



**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE
KARİDES KABUĞUNDAN KİTİN
EKSTRAKSİYONU**

Behiye TAŞER

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Gen Mühendisliği Bilim Dalı

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

2019

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE KARİDES
KABUĞUNDAN KİTİN EKSTRAKSİYONU**

Behiye TAŞER

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Gen Mühendisliği Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE KARİDES KABUĞUNDAN
KİTİN EKSTRAKSİYONU**

Doç Dr. Hakan ÖZKAN danışmanlığında, Behiye TAŞER tarafından hazırlanan bu çalışma **23/07/2019** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3./3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Pınar ARSLAN

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **25.07/2019** tarih ve **30./65** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE KARİDES KABUĞUNDAN KİTİN EKSTRAKSİYONU

Behiye TAŞER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Karides kabukları protein, mineral ve kitin içeriği bakımından oldukça zengindir. Kitin, doğada bolca bulunan doğal biyopolimerler olması sebebiyle özellikle de biyomalzeme olarak oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. Canlılardan kitinin ekstraksiyonu için kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, karides kabuklarından biyolojik kitin ekstraksiyonu için Türkiye’de 13 farklı bölgeden alınan toprak örneklerinden 35 bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin içerisinde en yüksek ekstraksiyon verimine sahip bakteri seçilmiş ve bu bakteri üzerinden optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH, kabuk konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve KH_2PO_4 , MgSO_4 gibi minerallerin kitin ekstraksiyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Kitin ekstraksiyonu için elde edilen optimum pH ve kabuk konsantrasyonu değerleri sırasıyla 7 ve 60 g/l olarak belirlenmiştir. Optimal inkübasyon süresi ise 4 gün olarak bulunmuştur. Aynı zamanda KH_2PO_4 ve MgSO_4 minerallerinin kitin ekstraksiyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Optimal değerler üzerinden 60 g kabuğun biyolojik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve başlangıç miktarına göre besiyerinde en son 27,3 g kabuk kalmıştır. Başlangıç ve ekstrakte kabuğun içerik analizleri gerçekleştirilmiştir. %DP, %DM ve kitin verimi (%) hesaplanmış ve sırasıyla 87,67, 41,95 ve 20,47 olarak bulunmuştur. Bu biyolojik kitin ekstraksiyonda *Paenibacillus jamilae* türünün kullanımı üzerine ilk çalışmadır.

2019, 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karides kabuğu, Kitin ekstraksiyonu, Deproteinizasyon, Demineralizasyon, *Paenibacillus jamilae*

ABSTRACT

Master Thesis

CHITIN EXTRACTION FROM SHRIMP SHELL BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

Behiye TAŞER

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Molecular Biology and Genetic
Gene Engineering Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Shrimp shells are rich in protein, mineral and chitin content. Chitin is widely used in nature as biomaterials, especially since it is a natural biopolymer. Chemical and biological methods are used for the extraction of chitin from living organisms. In this study, thirty-five bacteria were isolated from soil samples taken from thirteen different regions of Turkey for biological chitin extraction from shrimp Shell. Bacteria with the highest extraction efficiency was selected among these isolated bacteria and optimization studies were performed on these bacteria. Effects of pH, shell concentration, incubation time and minerals such as KH_2PO_4 , MgSO_4 on chitin extraction were investigated. The optimum pH and shell concentration values obtained for chitin extraction were determined as 7 and 60 g/l, respectively. Optimum incubation time was found on as four day. At the same time, it was determined that KH_2PO_4 and MgSO_4 minerals had no effect on chitin extraction. Biological extraction of 60 g shells was carried out on optimal condition and 27,3 g shells remained in the medium according to the initial amount. Content analysis of the initial and extracted shells were performed. DP%, DM% and chitin yield (%) of the shells were calculated and found as 87.67, 41.95 ve 20.47, respectively. This is the first study on the use of the species *Paenibacillus jamilae* in the biological chitin extraction.

2019, 75 pages

Keywords: Shrimp Shell, Chitin extraction, Deproteinization, Demineralization, *Paenibacillus jamilae*

TEŞEKKÜR

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

Öncelikle bu tezi yazmamda büyük destekte bulunan, çalışmalarım da her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a, tezimin deneysel aşamalarında büyük bir özveriyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla benimle ilgilenen çok kıymetli Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında çalıştığım numunelerin hazırlanması ve ölçümlerinin yapılmasında bana büyük katkıları olan Sayın Tuğba ORAK, Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTAÇI, Sayın Arş. Gör. Elanur TUYSUZ'e ve tüm deneysel çalışmalarım boyunca takıldığım her konuda bilgi ve tecrübesini benimle paylaşıp bana yol gösteren ablam Arş. Gör. Pınar GÜLLER'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarda kullandığım karides kabuğu atıklarının ve toprak örneklerinin temininde yardımcı olan, tezimin başından sonuna kadar yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli dostlarım Esra PALABIYIK, Meryem DOYMUŞ, Yaprak İlayda KARADAYI, Handan UĞUZ ve Meltem ALP'e sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sabır gösteren ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli anneme, babama ve abime tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Behiye TAŞER

Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kitin ve Kitosanın Çözünürlüğü.....	6
1.2. Kitin ve Kitosanın Molekül Ağırlığı	7
1.3. Kitosanın Kimyasal Özellikleri	7
1.4. Kitin ve Kitosanın Uygulama Alanları.....	8
1.5. Kitin Ekstraksiyon Yöntemleri.....	9
1.5.1. Kitinin kimyasal ekstraksiyonu	10
1.5.1.a. Kimyasal deproteinizasyon.....	10
1.5.1.b. Kimyasal demineralizasyon	11
1.5.2. Kitinin biyolojik ekstraksiyonu	13
1.5.2.a. Enzimatik deproteinizasyon	14
1.5.2.b. Fermantasyon	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	30
3.1.2. Deneysel Çalışmalarda kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanması.....	31
3.1.2.a. Lowry protein analizinde kullanılan çözeltiler	31
3.1.2.b. Kjeldahl azot tayininde kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.2.c. Bakteri izolasyonu için kullanılan çözeltiler	32
3.1.2.d. Enzim aktivitelerinde kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan besiyerlerinin hazırlanması	33
3.1.4. Bakterinin moleküler analizi için kullanılan çözeltiler	33
3.2. Yöntemler.....	34

3.2.1. Karides kabuğunun kurutulması ve toprak örneklerinin toplanması.....	35
3.2.2. Topraktan bakteri izolasyonu	35
3.2.3. Saflaştırılan bakterilerde proteaz ve kitinaz aktivite tayini	35
3.2.4. Karides kabuğunun içerik analizi	36
3.2.4.a. Lowry yöntemi ile karides kabuğunda protein analizi	37
3.2.4.b. Kül tayini	39
3.2.4.c. Kjeldahl yöntemi ile azot tayini.....	39
3.2.5. Bakteriden genomik DNA izolasyonu	40
3.2.6. 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi	41
3.2.7. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi	42
3.2.8. Klonlama	42
3.2.9. Optimizasyon Çalışmaları	47
3.2.9.a. Kitin Ekstraksiyonu için optimal pH'nın belirlenmesi.....	47
3.2.9.b. Kitin ekstraksiyonu için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi	48
3.2.9.c. Kitin ekstraksiyonu için optimal KH_2PO_4 ve MgSO_4 konsantrasyonlarının belirlenmesi	48
3.2.9.d. Kitin ekstraksiyonu için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	50
4.1. Kabuk İçeriği Analizleri	50
4.2. Topraktan Bakteri İzolasyonu	50
4.3. Proteaz ve Kitinaz Aktivitesine Göre Uygun Bakterinin Seçilmesi.....	52
4.4. Sekans Analizi Sonuçları.....	55
4.5. Optimizasyon Denemeleri	55
4.5.1. Kitin ekstraksiyonu için optimal pH'nın belirlenmesi	55
4.5.2. Kitin Ekstraksiyonu için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi	57
4.5.3. Kitin ekstraksiyonu için optimal KH_2PO_4 ve MgSO_4 konsantrasyonlarının belirlenmesi	58
4.5.4. Kitin ekstraksiyonu için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	60
5. TARTIŞMA SONUÇ	63
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
CaCl	Kalsiyum Klorür
CaCO ₃	Kalsiyum Karbonat
DD	Deastilasyon Derecesi
dk	Dakika
DM	Demineralizasyon Derecesi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
DP	Deproteinizasyon Derecesi
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
kb	Kilobaz
KOH	Potasyum hidroksit
M	Molarite
ml	Mililitre
N	Normalite
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
rRNA	ribozomal Ribonükleik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitin, protein ve kalsiyum karbonat bileşenli karides kabuğunun kimyasal bileşimi ve yapısı.....	3
Şekil 1.2. Kitin ve selülozun molekül yapısı	4
Şekil 1.3. Kitin deasetilasyonu ile kitosan oluşumu	6
Şekil 1.4. Kitosanın molekül yapısı	7
Şekil 1.5. Kabuklulardan kitin ve kitosan eldesinin şematik gösterimi	10
Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart eğri grafiği	38
Şekil 4.1. Kurutulmuş (a) ve toz haline getirilmiş (b) karides kabukları.....	50
Şekil 4.2. Toprak örneklerinin alındığı iller.....	51
Şekil 4.3. Bakteri izolasyonu için hazırlanan topraklı besiyeri (a) ve 6 kat seyreltilen besiyerinin TSA'ya aktarıldığı kültür (b)	51
Şekil 4.4. Bakteri seçimi için hazırlanan kabuklu besiyeri.....	52
Şekil 4.5. BAT-1 kodlu bakterinin inkübasyon süresi sonunda petride oluşturduğu kolonileri	54
Şekil 4.6. BAT-1 kodlu bakterinin 40X büyütmedeki mikroskop görüntüsü.....	55
Şekil 4.7. Proteaz ve kitinaz aktivitelerde optimal pH'nın belirlenmesi	56
Şekil 4.8. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi	57
Şekil 4.9. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal KH_2PO_4 konsantrasyonunun belirlenmesi	59
Şekil 4.10. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal MgSO_4 konsantrasyonunun belirlenmesi	60
Şekil 4.11. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de avlanan kabuklu deniz ürünleri miktarı	2
Çizelge 1.2. Biyosferdeki kitin kaynakları	5
Çizelge 1.3. Kitin ve kitosan için kullanılan yaygın çözücüler	7
Çizelge 1.4. Kitin ve Kitosanın biyolojik özellikleri ve fizikokimyasal karakteristikleri ile ilişkisi	12
Çizelge 3.1. Lowry protein analizi için standart çözelti	37
Çizelge 3.2. Lowry protein tayin yöntemi	38
Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı.....	41
Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR Programı.....	41
Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan kimyasallar	43
Çizelge 3.6. Koloni PCR’da kullanılan bileşenler ve miktarları	45
Çizelge 3.7. Koloni PCR programı.....	45
Çizelge 4.1. Topraktan saflaştırılan bakterilerin kodları	52
Çizelge 4.2. Saflaştırılan bakterilerin proteaz ve kitinaz aktivite sonuçları	53
Çizelge 4.3. Faklı pH değerlerinde elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri	56
Çizelge 4.4. Faklı kabuk konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri	58
Çizelge 4.5. Faklı KH ₂ PO ₄ konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri	59
Çizelge 4.6. Faklı MgSO ₄ konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri	60
Çizelge 4.7. Faklı inkübasyon sürelerinde elde edilen proteaz ve kitinaz aktiviteler ile %DP, %DM, LA ve Kitin verimi (%) değerleri	61
Çizelge 4.8. Başlangıç kabuğu ve ekstraksiyon işlemi sonrası karides kabuğunun yüzdece bileşenleri	62

