentasyon denemelerine geçildi.

3.1.1. Mikroorganizmaların stoklanması

- Aktifleşen kültürde oluşan pelletler steril pipet yardımı ile % 50 steril gliserol içeren kriyotüplere alındı.
- Tüpler ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere -20 ve -86°C’de stoklandı.

3.2. En Uygun Karbon ve Azot Kaynaklarının Belirlenmesi

Uygun maliyetli BS üretiminin sağlanabilmesi için alternatif hammaddeler ile mikroorganizmaların BS üretebilme kapasiteleri ölçüldü. Yapılan denemeler sonucunda uygun karbon ve azot kaynağı belirlendi.

3.2.1. Karbon kaynağının belirlenmesi

Farklı karbon kaynaklarının BS üretimine etkisinin incelenmesi için glukoz, früktoz, sukroz, mısır şurubu, elma kabuğu, kabuklu elma, kabuksuz elma, üzüm ve keçiyoynuzu kullanıldı.

Glukoz, früktoz, süktroz ve mısıır şurubu için aşğıdaki işlemler gerçektşirildi. Ayrıca glukoz denemelerde standart karbon kaynağı olarak kullanıldı.

- Karbon kaynağı hariç HS besiyeri bileşenleri 100 ml destile su içerisinde çözüldü ve ilgili karbon kaynağından 2 g tartıldı.
- Besiyeri 10 ml'lik cam tüplere 1 tüpe 3-4 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
- Otoklav sonrası besiyeri içerisine 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübasyon sonrası aktifleşen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletlerden aktarıldı ve 30°C'de inkübasyona bırakıldı.

Elma kabuğı, kabuklu elma, kabuksuz elma, üzüm ve keçiboynuzu için aşğıdaki işlemler gerçektşirildi.

- 5 g karbon kaynağı parçalanarak 100 ml destile su içerisine konuldu.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak şeker içeriğinin sıvıya geçmesi beklendi.
- Hazırlanan özüt içerisine HS besiyerinin karbon kaynağı dışındaki diğer bileşenleri (maya özütü, bakteriyolojik pepton, sitrik asit, Na₂HPO₄) eklendi.
- Besiyeri 10ml'lik cam tüplere 1 tüpe 3-4 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
- Otoklav sonrası besiyeri içerisine 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübasyon sonrası aktifleşen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletlerden konuldu ve 30 °C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.2. Azot Kaynağının Belirlenmesi

HS besiyeri bileşenleri olan maya özütü ve bakteriyolojik pepton denemelerde standart azot kaynağı olarak kullanıldı.

Maya özütü ve bakteriyolojik pepton için aşğıdaki işlemler gerçektşirildi:

- Azot kaynağı hariç HS besiyeri bileşenleri 100 ml destile su içerisinde çözöldü ve maya özütü ile bakteriyolojik peptondan 0,5 g tartıldı.
- Besiyeri 10 ml'lik cam tüplere 1 tüpe 3-4 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
- Otoklav sonrası besiyeri içerisinde 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübasyon sonrası aktifleşen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletlerden koyuldu.
- Tüpler 30°C'de inkübasyona bırakıldı.

Kuru fasulye ve nohut için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- 2,5 g azot kaynağı parçalanarak 100ml destile su içerisinde konuldu.
- 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak azot içeriğinin sıvıya geçmesi beklendi.
- Hazırlanan özüt içerisinde HS besiyerinin diğer bileşenleri (glukoz, sitrik asit, Na_2HPO_4) eklendi.
- Besiyeri 10 ml'lik cam tüplere 1 tüpe 3-4 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
- Otoklav sonrası besiyeri içerisinde 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübasyon sonrası aktifleşen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletlerden koyuldu.
- Tüpler 30°C'de inkübasyona bırakıldı.

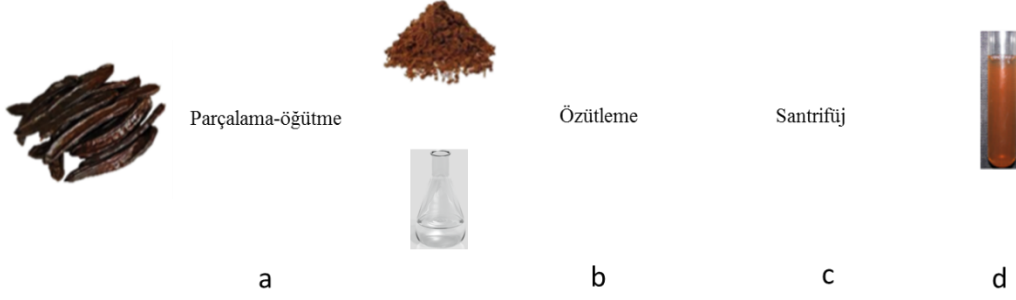
3.3. Keçiboynuzu Özütlemesi

Karbon kaynağı olarak seçilen keçiboynuzunun ileri çalışmalar için özütlenerek stok çözeltinin oluşturulmasında aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Keçiboynuzu öğütöldü.
- Destile su içerisinde 200-300 g/L olacak şekilde 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- Büyük partiköller kaba filtrasyon ile uzaklaştırıldı.

- Küçük partiküller 6000-9000 rpm’de (Hettich Universal 32R D-78532) 5-10 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırıldı.
- Elde edilen son sıvıdan örnek alınarak toplam şeker tayini yapıldı. Bu özüt ilerleyen çalışmalarda karbon kaynağı stoğu olarak kullanıldı.

İşlemler Şekil 3.1’de özetlenmiştir.

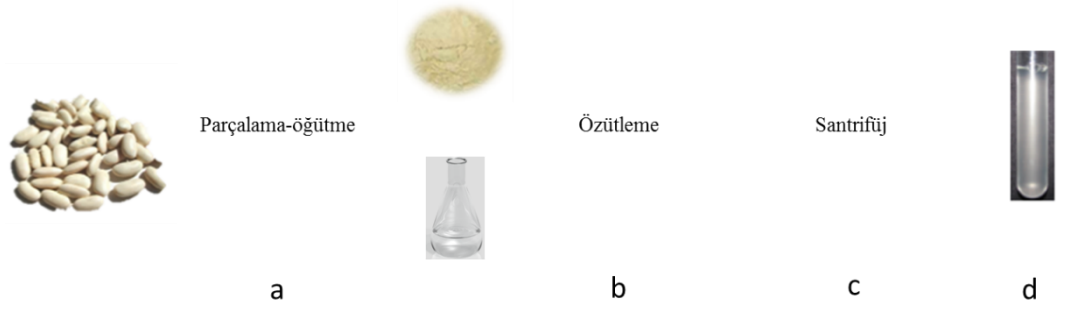


Şekil 3.1 Keçiboynuzu özütlenme basamakları; (a) öğütme, (b) otoklav ile özütlenme, (c) santrifüj ile partiküllerin uzaklaştırılması ve (d) özüt

3.4. Kuru Fasulyenin Özütlenmesi

- Kuru fasulye öğütüldü.
- Destile su içerisinde 80-100 g/L olacak şekilde 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.
- Büyük partiküller kaba filtrasyon ile uzaklaştırıldı.
- Ardından küçük partiküller 8500-10000 rpm’de (Hettich Universal 32R D-78532) 5-10 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırıldı.
- Elde edilen son sıvıdan örnek alınarak toplam azot tayini yapıldı. Bu özüt azot kaynağı stoğu olarak kullanıldı.

İşlemler Şekil 3.2’de özetlenmiştir.



Şekil 3.2 Kuru fasulye özütlemeye basamakları; (a) öğütme, (b) otoklav ile özütlemeye, (c) santrifüj ile partiküllerin uzaklaştırılması ve (d) özüt

3.5. Toplam Şeker Tayini

Toplam şeker tayini için fenol-sülfirik asit yöntemi kullanıldı (Nielsen, 2010).

Bu yöntem aşağıdaki adımlardan oluşmaktadır:

- 10mg glukoz hassas terazide tartılarak 100ml destile su içerisinde çözdürüldü ve 100µg/ml stok glukoz standartı hazırlandı.
- 5g fenol-fitaleyn eritilerek balon jojeye alındı ve destile su ile 100ml'ye tamamlandı.
- Stok standart seyreltildi (20, 40, 60 ve 80 µg/ml).
- Denemelerde destile su kör olarak kullanıldı.
- Keçiboynuzundan elde edilen özütün (literatür bilgileri de göz önünde bulundurularak) 100µg/ml ve daha az şeker içerecek şekilde seyreltilmesi yapıldı.
- Tüm standart ve örneklerden 1ml alınarak uzun cam tüplere konuldu.
- Tüplere 1ml fenol-fitaleyn eklendi ve vortekslendi.
- Herbir tüpe 3ml derişik sülfirik asit (H_2SO_4) eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler oda sıcaklığında (25°C) 10 dakika ardından su banyosunda (30°C) 20 dakika bekletildi.
- Tüm tüplerdeki örneklerin absorbensları 490 nm dalga boyunda ölçüldü.
- Standartların absorbens değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu.

- Standart eğrinin denklemi kullanılarak örneklerin şeker derişimi hesaplandı ve bu değerlere göre besiyerleri hazırlandı.

Bu deneme hazırlanan her parti keçiyoynuzu özütü için gerçekleştirildi.

3.6. Toplam Azot Tayini

Kuru fasulye özütünün toplam azot tayini için Kjeldahl metodu kullanıldı (Kjeldahl, 1883). Bu yöntem için aşağıdaki adımlar uygulandı:

- Özütlenen örneklerden ve kör olarak destile sudan 1ml Kjeldahl cihazı (Gerhardt Kjeldatherm) tüplerine konuldu.
- Yakma işlemi için tüplere bir adet selenyum tuz tableti ve 10ml sülfürik asit eklendi.
- Tüpler yakma düzeneğine konularak 415°C'de 3 saat bekletildi.
- Yakma işleminden sonra tüplerin soğuması beklendikten sonra destilasyon ve titrasyon işlemlerine geçildi.

Destilasyon işleminde %40'lık (w/v) NaOH kullanıldı.

- Körün bulunduğu tüp cihaza yerleştirildi ve pH'sı ölçüldü.
- pH 4,6 değerine (%3'lük borik asidin pH'sı) ayarlamak için 0,1N HCl (8,28 ml %37 HCl, 991,72ml destile su) çözeltisi eklendi ve HCl sarfiyat miktarı kaydedildi.
- Aynı işlemler örnekler için tekrarlanarak sarfiyat miktarları kaydedildi ve toplam protein miktarları aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{protein} = \frac{(S - S_{\text{kör}}) \times 0,0014}{g_{\text{örnek}}} \times 100 \times 6,25$$

S: Örneğin titrasyonunda kullanılan HCl sarfiyatı, $S_{\text{kör}}$:Körün titrasyonunda kullanılan HCl sarfiyatı, $g_{\text{örnek}}$: kullanılan örneğin gram cinsinden değeri.

3.7. Fermentasyon Optimizasyonu

Fermentasyon optimizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. Öncelikle literatür verileri de göz önünde bulundurularak etkili olabileceği düşünülen parametreler tespit edildi. Bu parametreler One Variable at A Time (OVAT-Her seferinde bir değişken) yaklaşımı ile ön çalışmalar yapılarak belirlendi.

3.7.1. OVAT denemeleri

OVAT denemeleri fermentasyon üzerinde etkili olduğu düşünülen parametrelerin her seferinde birinin değiştirilip diğerlerinin sabit tutulması ile gerçekleştirildi. Buradan elde edilen veriler parametrelerin alt ve üst limitlerinin belirlenmesinde kullanıldı. Bu denemelerde değiştirilen parametreler dışında kalan parametreler;

- Karbon kaynağı % 2,5 w/v
- Azot kaynağı %1 w/v
- Sitrik asit 1,15 g/L
- Na_2HPO_4 2,7 g/L
- pH 5,5
- İnkübasyon sıcaklığı 30 °C
- İnkübasyon süresi 7 gün
- S/V oranı $1,5 \text{ cm}^{-1}$

şeklinde sabit tutuldu.

pH: Besiyerindeki pH değişimi BS üretim verimini ve yapısını doğrudan etkileyebildiğinden bu parametre için OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- HS besiyeri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı.
- Besiyeri pH'sı 4,5-7 aralığında farklı değerler asetik asit ve NaOH kullanılarak ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyerinde 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktiveleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde pH dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

Sıcaklık: İnkübasyon sıcaklığı BS üretim miktarını etkileyebileceğinden bu parametre için OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- HS besiyeri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyeri 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktiveleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 25 ve 30°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde sıcaklık dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

Yüzey hacim oranı (S/V): Besiyeri S/V oranı mikroorganizmaların oksijen ve besin bileşenlerine aynı zamanda ulaşabilmeleri için önemli bir faktör olduğundan bu parametre için OVAT denemeleri gerçekleştirildi. Bu denemelerde farklı S/V oranlarının ayarlanabilmesi için kavanozlar kullanıldı. Bu denemelerde kavanoz kullanılmasına yüzey alanlarının erlenlerde olduğu gibi derinliğe bağlı olarak değişmemesinden dolayı karar verildi.

- HS besiyeri hazırlandı ve kavanozlara farklı yüzey/hacim oranı sağlayacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyeri 150rpm 30°C’de 24-48 saat aktifleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- S/V oranı 1 ve 2 cm⁻¹ olarak ayarlandı.
- Erlenler 30°C’de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde sıcaklık dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

İnkübasyon süresi: İnkübasyon süresi arttıkça BS’nin üretim miktarı ve kalınlığının arttığı bilinmektedir. Bu faktörün BS üretiminde etkili olup olmadığının, alt ve üst limitlerinin belirlenmesi amacıyla OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- HS besiyeri hazırlandı ve 250ml’lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyeri 150rpm 30°C’de 24-48 saat aktifleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C’de 4 ve 14 gün aralığında inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde sıcaklık dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

İnokulum miktarı: Başlangıç inokulum miktarının BS üretimini etkileyebileceği düşünüldüğünden bu parametre için OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- HS besiyeri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyeri 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktiveleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde sıcaklık dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

Karbon miktarı: BS üretiminde temel besiyeri bileşeni karbon kaynağıdır.

BS, karbon kaynağının β ,1-4-glikosidik bağları ile selüloz polimerine dönüşmesi ile üretilmektedir. Bu nedenle bu parametrenin etki düzeylerinin belirlenmesi amacıyla OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- Besiyerinde karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu stok çözeltileri kullanıldı. Keçiyoynuzu stok çözeltisi ile yapılan şeker tayini sonuçlarına göre %2-5 oranında şeker içeren besiyerleri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyerinde 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktiveleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde karbon kaynağı dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

Protein miktarı: Besiyerinde bulunan proteinler mikroorganizmaların metabolizmaları için gereklidir. Bu parametrenin BS üretim miktarını da etkileyeceği düşünüldüğünden alt ve üst limitlerinin belirlenmesi amacıyla OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- Besiyerinde azot kaynağı olarak kuru fasulye stok çözeltileri kullanılmıştır. Kuru fasulye stok çözeltisi ile yapılan protein tayini sonuçlarına göre %0,5-2 oranında protein içeren besiyerleri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyerinde 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktifleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde protein dışındaki tüm değerleri sabit tutuldu.

Tampon miktarı: Besiyeri pH düzenleyicileri olan tamponlar inkübasyon koşullarının istenilen düzeylerde tutulması için önemlidir. Bu bileşenin besiyerinde bulunması gereken alt ve üst limitlerin belirlenmesi amacıyla OVAT denemeleri gerçekleştirildi.

- Besiyerinde tampon olarak sitrik asit kullanılmaktadır. %0,5-1,5 (w/v) oranında sitrik asit içeren besiyerleri hazırlandı ve 250ml'lik erlenlere 100-125ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Standart HS besiyerinde 150rpm 30°C'de 24-48 saat aktifleştirilen mikroorganizmaların oluşturduğu pelletler her bir erlene steril kabin içerisinde aktarıldı.
- Erlenler 30°C'de 1 hafta aralığında inkübasyona bırakıldı.

Bu denemelerde tampon miktarı dışındaki tüm parametrelerin değerleri sabit tutuldu.

3.8. Deney Tasarımı ile İstatistiksel Optimizasyon Denemeleri

Bu tez çalışmasında istatistiksel optimizasyon çalışmaları Design Expert 7.0.0 programı ile gerçekleştirildi. Bu yaklaşım günümüzde OVAT denemelerinden

daha güvenilir sonuçların daha az denemeye ve şans faktörünü içermekten elde edilmesine olanak tanıdığı için tercih edilmektedir.

3.8.1. Plackett Burman Tasarımı (PBT)

PBT, çok sayıda parametrenin parametre sayısından bir fazla deney gerçekleştirilerek süreç üzerinde en fazla etkili olanların elenmesini sağlayan kullanışlı bir yöntemdir. BS üretiminde sekiz farklı parametrenin etkili olduğu düşünüldüğünden en etkili parametrelerin belirlenmesi amacıyla PBT kullanıldı.

OVAT denemelerinden etkili olabileceği belirlenen;

- Keçiboynuzu şeker miktarı (%1-3 w/v)
- Fasulye protein miktarı (%0,5-2 w/v)
- Başlangıç pH değeri (4,5-6,2)
- S/V oranı (1-2 cm⁻¹)
- İnokulum miktarı (%5-15 v/v)
- Inkübasyon süresi (4-10 gün)
- Sitrik asit miktarı (‰ 0,5-1,5)
- Sıcaklık (25-30°C)

parametreleri programa, OVAT denemeleri ve literatür bilgileri göz önüne alınarak alt ve üst limitleri ile birlikte girildi.

Oluşturulan deney matrisine göre besiyerleri ve aşılar hazırlandı. Denemeler, belirlenen şartlar altında en az 3 paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi. İlgili sürelerin sonunda örnekler hasat edilerek modifiye yıkama işlemi ile saflaştırıldı. Besiyerlerinin son pH'ları ölçülerek kayıt altına alındı ve örneklerin makro özellikleri göz ve el ile kontrol edildikten sonra 80°C'de bir gece boyunca

kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler hassas terazide tartıldıktan sonra sonuçlar programın yanıt kısmına girilerek değerlendirmeye alındı.

3.8.2. Merkezi Bileşen Tasarımı (CCD) denemeleri

CCD parametrelerin merkez, uç (düşük-yüksek) ve faktöriyel (düşük-yüksek) olmak üzere beş seviyede hacimsel olarak (3B düzlemde) denenmesine imkan tanıyan bir yöntemdir. Faktör sayısının iki olması durumunda ise yüzey alanı üzerinden analiz yapmaya olanak tanımaktadır. Geleneksel optimizasyon yönteminde ise sadece denenilen noktalar üzerinden analizler gerçekleştirilebildiğinden gerçek optimum noktanın ve parametreler arası etkileşimin tespit edilmesi çok zordur ve şans faktörü içermektedir. CCD yönteminde kurulan model, programın belirlediği merkez noktalarında hesaplanan hatalar ile diğer noktalar arasındaki farkları istatistiksel olarak karşılaştırarak modelin anlamlı olup olmadığına ve sürecin tahminlenmesinde kullanılıp kullanılmayacağına karar verilmesine olanak tanımaktadır. Bu nedenle PBT denemelerinde belirlenen üç parametre üzerinde CCD denemeler gerçekleştirildi.

PBT denemeleri sonunda elde edilen sonuçlara göre etkili olduğu belirlenen;

- İnokulum miktarı (4,3-14,3 % v/v)
- İnkübasyon süresi (4-14 gün)
- Kuru fasulye protein miktarı (1,5-4 % w/v)

parametreleri program matrisine alt ve üst limitleri ile birlikte girildi. Oluşturulan deney matrisine göre besiyerleri ve aşılar hazırlandı. Belirlenen şartlar altında denemeler en az 3 paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi. İlgili sürelerin sonunda

örnekler hasat edilerek modifiye yıkama işlemine tabi tutuldu. Besiyerlerinin son pH'ları ölçülerek kayıt altına alındı. Örneklerin makro özellikleri göz ve el ile kontrol edildikten sonra 80°C'de bir gece boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutulan örnekler hassas terazide tartıldıktan sonra sonuçlar programın yanıt kısmına girilerek değerlendirmeye alındı.

3.8.3. Doğrulama deneyleri

Bilimsel deneylerin tekrarlanabilirliğinin gösterilmesi ve oluşturulan modellerin denenmesi için doğrulama deneylerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle CCD ile elde edilen modelin doğrulanması için doğrulama deneyleri gerçekleştirildi.

CCD denemelerinden elde edilen sonuçlar ile oluşturulan modelde;

- Endüstriyel süreçlerde maliyetin en büyük kısmını oluşturan süre en az
- Protein miktarı deney aralığında
- İnokulum miktarı deney aralığında

seçildi ve doğrulama deneyleri için denemeler oluşturuldu.

Oluşturulan 30 denemeden rasgele 7 deneme seçildi. Seçilen denemeler göre besiyerleri ve aşılar hazırlandı. Belirlenen şartlar altında denemeler en az 3 paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi. İlgili sürelerin sonunda örnekler hasat edilerek modifiye yıkama işlemine tabi tutuldu. Kurutulan örnekler hassas terazide tartıldı. Verilerin programın %95 güven aralığında verdiği alt ve üst limitlerin arasında olup olmadığı kontrol edildi.

3.9. BS Yıkama İşlemi

Elde edilen selüloz tabakaları üzerindeki besiyeri ve hücrel artıklardan arındırılması için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Örnekler hasat edilerek destile su içerisinde yıkandı,
- 0.1 M NaOH içerisinde 2 defa 20-30 dakika kaynatıldı,
- Nötrleştirme amacıyla % 5'lik asetik asit çözeltisinde birkaç saniye bekletildi,
- Destile su içerisinde ağarınca kadar belirli aralıklarla suyu değiştirilerek 20-30 dakika kaynatıldı,
- Yarı-şeffaf görüntü elde edildikten sonra temiz destile su içerisine alınarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

3.9.1. Modifiye BS yıkama işlemi

Standart yıkama işleminde bakteriyel kalıntıların etkin bir şekilde uzaklaştırılamadığı görüldüğünden yıkama işlemi aşağıdaki şekilde modifiye edildi.

- Örnekler hasat edilerek destile su içerisinde yıkandı,
- 0.1 M NaOH içerisinde bir gece boyunca 60-80°C'de bekletildi,
- Nötrleştirme amacıyla % 5'lik asetik asit çözeltisinde birkaç saniye bekletildi,
- Destile su içerisinde ağarınca kadar belirli aralıklarla suyu değiştirilerek 20-30 dakika kaynatıldı,
- Yarı-şeffaf görüntü elde edildikten sonra temiz destile su içerisine alınarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

3.10. Ölçek Büyütme

İstatistiksel optimizasyon çalışmalarında petri kapları kullanılmıştır. Ancak projenin ana hedefi olan tabaka halinde yüz maskesi üretimi için daha büyük üretim kaplarının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla 30x20cm boyutlarında metal üretim kapları kullanıldı.

Optimum şartlara göre besiyerleri ve aşılar hazırlandı. Belirlenen şartlar altında (%10 v/v inokulum miktarı, %2,5 w/v karbon miktarı, %2,75 w/v protein miktarı, pH=5, sıcaklık 30°C, S/V oranı 1,5 cm⁻¹, %1,15 w/v sitrik asit, % 2,7g Na₂HPO₄) denemeler gerçekleştirildi. İlgili sürelerin sonunda örnekler hasat edilerek yıkama işlemine tabi tutuldu ve makro özelliklerine el ve göz ile kontrol edilerek bakıldı. Kuruyan örnekler hassas terazide tartıldı.

Devam eden çalışmalar için bu tepsilerde üretilen BS'ler kullanıldı.

3.11. Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri

Hayvan hücre kültürü denemelerinde HS2 (insan keratinosit hücreleri) ve L929 (fare fibroblast hücreleri) hücre hatları kullanıldı. Üretilecek olan yüz maskesi insan deri hücrelerinde kullanılacağı için HS2 ve ISO 10993-5:2009 (EN) standart prosedüründe testlerin L929 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmesi istendiğinden L929 hücre hattı seçildi.

3.11.1. HS2 ve L929 hücreleri

Hücrelerin çözdürülmesi

- Hücreler sıvı azot tankından (GT 40, Air Liquide, ABD) (-196 °C) çıkartıldı.

- Hücrelerin bulunduğu vial 37°C'deki su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü.
- Çözünen hücrelerin DMSO'nun zararlı etkisine maruz kalmaması amacıyla hücreler, 37 °C'ye ısıtılmış %10 FBS (fetal bovine serum) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM-F12-HS2 hücreleri için) ve Minimum Essential Medium (MEM-L929 hücreleri için) besin ortamı içerisinde toplanarak +4°C'de 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi (5810 R, Eppendorf, Almanya),
- Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak çöken hücrelerden oluşan pellet taze besin ortamıyla süspanse edildi ve hücreler 75 cm²'lik kültür kaplarına alındı.
- Kültür kaplarına alınan hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde (HERA Cell 150i, Heraeus, Almanya) inkübasyona alındı.

Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

Karakterizasyon testleri, stoklama ve sitotoksosite testleri için yeterince sayıda hücre elde edilmesi için hücreler çoğaltıldı ve pasajlandı. Bu amaçla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Çözdürülen hücreler kültür kabı içerisinde %80'in üzerinde doluluk oranına geldiğinde pasajlama işlemleri yapıldı.
- Pasajlama işleminde besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler; 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺² içermeyen fosfat tuz solüsyonu (PBS) içerisinde yıkandı.
- PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kültür kabının yüzeyini kaplayacak miktarda tripsin (% 0,05)-EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu eklendi.
- Ardından hücreler 4-5 dakika 37°C'de bekletildikten sonra mikroskop altında gözlemlendi ve yüzeyden kalktıkları tespit edildikten sonra, hazırlanmış DMEM-F12 (HS2) ve MEM (L929) besin ortamı içerisinde santrifüj tüpüne toplandı.
- 4°C'de 5 dakika 1000 rpm'de hücreler santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak hücreler bir miktar besin ortamı içerisinde süspanse edildi.

- Hücre süspansiyonu 1:3 oranında 3 farklı kültür kabına paylaştırılarak 37°C, %5 CO₂ ve %95-98 nem koşullarında tekrar inkübasyona kaldırıldı.

Hücrelerin dondurularak stoklanması

- 2-3 günde bir besin ortamı taze besin ortamı ile değiştirilerek yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra hücre stoklarının genişletilmesi için dondurma işlemine geçildi.
- Dondurma işleminde besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler; 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺² içermeyen fosfat tuz solüsyonu (PBS) içerisinde yıkandı.
- PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kültür kabının yüzeyini kaplayacak miktarda tripsin (% 0,05)-EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu eklendi.
- Ardından hücreler 4-5 dakika 37 °C'de bekletildikten sonra mikroskop altında gözlemlendi ve yüzeyden kalkıkları tespit edildikten sonra, hazırlanmış DMEM-F12 (HS2) ve MEM (L929) besin ortamı içerisinde santrifüj tüpüne toplandı.
- 4 °C'de 5 dakika 1000 rpm'de hücreler santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak hücreler dondurma vasatı (%10 DMSO - %90 FBS) içerisinde süspanse edildi.
- Seyreltme oranı 1:3 ve hacim 1 ml olacak şekilde kriyo tüplere paylaştırıldı.
- Hücreler -86°C'de köpük kaplar içerisinde dondurulduktan sonra sıvı azot tankına alındı.

3.11.2. HS2 hücrelerinin tutunma kinetikleri

L929 hücre hattı önceden karakterize edilmiş hücre hattı olduğu için tutunma ve büyüme kinetiklerinin çıkarılması işlemleri sadece HS2 hücreleri için gerçekleştirildi.

Yeterince hücre sayısı elde edildikten sonra hücreler kaldırıldı. Hücreler hemositometre yardımı ile sayılarak aşağıdaki formül ile toplam hücre miktarı belirlendi.

$$THS = \frac{8 \text{ gözde sayılan hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü}}{8} \times 10^4 \times TH$$

THS; toplam hücre sayısı, TH; toplam hacim; 10^4 ; 1 göz 0,1 mm³ hacime denk gelmektedir bu hacmin ml'ye dönüştürülmüş halidir.

- 6 gözlü kültür kaplarına 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde ekim yapıldı.
- Ekim sonrasında besin ortamı hacmi DMEM-F12 ile 2ml'ye tamamlandı.
- Her 30 dakikada besin ortamı pipetaj ile homojenize edilerek örnek alındı ve hemositometre ile sayım yapıldı
- Sayım işlemine besin ortamı içerisinde canlı hücre tespit edilmeyene kadar devam edildi ve böylece hücrelerin tutunma süreleri belirlendi.

Tüm işlemler üçer paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.11.3. HS2 hücrelerinin büyüme kinetikleri

Hücrelerin canlılıklarının zamana göre incelenmesi amacıyla büyüme kinetikleri çıkarıldı.

- 6 gözlü pleytlerde gerçekleştirilen çalışmalarda başlangıç hücre miktarı olarak 1×10^4 hücre/göz belirlendi.
- 75 cm²'lik kültür kaplarında yeterli miktarda hücre üretimi gerçekleştirildikten sonra hücreler yüzeyden kaldırıldı.
- Hemositometre ile sayım yapıldı.
- Sayım sonrasında belirlenen hücre miktarında ekim yapılarak son hacimler 2 ml'ye tamamlandı.

- Başlangıç hücre sayısı değeri olarak tutunma süresinde belirlenen 3 saatin sonunda hücrelerin kaldırılması ile yapılan sayım kabul edildi.
- Her gün 3 gözdeki hücreler kaldırılarak sayım yapıldı.
- Bu işleme hücreler ölüm fazına girene kadar devam edildi.

L929 hücre hattı karakterize hücre hattı olduğundan bu işlemler bu hücre hattı için yapılmadı.

3.11.4. Sitotoksosite denemeleri

Sitotoksosite denemelerinde ISO 10993-5:2009 (EN) belirtildiği üzere L929 fare fibroblast hücreleri ve HS2 insan keratinosit hücreleri kullanıldı.

3.11.4.1. Sitotoksosite çalışmaları için örneklerin hazırlanması

Denemelerde 2'si kontrol (HS besiyeri ile hazırlanmış) 2'si deney grubu (keçiyoynuzu ve kuru fasulye kullanılarak optimize edilmiş besiyeri – CHb besiyeri) olmak üzere 4 çeşit BS örneği hazırlandı. Bu örnekler;

- o Standart HS ile üretilen BS
- o Standart HS ile üretilip taurin içerisinde bekletilen BS
- o CHb besiyeri ile üretilen BS
- o CHb besiyeri ile üretilip taurin içerisinde bekletilen BS

şeklindedir.

- Tüm örnekler eşit süre aynı şartlar altında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında örnekler modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı.
- 50 mM taurin (moleküler ağırlık; 125,14) çözeltisi hazırlandı ve taurin içerecek örnekler bu çözelti içerisinde bir gece bekletildi.
- Örnekler 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.11.4.2. Sitotoksisite çalışmaları

Dolaylı sitotoksisite testi gerçekleştirildi. Bu çalışmanın aşamaları aşağıdaki gibidir.