1. GİRİŞ

Crustacean (kabuklular), böcek, örümcek ve çok bacaklılar gibi en fazla türe sahip olan Arthropod (eklem bacaklılar) filumunun bir üyesidir. Yengeç, ıstakoz, karides, kerevit, krill ve diğer birçok türü içeren kabuklular, birçok habitatta çeşitlilik gösterir ve bol miktarda bulunurlar (Farkas *et al.* 2003). Kabuklular hem denizde hem de karada yaşayan türlerden oluşan geniş bir sınıftır (Hadley 1986). Kabuklularında dahil olduğu 200'den fazla sucul takson, insan tüketimi için uygun kaynaklar olarak kabul edilmektedir (Worm *et al.* 2006). Eklembacaklılar, vücutlarının en dışında bulunan ve onları dış çevreden ayıran bir kutikul yapısına (dış iskelete) sahiptir (Atwood *et al.* 1982). Kutikul, diğer hayvanlardan, sıcaklık ve kimyasal gibi dış uyaranlardan ve hastalıklardan koruma ve hareket yeteneği kazandırma gibi fonksiyonlara sahiptir. Aynı zamanda, türe özgü morfolojiye bağlı olarak farklı fonksiyonlar gösterebilir. Eklembacaklılarda kutikulun kalsifikasyonu sadece kabuklularda görülür (Friedrich and Tautz 1995; Regier *et al.* 2010).

Deniz ürünleri, insan tüketimi için gıda olarak kabul edilen tatlı su ve deniz hayvanları olarak tanımlanabilir. Esas olarak balık ve kabuklu deniz hayvanlarını (kabuklular ve yumuşakçalar) içerir ve dünyada özellikle kıyı bölgelerinde birçok diyetle önemli bir protein kaynağıdır (Basurco *et al.* 2014). Başta karides kabukları olmak üzere deniz ürünleri tüketiminden elde edilen yan ürünler toplam kütlenin yaklaşık %40'ını oluşturur ve yavaş bozuldukları için büyük bir çevresel sorun haline gelirler (Kjartansson *et al.* 2006).

İnsan tüketimi için ıstakoz, karides ve yengeç gibi kabukluların işlenmesinde toplam kütlenin %40-50'si atıktır (Arbia *et al.* 2013). Su ürünleri işleme endüstrileri her yıl dünya çapında yaklaşık 6-8 milyon ton yengeç, karides ve ıstakoz kabuğu üretmektedir (FAO 2014). 2018 TÜİK değerlerine göre (Çizelge 1.1) Türkiye'de avlanan kabuklu deniz ürünlerinin toplam miktarı 4570,4 tondur. Bu kabuklu deniz ürünlerinde toplam kütlenin %40-50'si atık olarak değerlendirildiğinde (Arbia *et al.* 2013), ülkemizde bir yılda

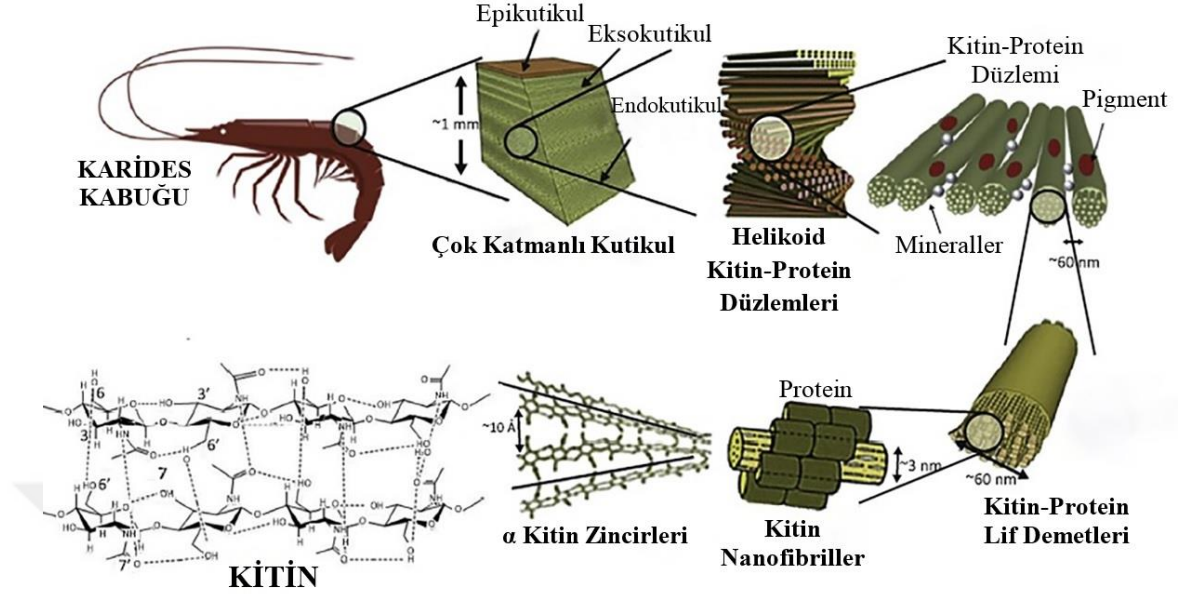
yaklaşık 2000 ton kabuk atığı ortaya çıkmaktadır. Bu yönüyle kabuklu deniz ürünleri atık yönetimi, gıda endüstrilerinin karşılaştığı büyük bir sorundur.

Atıkların sadece küçük bir kısmı hayvan yemi veya gübre olarak kullanılırken, diğerleri genellikle düzenli depolama alanlarına veya denize dökülür ve kıyı bölgelerinde potansiyel bir kirlilik sebebidir (Xuemei and Hawkins 2002). Kabuklu deniz hayvanı atıklarının bertarafı çevre sorunlarının çözümünde oldukça önemli bir yere sahiptir. Crustacean kabukları yüksek içerikleri ve kolay erişilebilirlikleri nedeniyle ticari kullanım için en önemli kitin kaynağıdır (Das and Ganesh 2010).

Çizelge 1.1. Türkiye’de avlanan kabuklu deniz ürünleri miktarı (TÜİK 2018)

Avlanan diğer deniz ürünleri (kabuklu) miktarı (Ton)	2018
Böcek - Spiny lobster	1,9
Deniz kereviti - Norway lobster	2,3
İstakoz - Common lobster	4,7
Erkek karides - Speckled shrimp	46
Jumbo karides - Green tiger prawn	758,8
Karabiga karides - Caramote prawn	219,4
Kırmızı karides - Giant gamba prawn	299
Pembe karides (Çimçim) - Deep water rose prawn	3212,9
Pavurya - Common shore crab	14,9
Mavi yengeç - Blue crab	10,5
TOPLAM	4570,4

Kabuk atıklarının başlıca bileşenleri (kuru kütle bazında) protein (%30-40), mineral (%30-50) ve kitindir (%20-30) (Şekil 1.1) (Sachindra *et al.* 2007; Handayani *et al.* 2008). Kabuk, yüksek miktarda arginin, glutamik asit, glisin ve alanin içeren, hayvan yemi için temel amino asitleri sağlayan değerli bir protein kaynağıdır (Nguyen *et al.* 2017). Kabuklu deniz ürünü atıklarındaki protein içeriği, türlere ve işleme yöntemlerine bağlı olarak değişir (Mao *et al.* 2017). Ayrıca protein hidrolizinden sonra, çeşitli boyutlardaki peptidlerden serbest amino asitler üretilir (da Silva *et al.* 2017).

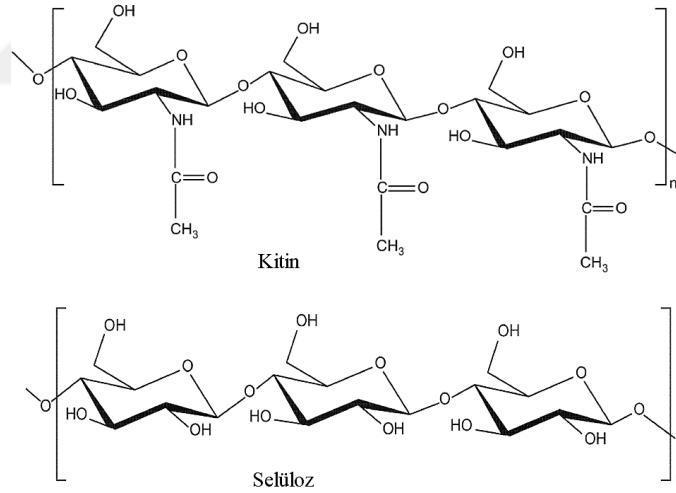


Şekil 1.1. Kitin, protein ve kalsiyum karbonat bileşenli karides kabuğunun kimyasal bileşimi ve yapısı (Hülsey 2018)

Kabuklularda dış iskelet, az miktarda magnezyum, fosfor ve kükürt, yüksek oranda da CaCO_3 (kalsiyum karbonat) içeren minerallerden oluşmaktadır. Dış iskeletin toplam inorganik bileşiminin yaklaşık %99'u; türler, vücuttaki konumu ve yaşam evrelerine bağlı olarak değişiklik gösterir (Conklin 1983). CaCO_3 'ün; ilaç, ziraat, inşaat ve kağıt endüstrilerinde geniş uygulama alanları vardır. Halen temel olarak mermer ve kireçtaşı gibi jeolojik kaynaklardan elde edilmektedir. Bu kaynaklar bol miktarda bulunur ancak çıkarılması zor olan ağır metaller içerebilir. Dolayısıyla kabuklardan elde edilen kalsiyum, yenilebilir kaynaklardan elde edilmesinden dolayı insan tüketimi için daha güvenilirdir (Kim *et al.* 2011).