- Yeterince hücre elde edilene kadar hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.
- Hücreler kaldırılarak sayıldı, her göze eşit miktarda hücre gelecek şekilde 6 gözlü hücre kültürü kaplarına alındı.
- Tutunma süreleri sonundan başlayarak düzenli aralıklarla mikroskop altında hücreler kontrol edildi ve hücreler tüm yüzeyi kaplayana kadar beklendi.
- Dolaylı sitotoksisite çalışmasında örneklerin doğrudan hücrelere temasının engellenmesi için besin ortamı agar ile katılaştırıldı. Bunun için destile su içerisinde %2'lik (w/v) agar hazırlanarak steril edildi.
- Yüzeyi kaplamış hücrelerin besin ortamı çekilerek yüzey PBS ile yıkandı.
- Isıtılmış agar ile %2 serum içeren besin ortamları ile 1:1 oranında karıştırılarak %1 oranında serum içeren çözelti hazırlandı.
- Çözeltinin soğuması beklendikten sonra hücrelerin üzerine bu besin ortamları eklendi.

Serum, örneklerin toksik etkilerini hücreler üzerinde göstermelerini engelleyebilmektedir. Bu nedenle %10 serum içeren ortamda büyütülen hücreler test aşamasında %1 serum içeren ortamda inkübe edilmiştir.

- Agarlı besin ortamının katılaşması beklendikten sonra steril pens yardımı ile önceden uygun boyutlarda kesilen BS örnekleri agarın üzerine yerleştirildi. 24 ve 72 saatin sonlarında örnekler giemsa ile boyanarak mikroskop altında incelendi.

3.11.4.3. Hücrelerin giemsa boya ile boyanması

Hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla giemsa boyama prosedürü kullanıldı (Semple et al., 1978). Bu prosedür için aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi.

- Boyama öncesi örnekler mikroskop altında görüntülenerek resimleri çekildi.
- Steril bistüri yardımı ile agar yüzeyden kaldırıldı. Bu işlem gerçekleştirilirken yüzeyde tutunmuş hücrelere zarar vermekten kaçınılmaya çalışıldı.
- Yüzey PBS ile yıkandı ve hemen PBS boşaltıldı.
- Hücrelerin fiksatif olarak kullanılan metanole alışması için PBS-metanol çözeltisi (1:1,5) ile ikinci bir yıkama gerçekleştirildi.
- Metanol ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Metanol döküldükten sonra bir kez daha metanol ilave edilerek tekrar metanol uzaklaştırıldı.
- Yüzeyi örtecek kadar Giemsa boyası eklenip 5 dakika kadar boyanın hücrelere nüfuz etmesi sağlandı.
- Boya uzaklaştırıldıktan sonra akan su altında boya kalıntılarının giderilmesi sağlandı ve örnekler mikroskop altında incelenerek görüntüler alındı.

3.12. BS Karakterizasyon Çalışmaları

Üretilen BS tabakalarının, BS yüz maskesi olarak istenilen özellikleri sergileyip sergilemediklerinin incelenmesi amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.12.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi

FTIR organik bileşiklerin yapısında bulunan fonksiyonel grupların tespiti, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri gibi özelliklerini belirlemek amacıyla moleküler bağ karakterizasyonu yapan bir tekniktir (Ulman, 2013; Yang, H. et al., 2007). Zamana karşı elde edilen veriler matematiksel metodlar kullanılarak frekans domainine aktararak değişik absorpsiyon değerlerine göre bir eğri çıkarılabilmektedir. Bu yöntemde maddenin yaptığı bağlar tespit edilebildiğinden

normalden farklı bir yapı ile bağ yapıp yapmadığı belirlenebilmektedir. FTIR analizi için aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi.

- BS örnekleri HS besiyerinde ve CHb besiyerinde belirlenen sürede üretildi.
- Örnekler hasat edildi ve modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı.
- Yıkanan örnekler liyofilize edilerek içerisindeki su uzaklaştırıldı.
- FTIR analizi, (Perkin Elmer, Frontier FT-IR Spectrophotometer L1280044, ABD) $650-4000\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede spektrumu çekilerek gerçekleştirildi.

3.12.2. X-Işını Kırınımı (X-Ray Diffraction- XRD) analizi

XRD cihazları X ışınlarının kırınımından yola çıkarak faz analizi yapan cihazlardır. Bu kırınımlardan elde edilen bilgiler ile materyalin atomik yapısı hakkında bilgiler elde edilebilmekte ve kristal yapılı malzemeler incelenebilmektedir (Nishiyama et al., 2002). XRD cihazında malzeme üzerine gönderilen X ışınları atomlar arasındaki mesafe veya farklı atomların bulunması durumuna göre farklı kırınımlar gerçekleştirdiğinden oluşan farklı fazlar incelenebilmektedir. İşlem sonucunda elde edilen pikler var olan kütüphane ile karşılaştırılarak ürünün özellikleri belirlenebilmektedir.

- BS örnekleri HS ve CHb besiyerinde belirlenen sürede üretildi.
- Örnekler hasat edildi ve modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı.
- Yıkanan örnekler liyofilize edilerek içerisindeki su uzaklaştırıldı.
- XRD analizi Philips X'Pert Pro (Hollanda) cihazı ile reflection mode 0-70 refleksiyon modunda gerçekleştirildi.

3.12.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy -SEM) görüntüleme

BS fiber çapları <120 nm boyutlarında olduğundan ışık mikroskobu ile incelenmesi mümkün değildir. Fiberlerin görüntülerinin alınması amacıyla SEM görüntüleme tekniği kullanıldı. Görüntüleme için aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi.

- BS örnekleri HS ve CHb besiyerinde belirlenen sürede üretildi.
- Örnekler hasat edildi ve modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı.
- Yıkanan örnekler liyofilize edilerek içerisindeki su uzaklaştırıldı.
- Örneklerin SEM görüntüleri çekilerek fiberlerin yapıları incelendi.

Bu analizler için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi (İYTEMAM)’nden hizmet alımı gerçekleştirildi.

3.12.4. Endotoksisite testi

Kontrol standart endotoksinin (CSE) sulandırılması

Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan yüksek moleküler ağırlıklı bileşik olan endotoksinler damariçi koagülasyon, tansiyon düşüklüğü ve ateşe neden olabilmektedir (Levin et al., 1970). *A. xylinum* Gram negatif bir bakteri olduğu için ürünlerin endotoksin içerme ihtimali bulunmaktadır. Örneklerin test edilmesi üretilen ürünlerin kullanılabilirliği açısından önemlidir. Önceleri atnalı yengeci amebosit hücrelerinin jelleşmesi ve canlı hayvanların (tavşan) kullanımına dayanan bu testler, canlı hayvanların deneylerde kullanılmasının kısıtlanması ile günümüzde *in vitro* yöntemler ile gerçekleştirilmektedir (Ketchum and Novitsky, 2000). Bu tez çalışmasında bu yöntemlerden biri olan yarı kantitatif jel-pıhtılaşması

(Blechova and Pivodova, 2001) yöntemi kullanıldı. Yöntem için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

- Kontrol standart endotoksin (CSE) hazırlandı.

CSE 100 ng / flakon

CSE potensi = 3.5 EU / ng

$$\begin{aligned} \text{CSE flakonunun konsantrasyonu} &= 3.5 \frac{\text{EU}}{\text{ng}} \times 100 \frac{\text{ng}}{\text{flakon}} \text{CSE} \\ &= 350 \frac{\text{EU}}{\text{flakon}} \end{aligned}$$

$$350 \frac{\text{EU}}{\text{flakon}} + 2 \text{ ml LRW (pirojensiz Lal suyu)} = 175 \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$

- CSE 2ml lal suyu (LRW) ile sulandırıldığında 20 dakika boyunca vorteklendi. Ardından stok ve standart çözeltileri hazırlandı.

Stok çözeltilerin hazırlanması

$$250\mu\text{l} \left(350 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 625\mu\text{l LRW} = 50 \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$

$$250\mu\text{l} \left(50 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 1000\mu\text{l LRW} = 10 \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$

$$250\mu\text{l} \left(10 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 2250\mu\text{l LRW} = 1 \frac{\text{EU}}{\text{ml}}$$

Bu çözeltiler 2-8 °C aralığında saklanmak şartıyla 14 gün süreyle stoklanabilmektedir.

Pozitif ve negatif kontrollerin (standartların) hazırlanması

$$2\text{ml} \left(1 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 2\text{ml LRW} = 0.5 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \quad (+)$$

$$2\text{ml} \left(0.5 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 2\text{ml LRW} = 0.25 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \quad (+)$$

$$2\text{ml} \left(0.25 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \right) + 2\text{ml LRW} = 0.125 \frac{\text{EU}}{\text{ml}} \quad (+)$$

$$2ml \left(0.125 \frac{EU}{ml} \right) + 2ml LRW = 0.06 \frac{EU}{ml} \quad (-, +)$$

$$2ml \left(0.06 \frac{EU}{ml} \right) + 2ml LRW = 0.03 \frac{EU}{ml} \quad (-)$$

$$2ml \left(0.03 \frac{EU}{ml} \right) + 2ml LRW = 0.015 \frac{EU}{ml} \quad (-)$$

Derişimleri 1 EU/ml'nin altındaki endotoksin seyreltmeleri hazırlandıktan hemen sonra kullanıldı.

Endotoksin testi için BS örneklerinin hazırlanması

- 0.1 g BS 0.4 ml su içerisinde pirojensiz cam tüplere konularak 20 dakika 121°C'de otoklavlandı.
- Daha sonra BS çözeltisinin seyreltmeleri hazırlandı. Bu seyreltmeler

$$0.1 ml BS = (1:1)$$

$$0.05 ml BS + 0.05ml LRW = (1:2)$$

$$0.05 ml BS (1:2) + 0.05ml LRW = (1:4)$$

$$0.05 ml BS(1:) + 0.05ml LRW = (1:8)$$

şeklinde hazırlandı.

Endotoksisite denemeleri

Tüm işlemler pirojensiz tüp ve pipetler kullanılarak gerçekleştirildi.

Örnekler ve kontrollerden 0,1 ml alınarak üzerlerine 0,1 ml limusate reaktifi eklendi. Reaktif eklendikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için tüm örnekler 1 saat boyunca titreşimsiz su banyosunda bekletilerek jel oluşumu kontrol edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüpler tek hareketle, sarsılmadan ters çevrildi. Akan çözeltilerde jel oluşmadığı kabul edildi ve negatif (-) olarak, çözeltinin akmadığı durumda jel oluştuğu kabul edildi ve pozitif (+) olarak işaretlendi.

3.13. Yüz Maskesi Ambalajlama Çalışmaları

Tez kapsamında nihai ürünün 50 mM taurin içeren BS tabakaları şeklinde olması planlanmıştır. Nihai ürünün stabilite, mikrobiyal stabilite ve fiziksel özelliklerinin test edilebilmesi için ambalajlı ürünler üretildi. Bunun için aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi:

- Optimum üretim parametreleri kullanılarak BS üretimi gerçekleştirildi.
- Üretim sonrasında hasat edilen ürünler modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı.
- BS örnekleri taurin içeren çözelti içerisinde (1 birim BS:4 birim çözelti –w/v) steril edildi.

BS'nin tamamına yakını (>%99) sudan oluştuğu için taurin yükleme çalışmalarında 50 mM'lık taurin çözeltisi, BS'nin ıslak ağırlığı da dahil edilerek hazırlandı.

- Otoklav sterilizasyonu sonrasında paraben içermeyen koruyucu (Phenostat) %1 oranında BS-taurin çözeltisinin içerisine lamin air flowda aseptik şartlar altında konuldu.
- 80°C'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda örnekler karıştırıldıktan sonra ambalaj makinesinde paketleme işlemine geçildi.
- Paketleme işlemi için paketleme cihazının kızıağı >250°C'ye çıkarıldı.
- BS örnekleri üç kenarı kapalı ambalaj paketlerinin içerisine yerleştirildikten sonra kızaktan geçirildi böylece dördüncü kenarının da kapanması sağlandı.
- Paketlenen ürünler üçer paralel olacak şekilde, stabilite (25 ve 40°C), mikrobiyal stabilite (challenge testi, toplam maya küf bakteri testi), kesilebilirlik ve biyoadezyon testleri için ayrıldı.

3.14. Mikrobiyal Stabilite ve Challenge Testleri

Mikrobiyal stabilite ve challenge testleri üretilen ilaç veya kozmetik ürünlerin raf ömrünün belirlenmesi ve kullanılan koruyucuların etkinliğinin tespit edilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu testlerin gerçekleştirilmesinde Ege Üniversitesi Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarı (EGEMİKAL)’ndan hizmet alımı yapıldı.

Testlerde aşağıdaki besiyerleri kullanıldı:

Letheen Broth (LB):

1000 ml destile su
 10 g Hayvan dokusu (enzimatik yöntem ile parçalanmış)
 5 g Beef özütü
 5 g Sodyum klorür (NaCl)
 0,7 g Lesitin
 Son pH 7,0 $\pm$ 0,2 (Neogen, 2015a)

Tryptic Soy Agar (TSA):

1000 ml destile su
 15 g Kazein pepton (pankreatik)
 5 g Soya pepton (papainik)
 5 g NaCl
 15 g Agar
 Son pH 7,3 $\pm$ 0,2 (Sigma-Aldrich, 2015)

Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar (SDCA):

1000 ml destile su
 5 g Enzimatik olarak parçalanmış kazein
 5 g Enzimatik olarak parçalanmış hayvan dokusu
 40 g Dekstroz
 0,05 g Kloramfenikol
 15 g Agar

Son pH 5,6 $\pm$ 0,2 (Neogen, 2015b)

Chromogenic Candida Agar with Chloramphenicol (CCAC)

1000 ml destile su

20 g Glukoz

10 g Pepton

0,5 g Kloramfenikol

0,4 g Kromojenik karışım

15 g Bakteriyolojik agar

Son pH 6,1 $\pm$ 0,2 (Conda, 2015)

Cetrimide Agar (CA)

1000 ml destile su

20 g Jelatin (pankreatik)

1,4 g Magnezyum klorür

10 g Potasyum sülfat

0,3 g Setrimid

15 g Agar

Son pH 7,2 $\pm$ 0,2 (Himedia, 2015)

Baird Parker Agar (BPA)

1000 ml destile su

10 g Tripton

5 g Sığır eti özütü

1 g Maya özütü

5 g Lityum klorür

12 g Glisin

10 g Sodyum pirüvat

0,1 g Potasyum tellürit

20 g Agar

50 ml Yumurta sarısı emülsiyonu

Son pH 6,8 $\pm$ 0,3 (Becton-Dickinson, 2015)

Tüm besiyerlerinin pH ayarlama işlemleri 25°C’de gerçekleştirildi.

3.14.1. Aerobik mezofilik bakteri sayımı

- BS örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılarak 90 mL LB besiyeri içerisinde homojenize edildi ve gerekli dilüsyonlar hazırlandı.
- Steril pipet ile petri kaplarına 1 mL başlangıç dilüsyonundan aktarıldı. İşlem diğer dilüsyonlar için tekrarlandı. Her dilüsyon 2 petriye inoküle edildi.
- Her petriye 44-47°C'ye soğutulmuş TSA besiyerinden yaklaşık 12-15 mL döküldü. İnokulum ile ortamın dikkatlice karışması sağlandı. Başlangıç süspansiyonunun hazırlanması ile besiyerinin petrilere dökülmesi arasında geçen sürenin 45 dakikayı geçmemesine dikkat edildi.
- Besiyeri katılaştıktan sonra, petriler ters çevrilerek inkübatöre kaldırıldı. 32,5±2,5°C' de 72±6 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi sonunda 15-300 koloni içeren petriler sayıldı. Yaygın gelişen mikroorganizmalar tek koloni olarak sayıldı.

Hesaplama

15-300 koloni içeren petriler dikkate alınarak ardışık iki seyreltmedeki sayı

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N: Ürünün g/ml' sindeki kolonilerin sayısı

$\sum c$: Seçilmiş olan petrilerin tümünde üreyen kolonilerin toplam sayısı

V: ml cinsinden inokulum miktarı

n_1 : Sayılan ilk dilüsyondaki petrilerin sayısı

n_2 : Sayılan ikinci dilüsyondaki petrilerin sayısı

d: Dilüsyon faktörü (ilk sayımın elde edildiği)

3.14.2. Maya-küf sayımı

- BS örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılarak 90 mL LB besiyeri içerisinde homojenize edildi ve gerekli dilüsyonlar hazırlandı.
- Steril pipet ile petri kaplarına 1 mL başlangıç dilüsyonundan aktarıldı. İşlem diğer dilüsyonlar için tekrarlandı. Her dilüsyon 2 petriye inoküle edildi.

- Her petriye 44-47°C'ye soğutulmuş SDCA besiyerinden yaklaşık 12-15 mL döküldü. İnokulum ile ortamın dikkatlice karışması sağlandı. Başlangıç süspansiyonunun hazırlanması ile besiyerinin petrilere dökülmesi arasında geçen süre 45 dakikayı geçmemesine dikkat edildi.
- Besiyeri katılaştıktan sonra, petrilere ters çevrilerek inkübatöre kaldırıldı. 32,5±2,5°C' de 72±6 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi sonunda 15-300 koloni içeren petrilere sayıldı. Yaygın gelişen mikroorganizmalar tek koloni olarak sayıldı.

Hesaplama işleminde aerobik mezofil bakteri sayımındaki formül kullanıldı.

3.14.3. *Candida albicans* aranması

- BS örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılarak 90 mL LB içerisinde homojenize edildi ve gerekli dilüsyonlar hazırlandı.
 - Homojenat 32,5±2,5°C' de 20 saat inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonucunda zenginleştirilmiş örnekten bir öze dolusu alınarak CCAC besiyerine çizgi ekimi yapıldı.
 - Çizgi ekimi yapılmış besiyeri 32,5±2,5°C' de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi sonunda *C. albicans* kolonileri yeşil renkli koloniler oluşturur. Koloni oluşumu var ise, *C. albicans* olup olmadığı biyokimyasal kitlerle identifikasyon sonucunda belirlenir.

3.14.4. *Pseudomonas aeruginosa* aranması

- BS örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılarak 90 mL modifiye LB besiyeri içerisinde homojenize edildi ve gerekli dilüsyonlar hazırlandı.
- Homojenat 32,5±2,5°C' de 20 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonucunda zenginleştirilmiş örnekten bir öze dolusu alınarak CA besiyerine çizgi ekimi yapıldı.
- Çizgi ekimi yapılmış besiyeri 32,5±2,5°C' de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda var ise beyazdan sarı yeşil pigmentli koloniler *P. aeruginosa* olarak doğrulamaya alınır. Şüpheli kolonilerin *P. aeruginosa* olup olmadığı Gram boyama ve oksidaz testi sonucunda belirlenir.

3.14.5. *Staphylococcus aureus* aranması

- BS örnekleri aseptik koşullarda 10 g tartılarak 90 mL modifiye LB besiyeri içerisinde homojenize edildi ve gerekli dilüsyonlar hazırlandı.
- Homojenat $32,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ 'de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda zenginleştirilmiş örnekten bir öze dolusu alınarak BPA besiyerine çizgi ekimi yapıldı.
- Çizgi ekimi yapılmış besiyeri $32,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ ' de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda var ise parlak siyah, etrafı şeffaf zonla çevrili koloniler *S. aureus* olarak doğrulamaya alınır. Şüpheli kolonilerin *S. aureus* olup olmadığı katalaz testi sonucunda belirlenir.

3.14.6. Challenge testi

Challenge testi üretilen kozmetik ürünlerin raf ömrü boyunca karşılaşma ihtimalleri bulunan mikroorganizmaların ürünün üzerine ekilmesi ile yapılan testlerdir. Ekilen mikroorganizmaların koruyucu tarafından elimine edilme hızları mevzuat limitleri ile karşılaştırılarak ürünün uygun olup olmadığına karar verildi.

Kültür süspansiyonlarının hazırlanması

Kültür süspansiyonlarının hazırlanması için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Bakteri ve maya süspansiyonu hazırlamak için, 2 kez genel besiyerinde alt kültür yapılmış 24 saatlik kültür kullanıldı.
- *A. brasiliensis* kültürü en az 7 gün inkübe edilerek spor gelişimi sağlandı.

Bu testte;

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

suşları kullanıldı.

- Bakteriler için 1×10^7 - 1×10^8 kob/ml, *C. albicans* için 1×10^6 - 1×10^7 kob/ml, *A. brasiliensis* için ise 1×10^6 - 1×10^7 spor/ml olacak şekilde uygun diluent içerisinde süspansiyon hazırlandı.
- Başlangıç inokulum sayısının belirlenmesi amacıyla hazırlanan süspansiyon uygun seyreltmelerde ekim yapıldı.

Test prosedürü

- Örnekler her bir test organizması için, 20 g/ml steril şişelere aktarıldı.
- Örneklerin üzerine 0,2 ml kültür süspansiyonu eklendi.
- Örnekler $22,5 \pm 2, 5^\circ\text{C}$ 'de iklimlendirme kabininde inkübe edildi.
- İnkübasyonun 7, 14 ve 28. günlerinde örneklerden 1 g veya 1 ml alınarak 9 ml nötralizer içerisine aktarıldı.
- 30 dakikalık nötralizasyonun ardından her organizma için uygun besiyeri kullanılarak ekim yapıldı.
- Bakteriler ve *C. albicans* 35°C 'de, *A. brasiliensis* 25°C 'de inkübe edildi.
- Uygun sürede yapılan inkübasyonun ardından sayım yapıldı.

3.15. Bakteriyel Selüloz Tabanlı Yüz Maskesinin Karakterizasyonu

Üretilen BS tabanlı taurin içeren ve içermeyen yüz maskelerinin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kesilebilirlik, biyoadezyon, taurin salım ve DSC analizleri gerçekleştirildi.

Bu başlıkta gerçekleştirilen çalışmalarda Ege Üniversitesi Farmasötik Teknoloji AD Araştırma Laboratuvarı ve Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarının (FABAL) alt yapı olanakları kullanıldı ve bazı testler için hizmet alımı yapıldı.

3.15.1. Kesilebilirlik ve biyoadezyon çalışmaları

BS'nin kesilebilirlik ve biyoadezyon çalışmaları TA-XT plus cihazı (TPA) kullanılarak yapıldı (Şekil 3.3).

- Kesilebilirlik için hazırlanan düzenekte BS örnekleri iki adet mesnetin arasına sığacak şekilde yerleştirildi ve cihaz ile yukarıdan aşağı doğru kuvvet uygulanarak kuvvet değerleri ölçüldü.
- Biyoadezyon çalışması için kurulan düzenekteki beherin içerisindeki su 37°C'ye getirildikten sonra içerisinde bulunan düzeneğe tavşan derisi konularak cihazın yukarıdan aşağı kuvvet uygulaması ve kuvvet uygulamasından sonra BS örneklerinin kaç mm boyunca cihazın aparatına bağlı kaldığının ölçümü yapıldı.



Şekil 3.3. TPA cihazı

3.15.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri

- BS örnekleri HS ve CHb besiyerlerinde belirlenen sürede üretildi.
- Üretim sonrasında örnekler modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.
- Örneklerin bir bölümüne taurin, bir bölümüne taurin ve koruyucu birlikte eklendi, bir bölüm örnek ise kontrol amacıyla hiçbir şey eklenmeden denemelerde kullanıldı. Denemede kullanılan örnekler;
 - Saf taurin
 - HS besiyerinde üretilen BS,
 - HS besiyerinde üretilen ve 50 mM taurin çözeltisi içerisinde bekletilen BS,
 - HS besiyerinde üretilen, 50 mM taurin ve %1 koruyucu (Phenostat) içeren çözelti içerisinde bekletilen BS
 - HS besiyerinde üretilen ve %1 Phenostat içeren çözelti içerisinde bekletilen BS
 - CHb besiyerinde üretilen BS,
 - CHb besiyerinde üretilen ve 50 mM taurin çözeltisi içerisinde bekletilen BS,

- CHb besiyerinde üretilen, 50 mM taurin ve %1 koruyucu (Phenostat) içeren çözelti içerisinde bekletilen BS
- CHb besiyerinde üretilen ve %1 Phenostat içeren çözelti içerisinde bekletilen BS

şeklindedir.

3.15.3. Taurin salım denemeleri

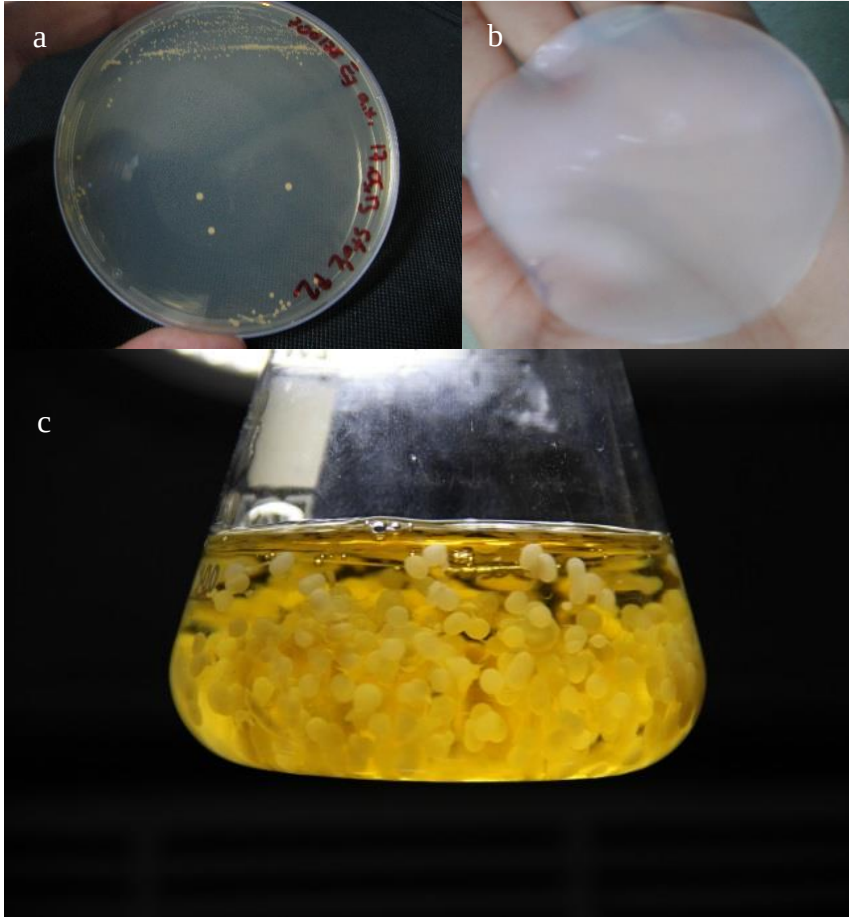
Üretilen BS'nin taurini absorbe edip etmediğinin ve uygun bir karakteristik ile taurin salımı gerçekleştirip gerçekleştirmediğinin belirlenmesi amacıyla LC/MS cihazı kullanılarak taurin salım denemeleri gerçekleştirildi. Saklama ve uygulama koşulları göz önüne alınarak çalışmalarda 25-40°C ve %60 nem içeren inkübatörlerde bekletilen ürünler kullanıldı. Yöntem için aşağıdaki adımlar uygulandı.

- 50 mM ve %1 Phenostat çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra ambalajlanmış ve 25-40°C'de inkübasyona bırakılmış BS örnekleri belirli aralıklarla açıldı.
- Su banyosunun içerisine su doldurulup sıcaklık 37°C'ye getirildi.
- Su banyosunun içerisine manyetik karıştırıcı yerleştirildi.
- 100 ml'lik beher içerisine bir miktar BS örneği kesilip tartılarak konuldu.
- BS'lerin üzerine 20 ml Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS eklendi (pH = 7,4).
- Manyetik karıştırıcı ile örnekler 400 rpm'de karıştırılmaya başlandı.
- Başlangıç günü (0. gün) örnekleri için 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda, 1. ay örnekleri için 30, 60. dakikalarda ve takip eden 7 saat boyunca 60 dakika da bir, diğer zamanlarda 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda 1ml örnek alındı.
- Beherlerin üzerine 1ml PBS eklenerek çözelti toplam hacmi sabit tutuldu.
- Alınan örnekler vial içerisine konuldu ve içerisindeki taurin miktarlarının belirlenmesi amacıyla LC/MS cihazında analiz edildi.

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Mikroorganizma Aktivasyonu ve Stoklanması

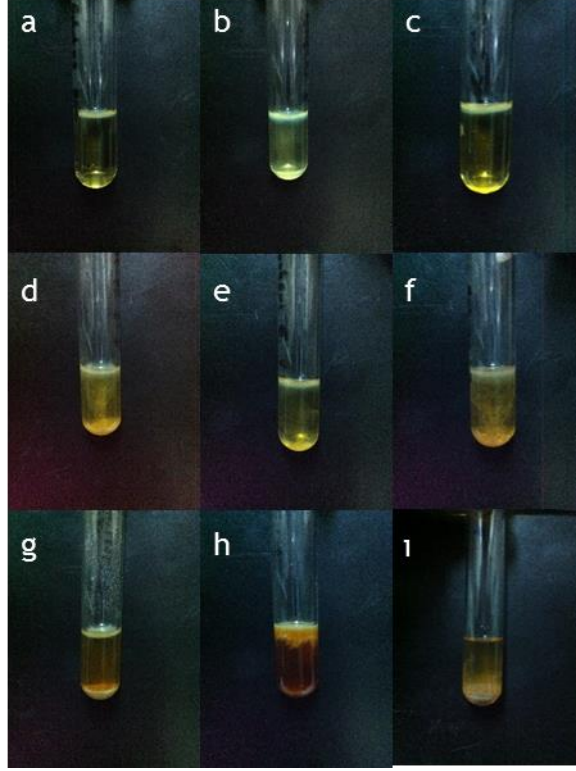
G. xylinus bakterilerinin stoklanması için yapılan ekimde oluşan koloniler, çalkalamalı kültürde bakterinin oluşturduğu kürecikler ve statik kültürde üretilen BS'nin morfolojik görüntüsü Şekil 4.1'te verilmiştir. Agar üzerindeki koloniler ve çalkalamalı kültürde oluşan kürecikler kontrol edildiğinde morfolojide herhangi bir sorun olmadığı görülmektedir. Çalkalamalı kültürde *G. xylinus* kolaylıkla mutasyona uğrayabilmekte ve selüloz üretmeyen versiyonlarına dönebildiği bilinmektedir (Nguyen et al., 2008). Kültürde selüloz üreten ve üretmeyen mikroorganizmalar birlikte bulunmaktadır. Ancak üretmeyenlerin baskın olduğu durumda küreciklerin ve besiyerinin morfolojisi değişebilmektedir. Bu durum göz ardı edilirse ortamda selüloz üreten mikroorganizmaların varlığı sayesinde statik kültürde üretim devam ettiği için (Valla and Kjosbakken, 1982) dolaylı verim düşüşüne neden olabilmektedir. Bu problem ile karşılaşmamak için aktifleştirilen kültürler statik kültürde kullanılmadan önce değerlendirilmiş ve gerektiğinde ana stoklara geri dönmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 (a) Agar üzerinde çizgi ekim sonrası oluşan *G. xylinus* kolonileri, (b) Statik kültürde elde edilen BS'nin yıkama sonrası görüntüsü ve (c) Çalkalamalı kültürde oluşan kürecikler.

4.2. Alternatif Karbon Kaynağının Belirlenmesi

Farklı karbon kaynakları kullanılarak yapılan öncül çalışmalar ile elde edilen BS örnekleri incelenmiştir. Üretilen BS'lerin morfolojileri, miktarları, mekanik özellikleri (el ile kontrol edilmiştir) ve üretim maliyeti göz önünde bulundurularak keçiyoynuzu en uygun alternatif karbon kaynağı olarak seçilmiştir. Alternatif karbon kaynağı denemeleri sonrasında elde edilen BS'lerin görünimleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Alternatif karbon kaynakları ile BS üretimi; (a) Glukoz, (b) Sukroz, (c) Fruktoz, (d) Kabuklu elma, (e) Kabuksuz elma, (f) Elma kabuğu, (g) Mısır şurubu, (h) Üzüm ve (i) Keçiboynuzu

4.3. Alternatif Azot Kaynağının Belirlenmesi

Yapılan ön denemelerde filtre edilmeyen kuru fasulye ve nohut özütlerinin içerdiği partiküller üretilen BS yapısının homojenliğini bozduğundan özütlerin kullanımından önce partiküller uzaklaştırılmıştır. Azot kaynağı olarak en iyi sonuç kuru fasulye özütü ile sağlandığından ilerleyen çalışmalarda bu özüt azot kaynağı olarak kullanılmıştır.

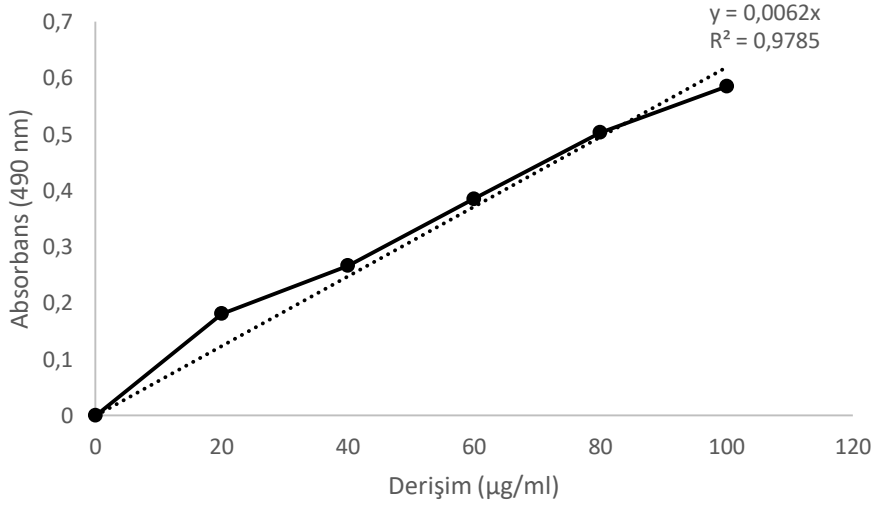
4.4. Toplam Şeker Tayini

Toplam şeker tayininde elde edilen absorbans verileri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Toplam şeker tayini standart absorbans verileri

Derişim (µg/ml)	Ortalama Absorbans değerleri (490nm)
0	0
20	0,181
40	0,266
60	0,385
80	0,503
100	0,586

Bu değerlere göre çizilmiş standart grafik Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3 Toplam şeker tayini standart grafiği ve elde edilen denklem

Farklı partilerde özütleme sonrası keçiboynuzunun %50-55 arasında değişen miktarda şeker içerdiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada keçiboynuzunun %44 sükroz, %7 fruktoz ve % 2 dolaylarında glukoz ve önemli miktarda mineral içerdiği gösterilmiştir (Khlifa et al., 2013). Başka bir çalışmada ise keçiboynuzunun kuru ağırlığının %48-50 arasında toplam şeker içerdiği bunun yanında ise %8’e yakın protein içerdiği bildirilmektedir (Bravo and Saura-Calixto, 1994). BS üretimi için

mikroorganizmaların gereksinim duyduğu proteinin bir kısmı bu sayede karşılanmış olabilir. Bu tez çalışmasında yapılan denemelerde keçiboynuzu özütü içeren besiyeri kullanımında son pH'nın standart HS üretimlerinde olduğu gibi 3 ve altına düşmediği tespit edilmiştir. pH düşüşünün glukozun glukonik asit veya ketoglukonik aside dönüşmesi nedeniyle olduğu bilinmektedir (Hutchens et al., 2007; Yang et al., 1998). Keçiboynuzu içerisinde glukozun az miktarda bulunması ve sükroz ile früktozun yüksek miktarda bulunması üretim sırasında pH düşüşünü engellemiş olabilir. Keçiboynuzu ve fasulyenin tamponlama kapasitesi yapılan bir çalışma ile de gösterilmiştir (Al-Dabbas et al., 2010).

4.5. Toplam Azot Tayini

Yapılan toplam azot tayini sonuçlarına göre kuru fasulyenin kuru ağırlığının %18-20 aralığında protein içerdiği tespit edilmiştir. Bu değer literatürde bir çalışmada belirtilen %18,5-21,9 aralığı ve başka bir çalışmada belirtilen %20,28-22,05 aralıkları ile örtüşmektedir (De Almeida Costa et al., 2006; Shimelis et al., 2006). Yapılan çalışmalar ile kuru fasulyenin protein içeriğinin yanında kalsiyum, magnezyum gibi mineraller ve karbohidratlar içerdiği de belirlenmiştir (Aykroyd et al., 1982). Bu özellikleri kuru fasulyenin fermentasyon çalışmalarında önemli bir azot kaynağı olmasını sağlamaktadır.

BS üretiminde alternatif karbon ve azot kaynağı olarak keçiboynuzu ve kuru fasulyenin kullanım yöntemi bu tez kapsamında geliştirilmiş ve Türk Patent Enstitüsü'ne "Hammadde Olarak Keçiboynuzu ve Kuru Fasulye Kullanılarak Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemi" adı altında 2013/08604 patent başvuru numarası ile başvurulmuştur (Hameş-Kocabaş et al., 2013).

4.6. Fermentasyon Optimizasyon Çalışmaları

Fermentasyon optimizasyon çalışmaları ön çalışmalar niteliğinde gerçekleştirilen OVAT denemeleri ve istatistiksel optimizasyon çalışmalarını içeren PBT, CCD ve doğrulama deneyleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. OVAT denemeleri

OVAT denemeleri sonucunda seçilen parametrelerin; pH, sıcaklık, yüzey hacim oranı, inkübasyon süresi, inokulum miktarı, karbon miktarı, protein miktarı ve tampon miktarı BS üretiminde etkili olabileceği görülmüştür. Ancak sadece bir parametre değiştirilip diğerleri sabit tutulduğunda etkin değerlendirme yapılamamıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde bir değişkenin değiştirilmesinin diğerinin etkisi üzerinde değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Bir değişken diğer değişkenin değişiminden etkilendiği ve değişkenlerin birbirleri ile etkileşimi ihmal edildiği için geleneksel optimizasyon yaklaşımı (OVAT) özellikle bu çalışmadaki gibi değişkenlerin birbiri ile etkileşiminin olduğu durumlarda doğru optimum koşulların tespitinde yetersiz kalabilmektedir (Antony, 2014). Bu yaklaşım doğru ve hassas optimum noktaların tespitinde şansa da ihtiyaç duymaktadır (Arockiasamy and Banik, 2008). Ayrıca değişken sayısındaki artış deneysel uygulama sayısını da üstel olarak arttırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı tez kapsamında değişkenler arası etkileşimin de değerlendirilmesini sağlayan istatistiksel optimizasyon yaklaşımı kullanılmıştır. Günümüzde birçok üretim prosesinin tasarımında yaygın olarak kullanılmaya başlanan istatistiksel yaklaşımlar birçok avantajlar sağlamakta (Montgomery et al., 1984) ve daha güvenilir verilerin elde edilmesine yardımcı olabilmektedir

(Yatsyshyn et al., 2010). Bu nedenle OVAT denemelerinden elde edilen veriler değerlendirme amacıyla değil istatistiksel optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi için alt ve üst limitleri belirlemede fikir vermiştir.

4.7. Deney Tasarımı ile İstatistiksel Optimizasyon Denemeleri

Faktörler arası etkileşimlerin açığa çıkarılması ve veri analizlerinin doğru/güvenilir bir şekilde istatistiksel olarak gerçekleştirilmesi amacıyla Design Expert yazılımı kullanılarak yapılan PBT ve CCD denemelerinin sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.7.1. Plackett Burman Tasarımı (PBT) denemeleri

Bu tez çalışmasında BS üzerinde etkili olduğu düşünülen parametrelerin analiz edilerek istatistiksel olarak etkili olmayanların çıkarılabilmesi amacıyla ilk aşamada PBT kullanılmıştır. OVAT denemeleri ve literatür verileri değerlendirilerek, PBT için parametreler aşağıdaki limitlerde seçilmiş ve kodlanmıştır.

- pH (4,5-6,2)-**pH**
- Sıcaklık (25-30 °C)-**S**
- Yüzey hacim oranı (1-2 l/cm)-**S/V**
- İnkübasyon süresi (4-10 gün)-**İS**
- İnokulum miktarı (% 5-15 v/v)-**İM**
- Karbon miktarı (% 1-3 w/v)-**K**
- Protein miktarı (% 0,5-2 w/v)- **P**
- Tampon miktarı (‰ 0,5-1,5 w/v)-**SA**

olarak belirlenmiştir.

Karbon konsantrasyonunun artışı BS üretiminde olumsuz etki gösterebileceği bilindiğinden karbon miktarı %1-3 aralığında denenmiştir (Masaoka et al., 1993).

Sekiz adet parametre olduğu için 11 parametrelili PBT seçilmiştir. PBT ile belirlenen parametre limitleri ve yanıtları Tablo 4.2’de verilmiştir. D1, D2, ve D3 parametreleri programın hata paylarını hesaplayabilmesi için oluşturduğu gerçek olmayan faktörlerdir. Yanıt, Y; değerleri BS’nin 80°C’de bir gece boyunca kurutulup ağırlığının artık değişmediği tespit edildiğinde hassas terazi ile ölçülmüş örneklerin mg/L cinsinden ifade edilmiş şeklidir.

Tablo 4.2 PBT tasarımı, yanıtlar (Y) ve besiyerinin son pH değeri

No	K	P	pH	S/V	İM	İS	SA	S	D1	D2	D3	Y	pH*
1	1	0.5	4,5	1	5	4	0,5	25	-1	-1	-1	93	4,41
2	1	2	6,2	2	5	4	0,5	30	-1	1	1	834	5.87
3	1	2	4,5	2	15	4	1,5	30	1	-1	-1	1332	4,3
4	3	0.5	6,2	2	15	4	0,5	25	1	-1	1	366	5,61
5	3	0.5	4,5	1	15	4	1,5	30	-1	1	1	295	4,15
6	1	0.5	6,2	1	15	10	0,5	30	1	1	-1	954	6,66
7	3	2	4,5	2	15	10	0,5	25	-1	1	-1	3270	6,55
8	3	2	4,5	1	5	10	0,5	30	1	-1	1	950	4,74
9	3	0.5	6,2	2	5	10	1,5	30	-1	-1	-1	1442	5,24
10	3	2	6,2	1	5	4	1,5	25	1	1	-1	155	5.85
11	1	0.5	4,5	2	5	10	1,5	25	1	1	1	1172	5.52
12	1	2	6,2	1	15	10	1,5	25	-1	-1	1	827	7,46

No; deneme numarası, **K**; karbon miktarı (%w/v), **P**; protein miktarı (%w/v), **pH**; besiyeri başlangıç pH değeri, **S/V**; yüzey hacim oranı (1/cm), **İM**; inokulum miktarı (%v/v), **İS**; inkübasyon süresi (gün), **SA**; sitrik asit miktarı (%w/v), **S**; inkübasyon sıcaklığı (°C), **D1, D2 ve D3**; PBT ile belirlenen boş faktörler - dummy faktörler

Tablodaki veriler incelendiğinde belirlenen şartlar altında BS’nin 93 ile 3270 mg/l gibi arasında değişen geniş bir aralıkta üretildiği görülmektedir. Bu duruma etkisi en yüksek olan parametrenin sadece 12 deney yapılarak klasik optimizasyon yöntemleri ile tespit edilmesi mümkün değildir.

PBT denemelerindeki sonuçlar değerlendirildiğinde besiyeri son pH değerinin 4'ün altına hiç bir deneyde inmediği görülmektedir. 10 günlük uzun inkübasyon sürelerinde bile pH'nın belirli aralıklarda kalması sağlanmıştır. Bu sonuç BS üretimindeki en büyük kısıtlardan biri olan pH düşüşünün, bu tez kapsamında alternatif hammaddeler kullanılarak geliştirilen CHb besiyeri sayesinde engellenebildiğini göstermektedir.

BS, kuru ağırlığının 1-700 katı kadar suyu absorbe edebilmektedir. Bu suyun %99'undan fazlası fiziksel, geriye kalan kısmı ise kimyasal olarak tutulmaktadır (Chang and Chen, 2014; Gayathry and Gopalaswamy, 2014). Fiziksel olarak bağlı olan su yapılan manipölasyonlarda kolaylıkla ayrılabilceğinden istatistiksel değerlendirmelerde kuru ağırlık miktarı kullanılmıştır. Ancak kuru ağırlık sadece üretim verimi hakkında bilgi verirken, yüz maskesi olarak kullanılacak ürünün yapısı, esnekliği ve dayanımı da göz önünde bulundurulması gereken özellikleridir. Bu nedenle üretilen BS kuru ağırlıklarının yanı sıra özellikleri de kayıt altına alınmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 PBT denemelerinde elde edilen BS örneklerinin görsel ve yapısal özellikleri

No	KA	IA	S	İS	STK	Özellikler
1	93	78,75	25	4	846,77	Gevşek yapıda, jel benzeri, çekme dayanımı çok düşük
2	834	202,88	30	4	243,26	Üretim kalın ama çekme dayanımı göreceli düşük
3	1332	229,92	30	4	172,61	Çekme dayanımı yüksek, ince ve kompakt üretim
4	366	204	25	4	557,38	Çekme dayanımı göreceli orta düzeyde üretim homojen değil
5	295	58,36	30	4	197,83	Üretim ince ama çekme dayanımı göreceli yüksek ve kompakt yapıda
6	954	431,18	30	10	451,97	Kalınlık, çekme dayanımı, su tutma kapasitesi iyi, en iyi üretim
7	3270	322,38	25	10	98,58	Çekme dayanımı göreceli yüksek, kompakt yapıda, yüzeyi pürüzlü, su tutma kapasitesi düşük
8	950	99,6	30	10	104,84	Üretim ince, kompakt, çekme dayanımı düşük
9	1442	302,58	30	10	209,83	Üretim orta kalınlıkta, çekme dayanımı çok düşük
10	155	133,98	25	4	864,38	Gevşek yapıda, jel benzeri, çekme dayanımı çok düşük
11	1172	345,32	25	10	294,64	Üretim çok kalın, çekme dayanımı orta düzeyde, su tutma kapasitesi düşük
12	827	179	25	10	216,44	Üretim çok kalın, çekme dayanımı orta düzeyde, su tutma kapasitesi düşük

No; deneme numarası, **KA;** kuru ağırlık miktarı (mg/L), **IA;** ıslak ağırlık miktarı (g/L), **İS;**inkübasyon süresi (gün), **S;** inkübasyon sıcaklığı (°C), **STK;** su tutma kapasitesi (KA/IA)

Tek bir özelliğin BS karakteristiğini belirlemede yeterli olmadığı Tablo 4.3'ten anlaşılmaktadır. Örneğin kuru ağırlık değerinin en yüksek olduğu 7 No'lu deneyin mekanik özelliklerinin iyi ancak morfolojisinin kötü ve su tutma kapasitesinin düşük olduğu görülmektedir. Aynı şekilde su tutma kapasiteleri en yüksek olan 1 ve 10 No'lu deneylerde üretilen BS'lerin mekanik ve morfolojik özelliklerinin iyi olmadığı ve kuru ağırlığının düşük olduğu görülmektedir. İlerleyen çalışmalarda bu veriler de göz önüne alınarak devam edilmiştir.

Parametrelerin bireysel olarak BS üretimine yüzdesel katkıları Tablo 4.4'te gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre üretimde %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı etkisi olan üç parametre;

- Protein miktarı
- İnokulum miktarı
- İnkübasyon süresi

şeklindedir. Bu üç parametrenin toplam etkisi %85,3'tür.

Tablo 4.4 Her bir parametrenin BS üretimindeki yüzdesel etkisi

Parametre	% Etki	P
K	0,022	0,8790
P	12,23	0,0296a
pH	2,13	0,2005
S/V	4,27	0,1036
İM	9,57	0,0405a
İS	63,50	0,0030a
SA	1,02	0,3412
S	4,86	0,0902
D1	0,29	
D2	0,95	
D3	1,15	

No; deneme numarası, **K**; karbon miktarı (%w/v), **P**; protein miktarı (%w/v), **pH**; besiyeri başlangıç pH değeri, **S/V**; yüzey hacim oranı (1/cm), **İM**; inokulum miktarı (%v/v), **İS**; inkübasyon süresi (gün), **SA**; sitrik asit miktarı (%w/v), **S**; inkübasyon sıcaklığı (°C), **D1, D2 ve D3**; PBT ile belirlenen boş faktörler - dummy faktörler

Karbon kaynağının %3'ün üzerine çıkması durumunda BS üretiminde düşüş gözlenmektedir (Son et al., 2003). Çalışmalarda üretimin karbon kaynağı nedeniyle baskılanmaması için toplam şeker konsantrasyonu %1-3 aralığında tutulmuştur. Bu durum test edilen limitler dahilinde karbon kaynağının etkili parametreler içerisinde yer almamasına neden olmuş olabilir. Devam eden çalışmalarda besiyerleri toplam şeker miktarı %2,5 olacak şekilde hazırlanmıştır.

Sıcaklık fermentasyon çalışmalarında en önemli etkenlerden biridir. Yapılan bir çalışmada *A. xylinum* için en uygun sıcaklığın 30°C (Oikawa et al., 1995), başka bir çalışmada ise 24°C'nin üretim için uygun olduğu ancak endüstriyel

süreçler için istenen sonuçları vermeyeceği belirtilmektedir (Jonas et al., 1998). Yapılan ön çalışmalarda 30°C’de yapılan üretimlerin diğer sıcaklıklardan daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu nedenle 30°C devam eden çalışmalarda kullanılacak sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir.

BS üretiminde pH değerinin 4-7 arasında uygun olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur. Glukonik asit üretimi nedeniyle ortam pH’sının düşmesi nedeniyle görece bazik başlangıç pH’larında başlanan çalışmalar da mevcuttur (Jagannath et al., 2008; Kojima et al., 1997; Vandamme et al., 1998; Verschuren et al., 2000). *A. xylinum* sirkede bulunabilen bir bakteri olduğu için düşük pH değerleri üretim için uygundur (Williams and Cannon, 1989). Tablo 4.2 incelendiğinde alternatif hammaddeler ile hazırlanan besiyerinde pH değeri 4’ün altına hiç inmemiştir. Bu nedenle besiyerinin pH’sı ilerleyen çalışmalarda 4,5-5 değerleri arasında tutulmuştur.

S/V oranının 0,5 ile 2,2 cm⁻¹ arasında en iyi değer olduğunu belirten farklı çalışmalar mevcuttur (Jonas et al., 1998; Krystynowicz et al., 2002; Ruka et al., 2012). Geniş hacimli kültür kaplarında BS üretildiğinde derinliğin çok az olması durumunda sıvının neredeyse tamamı üretilen BS tarafından absorbe edilerek kültür kabının içinde jele dönüşebildiğinden üretimi etkileyebilmektedir. Bu nedenle devam eden çalışmalarda, hem yeterli derinliğin sağlanması hem de endüstriyel üretimler göz önüne alınarak fazla besiyeri harcanmaması için S/V oranı 1,5’e sabitlenmiştir.

4.7.2. Merkezi Bileşen Tasarımı (Central Composite Design – CCD) denemeleri

PBT denemelerine göre etkili olduğu belirlenen üç parametrenin her biri için optimum değerleri bulmak için CCD denemeleri gerçekleştirilmiştir. Protein miktarı, inkübasyon süresi ve inokulum miktarının bireysel ve birlikte etkilerinin değerlendirilebilmesi için 2^3 tam faktöriyel CCD yöntemi seçilmiştir. Üç parametrenin 20 deneme ile incelendiği CCD tasarımı 6 aksiyel (uç), 6 faktöriyel ve 6 merkezi nokta içermektedir (Salihu et al., 2011). Belirlenen alt ve üst limitler ile oluşturulan CCD matrisi Tablo 4.5'te verilmiştir. Bu denemelerde PBT sonuçlarına göre seçilen parametrelerin alt-üst limitleri inkübasyon süresi için 4-14 gün, protein miktarı için %1,5-4 (w/v) ve inokulum miktarı için 4,3-14,3 % (v/v) olarak kullanılarak böylece daha geniş aralıkta etkilerin değerlendirmesi amaçlanmıştır. Tablo 4.5'teki besiyeri son pH değerleri incelendiğinde PBT denemelerinde elde edilen sonuçların desteklendiği ve pH değerlerinde üretimi etkileyecek şekilde düşüş olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.5 CCD matrisi, alt ve üst limitler, yanıtlar ve besiyeri son pH değerleri

No	İnokulum Miktarı (v/v %)	İnkübasyon Süresi (gün)	Protein Miktarı (w/v %)	Yanıt (g/L)	pH
1	14,3	9	2,75	1.123	4,62
2	12,3	12	3,5	1.273	4,87
3	12,3	6	3,5	0.913	4,58
4	9,3	9	2,75	1.553	4,41
5	4,3	9	2,75	1.287	4,53
6	9,3	9	2,75	1.727	4,47
7	6,3	12	3,5	1.462	4,59
8	9,3	9	4	1.153	4,7
9	6,3	6	2	0.913	4,4
10	9,3	4	2,75	0.847	4,7
11	6,3	6	3,5	0.947	5,0
12	9,3	9	1,5	0.757	4,37
13	12,3	6	2	0.873	4,4
14	6,3	12	2	1.190	4,82
15	9,3	9	2,75	1.753	4,47
16	9,3	9	2,75	1.733	5,78
17	9,3	9	2,75	1.793	5,74
18	9,3	9	2,75	1.710	6,09
19	9,3	14	2,75	1.630	5,5
20	12,3	12	2	1.340	5,19

No; deneme numarası, **pH;** besiyeri son pH değerini ifade etmektedir.

Değerlendirme amacıyla PBT denemelerinde olduğu gibi daha güvenilir olan kuru ağırlık değerleri baz alınmıştır. CCD denemelerinde yanıtlar 0,757 ile 1793 g/L değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Üretilen BS'lerin su tutma kapasiteleri ve kuru ağırlık dışındaki özelliklerinin de benzer olması üretim optimizasyon çalışmalarının istenildiği şekilde ilerlediğini göstermektedir.

Kuru ağırlık değerleri Design Expert programına girilerek veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve BS üretiminin tahminlenmesinde kullanılmak üzere aşağıda verilen ikinci dereceden denklem elde edilmiştir.

$$Y = +1710,98 - 28,47A + 214,97B + 69,20C + 4,38AB - 41,62AC \\ + 16,38BC - 175,67A^2 - 163,82B^2 - 264,06C^2$$

Denklemde Y mg/l cinsinde BS üretimini, A, B ve C sırasıyla, inokulum miktarı (% v/v), inkübasyon süresi (gün) ve protein miktarını (%w/v) ifade etmektedir.

Tablo 4.6’da yapılan varyans analizinin (ANOVA) sonuçları verilmiştir. %95 güven aralığında $p > F$ değerleri 0.05’ten küçük olan değişkenlerin anlamlı etkileri olduğu kabul edilmektedir (Box et al., 1978). 0,1’den büyük değerler ise anlamsız terim olarak kabul edilmektedir. Buna göre B (inkübasyon süresi), C (protein miktarı), A^2 (inokulum miktarı), B^2 ve C^2 istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunan değişkenlerdir. İnokulum miktarı (A) bireysel olarak BS üretiminde istatistiksel olarak anlamlı etki göstermemiştir. Ancak aynı değişkenin ikinci dereceden etkileri (A^2) anlamlı çıkmıştır. Geleneksel optimizasyon yöntemi ile bir değişkenin bu şekilde etkileşimli etkisinin tespit edilmesi çok zordur. ANOVA Fisher’ın En Küçük Anlamlı Farklar (Least Significant Difference-LSD) testi kullanılmıştır (Williams and Abdi, 2010). F ve p değerleri modelin BS tahminlenmesinde kullanılabilecek başarılı bir model olduğunu göstermektedir. Modelin p değerinin $<0,0001$ olması modelin F değerinin (31,79) şans eseri oluşmasının %0,01 gibi çok düşük olasılıkla mümkün olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.6 CCD denemeleri ANOVA sonuçları

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p > F	
Model	2280000	9	253300	31,79	<0,0001	Significant
A-İnokulum miktarı	11069,63	1	11069,63	1,39	0,2658	
B-İnkübasyon Süresi	631100	1	631100	79,20	<0,0001	
C-Protein miktarı	65388,85	1	65388,85	8,21	0,0168	
AB	153,12	1	153,12	0,019	0,8925	
AC	13861,13	1	13861,13	1,74	0,2166	
BC	2145,13	1	2145,13	0,27	0,6152	
A ²	444700	1	444700	55,81	<0,0001	
B ²	386800	1	386800	48,53	<0,0001	
C ²	100500	1	100500	126,09	<0,0001	
Residual	79690,61	10	79690,61			
Lack of Fit	45499,11	5	909982	1,33	0.3808	not significant
Pure Error	34191,50	5	6838,30			
Cor Total	2359000	19				
R ²				0.9662		
Adj R ²				0.9358		
Pred R-Squared				0.8227		
Adeq Precision				13,943		

Modelin değerlendirilmesi için kullanılabilecek bir diğer yöntem de lack of fit testidir. Eğer matematiksel model deneysel veriler ile iyi uyuyorsa bu test sayesinde sadece modelin doğasında bulunan rasgele hatalar yansıtılır (Bezerra et al., 2008). Regresyon analizi Lack of fit testinin yapılmasına da imkan tanımaktadır. Lack of fit değerinin anlamsız çıkması istenen bir durumdur (Kansal et al., 2005). Design Expert programı belirli bir mesafe kriteri kullanarak mümkün olan en uzak mesafeye her bir parametre için uç noktalar (aksiyel) atamaktadır. Bu noktalar için, oluşturulan modelin tahmin ettiği değer ve denemeden elde edilen değerlerin tekrar

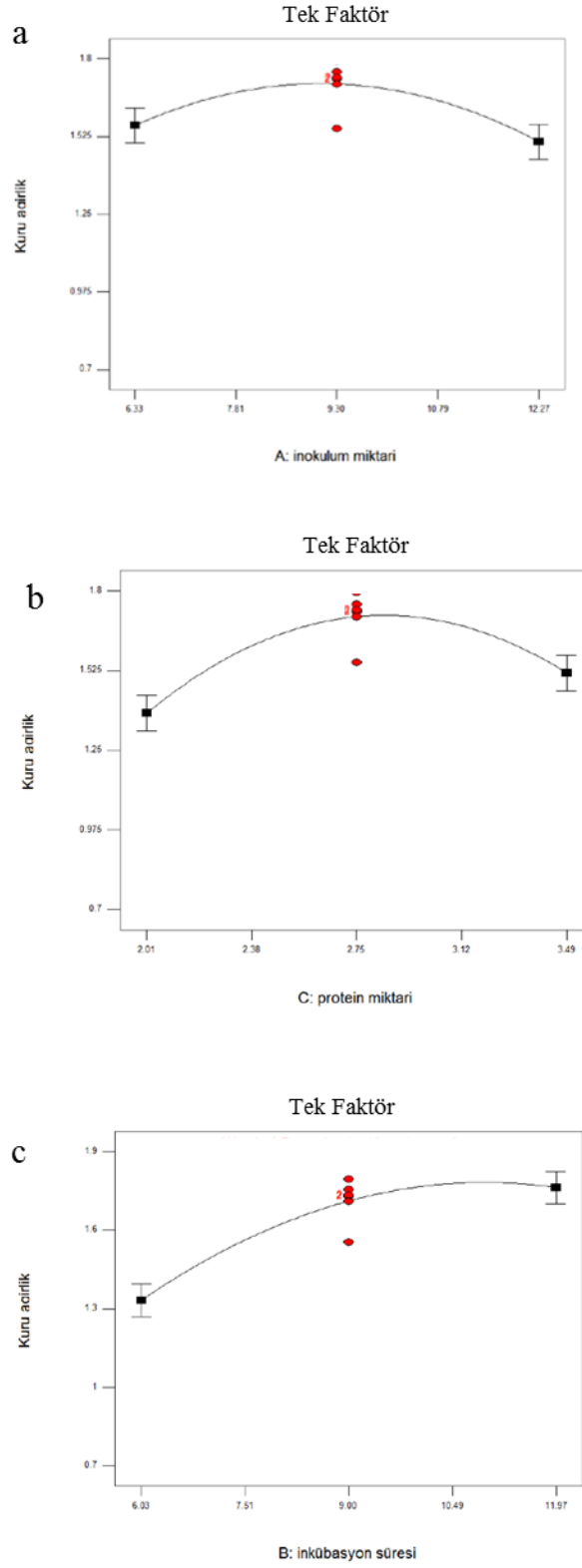
noktalarındaki saf hataya göre anlamlı farklılık gösterip göstermediği araştırılır (Andersen, 2015). Lack of fit değerinin anlamlı çıkması modelin terimler arasındaki ilişkiyi ifade edemediğini gösterir. Tablo 4.6'ya göre istatistiksel olarak anlamız (non-significant) Lack of fit değeri sonuçların model ile yeterli miktarda uyuştuğunu göstermektedir.

R^2 değerinin 1'e yaklaşması tahmin edilen ile deneysel verilerin iyi bir korelasyon gösterdiğini ifade etmektedir. Oluşturulan modelde bu değer 0,9662 olarak belirlenmiştir.

Adeq. Precision tasarım noktalarında tahminlenen değerlerin mesafelerini ortalama tahmin hatasına göre karşılaştırır ve 4'ten büyük değerler elde edilmesi istenir (Noordin et al., 2004). Elde ettiğimiz modelde bu değer 13,943 olarak çıkmıştır.

Design Expert programı ile yapılan denemelerde elde edilen sonuçları 2 (2B) ve 3 boyutlu (3B) grafikler aracılığıyla yorumlamak mümkündür. Her bir faktörün bireysel etkisinin incelenebileceği 2B grafikler Şekil 4.4'te verilmiştir. 2B grafiklerden görüldüğü gibi belirlenen aralıklarda her bir parametre için çan eğrisi benzeri görüntü elde edilmiştir. İnkübasyon süresinde ise belirli bir süre artış görülmekte sonrasında ise BS kuru ağırlık miktarı sabitlenmektedir. Statik kültürde kalınlık arttıkça üst taraftaki bakterilerin besiyeri bileşenlerine, alt taraftaki bakterilerin oksijene ulaşmaları güçleşmektedir (Hornung, M. et al., 2006). *A. xylinum* zorunlu aerob bir mikroorganizmadır ve üretim sıvı-hava arayüzeyinde gerçekleşmektedir (Watanabe and Yamanaka, 1995). Belirli bir hacimde ve S/V oranında üretim gerçekleştirildiğinden belirli süre sonunda BS kalınlığı bakterilerin

oksijen ve/veya besiyeri bileşenlerine ulaşmasını engellediğinden üretim belirli bir noktadan sonra artış göstermemiştir.



Şekil 4.4 Faktörlerin bireysel etkileri; (a) inokulum miktarı, (b) protein miktarı ve (c) inkübasyon süresi.