Kabuklulardaki dış iskeletin bir diğer bileşeni olan kitin (β -(1-4)-N-asetil-D-glukozamin), ilk kez 1811'de Fransız bilim insanı Henri Braconnot tarafından mantardan izole edilmiştir ve doğada çok çeşitli canlılar tarafından sentezlenen selüloz benzeri bir biyopolimerdir. Kitin; omurgasızların, kabukluların, böceklerin dış iskeletinde, mantar ve mayaların hücre duvarında destekleyici ve koruyucu ana bileşen olarak sıralı kristalin mikrofibriller şeklinde bulunur (Winterowd and Sandford 1995; Shahidi *et al.* 1999). Her yıl biyosferde en az 10^{13} kg kitin üretilir ve hidrolize edilir (Muzzarelli 1999). Kitin,

selülozdan sonra yeryüzünde en bol bulunan ikinci doğal polimerdir (Ornum 1992). Molekül yapısı olarak selüloza oldukça benzerdir (Şekil 1.2.) fakat selüloz üreten organizmalarda kitin görülmez (Lodhi *et al.* 2014). Aynı zamanda, düşük nitrojen içeriği (%1,25) ile hazırlanan sentetik selüloz türevlerine kıyasla daha yüksek azot yüzdesine (%6,89) sahiptir. Selüloz, dekstrin, pektin, agar, agaroz gibi doğal polisakkaritlerin çoğu asidik iken kitin ve kitosan yüksek derecede bazik polisakkaritlerdir. Son yüzyıl içinde, kitosan çalışmaları ve uygulamaları birçok farklı formda ele alınmıştır. Araştırmacılar, doğadaki farklı formları bulunan kitin ve kitosan için yeni kullanım alanları geliştirerek var olan orijinal Bracannot modeli üzerine yeni bulgular inşa etmektedir (Dai *et al.* 2011). Doğada yaygın kitin oluşumuna rağmen (Çizelge 1.2) bu zamana kadar kitin için en fazla kullanılan ticari kaynaklar yengeç ve karidedir. Kitin, sadece az kullanılan kaynak olmasından dolayı değil aynı zamanda çeşitli alanlarda yüksek potansiyelli biyomateryal olmasından dolayı da büyük ilgi görmeye başlamıştır (Rudall and Kenchington 1973).



Şekil 1.2. Kitin ve selülozun molekül yapısı (Shahidi and Abuzaytoun 2005)

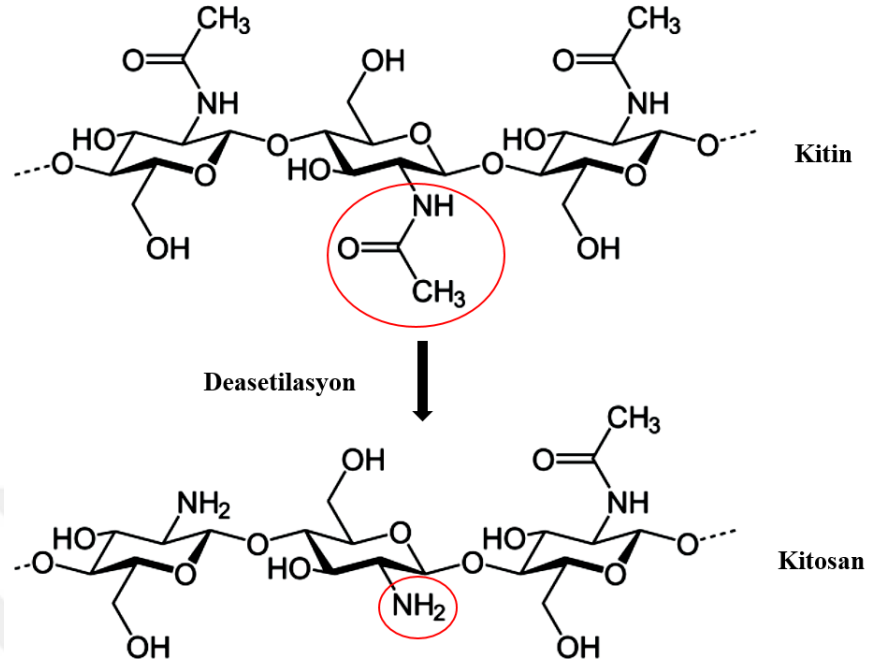
Yapıdaki mikrofibrillerin yönelimine göre kitinin; α , β ve γ formları mevcuttur (Rudall 1963). α kitin doğada en fazla bulunan formdur ve antiparalel zincirlere sahiptir. Kabukluların dış iskeletlerinde, yumuşakçaların ve böceklerin kabuklarında ve iskeletlerinde, mantarların ise hücre duvarlarında bulunur (Gardner and Blackwell 1975). Doğada nadir bulunan β kitin, paralel zincirler içerir ve mürekkep balığının uzantılarında

bulunur (Herth and Barthlott 1979). γ kitin ise paralel ve antiparalel zincirlerin bir karışımından oluşur ve böcek kozalarında bulunur (Rudall and Kenchington 1973). Kitin polisakkariti, oligosakkarit türevlerini üretmek için kısmen depolimerize edilebilir. Bu oligosakkaritler, değişken polimer uzunluklarında üretilebilir veya N-asetilglukozamine tamamen depolimerize edilebilir (Ramírez *et al.* 2010).

Çizelge 1.2. Biyosferdeki kitin kaynakları (Mathur and Narang 1990).

Deniz Canlıları	Böcek	Mikroorganizmalar
Yumuşakça	Örümcek	Maya
Halkalı solucan	Akrep	Yeşil alg
Sölenter	Karınca	Kahverengi alg
Kabuklular	Kolsu ayaklılar	Penicillium miselleri
Istakoz	Hamam böceği	Chytridiaceae
Yengeç		Blastocladiaceae
Karides		Sporlar
Kerevit		
Krill		

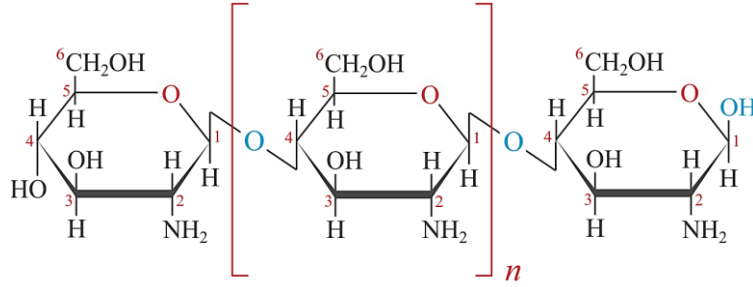
Kitin sert yapıya sahip olmasından dolayı çoğu çözücüde çözünmez. Bu nedenle kitinin kimyasal modifikasyonları gerçekleştirilebilir (Peter 1995). Şekil 1.3’de gösterildiği gibi kitin deasetilasyon derecesi yaklaşık %50’ye ulaştığında (polimerin kaynağına bağlı olarak), sulu asidik ortamda çözünür hale gelir ve bu yapı kitosan olarak adlandırılır (Rinaudo 2006). β -(1-4)-N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozaminin kopolimeri olan kitosan, kitinin alkali veya enzimatik deasetilasyonu ile elde edilen ve doğada bolca bulunan polimerik bir üründür. Kitosan, ilk olarak 1859’da Rouget tarafından, konsantre bir KOH çözeltisi içinde kitinin kaynama noktasına kadar ısıtılması sırasında keşfedilmiştir (Li *et al.* 1992). Deasetilasyon derecesi (DD) %50’nin üzerine çıktığında kitosan, organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözünür hale gelir ve katyonik bir polielektrolit gibi davranır. Kitin ve türevlerinin, özellikle de kitosanın potansiyel ve olağan uygulamalarının 200’den fazla olduğu tahmin edilmektedir (Brzeski 1987).



Şekil 1.3. Kitin deasetilasyonu ile kitosan oluşumu (Ramya *et al.* 2014)

1.1. Kitin ve Kitosanın Çözünürlüğü

Kitin ve kitosan arasındaki en belirgin fark çözünürlük özellikleridir. Kitin yapısında bulundurduğu güçlü hidrojen bağları sebebiyle sadece özel çözgenlerde çözünebilir. Kitinin çözülmesinde kullanılan çoğu çözücü toksiktir (Çizelge 1.3) ve bu nedenle gıda işleme uygulamalarında kullanılamaz (Winterowd and Sandford 1995). Kitosan organik çözücülerde ve suda çözünmezken glukozamin üzerindeki serbest amino grupları sayesinde formik asit, piruvik asit, laktik asit gibi bazı organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözünebilir. Bundan dolayı, kitine kıyasla kitosanın çözücülerini daha güvenilirlerdir. Kitosan, özellikle C2 pozisyonundaki amino gruplarının varlığı ve C3-C6 pozisyonlarındaki primer ve sekonder hidroksil grupları (Şekil 1.4) nedeniyle farklı alanlarda birçok yararlı uygulamaya sahiptir (Kurita 1986; Furusaki *et al.* 1996). Bu reaktif gruplar, kitosanın mekanik ve fiziksel özelliklerini değiştirmek için kimyasal modifikasyona kolayca maruz kalırlar. Amino gruplarının varlığı modifikasyon reaksiyonlarının yanı sıra farklı biyolojik fonksiyonlara da olanak sağlar (Kumar 2000).



Şekil 1.4. Kitosanın molekül yapısı (Gortari and Hours 2013)

Çizelge 1.3. Kitin ve kitosan için kullanılan yaygın çözücüler (Shahidi and Abuzaytoun 2005).

Bileşen	Çözücü
Kitin	Dimetilformamit / lityum klorür: Dietilformamit / lityum klorür
Kitosan	Formik asit / su: asetik asit / su: laktik asit / su: glutamik asit / su vb.

Kitosanın çözünürlük özellikleri çoğunlukla N-asetilasyon, asetil gruplarının dağılımı, pH ve iyonik kuvvet derecesi ile ilişkilidir (Anthonsen *et al.* 1993).

1.2. Kitin ve Kitosanın Molekül Ağırlığı

Doğal kitinin molekül ağırlığı normalde 1.000 kDa'dan yüksektir ve ticari olarak mevcut kitosanın molekül ağırlığı ise 100-1.200 kDa aralığındadır (Lower 1984; Li *et al.* 1992). Kitosanın ticari üretimi sırasında birçok kuvvet molekül ağırlığını etkileyebilir. Yüksek sıcaklık (>280°C kitosanda termal bozunma meydana gelir ve polimer zincirleri kırılır), çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi faktörler molekülde değişikliklere sebep olabilir (Muzzarelli 1977; Li *et al.* 1992).

1.3. Kitosanın Kimyasal Özellikleri

Kitosan çok fazla azot içeriğine sahip olan doğrusal amino polisakkaritlerdir. Rijit D-glukozamin yapısından kaynaklı yüksek hidrofiliklik, kristallik özelliklerine sahiptir.

Aynı zamanda deprotonlanmış amino grupları nükleofil etki gösterdiğinden zayıf bazlardır. Moleküller arası hidrojen bağları oluşumu ile yüksek viskoziteye sahiptir. Kimyasal aktivasyon ve çapraz bağlanmanın gerçekleştirilebilmesi için reaktif gruplar bulundurulur. Suda ve organik asitlerde çözünmezken sulu asidik çözeltilerde çözünür ve organik-inorganik asitlerle tuzlar oluştururlar. Glukozamin tekrar birimlerindeki pozitif yükten dolayı yüksek yük yoğunluğuna sahip katyonik polimerlerdir. Negatif yüklü moleküllerle etkileşime girerek topaklaştırıcı madde özelliği gösterirler. Bunların dışında; şelatlama ve kompleksleme özellikleri, polielektrolit, iyonik iletkenlik, film oluşturma gibi özelliklere sahiptir (Thakur and Thakur 2014).

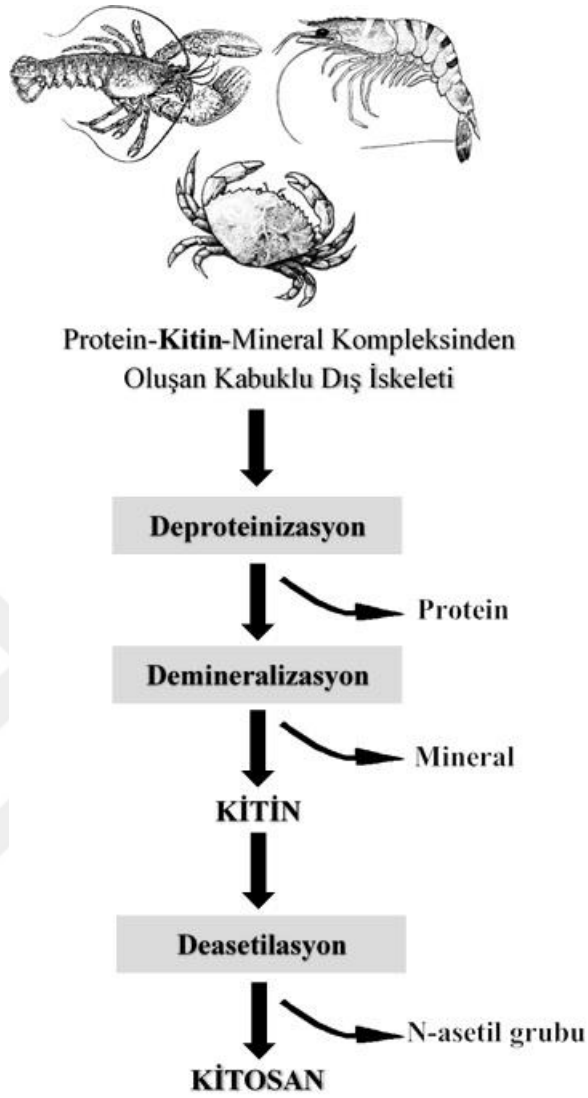
1.4. Kitin ve Kitosanın Uygulama Alanları

Kitin ve kitosan polisakkaritlerinin; biyouyumluluk, biyobozunurluk, non-toksitite ve adsorbsiyon gibi mükemmel özellikleri onları biyomateryaller için gerekli ve uygun kılmakta, aynı zamanda sentetik polimerlere alternatif olarak endüstriyel uygulamalarda da dikkat çekmektedir (Tan *et al.* 2009; Croisier and Jerome 2013). Bu polimerler, yüksek yüzey alanı, gözeneklilik, çekme dayanımı ve iletkenlik gibi üstün fiziksel özelliklere sahiptirler. Ayrıca farklı şekil ve formlarda (filmler, lifler, süngerler, boncuklar, toz, jel ve çözeltiler) kolayca kalıplanabilirler (Shukla *et al.* 2013). Çoğu polisakkaritin aksine, kitosanda polimer zinciri boyunca tekrarlayan pozitif yüklü amino gruplarının varlığı, molekülün iyonik veya hidrojen bağı yoluyla negatif yüklü yüzeylere bağlanmasını sağlar ve bu sayede de mükemmel adsorbsiyon özelliği kazanır (Muzzarelli 1973; Rha 1984; Shahidi 1996). Aynı zamanda, bu polisakkaritlerin; antifungal, antibakteriyel, antitümör, immünoadjuvan, antitrombojenik, antikolesterolemik gibi ilgi çekici biyolojik aktivitelerinin yanı sıra özellikle biyofilm yapımı ve yara iyileştirme gibi uygulamalarda kullanımını sağlayan biyoadhezif özellikleri de mevcuttur. Bütün bu özelliklerinden dolayı, kitin ve kitosanın, doku mühendisliği, yara iyileştirme, su arıtımı, ilaç salınım sistemleri, oftalmoloji, tekstil, gıda, kozmetik ve tarım gibi alanlarda yaygın kullanımı bulunmaktadır (Khor 2002; Rinaudo 2006).

1.5. Kitin Ekstraksiyon Yöntemleri

Kabuk dokusunda protein ve kitin, protein-kitin matrisini oluşturmak üzere bir araya gelir ve sert yapının oluşması için yoğun şekilde kalsifiye edilir (Kjartansson *et al.* 2006). Kabuktan kitin izolasyonu, genellikle deproteinizasyon yoluyla proteinlerin, demineralizasyon yolu ile minerallerin uzaklaştırılmasını içeren iki basamakta gerçekleştirilir. Bu işlemler sırasında kabukta var olan az miktardaki pigment ve lipitler de bertaraf edilir. Bazı durumlarda bu işlemlere ilaveten tortudaki pigmentlerin uzaklaştırılması için dekolorizasyon yapılabilir. Saf kitin eldesinde yıllar içinde birçok yöntem önerilmiş ve kullanılmıştır ancak standart bir yöntem benimsenmemiştir. Hem deproteinizasyon hem de demineralizasyon kimyasal ve enzimatik işlemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerin dışında mikrobiyal fermantasyon da kullanılabilir. Mikrobiyal fermantasyon yönteminde, diğerlerinin aksine deproteinizasyon ve demineralizasyon basamakları aynı anda gerçekleşir (Younes and Rinaudo 2015).

Kitin izolasyonu, uygulanacak yönteme bakılmaksızın kabuk seçimi ile başlar. Örneğin; ıstakoz ve yengeç seçimi, elde edilecek olan malzemenin kalitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Karides kabukları ise daha ince kabuk duvarına sahiptir ve dolayısıyla kitin izolasyonu diğer kabuk tiplerine oranla daha kolaydır (Younes and Rinaudo 2015).



Şekil 1.5. Kabuklulardan kitin ve kitosan eldesinin şematik gösterimi

1.5.1. Kitinin kimyasal ekstraksiyonu

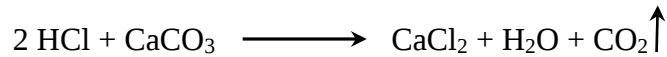
1.5.1.a. Kimyasal deproteinizasyon

Deproteinizasyon basamağının gerçekleştirilmesi, kitin ve protein arasındaki kimyasal bağların kırılmasını gerektirdiğinden güçtür. Ayrıca, biyopolimerin depolimerizasyonuna sebep olabilecek kimyasalların kullanımını gerektirir. Proteinlerin tamamen uzaklaştırılması, özellikle biyomedikal uygulamalarda insanlar üzerinde alerjik

reaksiyonlara sebep olmasından dolayı oldukça önemlidir. NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃ gibi çeşitli kimyasallar deproteinizasyon reaktifleri olarak test edilmiştir. NaOH öncelikli tercih edilen reaktiftir ve 0,125-5 M arasında değişen konsantrasyonlarda, değişen sıcaklıklarda (160°C'ye kadar), değişen işlem süresinde (birkaç dakika ile birkaç gün arasında) uygulanabilir. Deproteinizasyonun yanı sıra, NaOH kullanımı, kitinin kısmen deasetilasyonuna ve biyopolimerin hidrolizine sebep olarak molekül ağırlığını azaltmaktadır (Younes and Rinaudo 2015).

1.5.1.b. Kimyasal demineralizasyon

Demineralizasyon kalsiyum karbonat başta olmak üzere minerallerin uzaklaştırılması esasına dayanır. Demineralizasyon genellikle HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH ve HCOOH gibi asitlerin uygulanmasıyla gerçekleştirilir (No and Hur 1998; Percot *et al.* 2003). Bu asitler arasında öncelikle tercih edilen reaktif hidroklorik asittir. Demineralizasyon, kalsiyum karbonatın karbondioksit salınımı ile suda çözünür kalsiyum tuzlarına dönüşümünden dolayı kolaylıkla gerçekleştirilebilir (Younes and Rinaudo 2015).



Kabuk yapısında bulunan diğer minerallerin çoğu asit varlığında benzer şekilde reaksiyona girer ve çözünür tuzlara dönüşürler. Daha sonra tuzlar, katı kitin fazından filtrelenerek ve deiyonize su kullanılarak yıkamayla kolayca uzaklaştırılabilirler (Younes and Rinaudo 2015).

Her kabuğun mineralleşme derecesi; ekstraksiyon süresi, sıcaklık, partikül boyutu, asit konsantrasyonu ve çözücü/çözünen oranı ile değişir. Çözücü/çözünen oranı asit konsantrasyonuna bağlıdır, çünkü bir mol kalsiyum karbonat molekülünü kalsiyum klorüre dönüştürmek için iki mol HCl molekülüne ihtiyaç vardır. Tam bir reaksiyon gerçekleştirebilmek için asit alımı, stokiyometrik miktardaki minerallere eşit veya daha fazla olmalıdır (Johnson and Peniston 1982; Shahidi and Synowiecki 1991). Tüm

minerallerin uzaklaştırılması zor olduğu için (katının heterojenliği nedeniyle) daha büyük hacimli veya daha konsantre asit çözeltisi kullanılabilir (Younes and Rinaudo 2015).

Demineralizasyon, genellikle 2-3 saatlik HCl ile karıştırmayla gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, reaksiyon süresi 15 dakikadan 48 saate kadar değişiklik gösterebilir. Fakat daha uzun demineralizasyon süresi polimerin degradasyonuna yol açabilir (Okaför 1965). Ayrıca, yüksek sıcaklık kullanımı, çözücünün kitin matrisine penetrasyonunu arttırdığından demineralizasyon reaksiyonunu hızlandırdığı görülmüştür. Bu nedenle, bazı demineralizasyon reaksiyonları yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir (Truong *et al.* 2007). Bununla birlikte, yüksek sıcaklık, uzun süreli inkübasyon, yüksek asit konsantrasyonlarının kullanımı elde edilen kitinin fizikokimyasal özelliklerini etkilediği ve dolayısıyla kitinin farklı biyolojik özellikler sergilediği bildirilmiştir (Çizelge 1.4). Sonuçta, minerallerin uzaklaştırılmasına dair birçok deneysel koşul literatürlerde bulunmasına rağmen, kitinin molekül ağırlığı ve asetilasyon derecesi üzerine etkileri kaçınılmazdır (Younes and Rinaudo 2015).