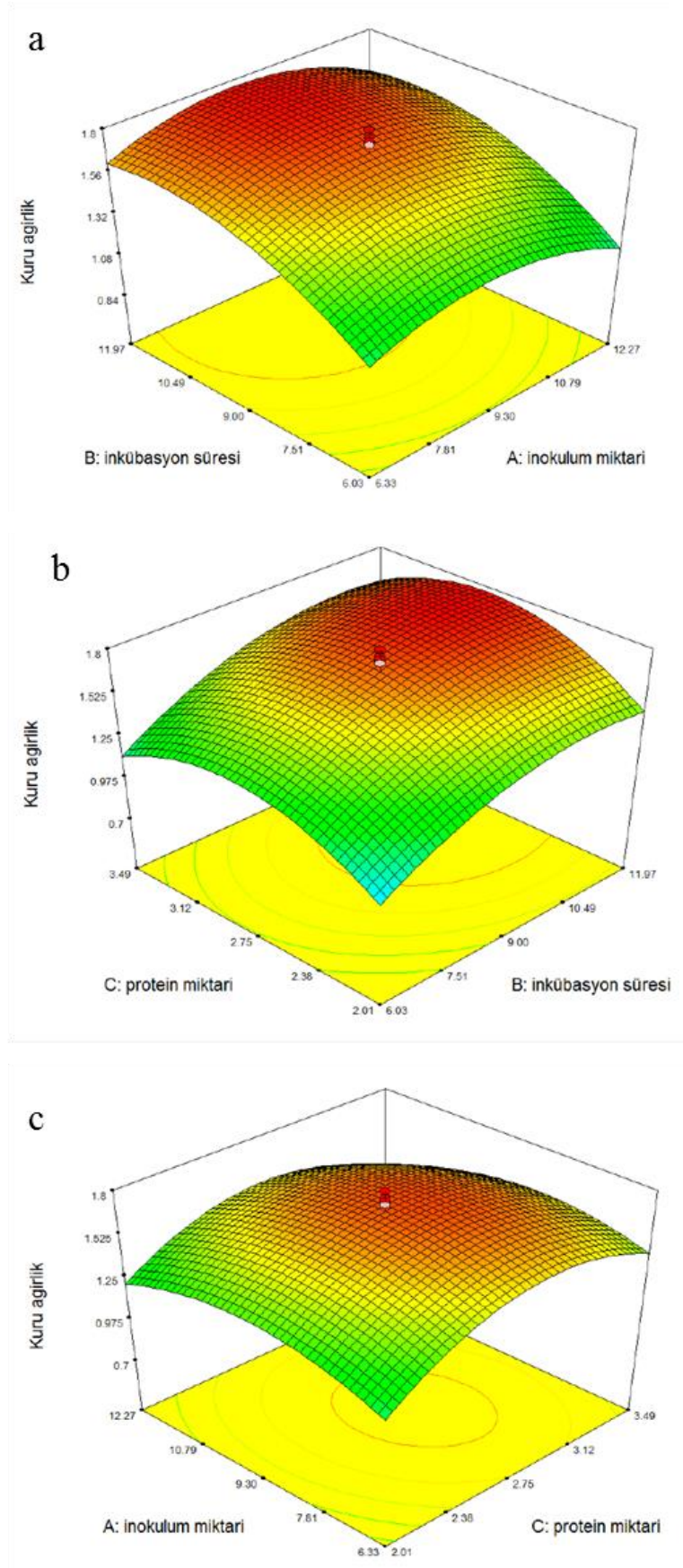
2B grafikler faktörlerin birlikte etkilerinin ne olduğunun anlaşılmasına imkan tanımamaktadır. Şekil 4.5'te deneme sonunda elde edilen model ile program tarafından çizilen 3B grafikler görülmektedir. Renklendirme, üretilen BS'nin kuru ağırlık miktarlarına göre yapılmaktadır. Kırmızı renklenen bölgeler üretimin en yüksek olduğu noktaları göstermekte ve üretim sırasıyla sarı, yeşil ve mavi renklere doğru giderek azalmaktadır. En yüksek üretimlerin grafik içerisinde tespit edilebilmesi 2B grafiklerin sonuçları ile örtüşmektedir.

İstatistiksel optimizasyon tasarımının geleneksel optimizasyon çalışmalarına göre en büyük avantajlarından birisi değişkenlerin ikili etkileşimlerini gösterebilmesidir. Bunun yanı sıra grafiklerden görülebileceği gibi ikinci değişken sabit iken incelenen değişkenin değişmesinin üretim üzerinde etkisinin nasıl olduğunu analiz etmek mümkündür. Örneğin Şekil 4.4'te inokulum miktarı ve inkübasyon süresinin BS üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde, inkübasyon süresinin 6 günde sabit tutulduğu kabul edilirse inokulum miktarının artışının BS üretiminde tek başına önemli bir değişim göstermediği gözlenmektedir. İki ve üç boyutlu grafikler incelendiğinde inkübasyon süresinin üretim üzerindeki etkisinin yüksek olduğu ve inkübasyon süresi arttıkça belirli bir noktaya kadar BS üretiminin de arttığı görülmektedir.

3B grafiklerde üçüncü parametreler merkez noktalarda (central points) sabit tutulmuştur. İnokulum miktarı diğer parametreler ile birlikte incelendiğinde; inkübasyon süresinin (Şekil 4.5a) ve protein miktarının minimumda tutulduğu durumda (Şekil 4.5c) inokulum miktarındaki değişimin kuru ağırlık üzerinde etkili olmadığı görülmektedir. İnokulum miktarı (A) istatistiksel olarak anlamsız parametre çıktığından bu beklenen durumdur. Ancak aynı grafiklerde (Şekil 4.5a ve 4.5c) inokulum miktarı ile birlikte diğer parametrelerin değiştirilmesi

durumunda %9,3 w/v değerinde optimum miktara daha kısa inkübasyon süresinde ve daha az protein kullanılarak ulaşılabilđi görölmektedir. Bu gözlemlere OVAT denemeleri ile ulaşmak mümkün değildir.

Aynı incelemeler protein miktarı için yapıldığında (Şekil 4.5b ve c) protein miktarının %2,75 olduğu durumda maksimum üretimin gerçekleştirildiği kırmızı bölgeye ulaşılabilđi görölmektedir. Inkübasyon süresi için ise 9 günün bu noktalara ulaşmak için yeterli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5a ve 4.5b). İnokulum miktarının ise %9-10 dolaylarında olması grafiklerde üretimin yüksek olduğu kırmızı bölgelere ulaşmak için uygun olduğu görölmüştür (Şekil 4.5a ve 4.5 c).



Şekil 4.5 Faktörlerin birlikte etkileri, (a) inkübasyon süresi-inokulum miktarı, (b) protein miktarı-inkübasyon süresi ve (c) inokulum miktarı-protein miktarı

4.7.3. Doğrulama deneyleri

Bu kapsamda program aracılığıyla, endüstriyel üretim gözönüne alınarak inkübasyon süresi en düşük seviyede tutulup BS üretimini en yüksek seviyede gerçekleştirebilecek parametrelerin seçilmesi sağlanmıştır. Seçilen parametreler, bu parametrelere göre program tarafından tahminlenen (beklenen) değerler, deneme ile elde edilen sonuçlar ve %95 güven aralığında kabul edilebilir en yüksek ve en düşük miktarlar Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7 Doğrulama deneyleri

No	İM (%v/v)	İS (gün)	P (% w/v)	R (beklenen) (mg/L)	R (deneysel) (mg/L)	%95 CI düşük	%95 CI yüksek
1	7,98	7,05	2,55	1439	1367	1357	1522
2	7,01	7,5	2,8	1488	1529	1402	1574
3	9,75	7,26	3	1508	1504	1428	1589
4	10,87	6,97	2,05	1154	1224	1048	1260
5	7,75	6,2	3	1328	1212	1233	1423
6	9,87	6,68	2,75	1431	1357	1349	1513
7	10,01	6,03	2,75	1314	1270	1226	1404

No; deneme numarası, **İM;** inokulum miktarı (%v/v), **İS;** inkübasyon süresi (gün), **P;** protein miktarı (%w/v), **R (beklenen);** programın oluşturduğu modele göre beklenen yanıt (mg/L), **R (deneysel);** yapılan denemeler sonucunda elde edilen yanıt (mg/L), **%95 CI düşük;** %95 güven aralığında beklenen en düşük yanıt (mg/L), **%95 CI yüksek;** %95 güven aralığında beklenen en yüksek yanıt (mg/L).

Doğrulama deneylerinin sonuçları incelendiğinde tüm denemelerin %95 güven aralığında arasında kaldığı görülmektedir. Ayrıca deneysel verilerin tümü beklenen değerlere yakın çıkmıştır. Bu sonuçlar elde edilen modelin BS üretiminin tahminlenebilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

4.7.4. Ölçek büyütme

Optimizasyon çalışmaları petri veya erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Ancak tezin ana hedefi olan BS tabanlı yüz maskesi üretimi için daha geniş yüzey alanı olan kültür kaplarına ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla kullanılan kültür kapları ve üretim çalışmaları Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6 Yüz maskesi için yapılan üretimler. (a) İnkübatör içerisinde genel görünüm. (b) Standart HS besiyerinde ekim. (c) CHb besiyerinde üretim. (d) Standart HS besiyerinde üretilen BS'nin hasatı. (e) CHb besiyerinde üretilen BS'nin hasatı.

Bu kültür kaplarında optimum şartlarda (%10 inokulum miktarı, 9 gün inkübasyon süresi ve %2,75 protein miktarı) üretilen BS'lerin ıslak ağırlıkları 200 g'ın üzerinde çıkmıştır. Bu miktarın yüz maskesi için uygun olmadığı düşünüldüğünden parametreler değiştirilerek daha ince BS üretimi sağlanmıştır. Bu değerler Tablo 4.8'de verilmiştir. Bu üretimlerde elde edilen BS'lerin ıslak ağırlıkları ortalama 90g ($\pm 4,5$)'dır. BS'nin keçiyoynuzu ve kuru fasulye kullanılarak hazırlanan bu ortama Carrob Haricot bean (CHb) besiyeri adı verilmiştir.

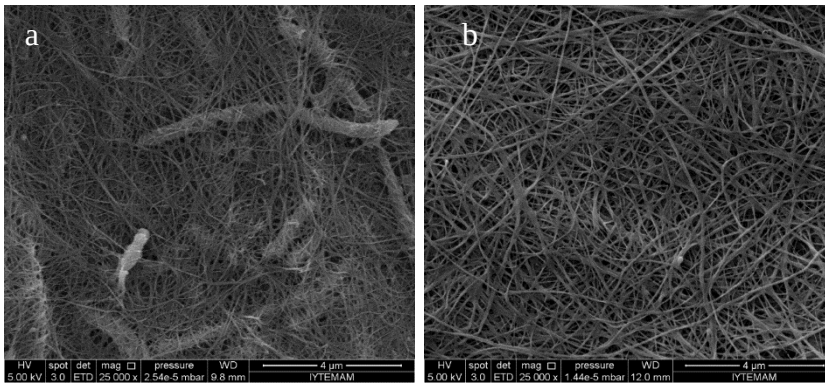
Tablo 4.8 Tepsili üretim parametreleri ve elde edilen sonuçlar

No	İM (%v/v)	İS (Gün)	P (%w/v)	R (mg)
1	10	7	2,5	498,1
2	10	7	2,5	490,3
3	10	7	2,5	482,2
4	10	7	2,5	513,8

No; deneme numarası, **İM**; inokulum miktarı (%v/v), **İS**; inkübasyon süresi (gün), **P**; protein miktarı (%w/v), **R**; tepsilerde üretilen BS'lerin kuru ağırlık değerleri.

4.8. BS Yıkama İşlemleri

BS'nin yüz maskesi olarak kullanılabilmesi için bakteri ve besiyeri kalıntılarından arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle literatürde belirtilen yıkama prosedürü uygulanmıştır (Roman and Winter, 2004). Yıkama işleminden sonra bakterilerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmadığı görüldüğünden yöntem 0,1M NaOH içerisinde bir gece bekletme adımı eklenerek modifikasyona gidilmiştir. İki yıkama yöntemi arasındaki fark Şekil 4.7'de net bir şekilde görülmektedir. Optimizasyon sonrası yapılan karakterizasyon, hücre kültürü ve paketleme çalışmalarında kullanılan BS'ler modifiye yöntem ile yıkanmıştır.



Şekil 4.7 BS SEM görüntüleri (a) Standart yıkama yöntemi sonrası, (b) Modifiye yıkama yöntemi sonrası.

4.9. Endotoksisite Sonuçları

Modifiye yıkama yöntemi ile saflaştırılan BS örneklerinin farklı seyreltmeleri (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000) ile yapılan endotoksisite testinin sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir. FDA vücut sıvıları ile doğrudan temas edecek biyomedikal cihazların 0,05 EU/ml’den daha fazla endotoksin içermemesi gerektiğini belirtmektedir. Doğal bariyer olan derimiz için ise net bir limit yoktur. Bunun nedeni deri farklı kimyasallara karşı olduğu gibi endotoksinlere karşı da vücudumuzu korumaktadır. Bu nedenle sindirim sisteminde olduğu gibi deri yüzeyinde kullanılacak maddeler için de endotoksin limiti yüksektir. Tez kapsamında üretilen örnekler ile yapılan test sonuçları incelendiğinde 10 seyreltmede jel oluşumu gözlenmemiştir. Jel oluşumunun gözlenmemesi o örnekte endotoksin içeriğinin testin tespit edebildiği limitin altında olduğunu ifade etmektedir. Buna göre yüz maskesi olarak kullanılması planlanan örnekler 0,6 EU/ml gibi düşük konsantrasyonda endotoksin içermektedir. Bu çalışma kapsamında BS’nin endotoksinlerden arındırılması için yüksek konsantrasyonlarda (1, 2, 3 ve 5 M) NaOH ile yıkama da gerçekleştirilmiştir. 3M ve üstü NaOH uygulaması BS fiberlerinin yapısını bozup ürünün degradasyonuna neden olmasına karşın endotoksin içeriğini çok fazla değiştirmemiştir. Bu nedenle çalışmada düşük konsantrasyonlarda NaOH uygulaması tercih edilmiştir.

Tablo 4.9 Endotoksisite sonuçları

Standartlar		Örnekler	
0.25 EU/ml	(+)	1:1	(+)
0.5 EU/ml	(+)	1:10	(-)
0.125 EU/ml	(+)	1:100	(-)
0.06 EU/ml	(+)	1:1000	(-)
0.03 EU/ml	(-)	1:10000	(-)
0.0150 EU/ml	(-)		

4.10. Hayvan Hücre Kültürü Denemeleri

BS, Nata de Cocco olarak yaygın olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Bernardo et al., 1998) ve FDA tarafından güvenilir kabul edilen ürünler (generally recognized as safe - GRAS) arasındadır (Lin et al., 2013). *G. xylinus* Gram negatif bir bakteridir (Jeong et al., 2010) ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan lipopolisakkaritler-endotoksinler bulunmaktadır (Ulevitch and Tobias, 1999). Bu nedenle gıda gibi endotoksin eşiğinin çok yüksek olduğu sektörlerde BS'nin kullanılmasında herhangi bir kısıtlama bulunmazken, biyoyumlu olduğu bilinmesine rağmen potansiyel endotoksin içeriği nedeniyle biyomedikal, tıp ve kozmetik gibi sektörlerde kullanılması düşünülen ürünlerin hücreler üzerinde toksik etkiye sebep olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

4.10.1.HS2 hücrelerinin karakterizasyonu

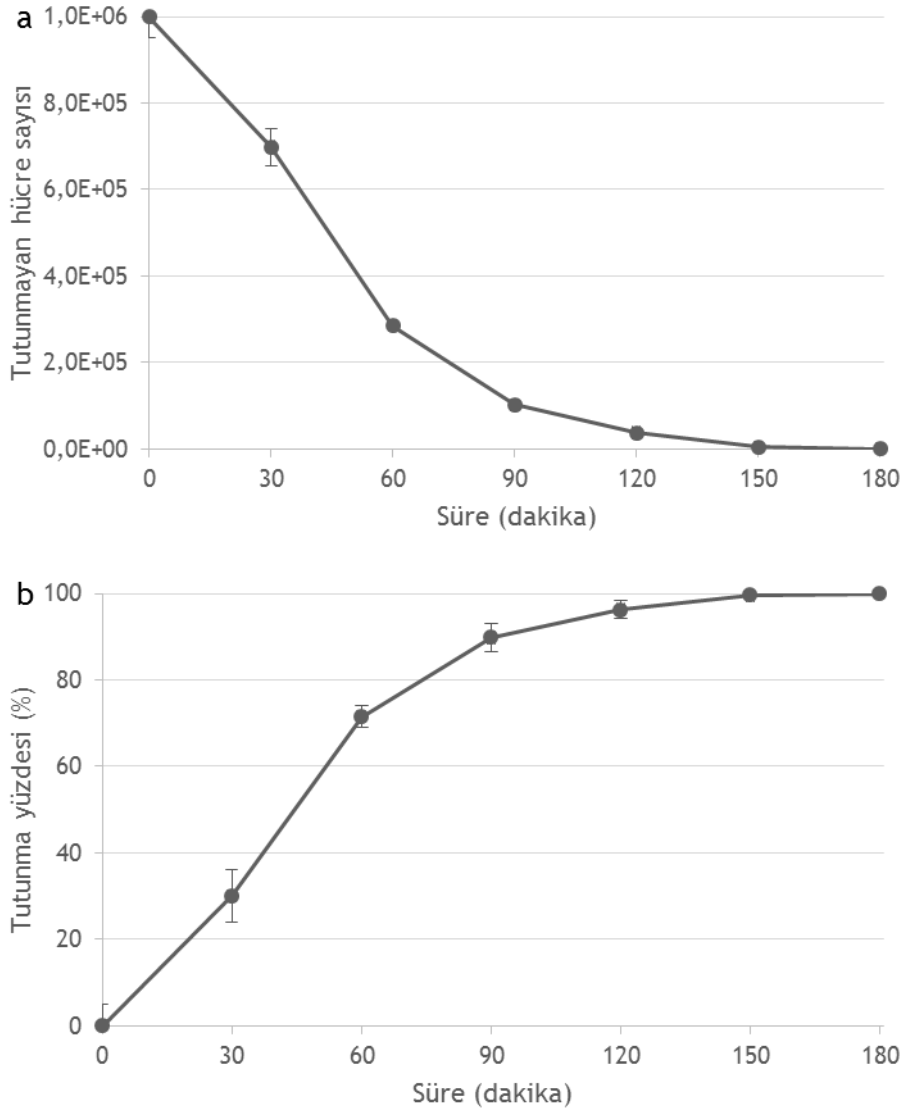
Yapılacak denemelerde HS2 hücrelerinin kültür kaplarında ne kadar sürede tutunduklarının belirlenmesi amacıyla tutunma testi yapılmıştır. Tutunma testinde

elde edilen sayım sonuçları Tablo 4.10'da bu sayım sonuçlarına göre tutunmayan hücre sayısı ve tutunma yüzde grafikleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.10 HS2 hücrelerinin zamana göre hücre sayıları

Süre (dakika)	Sayım1	Sayım2	Sayım3	Ortalama Hücre Sayısı	Tutunma miktarı (%)	Standart sapma (%)
0	1000000	950000	1050000	1000000	0	5
30	633750	755625	706875	698750	30,1	6,1
60	270000	270000	315000	285000	71,5	2,6
90	136000	68000	102000	102000	89,8	3,4
120	40000	56000	16000	37334	96,3	2
150	0	7500	3750	3750	99,6	0,4
180	0	0	0	0	100	0

Tablo 4.10 ve Şekil 4.8 incelendiğinde hücrelerin 90. dakika sonunda %90'ı, 180. dakika sonunda ise tamamı kültür kabına tutunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda hücrelere yapılacak tüm işlemlere ilk ekimlerinden 3 saat sonra başlanmıştır.

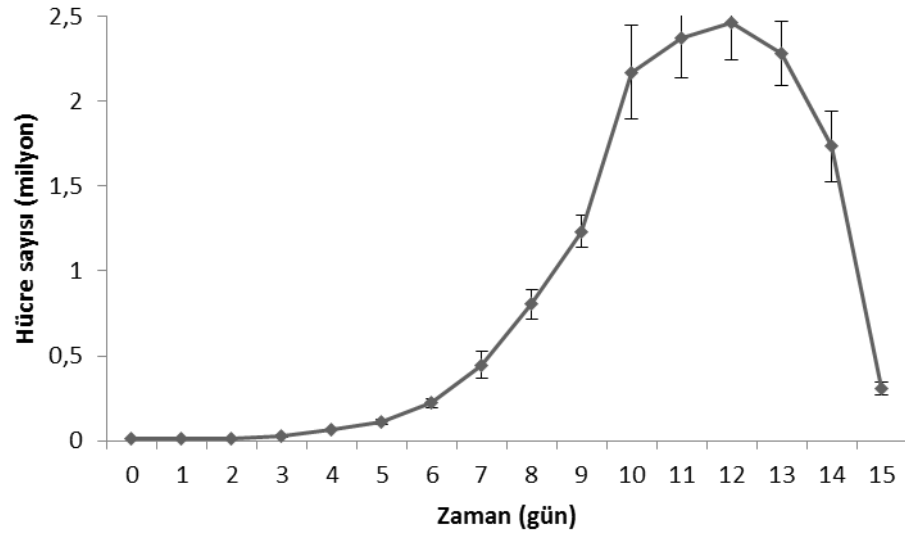


Şekil 4.8 HS2 hücreleri tutunma kinetiği; (a) tutunan hücre sayısı ve (b) tutunan hücre yüzdesi

4.10.2.HS2 hücreleri büyüme kinetikleri

6 gözlü hücre kültürü kaplarında 15 gün süreyle yapılan hücre sayımı sonuçlarına göre HS2 hücreleri için çizilen büyüme kinetiği grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde HS2 hücrelerinin on günlük bir süre boyunca sayılarının logaritmik olarak arttığı daha sonra birkaç gün süre ile sabit kalıp ardından düştüğü gözlenmektedir. Büyüme kinetiği çıkarılırken besin ortamı değiştirilmemiştir. Hücre sayısı arttıkça besin ortamı bileşenlerinin tükenme hızı da

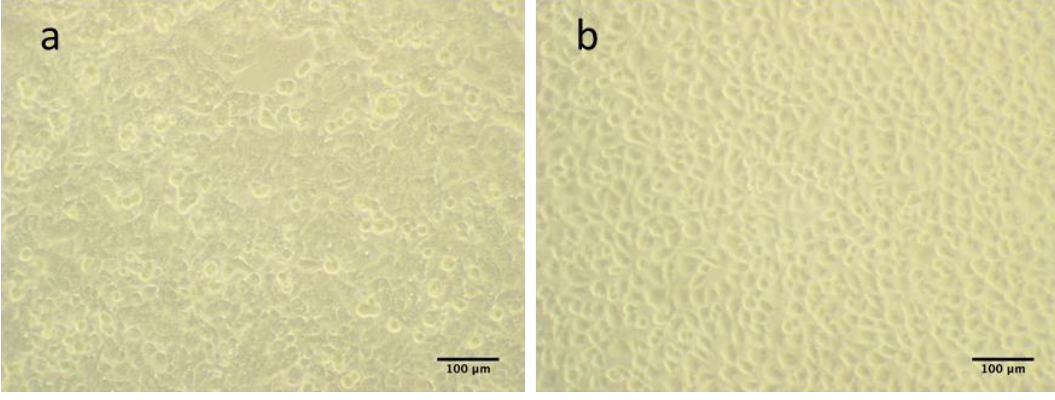
arttığından ve uzun süreli kültürden kaynaklanan kültür ortamı şartlarındaki değişikliklerden dolayı 12-13. günden sonra hücre sayısında düşüş gözlenmektedir.



Şekil 4.9 HS2 hücrelerinin büyüme kinetiği

4.10.3.Hücre morfolojileri

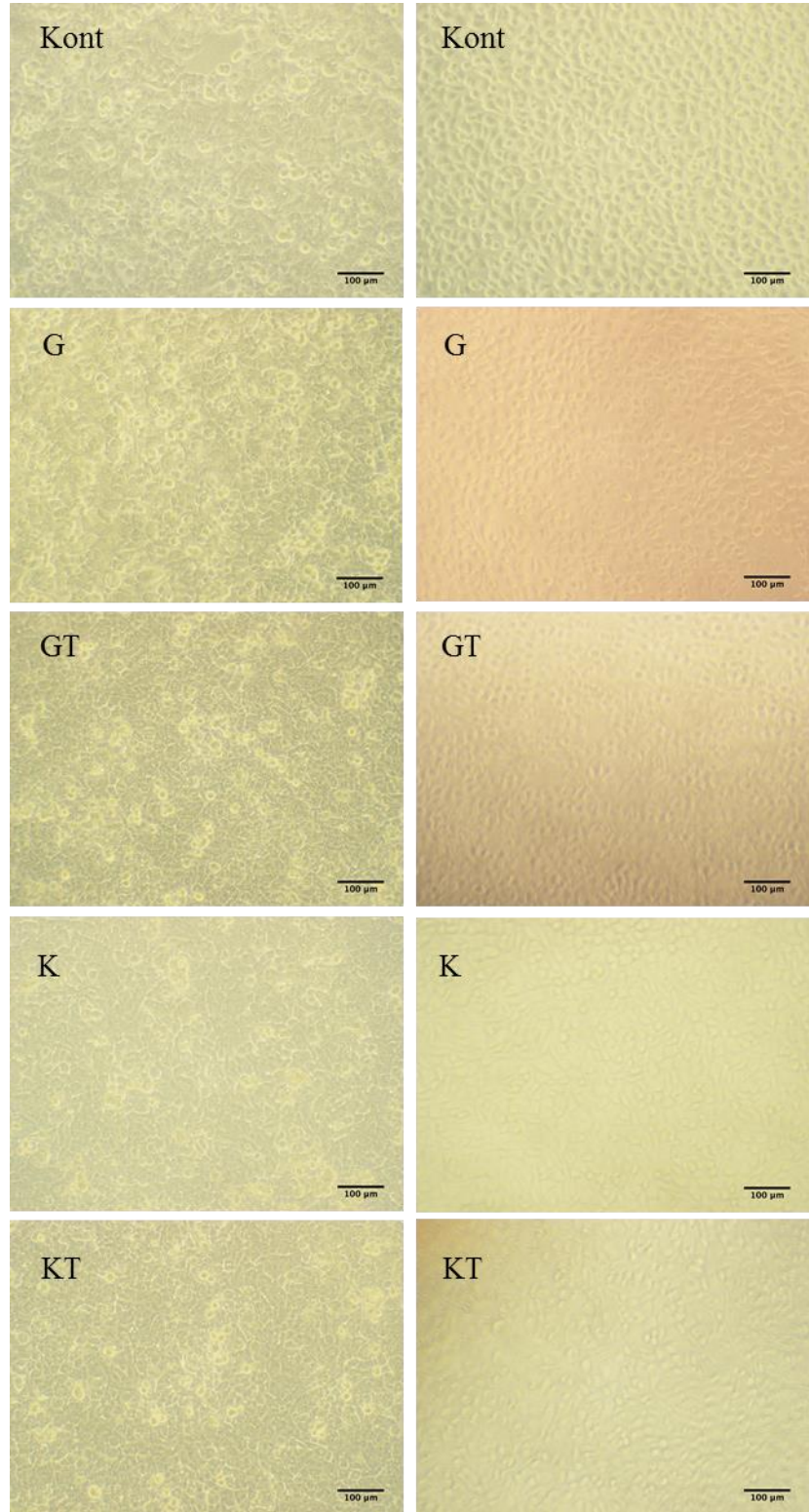
Kullanılan hayvan hücrelerinin, morfolojilerinin belirlenmesi ve denemelerden sonra farklılık meydana gelip gelmediğinin kontrol edilmesi amacıyla ışık mikroskobu altında fotoğrafları çekilmiştir. L929 ve HS2 hücrelerinin morfolojileri Şekil 4.10’da görülmektedir. Kontrol hücrelerinin morfolojileri deneme setlerindeki hücrelerin morfolojileri ile karşılaştırılarak BS’nin olası etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.10 Denemelerde kullanılan hücrelerin morfolojileri; (a) L929 ve (b) HS2 hücreleri (10X büyütme)

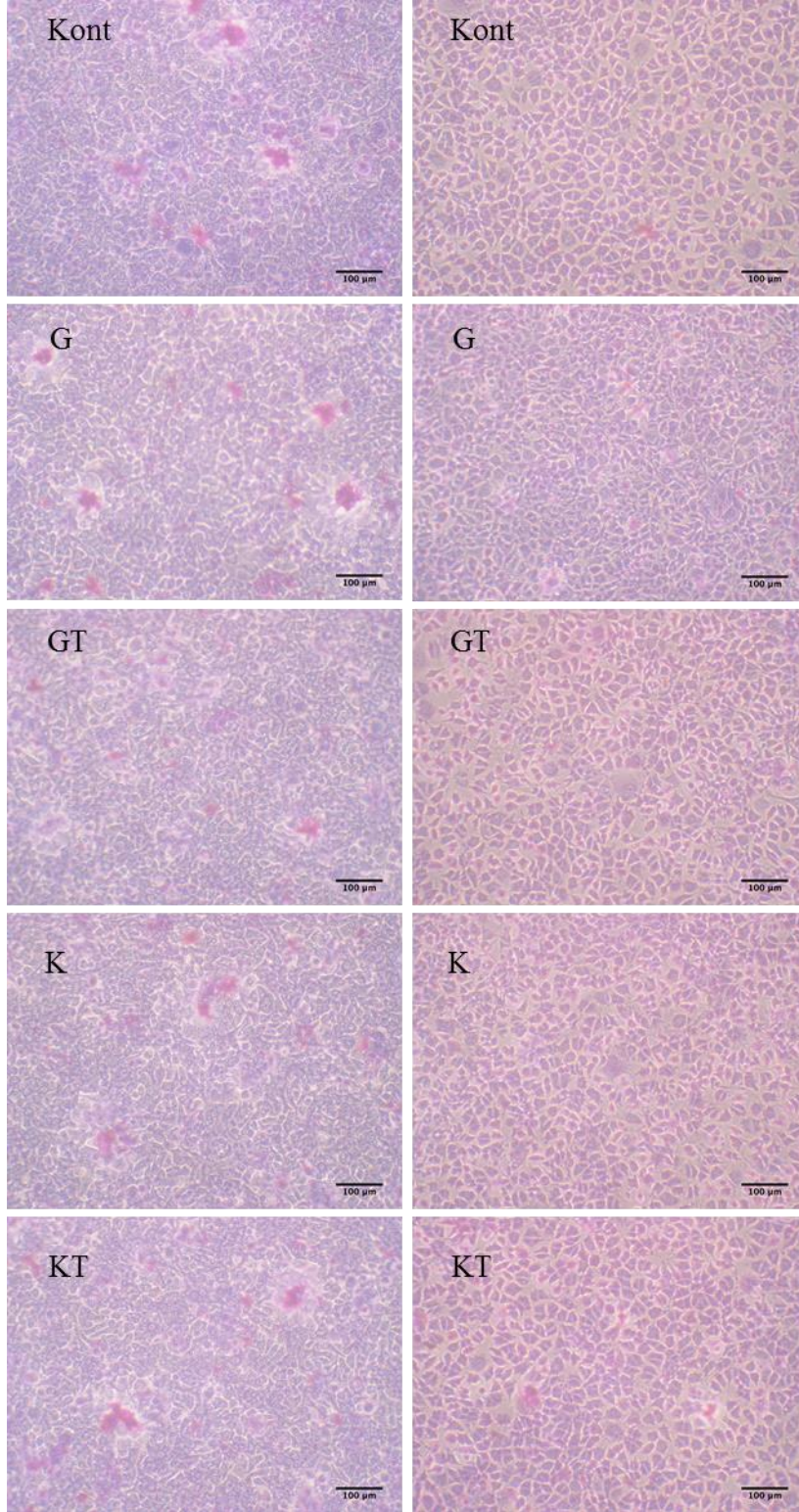
4.10.4. Sitotoksikite denemeleri

BS'nin hücre morfolojisi üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığının araştırılması amacıyla dolaylı sitotoksikite denemeleri gerçekleştirilmiştir. Morfoloji değişiminin gerçekleşip gerçekleşmediğine ve BS'nin bulunduğu yüzeyin altında hücre konsantrasyonunun azalıp azalmadığına giemsa boyama ile bakılmıştır. HS2 ve L929 hücrelerinin, 24 saat sonunda agarların yüzeyden kaldırılmasından sonra hücrelerin boyama öncesi çekilmiş görüntüleri Şekil 4.11'de, boyama sonrası çekilmiş görüntüleri Şekil 4.12'de, 72 saat sonunda agarların yüzeyden kaldırılmasından sonra hücrelerin boyama öncesi çekilmiş görüntüleri Şekil 4.13'te, HS2 hücrelerinin 72 saat sonunda boyama sonrası farklı büyütme ölçeklerinde çekilmiş görüntüleri Şekil 4.14'te ve L929 hücrelerinin 72 saat sonunda boyama sonrası farklı büyütme ölçeklerinde çekilmiş görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir.