Çizelge 1.4. Kitin ve Kitosanın biyolojik özellikleri ve fizikokimyasal karakteristikleri ile ilişkisi (Aranaz *et al.* 2009)

Özellikleri	Fizikokimyasal Karakteristikleri
Biyobozunur	Deasetilasyon derecesi, Asetil gruplarının dağılımı, Moleküler Ağırlık
Biyouyumlu	Deasetilasyon derecesi
Mukoadhezif	Deasetilasyon derecesi, Moleküler Ağırlık
Hemostatik	Deasetilasyon derecesi, Moleküler Ağırlık
Analjezik	Deasetilasyon derecesi
Adsorpsiyon arttırıcı	Deasetilasyon derecesi
Antimikrobiyal	Moleküler Ağırlık
Antikolesterolemik	Deasetilasyon derecesi, Moleküler Ağırlık, Viskozite
Antioksidan	Deasetilasyon derecesi, Moleküler Ağırlık

1.5.2. Kitinin biyolojik ekstraksiyonu

Kimyasal adımlar genellikle daha yüksek enerji girişı gerektiren yüksek sıcaklık koşullarında gerçekleştirilir. Üstelik yıkama adımları, teknik olarak geri dönüşümü zor ve pahalı olan, yüksek konsantrasyonlarda asit içeren, çok büyük miktarlarda aşındırıcı kimyasal atık suyun ortaya çıkmasına neden olur. Bu geleneksel kimyasal ekstraksiyon işlemleri, çevre için son derece tehlikelidir, maliyetli proseslerdir ve her yıkama basamağı sırasında yüksek miktarda tatlı su tüketimi ile yüksek konsantrasyonlarda mineral asit açığa çıkmaktadır (Gortari and Hours 2013). Bununla birlikte, kullanılan kimyasallar kitinin kısmen deasetilasyonuna ve polimerin hidrolize olmasına neden olarak, sonuçta değişken fizyolojik özelliklerde ürün ortaya çıkarır (Çizelge 1.4) (Arbia *et al.* 2013). Ayrıca, “Yeşil Kimya (endüstriyel biyoteknoloji)” kavramını temel alan yeşil ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi, kitin ekstraksiyonunda enzim ve mikroorganizmaların uygulanmasını desteklemiştir (Younes and Rinaudo 2015).

Karides kabuklarının kimyasal ve biyolojik yöntemlerle ekstraksiyonunu içeren karşılaştırmalı çalışmalarda, biyolojik yöntemin (mikroorganizmalar kullanarak) kimyasal yöntemden daha iyi olduğu, çünkü kitin yapısının korunduğı gösterilmiştir (Khanafari *et al.* 2008). Kitinin biyolojik ekstraksiyonu, daha kısa sürede yüksek tekrarlanabilirlik, daha basit manipölasyon, daha küçük çözücü tüketimi ve daha düşük enerji girdisi sunar. Bununla birlikte, biyolojik yöntem hala laboratuvar ölçekli çalışmalar ile sınırlıdır (Younes and Rinaudo 2015).

Son zamanlarda, kitin ekstraksiyonu için proteinlerin uzaklaştırılmasında proteolitik enzimlerin kullanıldığı yaygın biyolojik yöntemler ilgi görmeye başlamıştır. Deproteinizasyon basamağında enzimlerin kullanımı ilk olarak 1934’de tanımlanmıştır, ancak 1977’den bu yana bu yaklaşıma olan ilgi artmıştır (Younes and Rinaudo 2015). Bu çalışmalar daha sonra, Legarreta *et al.* (1996a) ve Cira *et al.* (2000) tarafından daha kapsamlı çalışılarak bakteriyel laktik asit fermentasyon süreci ortaya koyulmuştur.

1.5.2.a. Enzimatik deproteinizasyon

Biyolojik yöntemle kitin ekstraksiyonu proteaz kullanımını gerektirir. Proteolitik enzimler esas olarak bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklardan elde edilebilir. Alkalaz, pepsin ve tripsin gibi birçok proteaz, crustacean kabuklarından proteinleri uzaklaştırmakta ve kitin izolasyonu sırasında deasetilasyonu ve depolimerizasyonu en aza indirmektedir. Bu işlem, reaktanların erişilebilirliğini değiştiren katı malzemenin demineralizasyon adımıdan önce veya sonra gerçekleştirilebilir (Younes and Rinaudo 2015).

İzole edilmiş kitin ile ilişkili olarak yaklaşık %5-10'luk protein kalıntısı içeren kimyasal yöntemle kıyasla enzimatik yöntemlerin etkinliği daha düşüktür. Bu nedenle izole edilmiş kitin daha sonra saflığını arttırmak ve yapısını korumak için ek bir NaOH'le muamele (düşük miktarda ve kısa süreli) edilebilir (Younes and Rinaudo 2015).

Birçok çalışmada, deproteinizasyon aşamasında bakteriyal proteazların uygulandığı görülmektedir. Örneğin, Synowiecki and Al-Khateeb (2000) kitin ve besin açısından değerli protein hidrolizatlarının üretimi için önceden demineralize edilmiş karides atıklarına enzimatik deproteinizasyon uygulamıştır. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen bir serin endopeptidaz olan Alkalaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen deproteinizasyonun etkinliği, kitin molekülüne bağlı kalıntı peptidlerin ve aminoasitlerin varlığı ile sınırlandırılmıştır. Bu yöntem, yaklaşık %4 protein safsızlığı içeren kitin izolasyonuna imkan verir ve bu saflık, kitinin tıbbi olmayan birçok uygulaması için yeterlidir.

1.5.2.b. Fermantasyon

Enzimlerin kullanım maliyetini azaltmak için endojen mikroorganizmalar veya seçili mikroorganizma türlerinin eklenmesiyle elde edilen fermantasyon işlemi ile deproteinizasyon gerçekleştirilebilir. Fermantasyon işlemi; laktik asit ve non-laktik asit

(laktik asit dışında organik asit sentezleyen fermantasyon) fermantasyonu şeklinde ikiye ayrılabilir (Younes and Rinaudo 2015).

Kabuklu atıklarının demineralizasyonu laktik asit bakterileri ile ortamda glukoz, laktoz, sükroz veya dekstroz gibi bir karbon kaynağının, organik asitlerin ve çeşitli tuzların eklenmesiyle gerçekleştirilebilir. Deproteinizasyon işlemi için de *Pseudomonas aeruginosa* (Wang and Chio 1998), *Pseudomonas maltophilia* (Shimahara *et al.* 1984), *Candida parapsilosis* (Chen 2001), ve *Bacillus subtilis* gibi proteaz üreten mikroorganizmalar kullanılabilir. Ayrıca *Lactobacillus plantarum* gibi hem deproteinizasyon hem de demineralizasyon veriminin yüksek olduğu mikroorganizmaların kullanımıyla her iki basamak da aynı ortamda gerçekleştirilebilir (Rao *et al.* 2000).

Kabuklu dış iskeletinden fermantasyon yolu ile kitinin eldesinde birçok mikroorganizma türü ileri sürülmüştür. Laktik asit fermantasyonu için *Lactobacillus* sp., non-laktik asit fermantasyonu için *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pediococcus* sp. ve ko-fermantasyon için *Lactobacillus lactis*, *Teredinibacter turnerae*, *Bacillus licheniformis* gibi türler kitin ekstraksiyonunda çalışılmıştır (Arbia *et al.* 2013).

Laktik Asit Fermantasyonu

Karides atıklarının laktik asit bakterileri kullanılarak fermantasyonu, ham kitin içeren katı bir fraksiyonun ve protein, mineral ve pigment bakımından zengin bir sıvı fazın üretilmesiyle sonuçlanır (Fagbenro 1996). Karides kabuklarından kitinin geri kazanımında laktik asit fermantasyonu için *Lactobacillus* türleri seçilir. Laktik asit glukozun parçalanması sonucu oluşur ve bu olay sırasında ortam pH'sı azaltılarak mikroorganizmaların gelişimi baskılanmaktadır. Laktik asit, kabukta bulunan kalsiyum karbonat ile reaksiyona girerek çökelti oluşturan ve yıkanarak ortamdan uzaklaştırılabilen kalsiyum laktata dönüşmesini sağlar. Atığın deproteinizasyonu mikroorganizmalardaki proteolitik enzimlerin aktivitesiyle gerçekleştirilir. Laktik asit bakterilerinin kullanıldığı fermantasyonun etkinliği, inokulum miktarı, karbon kaynağı konsantrasyonu,

fermantasyonun başlangıç pH'sı ve fermentasyon boyunca pH'daki değişim ile fermentasyon süresi gibi faktörlere bağlıdır (Rao *et al.* 2000; Oh *et al.* 2007; Prameela *et al.* 2010).

Fermente edilmiş karides kabuklarında demineralizasyon etkinliğini arttırmak amacıyla *Pediococcus* sp. türü kullanılarak sükroz konsantrasyonu ve başlangıç pH değeri test edilebilmektedir. Yüksek sükroz konsantrasyonunda demineralizasyon derecesinin arttığı, aynı zamanda demineralizasyon derecelerinin pH 7'de yaklaşık %83, pH 6'da ise %68 olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Sükroz konsantrasyonu 50 g/l). Bu verilere göre başlangıç pH'nın demineralizasyon verimi üzerindeki etkisi belirlenmiştir (Choorit *et al.* 2008).

Kitin ekstraksiyonunda üç farklı laktik asit bakteri suşunun, karides atıklarının fermentasyon verimi üzerine etkisi incelenerek kimyasal ekstraksiyon ile karşılaştırmaları yapılmaktadır. Kimyasal metoda kıyasla mikrobiyal ekstraksiyonun daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca, seçilen üç *Lactobacillus* türü ile gerçekleştirilen mikrobiyal ekstraksiyonda kitin veriminde önemli bir farklılıklar vardır (Khanafari *et al.* 2008).

Non-Laktik Asit Fermentasyonu

Non-laktik asit fermentasyonunda *Bacillus* sp. (Yang *et al.* 2000), *Pseudomonas* sp. (Oh *et al.* 2007) ve *Aspergillus* sp. (Mahmoud *et al.* 2007) gibi hem bakteriler hem de mantarlar kullanılabilir.

Kitin ve kitosan üretimi için *Bacillus subtilis* bakterileri kullanıldığında fermentasyon sonrası karides kabuklarından proteinin yaklaşık %84'ü, minerallerin ise %72'si uzaklaştırılabilmektedir. Yapılan çalışmalara göre, kitinin standart kalitede üretimi için fermentasyon sonrasında protein kalıntıları ve mineralin uzaklaştırılmasında ilave olarak düşük konsantrasyonda alkali ve asit muamelesi gerektirdiği sonucuna varılmaktadır (Sini *et al.* 2007).

Karbon kaynağı olarak farklı glukoz konsantrasyonlarında ve yengeç kabuğunun farklı partikül boyutlarında DM (demineralizasyon) ve DP (deproteinizasyon) etkinliği *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi ile incelendiğinde laktik, süksinik ve sitrik asit gibi organik asitlere ilaveten kültür ortamında bakterinin yüksek proteaz aktivite sergilediği gözlenmektedir. Aynı zamanda, optimal inkübasyon sıcaklığında DM etkinliğinin, glukoz konsantrasyonuna ve kültür ortamındaki pH düşüşüne bağlı olduğu ortaya konulmaktadır (Oh *et al.* 2007).

Yüksek kalitede kitin eldesinde en önemli iki parametre, maksimum proteaz ve minimum kitinaz aktivitedir. Kabuklu atıklarının DP etkinliği ve yüksek kalitede kitin üretimi için *Bacillus licheniformis* suşlarının genetik gelişimleri üzerine yapılan çalışmada, *B. licheniformis* F11 yabanıl tipi büyük miktarlarda proteolitik enzimler üretmenin yanı sıra çok düşük kitinaz aktivite göstermektedir. Genetik olarak değiştirilmiş *B. licheniformis* suşları elde edilip (*B. licheniformis* F11.1, *B. licheniformis* F11.2, *B. licheniformis* F11.3, *B. licheniformis* F11.4) çalışıldığında ise bu varyantların karides kabuklarından yüksek molekül ağırlıklı kitin ekstrakte ettiği görülmektedir. En iyi sonuç, kitinaz aktivitenin tamamen ortadan kaldırıldığı ve uzun zincirli kitin ve kitosan üretiminde güçlü bir araç olduğu görülen F11.4 çift mutandı ile gerçekleştirilmiştir (Hoffmann *et al.* 2010).

Kitin ekstraksiyonunda mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik yöntemler kimyasal yöntemle kıyaslandığında daha basit, daha verimli ve çevre dostudur. Yine de mikrobiyal fermentasyonun, kimyasal yöntemle kıyasla daha uzun işlem süresi, proteazların daha zayıf erişilebilirliği (yüksek protein kalıntılarına sebep olan minerallerin varlığından kaynaklı) gibi dezavantajları vardır. Yine de, özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanıma uygun olabilmesi için deproteinizasyon oranı iyileştirilebilir. Bu, iki aşamalı fermentasyon veya mikroorganizmaların birlikte fermentasyonu (kofermantasyon) gibi eşzamanlı veya ardışık işlemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Daha yüksek saflıkta kitin elde etmek için biyoteknolojik işlemler, protein ve mineral kalıntılarını uzaklaştırmada düşük oranda kimyasal uygulaması ile desteklenebilir (Younes and Rinaudo 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde, yaptığımız yüksek lisans tezine benzer şekilde, karides kabuğundan mikrobiyal yolla kitin ve kitosan eldesine dair yapılan çalışmaların özetleri bulunmaktadır. Aynı zamanda, karşılaştırma yapabilmek adına farklı kabuklu türlerinden ve mantarlardan mikrobiyal yolla kitin eldesi, kitin verimini arttırabilmek için uygulanan optimizasyon denemeleri ve mikrobiyal metottan farklı olarak enzimatik deproteinizasyonla gerçekleştirilen kitin ekstraksiyonuna da değinilmiştir.

Rao and Stevens (2005) çalışmalarında, 3 dm³'lük iç hacme sahip yatay reaktörde *Lactobacillus plantarum* 541 bakterisi kullanılarak, karideslerin kafa ve kabuk kısımlarından fermantasyon yolu ile kitin eldesi incelenmiştir. Kafa ve kabuktan elde edilen ham kitin verimleri kimyasal yöntemle elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, sırasıyla %4,5 ve %13 olarak bulunmuştur. Karides kafasının biyolojik ekstraksiyonunda deproteinizasyon verimi %83, demineralizasyon verimi %88 iken karides kabuklarında bu verim değerleri sırasıyla %66 ve %63 olarak belirlenmiştir. Her iki durumda da elde edilen sıvı kısım, yüksek miktarda esansiyel amino asit içeriği sebebiyle insan tüketimi için protein tozu üretme potansiyeline sahiptir. Ardından ham kitin saflaştırılmış ve 12,5 M NaOH kullanılarak kitosana dönüştürülmüştür. Elde edilen kitosanın, kalıntı protein ve kül içerikleri %1'in altında, çözünürlüğü %98'den fazla, viskozitesi 50-400 cP aralığında ve deasetilasyon derecesi %81-84 olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığı ise (0,8-1,4)x10⁶ Da aralığındadır. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)) analizlerine göre, fermantasyon yoluyla elde edilen kitosanın, kimyasal metotla elde edilen kitosana benzer özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

Khanafari *et al.* (2008) tarafından yapılan çalışmada karides kabuğu atığından hem mikrobiyal hem de kimyasal yolla kitin ve kitosan ekstrakte etmiştir. Kimyasal yolla kitin ve kitosan ekstraksiyonunda verim sırasıyla 510 ve 410 mg/g'dır. Mikrobiyal yolla deproteinizasyon yapılmış karides kabuklarında, probiyotik bakterilerin demineralizasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre, karides

kabuklarının demineralizasyonunda laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus plantarum* (PTTC 1058)) etkinliğinin, ekstra nitrojen kaynağı olarak $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 'ün eklenmesi durumunda kimyasal metoda kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (1750'ye karşı 810 mg/g).

Yapılan başka bir çalışmada, Prameela *et al.* (2010) doğal probiyotikler kullanarak karides atıklarından kitin ve karotenoid üretimini gerçekleştirmiştir. Fermantasyon çalışmaları, %1-10 arasında inokulum seviyesi, %0-15 glukoz konsantrasyonu ve 0-72 saat inkübasyon süresinde denenmiştir. Maksimum pH düşüşü (3.01) ve toplam titre edilebilir asitlik artışı (2,715), %5 inokulum seviyesi, %15 glukoz konsantrasyonu ile 72 saatlik inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Aynı zamanda, doğal probiyotikler tarafından gerçekleştirilen kitin üretiminde (deproteinizasyon ve demineralizasyon etkinliğinde belirtildiği gibi) ve karotenoidlerin geri kazanımında fermantasyonun etkisi de araştırılmıştır. Probiyotiklerin kullanımıyla karides atıklarının fermantasyonunda %89 deproteinizasyon ve %69 demineralizasyon verimleri elde edilmiştir. Karides atıklarından elde edilen karotenoid ve kitin verimi sırasıyla %72,6 ve %5,65'dir. Çalışma sonuçlarına göre, kitin ve karotenoid ekstraksiyonunda zararlı kimyasal yöntemle alternatif bir proses olarak doğal probiyotiklerin kullanıldığı çalışmalar, daha etkili ve ekonomiktir.

Phuvasate and Su (2010) çalışmalarında, karides atıklarından kitosan eldesi için kitinin fermantasyon yoluyla demineralizasyonunda laktik asit bakterilerinin karışık kültürünü (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus lactis*) kullanmışlardır. 30°C sıcaklıkta 72 saatte laktik asit bakterilerinin fermantasyonuyla ya da oda sıcaklığında 2 saat 1 M laktik asit uygulamasının ardından alkali muamele (25°C sıcaklıkta 4 saat 0,5 M NaOH ardından 70°C'de 10 saat 12,5 M NaOH uygulaması) ile karides atıklarından elde edilen kitosan, HCl asit uygulamasıyla elde edilen kitosan ile karşılaştırıldığında aynı çözünürlükte (%100), daha düşük protein (%0,8-1,1) ve kül (%<0,01) içeriğinde olduğu belirlenmiştir. Hem laktik asit fermantasyonunun hem de laktik asit uygulamasının, güçlü kimyasalların kullanımını azaltmak için karides

atıklarından kitosan üretiminde kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Bir diğer çalışmada, Pacheco *et al.* (2011) dolgu yataklı reaktörde karides atıklarından (*Litopenaeus vannameii*) laktik asit fermantasyonu ile biyolojik yolla kitin üretimini gerçekleştirmiştir. 96 saat sonra maksimum demineralizasyon ve deproteinizasyon verimleri sırasıyla %92 ve %94 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda bu prosedür, atıktan gram başına 2400 µg'a kadar yüksek seviyede astaksantin geri kazanımını sağlamaktadır. Kitin eldesi, karşılaştırma amacıyla karides atıklarından asit ve alkali uygulamasıyla, kimyasal yolla da ekstrakte edilmiştir. Kimyasal olarak ekstrakte edilen kitine kıyasla biyolojik yöntemle elde edilen kitinin, daha yüksek molekül ağırlığı (1200 kDa) ve kristallik indeksine (%86) sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, biyolojik yöntemle elde edilen kitin türevlerinde, düşük deasetilasyon derecesinde (%25-40) kitinin kristal yapısının korunduğu gösterilmiştir.

Duan *et al.* (2011) çalışmalarında, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* olarak adlandırılan 3 farklı simbiyotik laktik asit bakterileri ile karides atıklarının fermantasyonunu gerçekleştirmiştir. Fermantasyon işleminde meydana gelen bileşen değişiklikleri araştırılmıştır. 8 saat içerisinde pH hızla 4,25 değerine düşmüş ve fermantasyon işlemi sırasında en düşük 3,22 pH ile laktik asit üretimi işlem sürecinde kayda değer şekilde artmıştır. Ayrıca, titre edilebilir asitlik 25 mmol/100ml'ye ulaşmıştır. 168 saatlik fermantasyondan sonra artan asidik çevre kalsiyum ve proteinlerin uzaklaştırılmasını hızlandırmış ve karides atıklarından kalsiyumun %91,3'ü, proteinlerin %97,7'si ve karotenoidlerin %32,3'ü uzaklaştırılmıştır. İlk 24 saatte glukozun yaklaşık %69,4'ü kullanılmıştır, dolayısıyla fermantasyonun ilk evrelerinde glukoz hızla tükenmektedir. Glukoz tüketiminin laktik asit bakterilerinin gelişmesi, kalsiyumun uzaklaştırılması ve titre edilebilir asitlikteki artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Khorrami *et al.* (2012) karides kabuklarından kitinin biyolojik ekstraksiyonunda laktik asit ve proteaz üreten *Lactobacillus plantarum* bakterisini kullanmışlardır. *L. plantarum*

bakterisi, karides kabuğu tozu ve melas içeren kesikli kültürde, 30°C’de inkübasyonla geliştirilmiştir. *L. plantarum* kültüründe üretilen organik asit ve proteazlar karides kabuğunun demineralizasyon ve deproteinizasyonunu gerçekleştirmiş ve bu işlemlerin yüzdesi sırasıyla %45 ve %54 olarak bulunmuştur.