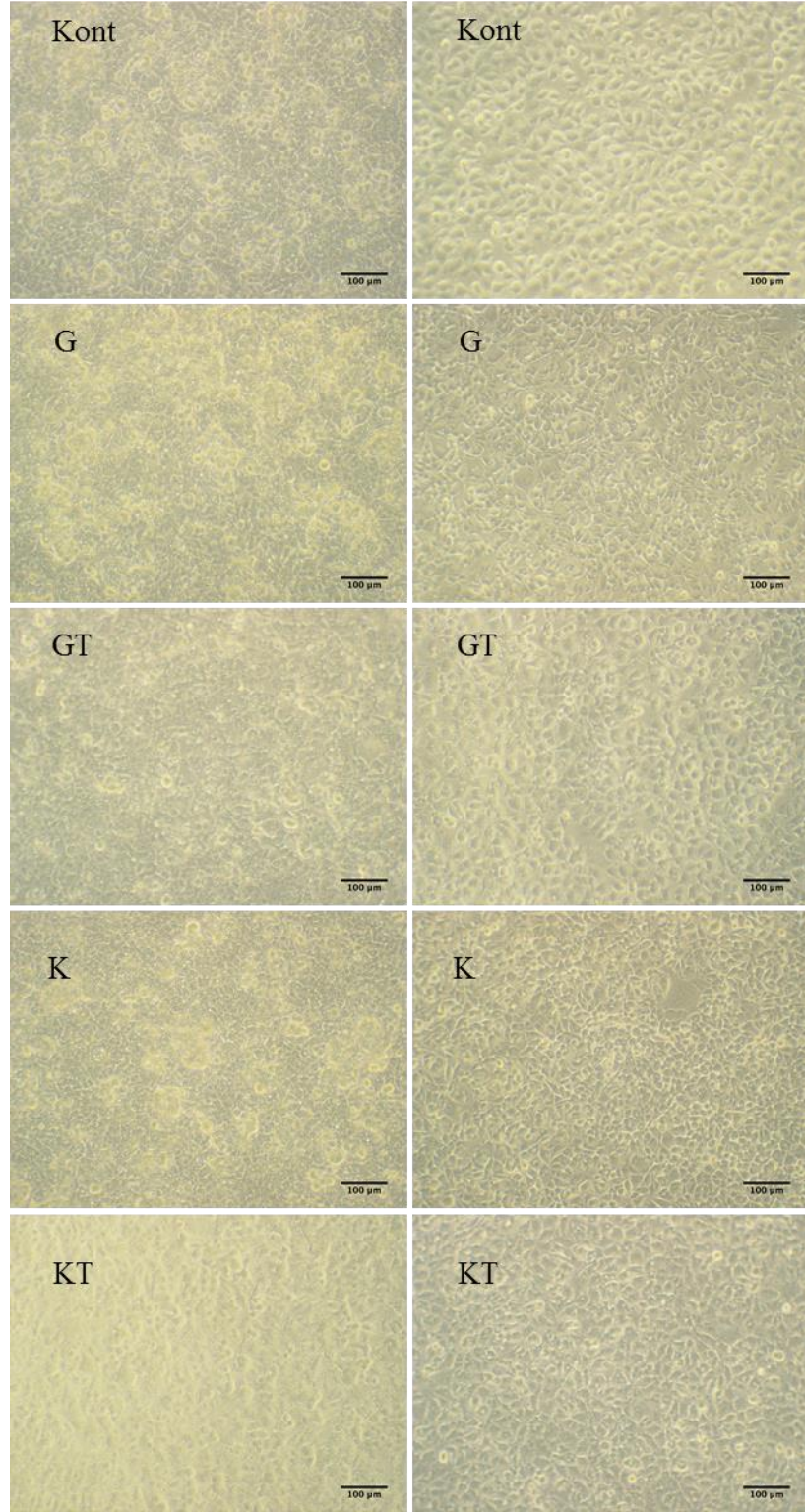
Şekil 4.11 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 24. saat boyama öncesi mikroskop görüntüleri (10x).

Kont; BS içermeyen gözler, **G;** Standart HS besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **GT;** 50mM taurin içeren G, **K;** CHb besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **KT;** 50mM taurin içeren K.



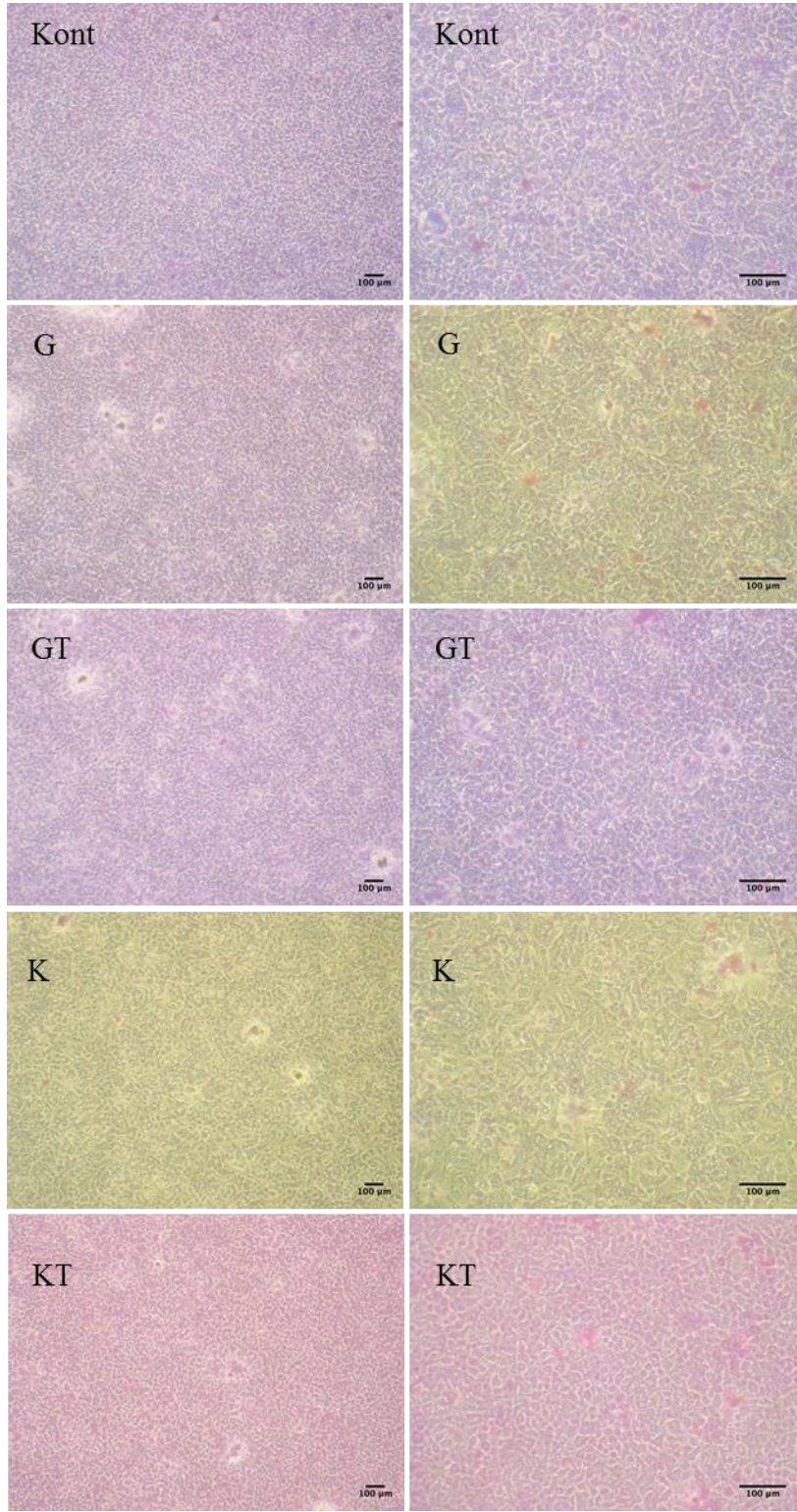
Şekil 4.12 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 24. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (10x).

Kont; BS eklenmemiş gözler, **G**; Standart HS besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **GT**; 50 mM taurin içeren G, **K**; CHb besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **KT**; 50 mM taurin içeren K.



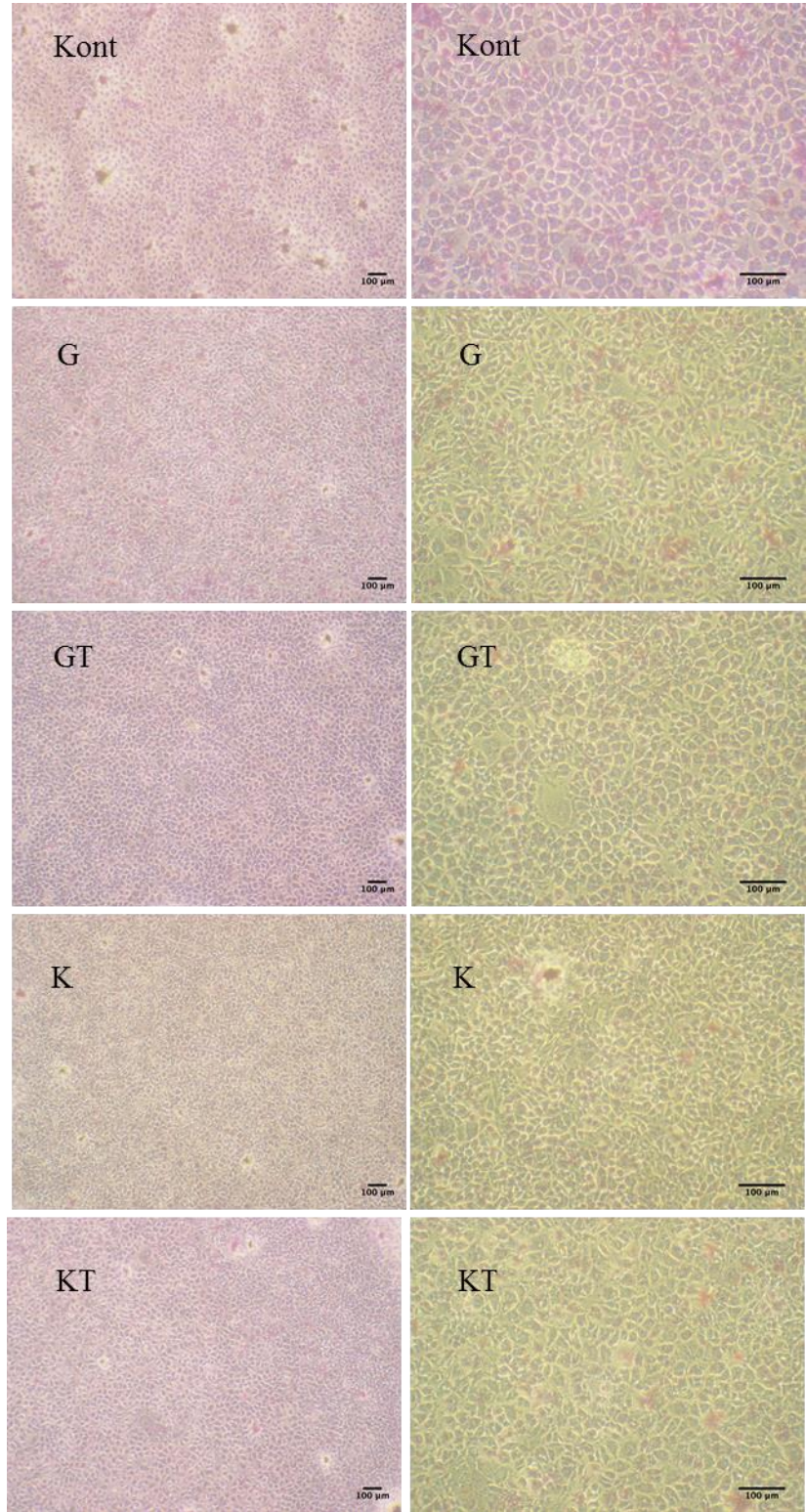
Şekil 4.13 HS2 (sol) ve L929 (sağ) hücrelerinin 72. saat boyama öncesi mikroskop görüntüleri (10x).

Kont; BS içermeyen gözler, **G**; Standart HS besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **GT**; 50 mM taurin içeren G, **K**; CHb besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **KT**; 50 mM taurin içeren K.



Şekil 4.14 HS2 hücrelerinin 72. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (sol: 4X; sağ: 10X büyütme).

Kont; BS eklenmemiş gözler, **G**; Standart HS besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **GT**; 50 mM taurin içeren G, **K**; CHb besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **KT**; 50 mM taurin içeren K.



Şekil 4.15 L929 hücrelerinin 72. saat boyama sonrası mikroskop görüntüleri (sol: 4X; sağ: 10X büyütme).

Kont; BS eklenmemiş gözler, **G;** Standart HS besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **GT;** 50 mM taurin içeren G, **K;** CHb besiyeri kullanılarak üretilmiş BS'lerin kullanıldığı gözler, **KT;** 50 mM taurin içeren K.

Dolaylı sitotoksosite testinde test edilen madde toksik etki gösteriyor ise maddenin konulduğu kısmın altında kalan bölge de hücrelerin seyrekleşmesi veya hiç ürememesi beklenmektedir. Şekil 4.11-4.15 incelendiğinde hiçbir deneme sonucunda kontrole göre seyrekleşme görülmemektedir. 72. saat resimleri geniş açıdan da (4X) çekilmiş ancak herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Hücre morfolojileri de kontrol ile karşılaştırıldığında bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar BS'nin hücreler üzerinde toksik etki göstermediğini ifade etmekte ve BS veya BS'ye dayalı ürünler [(BS-aljinat, BS-polietilenglikol, BS hidroksiapatit, BS jelatin, BS-poli(3-hidroksibutirat-co-4-hidroksibutirat) kompozitleri)] ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* literatür çalışmaları ile örtüşmektedir (Bäckdahl et al., 2006; Cai and Kim, 2010; Chiaoprakobkij et al., 2011; Fang et al., 2009; Kim et al., 2010; Zhijiang et al., 2012). Dolaylı sitotoksosite testi yüzeyin tamamı hücreler ile kaplandıktan sonra yapılmaktadır. Dolayısıyla hücreler çoğalmaya devam ettiklerinde tutunacak yüzey alanı bulamayacaklarından kısa sürede ölmeye başlayabilirler. Bu nedenle bu test yanlış negatif sonuç elde edilmemesi için 72. saat sonra sonlandırılmıştır. Literatürde BS üzerinde yapılan uzun dönemli *in vivo* biyoyumluluk çalışmalarının da olumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Klemm et al., 2001a; Pértile et al., 2012). Bu veriler ışığında BS'nin yüz maskesi olarak kullanılabileceğine karar verilmiş, karakterizasyonu yapıldıktan sonra ambalajlama, koruyucu ve taurin yükleme işlemlerine geçilmiştir.

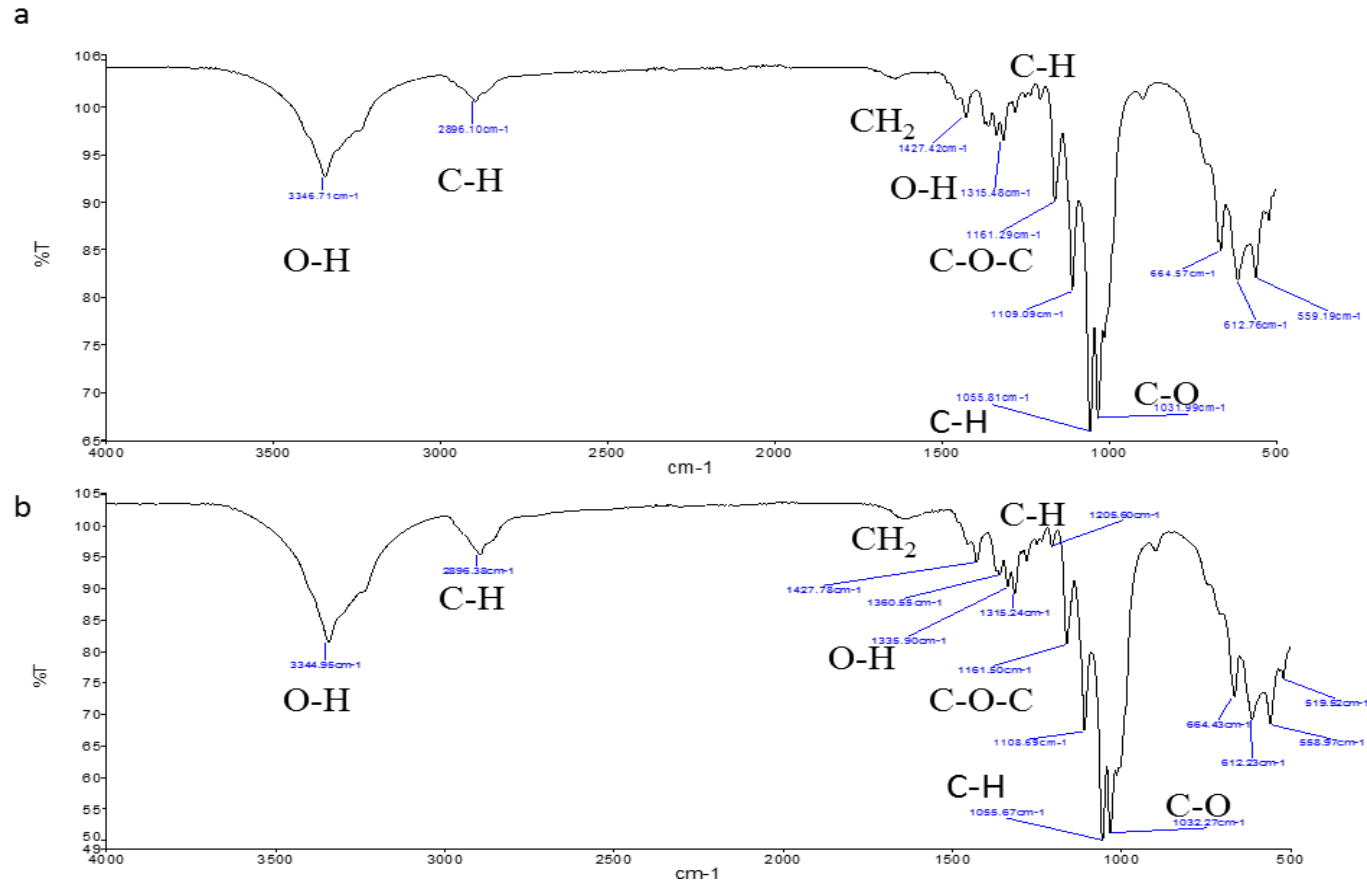
4.11. BS Karakterizasyon Çalışmaları

Hayvan hücre kültürü denemeleri ile sitotoksik etki göstermediği tespit edilen ve yüz maskesi için kullanılacak BS örneklerinin karakterizasyonu üretim açısından önem taşımaktadır. Bu tez kapsamında üretilen BS örneklerinin Fourier FTIR ve XRD metotları kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Bu testler BS'nin yapısal özellikleri hakkında fikir sahibi olmak için gerçekleştirilmiş ve testler sonucunda elde edilen analiz sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırma yapılmıştır.

4.11.1. FTIR analizi

Alternatif hammaddeler içeren CHb besiyeri ile üretilen BS'nin yapısal ve işlevsel durumunun değişip değişmediğinin incelenmesi amacıyla FTIR spektrumu çekilmiştir.

FTIR spektroskopisi yıkama, saflaştırma işleminin etkinliğini ve BS'nin yapısının incelenmesine olanak tanımaktadır. HS ve CHb besiyerinde üretilen BS örneklerinin FTIR analiz sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir.

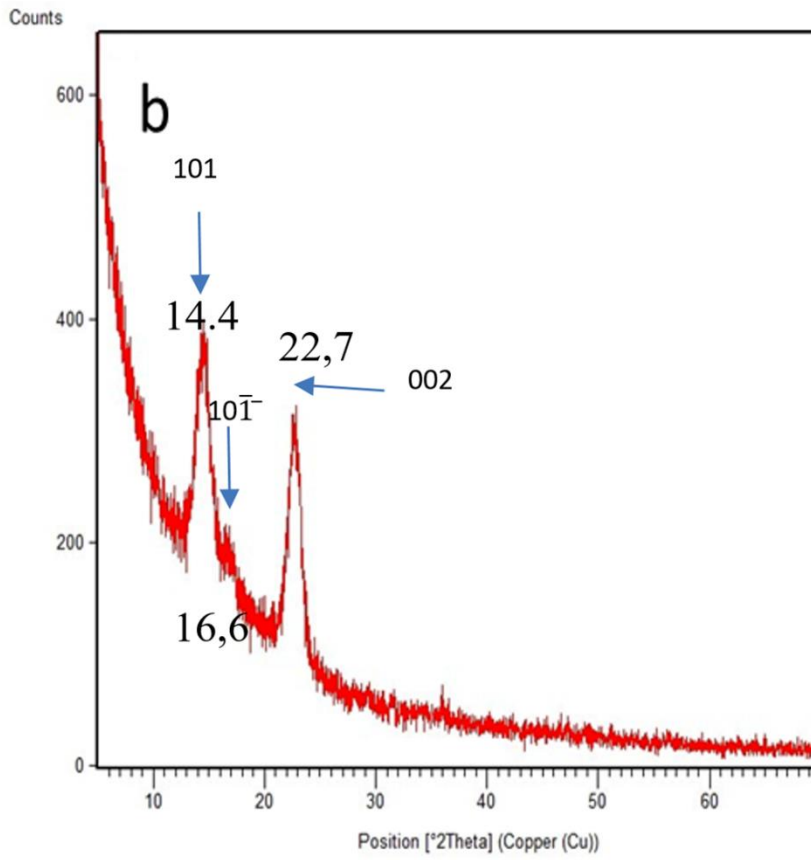
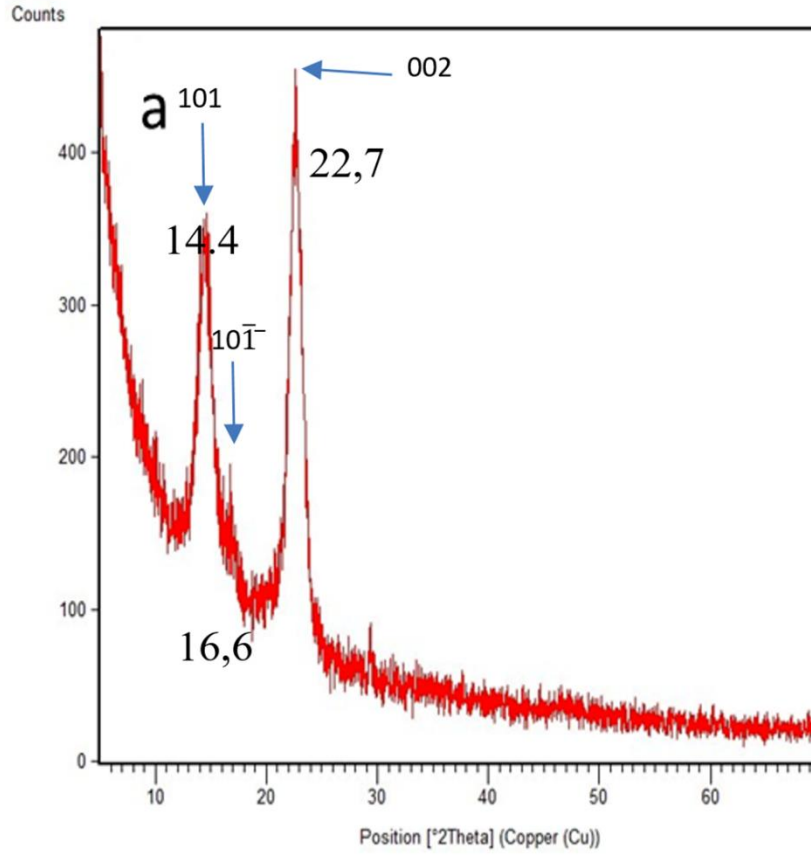


Şekil 4.16 FTIR analiz sonuçları; (a) HS ile üretilen BS ve (b) CHb besiyeri ile üretilen BS

FTIR spektrumunda 3350 cm^{-1} 'deki pik ve $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler saf selüloz için O-H esneme (O-H stretching), 2900 cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon piki C-H bağlanmasını, 1162 cm^{-1} 'deki pik C-O-C esnemeye, 1032 ve 1055 cm^{-1} 'deki pikler ise C-O bağlarına karşılık gelmektedir. 1277 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} 'deki bulunan ve kristalin bölge ile saf selülozun varlığına işaret eden pikler sırasıyla C-H bükülme (C-H bending), O-H bükülme ve CH_2 esneme bağlarına karşılık gelmektedir (Castro et al., 2011; Halib et al., 2012; Liu, G. et al., 2011; Wan et al., 2006). Şekil 4.16 incelendiğinde hem literatürde sıklıkla kullanılan HS besiyeri hem de bu çalışma ile geliştirilen CHb besiyerinde üretilen BS, saf selülozun vermesi gereken pikleri vermektedir. Aynı zamanda kristalin bölgelerin varlığı da bu grafiklerden anlaşılabilmektedir.

4.11.2. XRD analizi

BS'nin XRD pikleri birçok çalışmada belirlenmiştir (Barud et al., 2007; Castro et al., 2011; Hong et al., 2006; Li et al., 2009; Wan et al., 2006). Bu çalışmalarda $14,4$, ve $22,7$ [Position ($^{\circ}2\theta$) (Copper (Cu))]'deki güçlü piklerin BS'ye özgü olduğu belirtilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda aynı zamanda $16,6$ 'daki piklerin de BS'ye karakteristik olduğunu belirtilmektedir (Wan et al., 2006). Bu pikin pozisyonu ve büyüklüğü selüloz Ia ve Ib içeriği hakkında bilgi vermektedir (Watanabe et al., 1998). Bu üç pik sırasıyla 101 , $10\bar{1}$ ve 002 difraksiyon düzlemlerine karşılık gelmektedir. HS ve CHb besiyerinde üretilmiş BS'lerin XRD grafikleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Her iki grafikte de literatürde belirtilen pikler tespit edilmiştir.



Şekil 4.17 XRD spektrumları; (a) CHb ile üretilen BS ve (b) HS ile üretilen BS

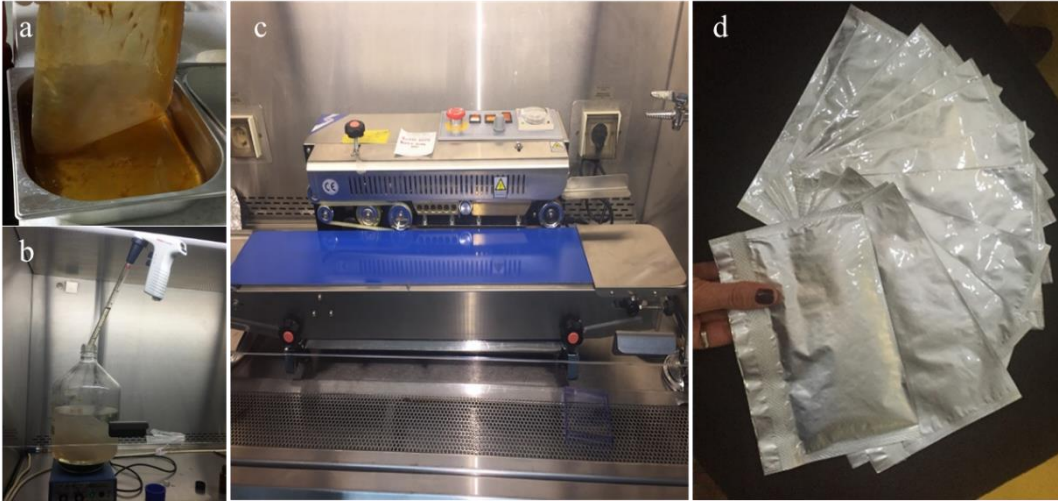
BS'nin kristalinite indeksi (CI);

$$CI = (I_{002} - I_{AM}) / (I_{002})$$

formülüne göre hesaplanmıştır (Park, S. et al., 2010). Sonuçlar her iki örneğinde selüloz Ia ve Ib formlarında olduğuna işaret etmektedir. Aralarındaki tek 002 düzlemindeki görece yoğunluk farkıdır. Bu durum örneklerin kristalinite indeksinde farklılığa neden olmaktadır. Yapılan hesaplamalar sonucunda alternatif hammaddeler ile üretilen BS için % 78, HS ile üretilen BS için % 61 kristalinite değerleri bulunmuştur.

4.12. Ambalajlama Çalışmaları

Ambalajlama çalışmaları sonucunda elde edilen ürünler Şekil 4.18'de verilmiştir. Keçiboynuzu ve kurufasulye kullanılarak (CHb besiyeri) yüz maskesi için uygun ağırlıkta üretilen BS'ler yıkanmış, taurin ve koruyucu eklenen çözelti içerisinde bekletilmiş ve sonrasında paketlenmiştir. Paketlemede ürün için özel belirlenen (17,5 cm x 12,5 cm) ölçülerdeki ambalajlar kullanılmıştır. Yüz maskeleri ikiye katlanarak paketlere yerleştirilmiştir. Elde edilen nihai ürünler, mekanik özellikler, salım ve mikrobiyal stabilitenin değişip değişmediğinin belirlenmesi için stabilite çalışmalarına alınmıştır. Paketleme başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş, içerisinde yüksek oranda su içeren BS bulunmasına karşın paketlerde herhangi bir sızıntı gözlenmemiştir.



Şekil 4.18 Ambalajlama çalışmaları; (a) yüz maskesi için belirlenen şartlarda üretilen BS, (b) modifiye yıkama yöntemi ile yıkanmış 50 mM taurin ve %1 koruyucu (Phenostat) içeren BS, c) ambalajlama cihazı ve d) ambalajlanmış son ürünler

4.13. Mikrobiyal Stabilite ve Challenge Testleri

Mikrobiyal stabilite ve tarama testlerinin sonuçları Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.11 Mikrobiyal stabilite sonuçları

Mikrobiyolojik analizler	Aerobik Bakteri Sayımı	Maya-Küf	<i>S.aureus</i>	<i>Paeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
0. gün	saptanmadı	saptanmadı	saptanmadı	saptanmadı	saptanmadı
1. ay	saptanmadı	saptanmadı			
2. ay	saptanmadı	saptanmadı			
3. ay	saptanmadı	saptanmadı			
4. ay	saptanmadı	saptanmadı			
5. ay	saptanmadı	saptanmadı			

Tablo 4.12 Challenge (tarama) testi sonuçları

Mikrobiyolojik analizler	7. gün	14. gün	27. gün	Mevzuat limiti
<i>E.coli</i>	>3 log	>3 log	>3 log	3 log
<i>S.aureus</i>	>3 log	>3 log	>3 log	3 log
<i>P.aeruginosa</i>	>3 log	>3 log	>3 log	3 log
<i>C.albicans</i>	>1 log	>1 log	>1 log	1 log
<i>A.niger</i>	>1 log	>1 log	>1 log	1 log

“Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) Kozmetik Ürünlerde Güvenlik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz”a göre bitmiş ürünün kabul kriterleri Tablo 4.13’te verilmiştir.

Tablo 4.13 TİTCK bitmiş ürün mikrobiyal kabul kriterleri

Analiz	Limit değerler
Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı	$1,0 \times 10^3$
Toplam maya-küf sayısı	$1,0 \times 10^3$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bulunmamalı
<i>Candida albicans</i>	Bulunmamalı

Bir kozmetik ürünün mikrobiyal stabilitesinin ve kullanılan koruyucunun etkinliğinin doğru şekilde tahmin edilmesi güçtür. Bu nedenle kullanım sürelerinin belirlenmesi amacıyla kozmetik ürünlerin raf ömrü boyunca karşılaşılabilecekleri Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ile belirli tipteki bakteri ve küflere maruz bırakılması gerekmektedir (Russell, 2003). Böylelikle koruyucunun etkinliği test edilebilmektedir. Avrupa Birliği kozmetik yasalarına göre kozmetik ürünlerinin hayvan denemelerine tabi tutulması yasaklanmıştır. Bu nedenle insan sağlığını riske atmadan ürünlerin test edilmesi gerekmektedir (Pauwels and Rogiers, 2010). 2013 yılı itibarı ile yasaklanan hayvan denemelerine alternatif olarak bazı zorlukları bulunmasına rağmen *in vitro* laboratuvar denemeleri önerilmektedir (Adler et al., 2011). Bu kapsamda laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen ve hücreler üzerinde toksik etki göstermediği belirlenen ürünlerin mikrobiyal stabilite ve koruyucu etkinliği için tarama testleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.11 incelendiğinde belirli dönemlerde inkübasyon koşullarından çıkarılıp test edilen ürünlerde herhangi bir mikrobiyal yük tespit edilmemiştir. Bu %0,5-2 aralığında kullanılabilen koruyucunun %1 oranında istenilen koruma etkisini ürünümüzde sağladığını göstermektedir. *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* türlerinin başlangıçta üründe bulunmaması durumunda sonra kontaminasyona neden olmaları

beklenmediğinden başlangıç zamanından sonra bu mikroorganizmalar aranmamıştır. Tablo 4.12 incelendiğinde %1 oranında koruyucunun 1×10^7 - 1×10^8 kob/ml, *C. albicans* için 1×10^6 - 1×10^7 kob/ml, *A. brasiliensis* için ise 1×10^6 - 1×10^7 spor/ml gerçekleştirilen ekimlerde mikroorganizmaların eliminasyonunda mevzuat limiti olan 3 log'un üzerinde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ürünün uzun süre boyunca (5ay) mikrobiyal yük açısından koruyucu tarafından etkin bir şekilde korunduğunu ve kontaminasyon durumunda ise mikroorganizmaların etkin bir şekilde elimine edildiğini göstermektedir.

4.14. BS Yüz Maskesi Özelliklerinin Belirlenmesi

Üretilen yüz maskesinin kullanıcı tarafından rahat bir şekilde kullanılıp kullanılamayacağını belirlenmesi amacıyla HS ve CHb besiyerleri ile üretilen koruyu ve taurin içeren ve içermeyen örnekler TA-XT Plus Texture analiz (TPA) cihazı kullanılarak biyoadezyon ve kesilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'te verilmiştir.

4.14.1. BS yüz maskesi biyoadezyon testi

Örneklere uygulanan kuvvet, neticesinde geri çekilme sırasında BS örneklerinin ne kadar mesafe boyunca aparata yapıştığı Tablo 4.14'te gösterilmektedir. Deneme sırasında en yüksek kuvvetin herhangi bir şey içermeyen alternatif hammaddeler ile yapılan üretim CHb (0,102 kg) ve standart besiyeri ile üretilen örnekler için HS (0,119 kg) yapılan denemelerde elde edildiği görülmektedir. Yapışma mesafeleri göz önüne alındığında Chb besiyeri ile yapılan üretimde taurin ve koruyucu eklemesinin değerleri 3,483 mm'den 3,058mm'ye

düşürdüğü gözlenirken, bu değer HS besiyeri ile üretilen örneklerde 2,950 mm'den 2,133 mm'ye düşmektedir. Standart sapmalarda göz önünde bulundurulduğunda taurin ve koruyucu eklenmesinin CHb besiyeri ile üretimlerde (2,754-3,483) HS besiyeri ile üretimlere göre (2,133-3,208) daha az değişime neden olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.14 CHb ve HS ile üretilen BS'lerin Biyoadezyon sonuçları

Örnekler	Kuvvet(kg)					Yapışma mesafesi (mm)				
	1	2	3	Ort	Std	1	2	3	Ort	Std
CHb+50mM T	0,062	0,071	0,060	0,064	0,006	2,525	3,450	2,788	2,921	0,477
CHb+%1 Phe	0,078	0,089	0,062	0,076	0,014	2,66	2,850	2,750	2,754	0,094
CHb	0,096	0,105	0,104	0,102	0,005	3,187	3,537	3,500	3,483	0,192
CHb+50mMT+%1 Phe	0,066	0,078	0,067	0,070	0,007	2,725	3,125	3,325	3,058	0,306
HS+50mM T	0,081	0,069	0,075	0,075	0,008	3,138	3,125	3,362	3,208	0,133
HS+%1 Phe	0,106	0,106	0,107	0,106	0,001	2,850	2,425	2,463	2,579	0,235
HS	0,126	0,115	0,115	0,119	0,006	3,013	2,825	3,013	2,950	0,109
HS+50mM T+ %1 Phe	0,108	0,121	0,119	0,116	0,007	1,800	2,038	2,562	2,133	0,390

CHb; CHb besiyeri kullanılarak hazırlanan BS, **HS;** standart besiyeri ile hazırlanan BS, **T;** Taurin, **Phe;** Phenostat

4.14.2. BS yüz maskesi kesilebilirlik testi

Örneklere uygulanan kuvvet neticesinde BS örneklerinin ne kadar sürede kesildiği Tablo 4.15'te gösterilmektedir. Yapılan analiz sonuçları değerlendirdiğinde HS besiyeri ile üretilen BS örneklerin kesilmesi için gereken kuvvetin daha yüksek, sürenin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç daha düşük kuvvet ile daha uzun sürede kesilen CHb besiyeri ile üretilen örneklerin daha esnek olduğunu göstermektedir. Son ürün olarak değerlendirilebilecek taurin ve phenostat içeren örnekler kıyaslandığında HS besiyeri ile üretimlerin mekanik özelliklerinin CHb ile üretilen BS örneklerinden daha fazla değiştiği görülmektedir.

Tablo 4.15 CHb ve HS ile üretilen BS'lerin kesilebilirlik sonuçları

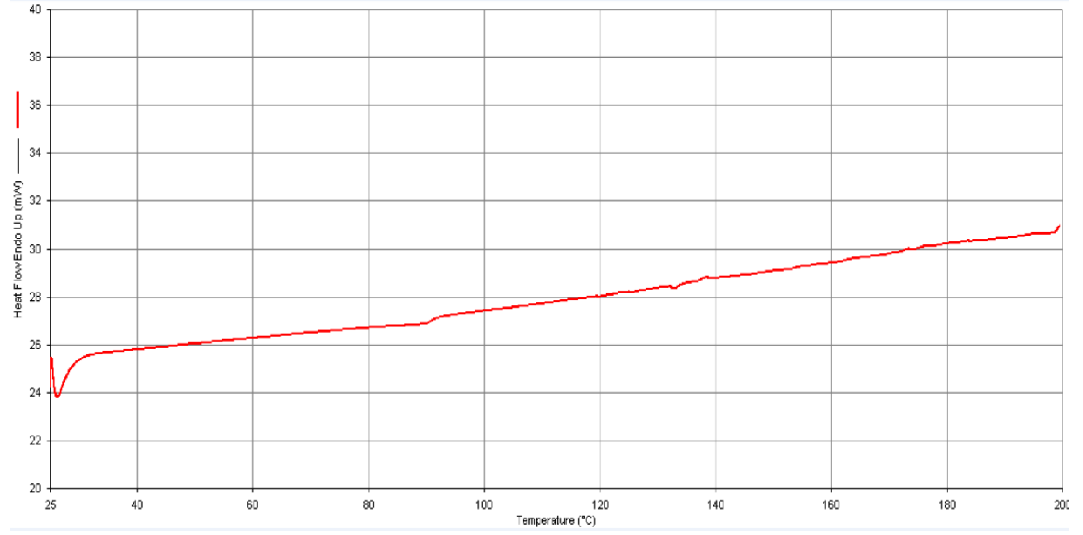
Örnekler	Kuvvet(kg)			Ort	Std	Süre (s)
	1	2	3			
CHb+50mM T	0,360	0,327	0,372	0,353	0,023	0,565
CHb+%1 Phe	0,344	0,341	0,263	0,316	0,046	0,466
CHb	0,435	0,402	0,418	0,418	0,017	0,513
CHb+50mMT+%1 Phe	0,417	0,479	0,442	0,442	0,033	0,489
HS+50mM T	0,589	0,570	0,545	0,545	0,067	0,439
HS+%1 Phe	0,507	0,565	0,511	0,511	0,053	0,388
HS	0,359	0,347	0,335	0,335	0,031	0,375
HS+50mM T+ %1 Phe	0,579	0,523	0,529	0,529	0,047	0,327

CHb; CHb besiyeri kullanılarak hazırlanan BS, **HS;** standart besiyeri ile hazırlanan BS, **T;** Taurin, **Phe;**

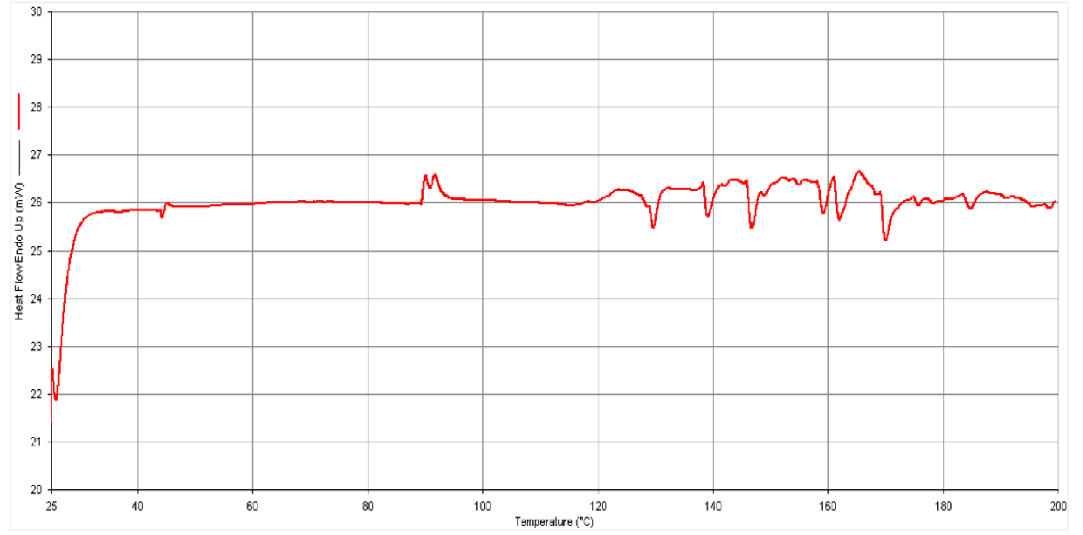
Phenostat

4.14.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri

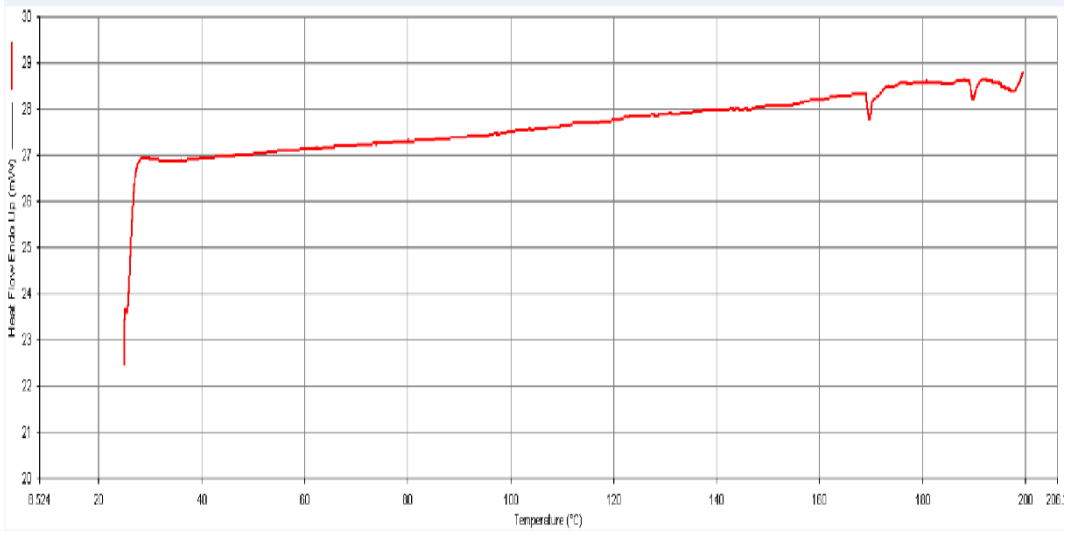
DSC biyolojik moleküllerinin termal özelliklerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Spink, 2008). DSC sıvı çözeltideki biyolojik molekülün ısı kapasitesini sıcaklığın bir fonksiyonu olarak elde edilmesini sağlamaktadır (Lopez and Makhatadze, 2002). Taurinin erime sıcaklığı 300 °C üzerindedir (White, A. and Fishman, 1936). Bu sıcaklıkta biyolojik polimerlerde bozunma pikleri görüldüğünden çalışmalar olası camsı geçiş sıcaklıklarını gözleyebileceğimiz bir aralıkta yürütülmüştür. Saf taurinin, CHb ve HS besiyeri ile üretilen, taurin ve phenosat içeren/içermeyen BS yüz maskelerinin DSC grafikleri Şekil 4.19-4.27'de verilmiştir. formülasyonların hiçbirinde hammaddelerin saf hallerinde görülmesi beklenen camsı geçiş gözlenmemiştir. Bu durum elde edilen biyoteknolojik materyalin yapısal olarak orjin materyalden farklılaştığının bir göstergesi olabilir. Eklenen taurin ve koruyucunun DSC grafiklerindeki bozunma piklerini daha ötelediği görülmektedir. Bu durum da eklenen bu maddelerin sadece mikrobiyolojik ve oksidatif strese karşı değil, materyalde çözünmeleri sonucunda termal bozunmaya karşı da olumlu katkı yaptıkları sonucunu desteklemektedir.



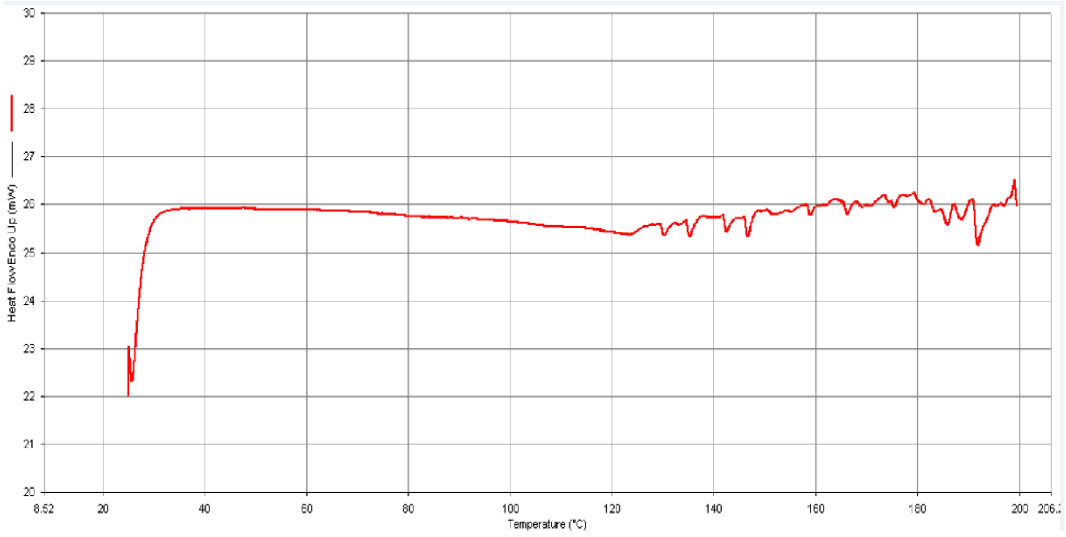
Şekil 4.19 Saf taurin



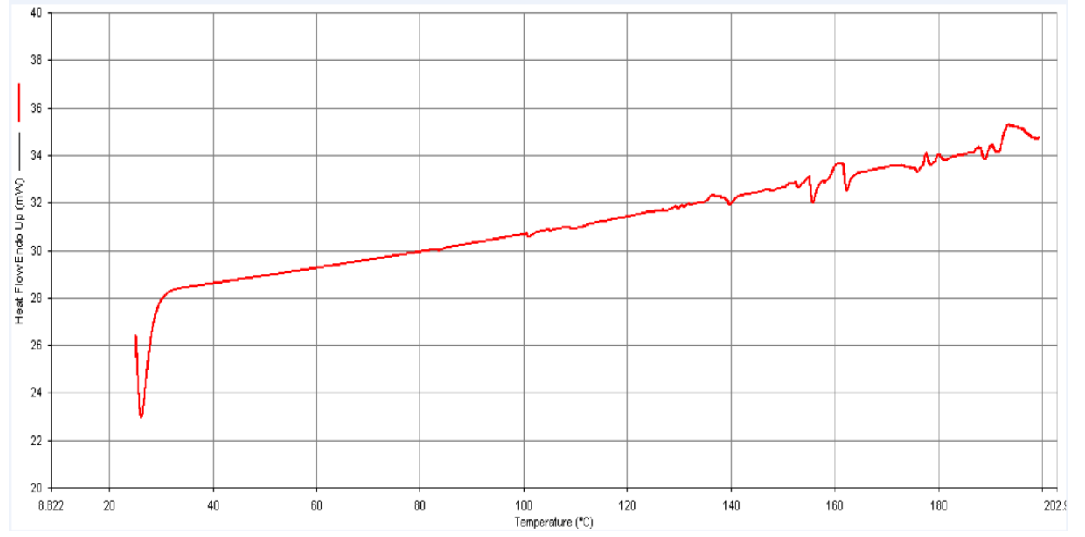
Şekil 12.20 CHb besiyeri ile üretilen ve 50 mM taurin içerisinde bekletilen BS



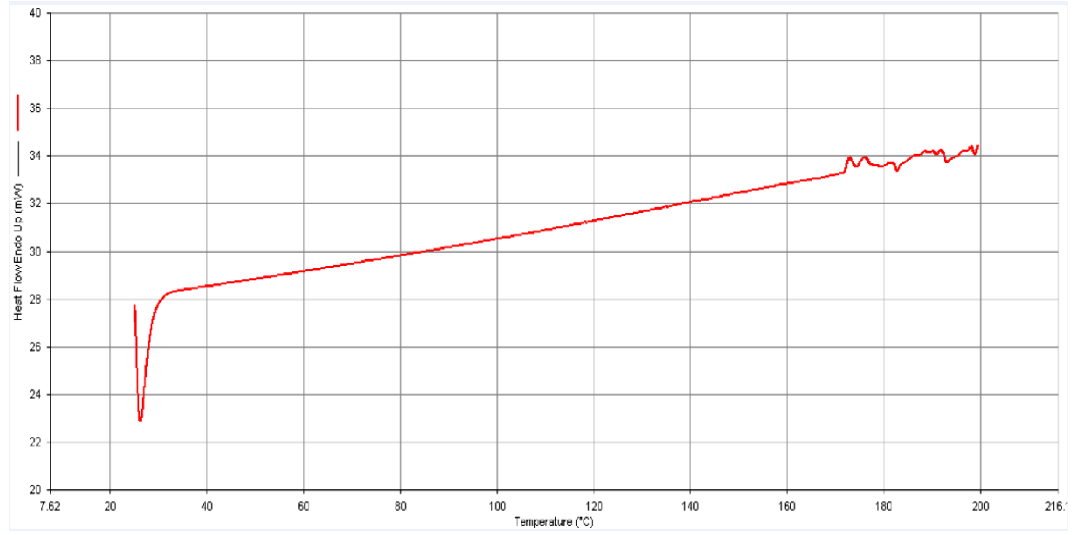
Şekil 4.21 CHb besiyeri ile üretilen ve %1 oranında koruyucu (Phenostat) içeren BS



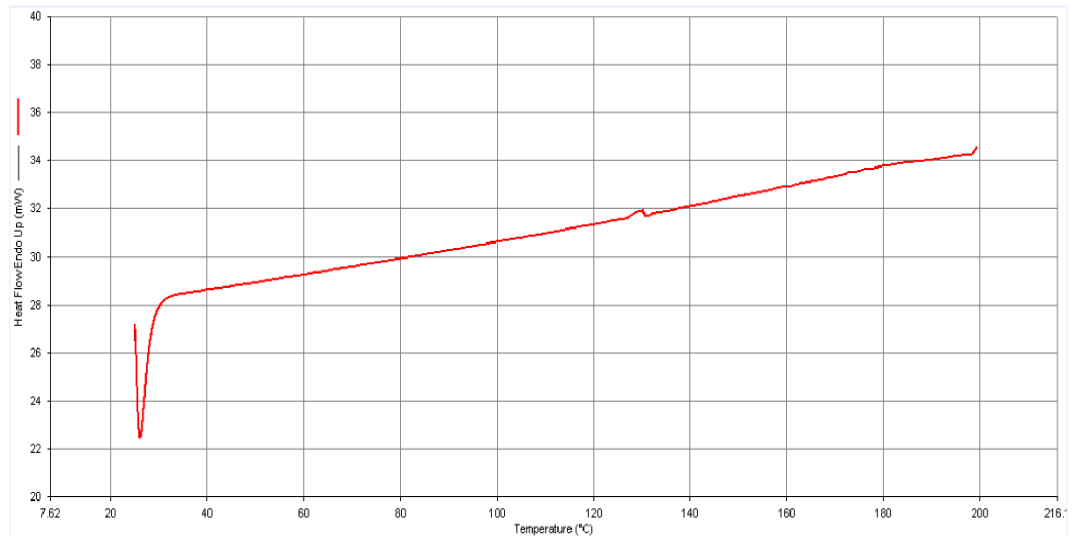
Şekil 4.22 CHb besiyeri ile üretilen BS



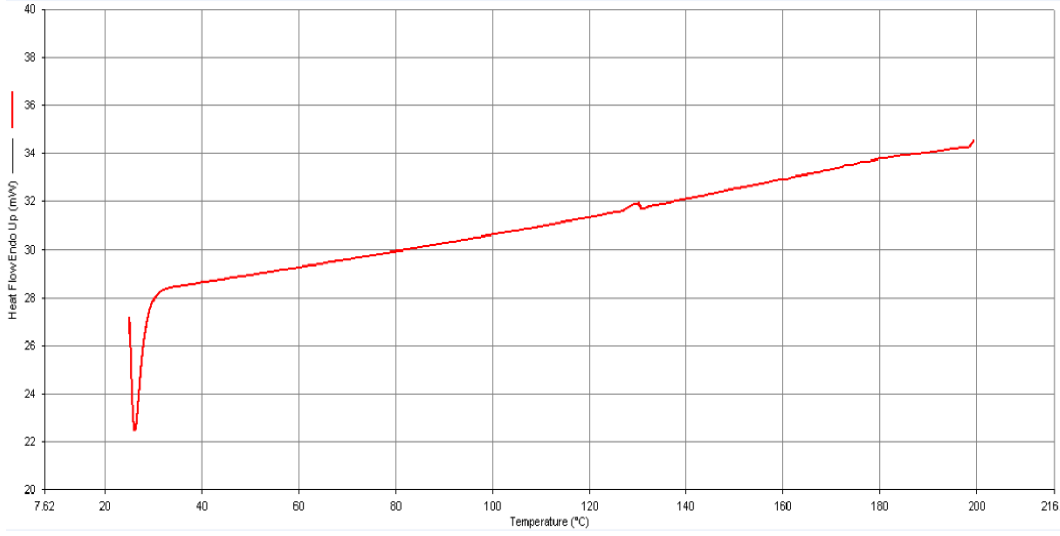
Şekil 4.23 CHb besiyeri ile üretilen 50 mM Taurin içerisinde bekletilen ve %1 Phenostat içeren BS



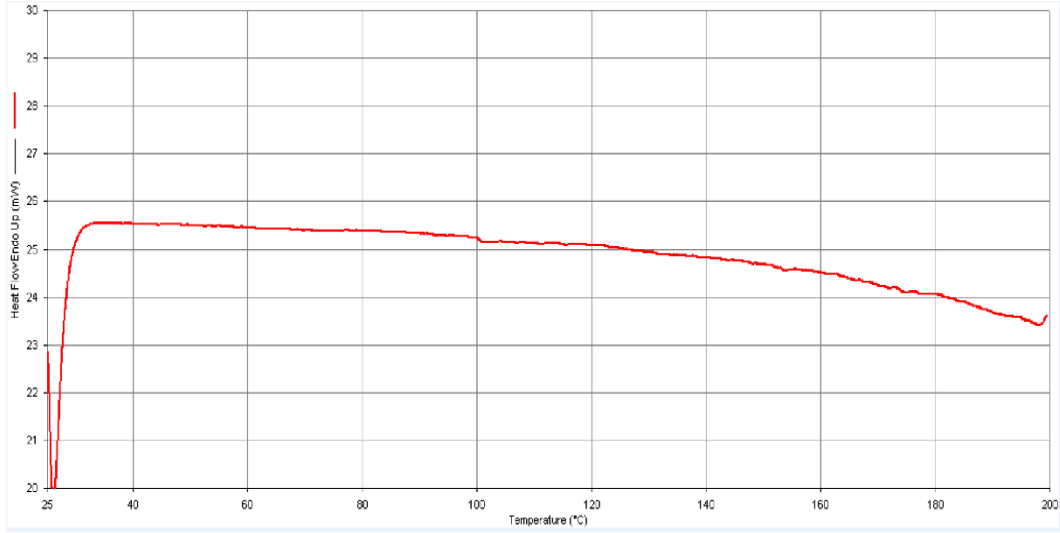
Şekil 4.24 HS ile üretilen ve 50mM taurin içeren BS



Şekil 4.25 HS ile üretilen ve %1 Phenostat içeren BS



Şekil 4.26 HS ile üretilen BS

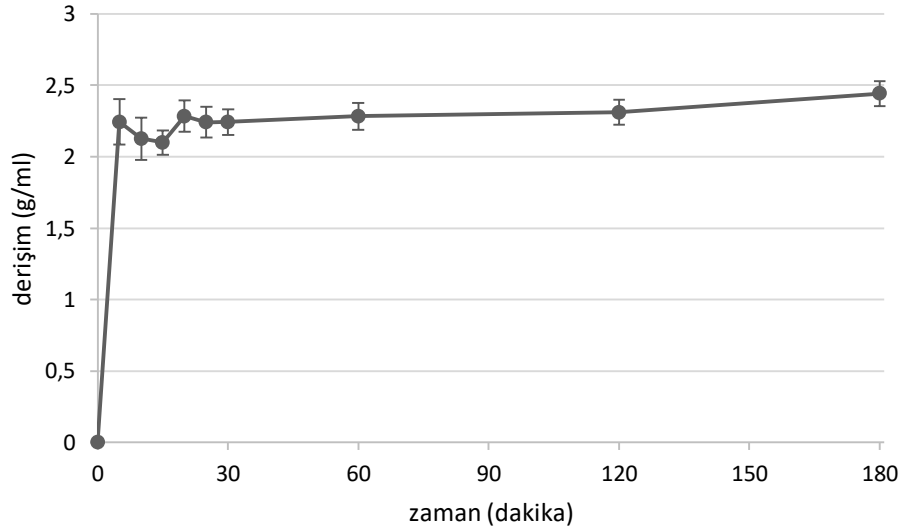


Şekil 4.27 HS besiyeri ile üretilen 50 mM Taurin içerisinde bekletilen ve %1 Phenostat içeren BS

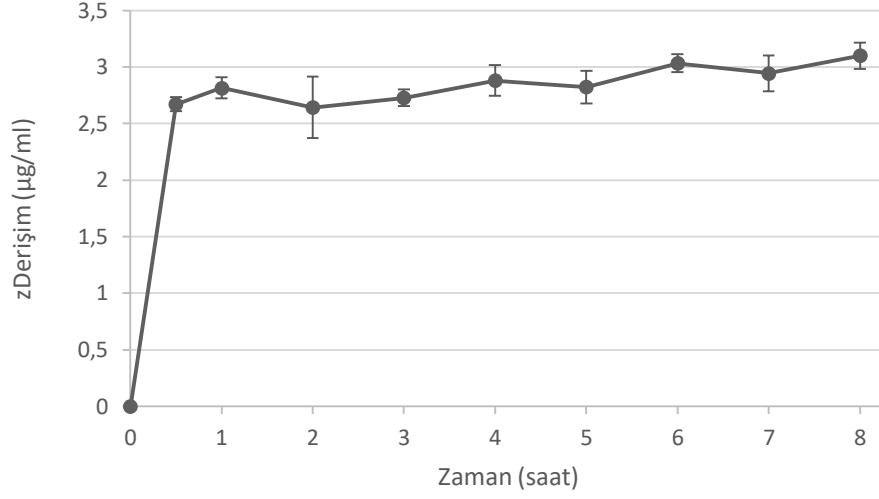
4.14.2.BS yüz maskesi taurin salım testi

Vücutta ROS ve FR'lerin oluşumu (lipid oksidasyonu, XO'un hipoksantin ve ksantin arasındaki oksijeni kofaktör olarak kullanarak ROS ve FR'lerin oluşması gibi) ve yok edilmesi çeşitli yollarla gerçekleşmektedir (Finaud et al., 2006; Quinlan et al., 1997). Taurinin hücre yenilenmesi ve çoğalmasında etkili olduğu, ROS ve FR'lerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olduğu veya seviyesinin azaltılmasını sağladığı, hücreler için besleyici ve destekleyici olarak

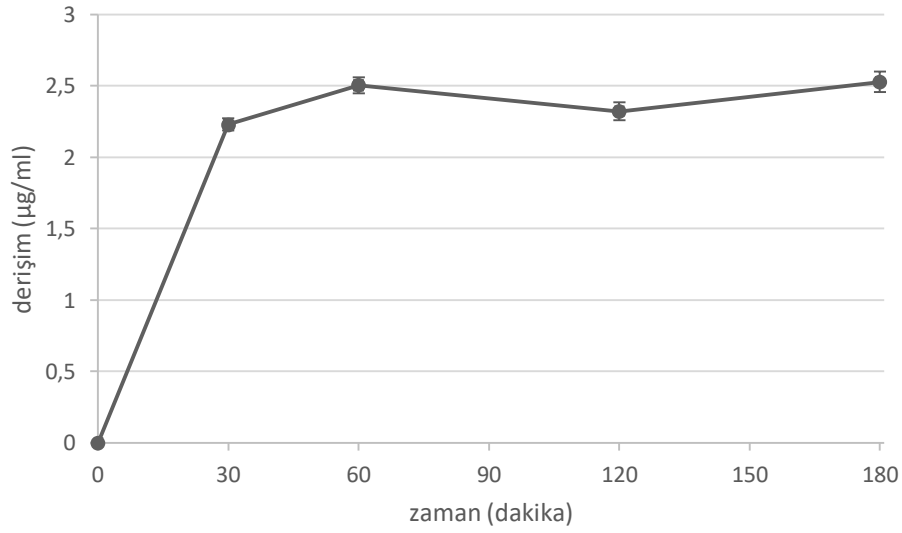
görev yaptığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Chen et al., 1998; Değim et al., 2002; Devamanoharan et al., 1997; Guerin et al., 2001). CHb besiyerinde üretilen BS örnekleri modifiye BS yıkama yöntemi ile yıkandıktan sonra taurin ve koruyucu yüklenmiştir. Üretilen BS yüz maskelerinin nemlendirme özelliğinin yanı sıra antioksidan özellik sergileyebildiğinin gösterilmesi için taurin salım profilleri çıkarılmıştır. Başlangıçta (0. gün) elde edilen salım profili Şekil 4.28’de, 1. ay sonunda elde edilen salım profili Şekil 4.29’da, 25°C, %60 nem koşullarında bekletilen ürünlerden 2. ay sonunda elde edilen salım profili Şekil 4.30’da, 40°C, %60 nem koşullarında bekletilen ürünlerden 2. ay sonunda elde edilen salım profili Şekil 4.31’de, 25°C, %60 nem koşullarında bekletilen ürünlerden 4. ay sonunda elde edilen salım profili Şekil 4.32’de, 40°C, %60 nem koşullarında bekletilen ürünlerden 4. ay sonunda elde edilen salım profili Şekil 4.33’te ve LC/MS cihazının saf taurin ile oluşturduğu standart grafik Şekil 4.34’te verilmiştir.