Liu *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada proteaz üreticisi olarak *Bacillus licheniformis* 21886 (B. 21886) ve asit üreticisi olarak da *Gluconobacter oxydans* DSM-2003 (G. 2003) bakterilerinin ardışık kofermantasyonlarını gerçekleştirerek karides atıklarının kafa kısmındaki kitinin biyolojik ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Bu bakterilerin ayrı ayrı kültürü yapıldığında B. 21886 glukoz yokluğunda karides atıklarından proteinlerin %83,1’ini, G. 2003 bakterisinin ise minerallerin %95’ini uzaklaştırdığı belirlenmiştir. Atığın, ilk B. 21886, ardından G. 2003 ile kofermantasyonu sonucu %90,8 kitin içeriğinde deproteinizasyon ve demineralizasyon etkinlikleri sırasıyla %87 ve %93,5 bulunmuştur. G. 2003’ün tek fermantasyonuna kıyasla kofermantasyonunda üç kat daha fazla organik asit salınmaktadır ve 96 saatlik fermantasyon süresinin rapor edilen kültür döngüsünün nerdeyse yarısı kadar olduğu görülmektedir.

Ploydee and Chaiyanan (2014) karidesten daha yüksek kitosan eldesi için yaptığı çalışmada *Lactobacillus pentosus* L7 bakterisi ile fermantasyon yolunu kullanarak kitin elde etmiştir. 3,9±0,1 pH değerinde kabuktaki kalsiyum karbonat 48 saatte çözünmüştür. İşlemin ardından geriye kalan kalsiyum kalıntıları (%1,4±0,5) ve ham protein (%23,2±2,5) proteolitik *Bacillus thuringiensis* SA aktivitesiyle elimine edilmiştir. Karides kabuklarının demineralizasyon ve deproteinizasyonundan sonra karides kitinindeki kalıntı kalsiyum ve ham protein yüzdesi sırasıyla %1,7±0,4 ve %3,8±1,3 şeklindedir. Ardından kitinin deasetilasyonu için 121°C’de 5 saat, %50 NaOH ile muamele edilmiştir. Deasetilasyondan sonra kalıntı kalsiyum, ham protein ve asetilasyon derecesi sırasıyla %1,6±0,6, %0,4±0,3 ve %83,2±1,5 olarak bulunmuştur. Bu iki aşamalı biyolojik yöntemle (demineralizasyon ve deproteinizasyon) elde edilen kitinden üretilen kitosanın viskozitesi 1.007±14,7 mPa.s iken kimyasal işlemlerle ekstrakte edilen kitinden üretilen kitosanın viskozitesi 323±15,6 mPa.s’dir ve bu sonuçlara göre biyolojik olarak saflaştırılmış kitinden daha yüksek kalitede kitosan elde edilmiştir.

Neves *et al.* (2017) çalışmasında, et ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* bakterisinin fermantasyonu ile karides kabuklarından biyolojik yolla kitin ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Maksimum 72 saatlik kesikli fermantasyon ile pH ayarlaması ve yeniden inokülasyon gibi basit stratejilerin kullanıldığı proste, yaklaşık %99 deproteinizasyon ve %87 demineralizasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından %6,7'lik (ağırlık/hacim) kitinin deasetilasyonu için oda sıcaklığında 168 saat NaOH ile muamelesiyle kitosan elde edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre, elde edilen kitinin verimi kimyasal ekstraksiyondan %40 daha yüksektir ve bu çalışma, kitin biyopolimerinden elde edilecek olan kitosanın üretim prosesinde ilgi çekici bir metot olduğunu göstermektedir.

Aranday-García *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus brevis* ve *Rhizopus oligosporus* mikroorganizmaları kullanılarak karides kabuklarının fermantasyonuyla elde edilen kitinlerin, ticari biyopolimerden daha yüksek molekül ağırlığında olduğu gözlenmiştir. *L. brevis*'in *R. oligosporus* ile ardışık inokulumu sonucu ekstrakte edilen kitinin daha yüksek geçirgenlik ve asetilasyon derecesine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, sadece *L. brevis* ile ekstrakte edilen kitine kıyasla gelişmiş mekanik özellikler de sergilediği görülmüştür.

Kitin ekstraksiyonunda, deproteinizasyon ve demineralizasyon verimlerini arttırabilmek için çeşitli optimizasyon çalışmaları yapılabilmektedir.

Rao *et al.* (2000) karides atıklarından kitin üretiminde *Lactobacillus* fermantasyonunu etkileyen faktörleri belirlemek için yaptığı çalışmada, verim, farklı asitler kullanılarak pH'nın ayarlandığı fermantasyon işlemiyle test edilmiştir. Karides atıklarına %5 glukoz ilavesi laktik asit bakterilerinin büyümesini desteklemiş ve daha iyi bir fermantasyon gerçekleşmesini sağlamıştır. Başlangıç ve fermantasyon sırasındaki pH'nın kontrolü için kullanılan dört asit arasından en etkili olanların asetik asit ve sitrik asit olduğu kanıtlanmıştır. %6,7 *L. plantarum* inokulum, %5 glukoz ve asetik asitle ayarlanan pH 6'da, biyoatığın fermantasyonunda %75 deproteinizasyon, %86 demineralizasyon elde edilmiştir. Asetik asit yerine sitrik asit kullanıldığında deproteinizasyon ve

demineralizasyon verimleri sırasıyla %88 ve %90 bulunmuştur. Ancak asetik asit varlığında gerçekleştirilen fermantasyonda daha saf kitin fraksiyonları elde edilmiştir. Sonuçlara göre, karides atıklarının fermantasyonu için *Lactobacillus* ve asetik asit uygulamalarının uygun maliyetli ve çevre dostu bir prosedür oluğu sonucuna varılmıştır.

Rao and Stevens (2006) kitin üretimi için, karides atıklarının fermantasyonunu farklı tuz konsantrasyonları altında iki farklı *Lactobacillus plantarum* suşu ile incelemişlerdir. Fermantasyon, amilolitik (nişastayı enzimatik olarak parçalayabilen) *L. plantarum* A6 ve amilolitik olmayan *L. plantarum* 541 bakterileri ile çeşitli tuz konsantrasyonlarında, pH 6'da gerçekleştirilmiştir. Her iki suş da %6 tuz ilavesine kadar karides atığında kayda değer büyüme göstermiştir. Başlangıç pH'sının asetik asit kullanılarak 6'ya düşürülmesiyle, %10 inokulum ve %5 glukoz ortamında gerçekleştirilen fermantasyonda biyolojik atıkların bozulmadığı gözlenmiştir. Karides atıklarındaki mikrobiyal büyüme eğilimi, MRS-agar plakları üzerinde, değişen pH ve laktik asit üretimiyle belirlenmiştir. *L. plantarum* 541 ile gerçekleştirilen deproteinizasyon ve demineralizasyon etkinliği *L. plantarum* A6 suşuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. 541 suşunda %2 tuz konsantrasyonu altında maksimum %81,4 demineralizasyon ve %59,8 deproteinizasyon gerçekleştirilirken A6 suşunda %65,5 demineralizasyon ve %52,2 deproteinizasyon gerçekleşmiştir.

Bir diğer optimizasyon çalışmasında, Aytekin and Elibol (2010) biyolojik yöntemle karides atıklarından kitin ekstraksiyonunu farklı glukoz konsantrasyonlarında incelemiştir. Aynı zamanda, elde edilen sonuçlar, ilk olarak mineralin ardından da proteinin uzaklaştırıldığı kimyasal yöntemle karşılaştırılmıştır. Laktik asit üreticisi olarak *Lactococcus lactis* ve proteaz üreticisi olarak da *Teredinobacter turnirae* bakterileri kullanılarak farklı stratejiler denenmiştir. Öncelikle ayrı ayrı kültürleri yapıp ardından kofermantasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrı ayrı kültürlerinde *T. turnirae* daha iyi deproteinizasyon gerçekleştirirken *L. lactis* inorganik materyallerin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Her iki bakterinin kofermantasyonunda ise üç farklı protokol uygulanmıştır. En yüksek proses verimi (%95,5) *T. turnirae*'nin ilk ekiminde elde edilmiştir.

Mao *et al.* (2013) çalışmalarında, antioksidan üretimi ve kitin eldesi için *Streptococcus thermophilus* mikroorganizmasını kullanarak karides kafalarının fermantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yanıt yüzey metodolojisi optimizasyonu ile fermantasyon koşulları; pH 5,0 başlangıç değerinde, 42°C’de, 64 saatlik inkübasyon süresinde, %10 karides kafası konsantrasyonu, %5 glukoz konsantrasyonu, %1,2 (v/v) inokulum büyüklüğü şeklinde belirlenmiş ve deproteinizasyon oranı %93,59 bulunmuştur. Süpernatant sıvısındaki antioksidan aktivite fermantasyon sırasında büyük ölçüde artmıştır. Ticari kitin (CTa), *S.thermophilus* fermantasyonu ile hazırlanan kitin (CTb) ve kimyasal yöntemle hazırlanan kitinlerin (CTc) FT-IR ve XRD (X-ışını Kırınımı (X-Ray Diffraction) analizleri karşılaştırıldığında CTb’nin en yüksek deasetilasyon derecesine sahip olduğu görülmüştür.

Le and Nguyen (2014) daha önceki çalışmalarında *Lactobacillus plantarum* NCDN4 bakterisini kullanarak sterilize edilmiş karides atıklarından kitin ekstrakte etmişlerdir. Ancak büyük ölçeklerde karides atıklarının sterilizasyonu ekonomik olmayacağı için bu çalışmalarında yine *Lactobacillus plantarum* NCDN4 kullanılarak sterilize edilmemiş karides atıklarından kitin eldesi gerçekleştirilmiştir. İnokulum, glukoz konsantrasyonu, başlangıç pH’sı, NaCl konsantrasyonu ve fermantasyon süresi gibi demineralizasyonu etkileyen faktörler araştırılmıştır. %20 *L. plantarum* inokulumu, %12,5 glukoz ve pH 6’da 30°C sıcaklıkta 4 günde gerçekleştirilen fermantasyonla, %99,28 demineralizasyon, %48,65 deproteinizasyon verimleri elde edilmiştir. Fermantasyon kalıntısındaki kül ve protein içeriği sırasıyla %1,33 ve %22,46’dır. Sterilize durumla kıyaslandığında demineralizasyon ve deproteinizasyon etkinlikleri benzer bulunmuştur.

Francisco *et al.* (2015) kitin eldesi için farklı karbonhidrat kaynakları ile muamele edilen iki *Lactobacillus* türü kullanılarak karides atıklarının deproteinizasyon ve demineralizasyon etkinlikleri, kitosanın kimyasal dönüşümü ve üretilen kitin ve kitosanın kalitesi belirlenmiştir. Karbonhidrat kaynağı olarak %5 glukoz ve %5 manyok nişastası kullanıldığında, 24 saat sonra başlangıç pH’ları 6,0’dan sırasıyla 6,8’e ve 7,2’ye yükseltilmiş ve pH, uygulama süresi boyunca 6,7 ile 7,3 arasında tutulmuştur. %5 glukoz ve %5 manyok nişastasındaki en yüksek demineralizasyon, sırasıyla %82 ve %83 ile

uygulamanın ilk gününde belirlenmiştir. Deproteinizasyon ise %84,4 ile %5 manyok nişastasının üçüncü gününde en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Manyok ve glukoz kaynaklarından elde edilen kitinin protein ve mineral kalıntıları %1'in altında ve çözünürlükleri sırasıyla %59 ve %44,3 olarak belirlenmiştir. Yine aynı karbon kaynaklarından kitosan eldesinde protein içerikleri %0,05'in altında ve mineral kalıntıları ise sırasıyla %1,1 ile %0,8 olarak tespit edilmiştir. Kitosanın çözünürlüğü ve deasetilasyon derecesi glukoz konsantrasyonu için sırasıyla %56 ve %33 iken manyok nişastası için bu değerler %48 ve %29 olarak belirlenmiştir.