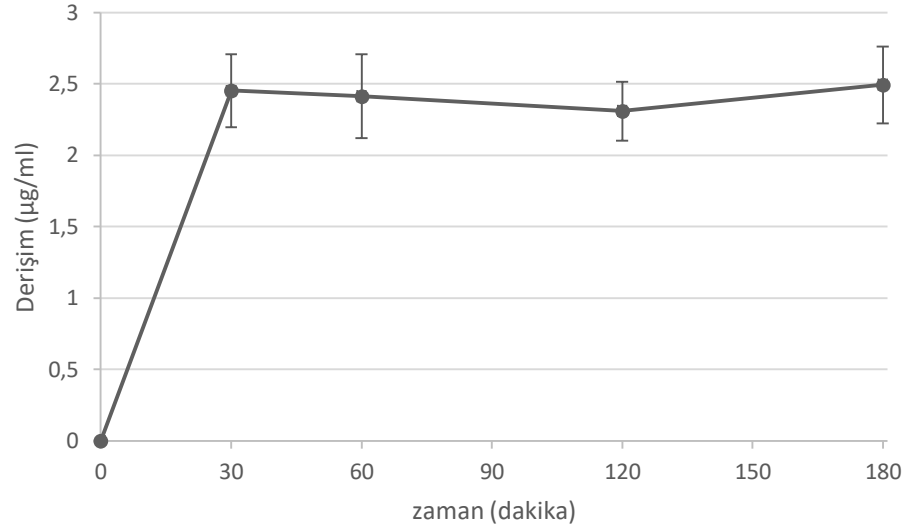
Şekil 138 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (0. gün)



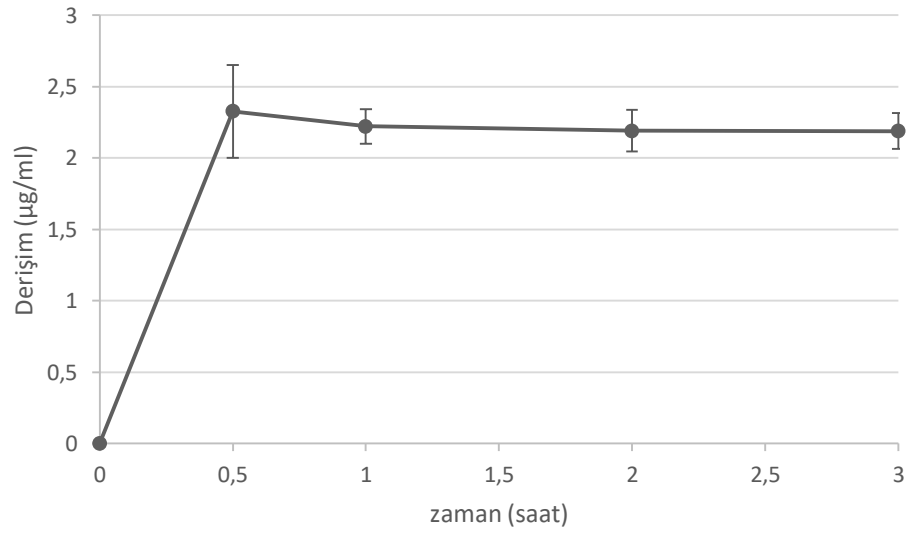
Şekil 4.29 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (1. ay)



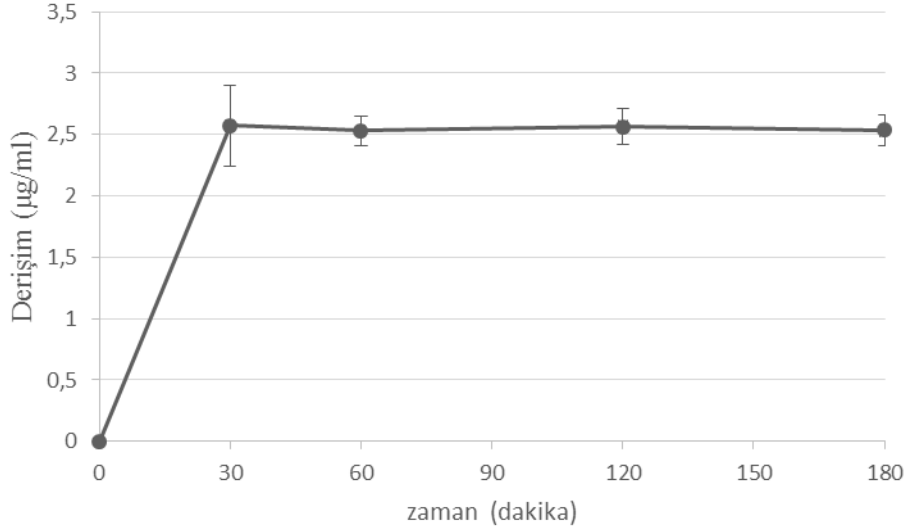
Şekil 4.30 50 mM taurin vve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (2. ay 25°C)



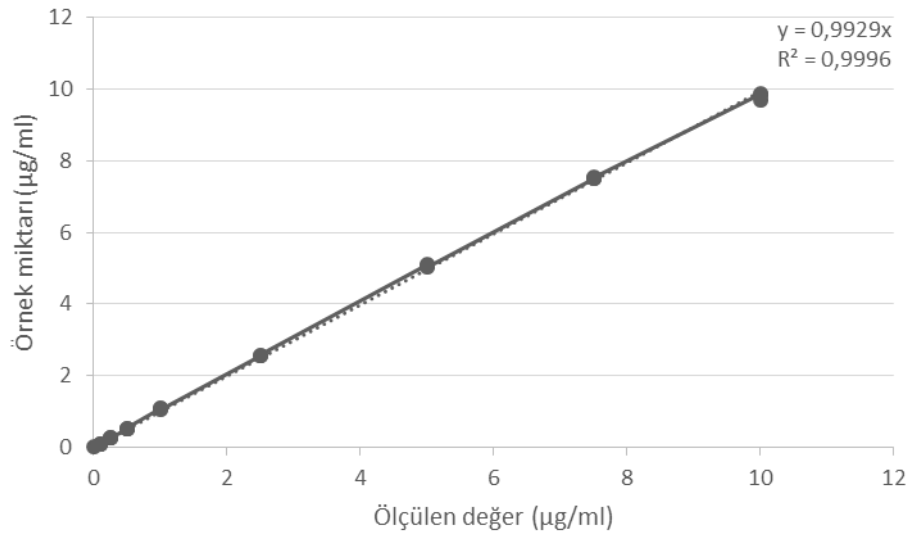
Şekil 4.31 50 mM taurin vve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (2. ay 40°C)



Şekil 4.32 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (4. Ay, 25°C)



Şekil 143 50mM taurin ve %1 Phenostat içeren BS taurin salım grafiği (4. Ay, 40°C)



Şekil 154 Saf taurin ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

BS'nin taurin yüklemesinden sonra 5. dakika sonunda en yüksek değere yaklaştığı ve devam eden 3 saat boyunca beherdeki taurin derişiminin değişmediği görülmektedir. Devam eden aylarda benzer bir profil elde edilmiştir. Taurin derişimleri göz önüne alındığında başlangıç anında, 1. ay ve 4. ay sonunda 2,5 ve 3,0 µg/ml aralığında sabitlendiği görülmektedir. Bu BS'nin 4 ay sonunda dahi salım karakteristiğini ve taurin içeriğini koruduğu anlamına gelmektedir. Kesilen

BS'lerin ağırlıkları LC-MS cihazının taurini doğrusal olarak tespit edebildiği limitler (Şekil 4.34) göz önünde bulundurularak 0,150 g üzerinden değerlendirilmiştir. 50 mM taurin çözeltisi içerisinde bekletilen 0,150 g BS'nin 900-1000 µg taurin içermesi beklenmektedir. 20 ml PBS içerisinde gerçekleştirilen denemelerde taurin konsantrasyonunun 45-50 µg/ml dolaylarında çıkacağı öngörülmüştür. Ancak grafikler incelendiğinde salım profilleri çok düzgün olmasına karşın elde edilen taurin derişimi (2,5-3,5 µg/ml) beklenen değerden düşük çıkmıştır. BS'nin yüksek hidrojen bağı yapabilme kapasitesi olduğu bilinmektedir (Hakeem et al., 2014). Taurinin moleküler yapısı incelendiğinde (Şekil 2.11) oksijenlerin her biri üzerindeki ve azot üzerindeki ortaklanmamış elektronlar ile azot ve hidroksi gruplarındaki hidrojenlerin hidrojen bağı yapabilme kapasitesinin mevcut olduğu görülmektedir (E. Bedir, 2015, yazılı görüşme). Taurin ile BS arasında gerçekleşmiş olabilecek hidrojen bağları taurin salım miktarının beklenenden düşük çıkmasına sebep olmuş olabilir. Sonuç olarak bir yüz maskesinin $30 \pm 3,5$ mg (üretilen son ürünün $90 \pm 4,5$ g olduğu düşünüldüğünde) dolaylarında taurini 5 dakika sonunda salması beklenmektedir. Literatürde yapılan taurinin antioksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalar taurinin 10 µg/ml konsantrasyonda %11, 250 µg/ml konsantrasyonda %25 reaktif oksijen süpürme yeteneğinde olduğunu belirtmektedir (Ripoll et al., 2012). Ayrıca taurinin 1-10 mM gibi düşük konsantrasyonlarda dahi hücreleri toksik hasardan koruduğu *in vitro* olarak da gösterilmiştir (Timbrell et al., 1995). Beş dakika gibi kısa bir zaman diliminde taurinin en yüksek salım değerine ulaşabilmesi yüz maskesinin kısa bir uygulama süresine sahip olacağını göstermektedir. Bu durumun kullanıcı konforu açısından iyi olduğu düşünülmektedir.

Bitmiş Ürün Spesifikasyonları

Sağlık Bakanlığı tarafından Resmi gazetede (Sayı:21899 ve 08.04.1994) yayınlanan ve yine bakanlıkça hazırlanan 2005 “Kozmetik ürünlerde iyi üretim uygulamaları” dokümanına göre kozmetik ürünlerin ve bu ürünlerin üretilmesinde kullanılan hammaddelerin spesifikasyonları ve kalite kontrol yöntemleri belirtilmelidir. Tez kapsamında üretilen BS yüz maskelerinin hammadde spesifikasyonları Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.16 Hammadde spesifikasyonları

Hammadde Adı	Kullanım amacı	Analiz yöntemi	Özellik
Keçiboynuzu	Karbon kaynağı	Fenol sülfürik asit yöntemi ile toplam şeker tayini	%50-55 toplam şeker
Kuru fasulye	Azot kaynağı	Kjeldahl azot tayini	%18-20 toplam protein
Sitrik asit	Tampon	Laboratuvar sınıfı ürün	Laboratuvar sınıfı ürün
Na ₂ HPO ₄	Tampon	Laboratuvar sınıfı ürün	Laboratuvar sınıfı ürün

Son ürüne ait bilgiler ve bitmiş ürün spesifikasyonları Tablo 4.17’de özetlenmiştir.

Tablo 4.17 Bitmiş ürün spesifikasyonları

	Analiz yöntemi	Özellik
Biyoyumluluk	Dolaylı sitotoksosite testi (ISO10993-5)	<i>In vitro</i> denemelerde ürün hayvan hücreleri üzerinde herhangi bir morfolojik değişime ve çoğalma da azalmaya neden olmamaktadır.
Endotoksin	LAL testi	0,6 EU/ml
Mikrobiyal stabilite	Toplam aerobik bakteri, maya küf sayımı (5 ay süreyle)	Herhangi bir mikrobiyal yük yoktur.
Koruyucu etkinliği	Challenge testi <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 Suşlarına karşı koruyucunun etkinliği test edilmiştir	>3 log
Mekanik özellikler	Texture Profile Analysis (TPA) (biyoadezyon ve kesilebilirlik)	Biyoadezyon: 0,070 ($\pm 0,030$) kg kuvvet uygulaması ile 3 ($\pm 0,5$) mm yapışma mesafesi Kesilebilirlik: 0,45($\pm 0,1$) kg kuvvet $\sim 0,5$ sn kesilme süresi
Termal özellik	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	İşlenme ve kullanma sıcaklıklarında (0-125°C) bozunma yoktur
Bağ analizi	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	BS'ye özgü OH, CH, COC CH ₂ bağları bulunmaktadı
Kristalinite	X-Ray Diffraction (XRD)	>% 70 kristalinite
Ambalaj	Paket kapama cihazı	Dokumasız alüminyum katkılı folyolardan oluşan paketler ile yapılan paketleme sonucunda herhangi bir sızıntı veya ürün ile etkileşim yoktur.

5. GENEL SONUÇLAR

Bu tez kapsamında BS'nin ekonomik olarak üretilmesi amacıyla öncelikle alternatif karbon kaynakları (kabuklu elma, kabuksuz elma, elma kabuğu, üzüm ve keçiyoynuzu) ve azot kaynaklarının (nohut ve kuru fasulye) belirlenmesi için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Standart yıkama yönteminin BS üzerinden bakterileri etkin bir şekilde uzaklaştıramadığı görülmüş yıkama yöntemi modifiye edilmiş ve bakteriler uzaklaştırılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda keçiyoynuzu ve kurufasulyenin alternatif hammaddeler olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bu hammaddeler ile besiyeri optimizasyonu yapılabilmesi amacıyla OVAT denemeleri gerçekleştirilmiş ve sekiz farklı parametre için alt ve üst limitler - pH (4,5-6,2), sıcaklık (25-30 °C), yüzey hacim oranı (1-2 l/cm), inkübasyon süresi (4-10 gün), inokulum miktarı (% 5-15 v/v), karbon miktarı (% 1-3 w/v), protein miktarı (% 0,5-2 w/v), tampon miktarı (‰ 0,5-1,5 w/v)- literatür verileri de göz önüne alınarak tespit edilmiştir. Daha sonra bu alt ve üst limitler kullanılarak parametrelerin elenmesi için PBT denemeleri gerçekleştirilmiş ve protein miktarı (%12,23), inokulum miktarı (%9,57), inkübasyon süresi (%63,5) olarak tespit edilmiştir. BS üretimine %85,3 toplam etkisi olan bu üç parametre ile (diğer parametreler ön çalışmalar ve literatür bilgilerine göre sabitlenmiştir) CCD denemeleri gerçekleştirilmiştir. CCD denemelerine göre geliştirilen CHb besiyeri için; inkübasyon süresi 9 gün, inokulum miktarı % 10 v/v ve protein miktarının %2,75 w/v olduğu durumun optimum koşullar olduğu tespit edilmiştir. CCD ile tüm parametreler için çan eğrisi benzeri yapı elde edilmiş ve BS üretiminin tahminlenmesinde kullanılmak üzere ikinci dereceden bir model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelin sınanması için doğrulama deneyleri gerçekleştirilmiş ve %95

güven aralığında modelin BS üretimin tahminlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Besiyeri optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra CHb besiyeri ile yüz maskesi üretim çalışmalarına (metal tepsi kaplarda 30x20xm) geçilmiştir. Yukarıda belirtilen optimum şartlar altında gerçekleştirilen üretimlerin 200g'ın üzerinde ıslak BS üretimi ile sonuçlandığı görülmüştür. Bunun yüz maskesi için uygun bir ağırlık olmayacağı düşünüldüğünden inkübasyon süresi 5-7 gün aralığına çekilerek $90 \pm 4,5$ g ıslak BS/tepsi şeklinde üretimin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Devam eden çalışmalarda bu koşullar yüz maskesi üretimi için kullanılmıştır.

Üretim koşulları sabitlendikten sonra BS yüz maskelerine 50mM taurin ile %1 Phenostat yüklemesi ve ambalajlama çalışmalarına geçilmiştir. Paketlenen ürünler %60 nem ve 25-40 °C saklama koşullarında challenge, mikrobiyal stabilite, salım ve mekanik stabilite testlerine alınmıştır. *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ve *A. brasiliensis*'e karşı yapılan challenge testleri %1 oranında eklenen Phenostat'ın bu mikroorganizmaların inhibisyonunda mevzuat limitlerinden daha yüksek (>3log) başarı sağladığını ortaya koymuştur. 25 °C-%60 nem koşullarında bekletilen başlangıç zamanından başlayarak her ay yapılan testlerde üründe herhangi bir mikrobiyal gelişme olmadığı ve 5 aylık bir dönem için son ürünün mikrobiyal olarak stabil kaldığı gösterilmiştir. Taurin ve koruyucu içeren/içermeyen BS yüz maskeleri ile yapılan mekanik testler (biyoadezyon, kesilebilirlik) CHb besiyeri ile üretilen BS örneklerinin HS besiyeri ile üretilen örneklerle benzer veya daha iyi özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. Yapılan DSC analizleri BS yüz maskelerine eklenen taurin ve koruyucunun DSC grafiklerindeki bozunma piklerini daha ötelediğini göstermiştir. Bu durum da eklenen bu maddelerin sadece mikrobiyolojik ve oksidatif strese karşı değil, materyalde

öz nmeleri sonucunda termal bozunmaya karşı da olumlu katkı yaptıkları sonucunu ortaya koymaktadır. Paketli ürünlere yapılan salım stabilitesi çalışmaları 4 aylık bir süreçte BS yüz maskelerinin salım profillerini ve saldıkları taurin miktarlarını koruduklarını göstermiştir. BS yüz maskelerinden taurin salımı beklenenden az gerçekleşmiştir (~30 mg taurin/yüz maskesi). Bunun nedeni yüksek hidrojen bağı yapabilme kapasitesine sahip taurin ve BS'nin birbirleri ile yaptıkları bağlanmalar olabilir. Salım sonuçları belirtilen taurin miktarının 5 dakika gibi kısa bir sürede salınabildiğini göstermektedir. Bu kullanıcı için önemli bir kolaylık sağlayacaktır. Sonuç olarak üretilen “Bakteriyel selülozdan üretilen doğal yüz maskesi”nin mikrobiyal, mekanik ve salım profillerinin yüz maskesi olarak kullanılabilmek için uygun olduğu, BS yüz maskelerinin nemlendirme ve taurin aracılığıyla da antioksidan özellikleri için kullanılabileceği gösterilmiştir.

6. ÖNERİLER

BS sahip olduğu eşsiz özellikleri ile biyomedikal, tıp, doku mühendisliği gibi yüksek katma değerli sektörlerde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu tez kapsamında üretilen ürünün mevcut hali ile ya da farklı etken maddeler ile fonksiyonelleştirilerek doku mühendisliğinde iskele olarak kullanım potansiyeline bakılabilir. Ayrıca farklı taurin ve koruyucu içermeyen saf BS tabakası farklı antioksidan ve antiaging özellikte bileşenler ile yüklenerek ürün çeşitliliği genişletilebilir. CHb besiyeri oluşturulmasında santrifügasyon basamağı yerine kaba filtrasyon ve sedimentasyon işlemleri tercih edilirse üretim yönteminin endüstriyel boyuta aktarılması daha kolay olabilir. BS'nin mevcut paketleme yönteminde paket içerisinde düzgün şekilde kalamadığı görülmüştür. Farklı bir tabakanın üzerine katlanarak paketleme yapılabilir ve paket açıldığında şeklin sabit kalması sağlanabilir. Üretilen BS yüz maskeleri dikdörtgen şekillidir. Göz, ağız ve burun için uygun boşlukların sağlanabileceği bir BS kesme cihazı geliştirilerek ürünün daha kullanışlı hale getirilmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K.E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., and Bal-Price, A.,** 2011, Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects—2010, *Archives of toxicology*, 85(5), 367-485pp.
- Al-Dabbas, M.M., Al-Ismail, K., Taleb, R.A., and Ibrahim, S.,** 2010, Acid-base buffering properties of five legumes and selected food in vitro, *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 5(2) 154-160pp.
- Andersen, J.M.,** 2015, <http://www.Statease.Com/news/faqalert6-07.Html>, (Erişim Tarihi: 13 Temmuz 2015).
- Antony, J.** 2014. Design of experiments for engineers and scientists: *Elsevier*, 190p.
- Arockiasamy, S., and Banik, R.M.,** 2008, Optimization of gellan gum production by *sphingomonas paucimobilis* atcc 31461 with nonionic surfactants using central composite design, *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(3), 204-210pp.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., and Kefalas, P.,** 2005, Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89(1), 27-36pp.
- Aykroyd, W.R., Doughty, J., and Walker, A.F.** 1982, *Legumes in human nutrition* (Vol. 20): Food & Agriculture Org, 152p.
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B.R., Risberg, B., and Gatenholm, P.,** 2006, Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells, *Biomaterials*, 27(9), 2141-2149pp.
- Barud, H., Ribeiro, C., Crespi, M.S., Martines, M., Dexpert-Ghys, J., Marques, R.F., Messaddeq, Y., and Ribeiro, S.,** 2007, Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 87(3), 815-818pp.
- Becton-Dickinson.** 2015, <https://www.Bd.Com/resource.aspx?Idx=9364>, (Erişim tarihi: 19 Temmuz 2015).
- Bernardo, E., Neilan, B., and Couperwhite, I.,** 1998, Characterization, differentiation and identification of wild-type cellulose-synthesizing acetobacter strains involved in nata de coco production, *Systematic and applied microbiology*, 21(4), 599-608pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., and Escalera, L.A.,** 2008, Response surface methodology (rsm) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76(5), 965-977pp.
- Bickers, D.R., and Athar, M.,** 2006, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2565-2575pp.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., and Kalinowska, H.,** 2005a, Bacterial cellulose, *Biopolymers online*, 37-53pp
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., and Kalinowska, H.** 2005b, Bacterial cellulose *Biopolymers online*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 37-53pp
- Blechova, R., and Pivodova, D.,** 2001, Limulus amoebocyte lysate (lal) test-an alternative method for detection of bacterial endotoxins, *Acta Veterinaria Brno*, 70(3), 291-296pp.
- Box, G.E., Hunter, W.G., and Hunter, J.S.,** 1978, Statistics for experimenters, 639p.
- Bravo, L., and Saura-Calixto, F.,** 1994, Composition and potential uses of mesquite pods (prosopis pallida l): Comparison with carob pods (ceratonia siliqua l), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(3), 303-306pp.
- Brown Jr, R.M., Czaja, W., Jeschke, M., and Young, D.J.** 2015, Multiribbon nanocellulose as a matrix for wound healing: Google Patents.
- Cai, Z., and Kim, J.,** 2010, Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: Characterization and first evaluation of biocompatibility, *Cellulose*, 17(1), 83-91pp.
- Carley, K.M., Kamneva, N.Y., and Reminga, J.** 2004, Response surface methodology:DTIC Document, <http://oai.dtic.mil> (Erişim tarihi 23.072015).
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I., and Gañán, P.,** 2011, Structural characterization of bacterial cellulose produced by gluconacetobacter swingsii sp. From colombian agroindustrial wastes, *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96-102pp.
- Chang, W.-S., and Chen, H.-H.,** 2014, Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings, *Food Hydrocolloids*, 1-9pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., and Shoda, M.,** 2000, Bacterial cellulose production by acetobacter xylinum in a 50-l internal-loop airlift reactor, *Biotechnology and bioengineering*, 68(3), 345-352pp.
- Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A., and Singhal, R.S.,** 2009, Microbial cellulose: Fermentative production and applications, *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107-124pp.
- Chen, L., Hong, F., Yang, X.-X., and Han, S.-F.,** 2013, Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism, *Bioresource technology*, 135, 464-468pp.
- Chen, X.-C., Pan, Z.-L., Liu, D.-S., and Han, X.** 1998, Effect of taurine on human fetal neuron cells: Proliferation and differentiation *Taurine* Springer, 3, . 397-403pp.
- Cheng, K.-C., Catchmark, J.M., and Demirci, A.,** 2011, Effects of cmc addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis, *Biomacromolecules*, 12(3), 730-736pp.
- Chiaoprakobkij, N., Sanchavanakit, N., Subbalekha, K., Pavasant, P., and Phisalaphong, M.,** 2011, Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts, *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 548-553pp.
- Choi, Y.J., Ahn, Y., Kang, M.S., Jun, H.K., Kim, I.S., and Moon, S.H.,** 2004, Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(1), 79-84pp.
- Conda.** 2015, <http://www.Condalab.Com/pdf/1382.Pdf>, (Erişim tarihi 17: Temmuz 2015).
- Çoban, E.P., and Biyik, H.,** 2013, Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by acetobacter lovaniensis hbb5, *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5346-5354pp.
- De Almeida Costa, G.E., Da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S.M., and De Oliveira, A.C.,** 2006, Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes, *Food Chemistry*, 94(3), 327-330pp.
- Değim, Z., Celebi, N., Sayan, H., Babül, A., Erdoğan, D., and Take, G.,** 2002, An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation, *Amino acids*, 22(2), 187-198pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Devamanoharan, P., Ali, A., and Varma, S.**, 1997, Prevention of lens protein glycation by taurine, *Molecular and cellular biochemistry*, 177(1-2), 245-250pp.
- Draelos, Z.K.**, 1995, Cosmetics: An overview, *Current Problems in Dermatology*, 7(2), 45-64pp.
- Draper, N.R., and Lin, D.K.J.** 1988, *Using plackett and burman designs with fewer than n-1 factors*: University of Wisconsin, Department of Statistics, 22p.
- Embuscado, M.E., Marks, J.S., and Bemiller, J.N.**, 1994, Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by acetobacter xylinum, *Food Hydrocolloids*, 8(5), 407-418pp.
- Evans, B.R., O'Neill, H.M., Malyvanh, V.P., Lee, I., and Woodward, J.**, 2003, Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 18(7), 917-923pp.
- Fang, B., Wan, Y.-Z., Tang, T.-T., Gao, C., and Dai, K.-R.**, 2009, Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposite scaffolds, *Tissue Engineering Part A*, 15(5), 1091-1098pp.
- Finaud, J., Lac, G., and Filaire, E.**, 2006, Oxidative stress, *Sports medicine*, 36(4), 327-358pp.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T., Nomizo, A., Gerlach, R.F., and Fonseca, M.J.V.**, 2010, Protective effect of calendula officinalis extract against uvb-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *Journal of ethnopharmacology*, 127(3), 596-601pp.
- Fontana, J., De Souza, A., Fontana, C., Torriani, I., Moreschi, J., Gallotti, B., De Souza, S., Narcisco, G., Bichara, J., and Farah, L.**, 1990, Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(1), 253-264pp.
- Fu, L., Zhang, J., and Yang, G.**, 2013, Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair, *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1432-1442pp.
- Gayathry, G., and Gopalaswamy, G.**, 2014, Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from acetobacter xylinum, *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 39, 93-96pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gilchrest, B.A.**, 1989, Skin aging and photoaging: An overview, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 21(3), 610-613pp.
- Goebel, C., Aeby, P., Ade, N., Alépée, N., Aptula, A., Araki, D., Dufour, E., Gilmour, N., Hibatallah, J., and Keller, D.**, 2012, Guiding principles for the implementation of non-animal safety assessment approaches for cosmetics: Skin sensitisation, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(1), 40-52pp.
- Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., and Bhat, R.**, 2012, Fermentation of black tea broth (kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose, *International Food Research Journal*, 19(1), 109-117pp.
- Gokce H, E., Korkmaz, E., Deller, E., Sandri, G., Bonferoni, M.C., and Ozer, O.**, 2012, Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: Evaluation of antioxidant potential for dermal applications, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1841-1850pp.
- Gokce Homan, E., Korkmaz, E., Tuncay-Tanriverdi, S., Deller, E., Sandri, G., Bonferoni, M.C., and Ozer, O.**, 2012, A comparative evaluation of coenzyme q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5109-5117pp.
- Grande, C.J., Torres, F.G., Gomez, C.M., and Bañó, M.C.**, 2009, Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, 5(5), 1605-1615pp.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo, Y.**, 2001, Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, *Human reproduction update*, 7(2), 175-189pp.
- Gutierrez, J., Tercjak, A., Algar, I., Retegi, A., and Mondragon, I.**, 2012, Conductive properties of tio 2/bacterial cellulose hybrid fibres, *Journal of colloid and interface science*, 377(1), 88-93pp.
- Hakeem, K.R., Jawaid, M., and Rashid, U.**, 2014, Biomass and bioenergy, 24p.
- Halib, N., Amin, M., and Ahmad, I.**, 2012, Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose, *Sains Malaysiana*, 41(2), 205-211pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hameş-Kocabaş, E.E., Bilgi, E., Bayır, E., and Şendemir-Ürkmez, A.,** 2013, Hammadde olarak keçiyoynuzu ve kuru fasulye kullanılarak bakteriyel selüloz üretim yöntemi, patent number; 2013/08604, *Türk Patent Enstitüsü*.
- Hestrin, S., and Schramm, M.,** 1954, Synthesis of cellulose by acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochemical Journal*, 58(2), 345-352pp.
- Himedia.** 2015, <http://himedialabs.Com/td/m024.Pdf>, (Erişim tarihi: 18 Temmuz 2015) .
- Hong, F., and Qiu, K.,** 2008, An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain acetobacter aceti subsp. Xylinus atcc 23770, *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545-549pp.
- Hong, L., Wang, Y., Jia, S., Huang, Y., Gao, C., and Wan, Y.,** 2006, Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route, *Materials Letters*, 60(13), 1710-1713pp.
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A.M., and Schmauder, H.P.,** 2006, Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (part 1), *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537-545pp.
- Hornung, M., Ludwig, M., and Schmauder, H.,** 2007, Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (part 3), *Engineering in Life Sciences*, 7(1), 35-41pp.
- Hutchens, S.A., Leon, R., O'Neill, H.M., and Evans, B.R.,** 2007, Statistical analysis of optimal culture conditions for gluconacetobacter hansenii cellulose production, *Letters in applied microbiology*, 44(2), 175-180pp.
- Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., and Kim, Y.S.,** 1999, Effects of ph and dissolved oxygen on cellulose production by acetobacter xylinum brc5 in agitated culture, *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(2), 183-188pp.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., and Budhiono, A.,** 2000, Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts, *Journal of Materials Science*, 35(2), 261-270pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S., Raju, P., and Bawa, A.,** 2008, The effect of ph, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (nata-de-coco) by acetobacter xylinum, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2593-2599pp.
- Jeong, S.I., Lee, S.E., Yang, H., Jin, Y.-H., Park, C.-S., and Park, Y.S.,** 2010, Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals, *Molecular & Cellular Toxicology*, 6(4), 370-377pp.
- Jonas, R., and Farah, L.F.,** 1998, Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 101-106pp.
- Jonas, R., and Farah, L.F.,** 1998, Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 101-106pp.
- Kansal, H., Singh, S., and Kumar, P.,** 2005, Parametric optimization of powder mixed electrical discharge machining by response surface methodology, *Journal of Materials Processing Technology*, 169(3), 427-436pp.
- Kennedy, M., and Krouse, D.,** 1999, Strategies for improving fermentation medium performance: A review, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 456-475pp.
- Keshk, S.,** 2014, Bacterial cellulose production and its industrial applications, *J. Bioproc. Biotechniq*, 4, 150-159pp.
- Keshk, S., and Sameshima, K.,** 2005, Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production, *African Journal of Biotechnology*, 4(6), 478-482pp.
- Ketchum, P.A., and Novitsky, T.J.** 2000, Assay of endotoxin by limulus amebocyte lysate, *Septic shock methods and protocols: Springer*, 3-12pp.
- Khan, T., Park, J.K., and Kwon, J.-H.,** 2007, Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(5), 816-826pp.
- Khlifa, M., Bahloul, A., and Kitane, S.,** 2013, Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L) and its morphological study, *J. Mater. Environ. Sci.*, 4 ((3)), 348-353pp.
- Khuri, A.I., and Mukhopadhyay, S.,** 2010, Response surface methodology, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, J., Cai, Z., and Chen, Y.**, 2010, Biocompatible bacterial cellulose composites for biomedical application, *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 1(1), 864-878pp.
- Kjeldahl, J.**, 1883, Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 22(1), 366-382pp.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., and Bohn, A.**, 2005, Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358-3393pp.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., and Wagenknecht, W.** 2004, *General considerations on structure and reactivity of cellulose: Section 2.1–2.1. 4: Wiley Online Library*, 9-29pp.
- Klemm, D., Schmauder, H.P., and Heinze, T.**, 2005, Cellulose, *Biopolymers online*.
- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.-P., and Marsch, S.** 2006, Nanocelluloses as innovative polymers in research and application *Polysaccharides ii: Springer*, 49-96pp.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., and Marsch, S.**, 2001a, Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery, *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603pp.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., and Marsch, S.**, 2001b, Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery, *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603pp.
- Kojima, Y., Seto, A., Tonouchi, N., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F.**, 1997, High rate production in static culture of bacterial cellulose from sucrose by a newly isolated acetobacter strain, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(9), 1585-1586pp.
- Kokabi, M., Sirousazar, M., and Hassan, Z.M.**, 2007, Pva–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing, *European Polymer Journal*, 43(3), 773-781pp.
- Kolpak, F.J., Weih, M., and Blackwell, J.**, 1978, Mercerization of cellulose: 1. Determination of the structure of mercerized cotton, *Polymer*, 19(2), 123-131pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kouda, T., Yano, H., and Yoshinaga, F.**, 1997, Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4), 371-376pp.
- Kroon-Batenburg, L., Bouma, B., and Kroon, J.**, 1996, Stability of cellulose structures studied by md simulations. Could mercerized cellulose ii be parallel?, *Macromolecules*, 29(17), 5695-5699pp.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., and Bielecki, S.**, 2002, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189-195pp.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., and Bras, J.**, 2012, Microfibrillated cellulose – its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review, *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 735-764pp.
- Levin, J., Poore, T.E., Zauber, N.P., and Oser, R.S.**, 1970, Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria, *New England Journal of Medicine*, 283(24), 1313-1316pp.
- Li, X., Chen, S., Hu, W., Shi, S., Shen, W., Zhang, X., and Wang, H.**, 2009, In situ synthesis of cds nanoparticles on bacterial cellulose nanofibers, *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 509-512pp.
- Liebner, F., Haimer, E., Wendland, M., Neouze, M.A., Schlufte, K., Miethe, P., Heinze, T., Potthast, A., and Rosenau, T.**, 2010, Aerogels from unaltered bacterial cellulose: Application of scco2 drying for the preparation of shaped, ultra-lightweight cellulosic aerogels, *Macromolecular bioscience*, 10(4), 349-352pp.
- Lin, D.K., and Draper, N.R.**, 1992, Projection properties of plackett and burman designs, *Technometrics*, 34(4), 423-428pp.
- Lin, S.-P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.-R., Demirci, A., and Cheng, K.-C.**, 2013, Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose, *Cellulose*, 20(5), 2191-2219pp.
- Lin, S.-Y., Chen, K.-S., and Run-Chu, L.**, 2001, Design and evaluation of drug-loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling properties, *Biomaterials*, 22(22), 2999-3004pp.
- Liu, C., Yang, D., Wang, Y., Shi, J., and Jiang, Z.**, 2012, Fabrication of antimicrobial bacterial cellulose–ag/agcl nanocomposite using bacteria as versatile biofactory, *Journal of Nanoparticle Research*, 14(8), 1-12pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, G., He, F., Li, X., Wang, S., Li, L., Zuo, G., Huang, Y., and Wan, Y.**, 2011, Three-dimensional cuprous oxide microtube lattices with high catalytic activity templated by bacterial cellulose nanofibers, *Journal of Materials Chemistry*, 21(29), 10637-10640pp.
- Lopez, M., and Makhatadze, G.** 2002, Differential scanning calorimetry. In H. Vogel (Ed.), *Calcium-binding protein protocols: Volume 2: Methods and techniques*, Springer, 113-119pp
- Mandenius, C.F., and Brundin, A.**, 2008, Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology, *Biotechnology progress*, 24(6), 1191-1203pp.
- Masaoka, S., Ohe, T., and Sakota, N.**, 1993, Production of cellulose from glucose by acetobacter xylinum, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18-22pp.
- Mason, R.L., Gunst, R.F., and Hess, J.L.** 2003, *Statistical design and analysis of experiments: With applications to engineering and science* Vol. 474: John Wiley & Sons.
- Mcnamara, J.T., Morgan, J.L., and Zimmer, J.**, 2015, A molecular description of cellulose biosynthesis, *Annual Review of Biochemistry*, 84(1) 895-921pp.
- Miller, A., and Sitter, R.**, 2001, Using the folded-over 12-run plackett—burman design to consider interactions, *Technometrics*, 43(1), 44-55pp.
- Montagna, W.**, 1967, Comparative anatomy and physiology of the skin, *Archives of dermatology*, 96(4), 357-363pp.
- Montgomery, D. C.** 2008. Design and analysis of experiments. *John Wiley & Sons*, 350p.
- Moosavi-Nasab, M., and Yousefi, A.**, 2011, Biotechnological production of cellulose by gluconacetobacter xylinus from agricultural waste, *Iran J Biotechnol*, 9(2), 94-101pp.
- Moran-Mirabal, J.M., and Cranston, E.D.**, 2015, Cellulose nanotechnology on the rise, *Industrial Biotechnology*, 11(1), 14-15pp.
- Müller, F.A., Müller, L., Hofmann, I., Greil, P., Wenzel, M.M., and Staudenmaier, R.**, 2006, Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 27(21), 3955-3963 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Myers, R.H., Montgomery, D.C., and Anderson-Cook, C.M.** 2009, *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* : John Wiley & Sons, 677p.
- Nagata, Y., and Chu, K.H.**, 2003, Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms, *Biotechnology letters*, 25(21), 1837-1842pp.
- Nakagaito, A., Iwamoto, S., and Yano, H.**, 2005, Bacterial cellulose: The ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites, *Applied Physics A*, 80(1), 93-97pp.
- Nakai, T., Nishiyama, Y., Kuga, S., Sugano, Y., and Shoda, M.**, 2002, Orf2 gene involves in the construction of high-order structure of bacterial cellulose, *Biochemical and biophysical research communications*, 295(2), 458-462pp.
- Neogen.** 2015a, http://www.Neogen.Com/acumedia/pdf/prodinfo/7105_pi.Pdf, (Erişim tarihi: 19 Temmuz 2015).
- Neogen.** 2015b, http://www.Neogen.Com/acumedia/pdf/prodinfo/7306_pi.Pdf, (Erişim tarihi: 19 Temmuz 2015).
- Nguyen, V.T., Flanagan, B., Gidley, M.J., and Dykes, G.A.**, 2008, Characterization of cellulose production by a gluconacetobacter xylinus strain from kombucha, *Current microbiology*, 57(5), 449-453pp.
- Nguyen, V.T., Flanagan, B., Mikkelsen, D., Ramirez, S., Rivas, L., Gidley, M.J., and Dykes, G.A.**, 2010, Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a gluconacetobacter xylinus strain from kombucha, *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 337-343pp.
- Nielsen, S.S.** 2010, Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates *Food analysis laboratory manual*: Springer, 47-53pp.
- Nishiyama, Y., Langan, P., and Chanzy, H.**, 2002, Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose i β from synchrotron x-ray and neutron fiber diffraction, *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), 9074-9082pp.
- Nogi, M., and Yano, H.**, 2008, Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation in the electronics device industry, *Advanced Materials*, 20(10), 1849-1852pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Noordin, M.Y., Venkatesh, V.C., Sharif, S., Elting, S., and Abdullah, A.,** 2004, Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning aisi 1045 steel, *Journal of Materials Processing Technology*, 145(1), 46-58pp.
- Noro, N., Sugano, Y., and Shoda, M.,** 2004, Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by acetobacter xylinum, *Applied microbiology and biotechnology*, 64(2), 199-205pp.
- O'sullivan, A.C.,** 1997, Cellulose: The structure slowly unravels, *Cellulose*, 4(3), 173-207pp.
- Oikawa, T., Ohtori, T., and Ameyama, M.,** 1995, Production of cellulose from d-mannitol by acetobacter xylinum ku-1, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(2), 331-332pp.
- Okiyama, A., Motoki, M., and Yamanaka, S.,** 1993, Bacterial cellulose iv. Application to processed foods, *Food Hydrocolloids*, 6(6), 503-511pp.
- Özer, Ö.,** 2009a, Bilimden pratiğe kozmesötikler, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 28, 175-177pp.
- Özer, Ö.,** 2009b, Yüz bakımında kullanılan yaşlanma karşıtı kozmesötikler, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 29, 40-43pp.
- Park, J.K., Jung, J.Y., and Park, Y.H.,** 2003, Cellulose production by gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol, *Biotechnology letters*, 25(24), 2055-2059pp.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., and Johnson, D.K.,** 2010, Research cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnol Biofuels*, 3(10) 10p.
- Pauwels, M., and Rogiers, V.,** 2010, Human health safety evaluation of cosmetics in the eu: A legally imposed challenge to science, *Toxicology and applied pharmacology*, 243(2), 260-274pp.
- Pértile, R.A., Moreira, S., Gil Da Costa, R.M., Correia, A., Guãrdao, L., Gartner, F., Vilanova, M., and Gama, M.,** 2012, Bacterial cellulose: Long-term biocompatibility studies, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(10), 1339-1354pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Petersen, N., and Gatenholm, P.**, 2011, Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives, *Applied microbiology and biotechnology*, 91(5), 1277-1286pp.
- Plackett, R.L., and Burman, J.P.**, 1946, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 305-325pp.
- Pourramezan, G., Roayaei, A., and Qezelbash, Q.**, 2009, Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by acetobacter sp. 4b-2, *Biotechnology*, 8(1), 150-154pp.
- Quinlan, G.J., Lamb, N.J., Tilley, R., Evans, T.W., and Gutteridge, J.**, 1997, Plasma hypoxanthine levels in ards: Implications for oxidative stress, morbidity, and mortality, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 155(2), 479-484pp.
- R. Malcolm Brown, J.**, 1989, Cellulose: Structural and functional aspects, *Ellis Horwood Limited*, 145-151pp.
- Ramana, K., Tomar, A., and Singh, L.**, 2000, Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by acetobacter xylinum, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 245-248pp.
- Rani, M.U., and Appaiah, A.**, 2011, Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from gluconacetobacter hansenii uac09, *Annals of microbiology*, 61(4), 781-787pp.
- Ripoll, C., Coussaert, A., Waldenberger, F.R., Vischer, C., Ginouvès, A., David McGahie, B., and Gatto, H.**, 2012, Evaluation of natural substances' protective effects against oxidative stress in a newly developed canine endothelial cell-based assay and in cell-free radical scavenging assays, *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10(2), 113-124pp.
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R., and Van Der Mei, H.C.**, 2006, Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria, *Process Biochemistry*, 41(1), 1-10pp.
- Roman, M., and Winter, W.T.**, 2004, Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose, *Biomacromolecules*, 5(5), 1671-1677pp.
- Ruka, D.R., Simon, G.P., and Dean, K.M.**, 2012, Altering the growth conditions of gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 613-622pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Russell, A.**, 2003, Challenge testing: Principles and practice, *International journal of cosmetic science*, 25(3), 147-153pp.
- Salihu, A., Alam, M.Z., Abdulkarim, M.I., and Salleh, H.M.**, 2011, Optimization of lipase production by candida cylindracea in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(1), 66-73pp.
- Sani, A., and Dahman, Y.**, 2010, Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(2), 151-164pp.
- Schumann, D.A., Wippermann, J., Klemm, D.O., Kramer, F., Koth, D., Kosmehl, H., Wahlers, T., and Salehi-Gelani, S.**, 2009, Artificial vascular implants from bacterial cellulose: Preliminary results of small arterial substitutes, *Cellulose*, 16(5), 877-885pp.
- Semple, T.U., Quinn, L.A., Woods, L.K., and Moore, G.E.**, 1978, Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model, *Cancer research*, 38(5), 1345-1355pp.
- Shah, J., and Brown Jr, R.M.**, 2005, Towards electronic paper displays made from microbial cellulose, *Applied microbiology and biotechnology*, 66(4), 352-355pp.
- Shigematsu, T., Takamine, K., Kitazato, M., Morita, T., Naritomi, T., Morimura, S., and Kida, K.**, 2005, Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutant of gluconacetobacter xylinus and its use for bioconversion of sweet potato pulp, *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 415-422pp.
- Shimelis, E.A., Meaza, M., and Rakshit, S.**, 2006, Physico-chemical properties, pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (phaseolus vulgaris l.) varieties grown in east africa, 19pp.
- Shoda, M., and Sugano, Y.**, 2005, Recent advances in bacterial cellulose production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 1-8pp.
- Sigma-Aldrich.** 2015, <https://www.Sigmaaldrich.Com/content/dam/sigmaaldrich/docs/fluka/datasheet/22091dat.Pdf>, (Erişim tarihi: 19 Temmuz 2015).
- Simon, I., Glasser, L., Scheraga, H.A., and Manley, R.J.**, 1988, Structure of cellulose. 2. Low-energy crystalline arrangements, *Macromolecules*, 21(4), 990-998pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smole, M.S., Hribernik, S., Kleinschek, K.S., and Kreže, T.**, 2013, Plant fibres for textile and technical applications, *Advances in Agrophysical Research*, 10, 52372.
- Son, H.-J., Kim, H.-G., Kim, K.-K., Kim, H.-S., Kim, Y.-G., and Lee, S.-J.**, 2003, Increased production of bacterial cellulose by acetobacter sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions, *Bioresource technology*, 86(3), 215-219pp.
- Spink, C.H.** 2008, Differential scanning calorimetry. In J. C. Dr. John and Dr. H. William Detrich, III (Eds.), *Methods in cell biology*: Academic Press 84(1) 115-141pp.
- Srinivas, M., Chand, N., and Lonsane, B.**, 1994, Use of plackett-burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by aspergillus niger mrss 234 in solid state fermentation system, *Bioprocess Engineering*, 10(3), 139-144pp.
- Stern, R., and Maibach, H.I.**, 2008, Hyaluronan in skin: Aspects of aging and its pharmacologic modulation, *Clinics in dermatology*, 26(2), 106-122pp.
- Sun, J.**, 2004, Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse, *Polymer Degradation and Stability*, 84(2), 331-339pp.
- Sunagawa, N., Fujiwara, T., Yoda, T., Kawano, S., Satoh, Y., Yao, M., Tajima, K., and Dairi, T.**, 2013, Cellulose complementing factor (ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in acetobacter xylinum, *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(6), 607-612pp.
- Timbrell, J.A., Seabra, V., and Waterfield, C.J.**, 1995, The in vivo and in vitro protective properties of taurine, *General Pharmacology: The Vascular System*, 26(3), 453-462pp.
- Tokoh, C., Takabe, K., Fujita, M., and Saiki, H.**, 1998, Cellulose synthesized by acetobacter xylinum in the presence of acetyl glucomannan, *Cellulose*, 5(4), 249-261pp.
- Trovatti, E., Serafim, L.S., Freire, C.S., Silvestre, A.J., and Neto, C.P.**, 2011, Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory, *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1417-1420pp.
- Tur, E.**, 1997, Physiology of the skin—differences between women and men, *Clinics in dermatology*, 15(1), 5-16pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ulevitch, R.J., and Tobias, P.S.**, 1999, Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system, *Current Opinion in Immunology*, 11(1), 19-22pp.
- Ulman, A.** 2013, *An introduction to ultrathin organic films: From langmuir--blodgett to self--assembly*: Academic press, 433p.
- Valla, S., and Kjosbakken, J.**, 1982, Cellulose-negative mutants of acetobacter xylinum, *Journal of General Microbiology*, 128(7), 1401-1408pp.
- Vandamme, E., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., and De Wulf, P.**, 1998, Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 93-99pp.
- Verschuren, P.G., Cardona, T.D., Nout, M.R., De Gooijer, K.D., and Van Den Heuvel, J.C.**, 2000, Location and limitation of cellulose production by acetobacter xylinum established from oxygen profiles, *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(5), 414-419pp.
- Vitta, S., and Thiruvengadam, V.**, 2012, Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites, *Current Science(Bangalore)*, 102(10), 1398-1405pp.
- Wahid, Z., and Nadir, N.**, 2013, Improvement of one factor at a time through design of experiments, *World Applied Science Journal (Mathematical Applications in Engineering)*, 21, 56-61pp.
- Wan, Y., Hong, L., Jia, S., Huang, Y., Zhu, Y., Wang, Y., and Jiang, H.**, 2006, Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 66(11), 1825-1832pp.
- Wang, J., and Wan, W.**, 2009, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *International journal of hydrogen energy*, 34(1), 235-244pp.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., and Yoshinaga, F.**, 1998, Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose*, 5(3), 187-200pp.
- Watanabe, K., and Yamanaka, S.**, 1995, Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(1), 65-68pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wei, B., Yang, G., and Hong, F.,** 2011, Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 533-538pp.
- White, A., and Fishman, J.B.,** 1936, The formation of taurine by the decarboxylation of cysteic acid, *Journal of Biological Chemistry*, 116(2), 457-461pp.
- White, D.G., and Brown Jr, R.M.,** 1989, Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose, *Cellulose and wood-chemistry and technology*. Wiley, New York, 573p.
- Williams, L.J., and Abdi, H.,** 2010, Fisher's least significant difference (lsd) test, *Encyclopedia of research design*, 1-5pp.
- Williams, W.S., and Cannon, R.E.,** 1989, Alternative environmental roles for cellulose produced by acetobacter xylinum, *Applied and environmental microbiology*, 55(10), 2448-2452pp.
- Wong, H.C., Fear, A.L., Calhoon, R.D., Eichinger, G.H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D.H., Meade, J.H., and Emerick, A.W.,** 1990, Genetic organization of the cellulose synthase operon in acetobacter xylinum, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 8130-8134pp.
- Wu, S.-C., and Lia, Y.-K.,** 2008, Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54(3-4), 103-108pp.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., and Uryu, M.,** 1989, The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141-3145pp.
- Yang, G., Xie, J., Deng, Y., Bian, Y., and Hong, F.,** 2012, Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/agnps composite: A "green" route for antibacterial application, *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2482-2487pp.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., and Zheng, C.,** 2007, Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis, *Fuel*, 86(12), 1781-1788pp.
- Yang, J., Yu, J., Fan, J., Sun, D., Tang, W., and Yang, X.,** 2011, Biotemplated preparation of cds nanoparticles/bacterial cellulose hybrid nanofibers for photocatalysis application, *Journal of Hazardous Materials*, 189(1-2), 377-383pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Y.K., Park, S.H., Hwang, J.W., Pyun, Y.R., and Kim, Y.S.,** 1998, Cellulose production by acetobacter xylinum brc5 under agitated condition, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 312-317pp.
- Yatsyshyn, V.Y., Fedorovych, D.V., and Sibirny, A.A.,** 2010, Medium optimization for production of flavin mononucleotide by the recombinant strain of the yeast candida famata using statistical designs, *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 52-60pp.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., and Watanabe, K.,** 1997, Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2), 219-224pp.
- Yoshino, T., Asakura, T., and Toda, K.,** 1996, Cellulose production by acetobacter pasteurianus on silicone membrane, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(1), 32-36pp.
- Yosipovitch, G., Devore, A., and Dawn, A.,** 2007, Obesity and the skin: Skin physiology and skin manifestations of obesity, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(6), 901-916pp.
- Zeng, X., Small, D.P., and Wan, W.,** 2011, Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by acetobacter xylinum bpr 2001 from maple syrup, *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506-513pp.
- Zhao, Y., Zhang, Y., Lindstrom, M.E., and Li, J.,** 2015, Tunicate cellulose nanocrystals: Preparation, neat films and nanocomposite films with glucomannans, *Carbohydr Polym*, 117, 286-296pp.
- Zhijiang, C., Chengwei, H., and Guang, Y.,** 2012, Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation, *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1073-1080pp.
- Zhou, L., Sun, D., Hu, L., Li, Y., and Yang, J.,** 2007, Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by acetobacter xylinum, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(7), 483-489pp.

ÖZGEÇMİŞ

EYÜP BİLGİ

Doğum Tarihi: 22.07.1989

Biyomühendis

E-Posta: bilgieyup@gmail.com

Gsm: (554) 424 22 55

Eğitim

- **Eylül, 2008 – Haziran, 2012 Lisans;** Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova/İzmir (Mezuniyet Not Ortalaması: 3,09)

Deneyimler

- 2014-2015 Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Araştırma Görevlisi
- 2011 - Zentiva Sağlık Ürünleri Sanayi ve Tic. A.Ş. Geliştirme Departmanı (Zorunlu yaz stajı)

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- E. Bayir, **E. Bilgi**, A. Sendemir-Urkmez, E. E. Hames-Kocabas (2015), “The effects of different intensities, frequencies and exposure times of extremely low-frequency electromagnetic fields on the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157: H7”, *Electromagnetic Biology and Medicine* 34 (1):14-18.

Uluslararası kitap bölümü

- E. Bayir, **E. Bilgi**, A. Sendemir-Urkmez (2014), “Implementation of Nanoparticles in Cancer Therapy”, Handbook of Research on Nanoscience, Nanotechnology & Advanced Materials, Ed. Mohamed Bououdina, IGI Global.

Patent Başvuruları

- E. E. Hameş Kocabaş, **E. Bilgi**, E. Bayır, S. Suphi Öncel, A. Şendemir Ürkmez, “İçi boş yapıda farklı şekillerde bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirmek için reaktör ve üretim yöntemi”, Türk Patent Enstitüsü (TPE), Patent başvuru no: 2014/04316, Başvuru tarihi: 15.04.2014
- E. E. Hameş Kocabaş, **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Şendemir Ürkmez, “Ham madde Olarak Keçi boynuzu ve Kuru Fasulye Kullanılarak Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemi” Türk Patent Enstitüsü (TPE), Patent başvuru no: 2013/08604, Başvuru tarihi: 16.07.2013

Projeler

- 2015 – Bakteriyel selüloz tabanlı yüksek su tutma kapasiteli medikal ped. 1533.TGSD.2015. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenmektedir. (PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ-FİKİR SAHİBİ)
- 2013 – “Bakteriyel Selülozdan Doğal Yüz Maskesi Üretimi” Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenmiştir (SAN-TEZ Proje no: 2013-1/198. [TEZ ÖĞRENCİSİ])
- 2011 – “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Mikroorganizmalar, Sağlıklı ve Kanserli Memeli Hücreleri Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” TÜBİTAK- 2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı.[LİSANS BİTİRME TEZİ]

Ödüller

- 2015 - Sözlü bildiri birincilik ödülü, *International Biomedical Engineering Congress 2015 (IBMEC'15)*, Lefkoşe, Kıbrıs

Sertifikalar

- 2015, MeristemEGE Girişimcilik Sertifika Mezunu (2. Dönem Mezunu)
- 2014, Scanco Medical microCT Operatör Eğitim Sertifikası

Organizasyon Komitesinde Yer Alınan Kongre ve Sempozyumlar

- 2015, VII. Bioengineering Congress (BEC2015)
- 2013, 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

- E. Bayır, **E. Bilgi**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2015), “Production of Bacterial Cellulose - Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Regeneration”, *International Biomedical Engineering Congress 2015 (IBMEC'15)*, Mart 12-14, Lefkoşa, Kıbrıs
- E. Bayır, **E. Bilgi**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2015), “Enhancing Pore Diameters of Bacterial Cellulose to Use in Biomedical Applications”, *International Biomedical Engineering Congress 2015 (IBMEC'15)*, Mart 12-14, Lefkoşa, Kıbrıs
- **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Sendemir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2015), “Statistical Optimization of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* using Alternative Raw Materials”, *International Biomedical Engineering Congress 2015 (IBMEC'15)*, Mart 12-14, Lefkoşa, Kıbrıs
- E. Bayır, **E. Bilgi**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2013), “The Utilization of Bacterial Cellulose and Hydroxyapatite-Bacterial Cellulose Composite as a Tissue Engineering Scaffold”, *VI. International Bioengineering Congress*, Kasım 12-15, Aydın, Türkiye
- E. Bayır, **E. Bilgi**, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Sendemir Ürkmez (2012), “Evaluation of the Effects of Magnetic Nanoparticles on Human Bone Cells *in vitro*”, *Nanosafety Congress-Turkey: Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms*, Nisan 26-28, Antalya, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendimir Ürkmez (2012), “Effects of Polymer Coatings on Cellular Responses to Magnetic Nanoparticles *in vitro*”, *8th Nanoscience and Nanotechnology Congress (NANOTR VIII)*, Haziran 25 -29, Ankara, Türkiye

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

- E. Bayır, **E. Bilgi**, S. S. Öncel, A. Şendimir-Ürkmez, E. Esin Hameş (2014), “İçi boş yapıda farklı şekillerde bakteriyel selüloz üretimi için reaktör”, *Türkiye İnovasyon Haftası*, Mayıs 29-30, İzmir, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, S. S. Öncel, A. Şendimir-Ürkmez, E. Esin Hameş (2014), “Alternatif hammadde kullanılarak bakteriyel selüloz üretim yöntemi”, *Türkiye İnovasyon Haftası*, Mayıs 29-30, İzmir, Türkiye
- E. Esin Hameş, **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Şendimir Ürkmez (2014), “Hammadde olarak keçiyoynuzu ve kuru fasulye kullanılarak bakteriyel selüloz üretim yöntemi”, *3. Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri*, Aralık 11-12, İzmir, Türkiye
- E. Esin Hameş, **E. Bilgi**, E. Bayır, S. S. Öncel, A. Şendimir Ürkmez (2014), “İçi boş yapıda farklı şekillerde bakteriyel selüloz üretimi için reaktör”, *3. Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri*, Aralık 11-12, İzmir, Türkiye
- E. Bayır, **E. Bilgi**, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendimir Ürkmez (2013), “Manyetit (Fe₃O₄) Nanopartiküllerin ve Farklı Kaplamaların İnsan Osteosarkoma

Hücreleri Üstüne Etkileri”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye

- **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Şendemir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2013), “Nanofiber yapıli bakteriyel selülozun alternatif karbon kaynakları ile üretilmesi”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendemir Ürkmez (2013), “Bakteriyel Selülozun Manyetik Nanopartiküller ve Hidroksiapatit için Taşıyıcı Olarak Kullanılması”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Şendemir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2012), “Mikroorganizmaların Ketlenmesinde Elektromanyetik Alan Kullanımı”, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eylül 3–7, İzmir, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendemir Ürkmez (2012), “Kaplama ve Kaplamasız Manyetik (Fe_3O_4) Nanopartiküllerin İnsan Osteosarkoma Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi”, *17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*, Ekim 3–5, İstanbul, Türkiye
- E. Bayır, **E. Bilgi**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendemir Ürkmez (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Sağlıklı ve Kanseri Kökenli Hücreler Üzerine Etkisi”, *17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*, Ekim 3–5, İstanbul, Türkiye
- E. Bayır, **E. Bilgi**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendemir Ürkmez (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Hayvan Hücreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *9. Ege Biyomühendislik Günleri*, Nisan 20–21, İzmir, Türkiye
- **E. Bilgi**, E. Bayır, A. Şendemir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Mikroorganizmalar Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *9. Ege Biyomühendislik Günleri*, Nisan 20–21, İzmir, Türkiye

Katılınan Seminer ve Sempozyumlar

- 2015 - *International Biomedical Engineering Congress 2015 (IBMEC'15)*, Lefkoşe, Kıbrıs
- 2014 - *2. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci kongresi*, İzmir, Türkiye
- 2014 - *İnovasyon Haftası*, İzmir, Türkiye
- 2013 - *VI. International Bioengineering Congress*, Aydın, Türkiye
- 2013 - *19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013)*,
- 2013 - *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, İzmir, Türkiye
- 2013 - *İnovasyon Çalıştayı*, İzmir, Türkiye
- 2012 - *Nanosafety Congress-Turkey: Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms*, Antalya, Türkiye
- 2012 - *8th Nanoscience and Nanotechnology Congress (NANOTR VIII)*, Ankara, Türkiye
- 2012 - *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye
- 2012 - *17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*, İstanbul, Türkiye
- 2010 - *2. Kök Hücre Sempozyumu*, İzmir, Türkiye
- 2009 - *1. Kök Hücre Sempozyumu*, İzmir, Türkiye
- 2009 - *Yapay Doku ve Organ Sempozyumu*, İzmir, Türkiye