Karides dışında, yengeç, ıstakoz, kerevit gibi farklı kabuklu türlerinden de kitin ekstraksiyonu yapılabilmektedir.

Jung *et al.* (2007) çalışmalarında, yengeç kabuğu atığından kitinin biyolojik ekstraksiyonu için ardışık iki basamaklı fermantasyon metodunu uygulamıştır. Bu araştırmada, laktik asit bakterisi olarak *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074, proteaz üreticisi olarak da *Serratia marcescens* FS-3 bakterileri kullanılmıştır. Ardışık fermantasyonda, ilk olarak uygulanan stratejide, birinci basamakta KCTC-3074 ikinci basamakta da FS-3 bakterisi, diğer fermantasyon stratejisinde ise birinci basamakta FS-3, ikinci basamakta KCTC-3074 bakterilerinin kombinasyonu gerçekleştirilmiştir. KCTC-3074 bakterisiyle gerçekleştirilen birinci basamaktaki fermantasyonda pH 6,9'dan hızla 3,31'e düşmüştür ve 5 günde toplam titre edilebilir asitlik 10,99'a yükselmiştir. FS-3'lü ikinci fermantasyon basamağında 7.günde pH 2,82'ye ve toplam titre edilebilir asitlik 1,71'e düşmüştür. FS-3'ün kullanıldığı birinci basamakta 5 günde pH 6,9'dan 5,89'a çok az bir düşüş gösterirken toplam titre edilebilir asitlik 1,5'dir. KCTC-3074'ün eklendiği ikinci fermantasyon basamağında 7.günde pH 3,62 ve toplam titre edilebilir asitlik 8,95'dir. FS-3 ve KCTC-3074 bakterilerinin tek başına gerçekleştirdiği fermantasyonlara kıyasla farklı stratejilerle gerçekleştirilen ardışık kofermantasyonları, yengeç kabuğundan protein ve CaCO₃'ün beraber uzaklaştırılmasında en iyi sonuçları vermiştir. Bu kombinasyonla en son fermantasyonda demineralizasyon ve deproteinizasyon oranları sırasıyla %94,3 ve %68,9 olarak hesaplanmıştır.

Bir diğ er çalışmada, Das and Ganesh (2010) yengeçten kitin eldesinde kabuğ n demineralizasyonu için HCl yerine *Lactobacillus plantarum* bakterisi tarafından üretilen organik asit ve deproteinizasyon işlemi için de *Aspergillus niger*'i kullanmıştır. HCl asit ile demineralizasyonda 1:15, 1:25 ve 1:35 oranlarında asit uygulaması yapılmış ve sırasıyla %28,1, %27,35, %27,05 verimleri elde edilmiştir. Bakteriden elde edilen laktik asit de aynı oranlarda uygulandığında, verimler sırasıyla %22,6, %20,85 ve %20,15 şeklinde bulunmuştur. *Aspergillus niger*'in deproteinizasyon etkinliğı için yapılan testte, 67 U ml/1 azokazein varlığında maksimum proteolitik aktivite g sterdiğı belirlenmiştir. Bu modifiye metotla elde edilen ham kitin, %22,6-20,15 verim ile 4,52-4,03 g aralığındadır.

Flores-Albino *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada, karbon kaynağı olarak şeker kamışı melasının kullanıldığı *Lactobacillus* sp. B2'nın derin kültür fermantasyonu ile yengeç atıklarından eş zamanlı kitin ve L(+)-laktik asit üretimini gerçekleştirmişlerdir. Fermantasyon 2 litrelik karıştırmalı tankta, seçilen koşullarda yapılmış ve %34'l k kitin verimi ile %88 demineralizasyon, %56 deproteinizasyon verimleri elde edilmiştir. Aynı zamanda, üretilen laktik asit miktarı 19,5 g/l'dir (verim %77). Fermantasyonla saflaştırılan kitinin asetilasyon derecesi %95, kalıntı k l ve protein içerikleri ise sırasıyla %0,81 ve %1 0,125 olarak bulunmuştur.

Hajji *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada, proteaz üreticisi olarak belirledikleri altı *Bacillus* türü (*Bacillus subtilis* A26, *Bacillus mojavensis* A21, *Bacillus pumilus* A1, *Bacillus amyloliquefaciens* An6, *Bacillus licheniformis* NH1 ve *Bacillus cereus* BG1) ile kitin  retilimi için yengeç kabuğ  atıklarının fermantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Besiyeri olarak sadece yengeç kabuğ  içeren fermantasyon işleminde en yüksek demineralizasyon *B. licheniformis* NH1 (%83 0,5) ve *B. pumilus* A1 (%80 0,6) iken en yüksek deproteinizasyon A1 (%94 1) ardından da NH1 (%90 1,5) suşlarında belirlenmiştir. Kültür ortamına yengeç kabuğ nun yanı sıra %5 (ağırlık/hacim) glukoz ilave edildiğı zaman demineralizasyon etkinliğini önemli ölçüde, deproteinizasyon oranını ise çok az arttırdığı görülmüştür.

Chakravarty *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada ıstakoz kabuklarından kitin eldesinde organik asit üreten bakteri olarak *Lactobacillus plantarum*, proteaz aktivite için ise *Bacillus megaterium* NH21 ve *Serratia marcescens* db11 bakterilerinin ayrı ayrı ko-kültürleri denenmiş ve kabuktan deproteinizasyon-demineralizasyon etkinliklerini arttırmak için en uygun kültür koşulları belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Serratia marcescens* db11'in ko-kültürü ile gerçekleştirilen uygulamada, %87,19'luk total deproteinizasyon ve %89,59'luk total demineralizasyon ile ıstakoz kabuklarından CaCO_3 'ün ve proteinlerin en iyi şekilde uzaklaştırıldığı, böylece en yüksek kitin veriminin (%82,59) elde edildiği gözlenmiştir.

Dun *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada, *Bacillus coagulans* LA204 ve Proteinaz K kullanılarak kerevit kabuğu tozundan Ca^{+2} ve proteinlerin uzaklaştırılmasıyla kitin eldesi amaçlanmıştır. Enzim hidrolizi ve fermentasyonun eş zamanlı prosesi, non-steril şartlarda 5 litrelik biyoreaktörde, %5 (ağırlık/hacim) kerevit kabuğu tozu, %5 (ağırlık/hacim) glukoz, 1000 U proteinaz K (kerevit kabuğu tozu/g) ve %10 *B. coagulans* LA204 inokulumu ile 50°C'de gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik fermentasyondan sonra deproteinizasyon, demineralizasyon verimi ve kitin geri kazanım yüzdeleri sırasıyla %93, %91 ve %94 şeklinde belirlenmiştir. 1 mol glukoz ilavesi 0,91 mol kalsiyum karbonatın verimli bir şekilde çıkarılmasını sağlamış ve çıkarılmış proteinin %93'ü asitte çözünür proteine hidrolize edilmiştir. Bu çalışmaya göre, eş zamanlı enzim hidrolizi ve fermentasyon, biyolojik yöntemle kitin ekstraksiyonunda yeni bir strateji olabileceğini göstermiştir.

Kitin ve kitosan eldesi, sadece kabuklulardan değil, hücre duvarlarında kitin ihtiva etmeleri nedeniyle mantarlardan da gerçekleştirilebilmektedir.

Göksungur (2004) çalışmasında, hem erlenlerin çalkalamalı kültürlerinde hem de karıştırmalı fermentör tanklarında *Rhizopus oryzae* 00.4367'dan kitosan elde edilmiştir. Çalkalamalı erlen kültürlerinde, sentetik besiyeri, işlenmiş ve işlenmemiş şeker pancarı melası olmak üzere 3 farklı kültür ortamı kullanılmıştır. Fermentör tankındaki kültür ortamı ise, sentetik besiyeri ve işlem görmemiş şeker pancarı melasıdır. Genel olarak

melas ortamında, biyokütlenin yaklaşık %8-10'u, alkali çözünmez materyalin ise %32-38'i kitosan olarak ekstrakte edilmiştir. İşlem görmemiş melas ortamında elde edilen sonuçlar glukoz içeren sentetik besiyeri ile karşılaştırılmış ve en yüksek kitosan konsantrasyonu melas ortamında gözlenmiştir. Çalkalamalı kültürlerde, maksimum kitosan verimi (961 mg/ml), 40 g/ml'lik şeker konsantrasyonuna sahip işlenmemiş şeker pancarı melası ortamında elde edilmiştir. Havalandırma oranı, çalkalama hızı ve şeker konsantrasyonu faktörlerinin fermentör tankında kitosan üretimi üzerine etkilerini ortaya koyabilmek için yanıt yüzey metodolojisi kullanılmış ve bu değişkenlerin optimum değerleri belirlenmiştir. Bu optimum değerler üzerinden fermentör tankında maksimum 1109,3 mg/ml kitosan elde edilmiştir. Bu çalışma, fermantasyon işlemi için alternatif kültür ortamı olarak melasın kullanımı üzerine yapılan ilk detaylı çalışma olup pilot ve endüstriyel ölçekli denemeler için daha fazla çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmaktadır.

Gachhi and Hungund (2018) çalışmalarında *Rhizopus oryzae* (NCIM 877)'den kitin ve kitosanın iki fazlı ekstraksiyonunu araştırmışlardır. Gerekli karbon kaynağı, pH ve biyokütle gibi optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve 9 günlük inkübasyondan sonra maksimum kitosan verimi (0,288 g/l) elde edilmiştir. Deasetilasyon aşaması sülfürik asit uygulamasıyla modifiye edilerek kitin ve kitosan verimi geliştirilmiştir (117 mg/g'dan 367 mg/g'a). Kitin ve kitosanın karakterizasyon çalışmaları FT-IR ve XRD metodları kullanılarak belirlenmiştir. XRD sonuçlarına göre, ekstrakte kitinin kitosana kıyasla daha kristalin yapıda olduğu görülmüştür. Kitin ve kitosanın deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı ve viskozitesi, yapılan çalışmalarda standarda kıyasla daha üstün bulunmuştur. Ekstrakte edilen kitosanın antioksidan özelliği incelendiğinde yüksek molekül ağırlığı sebebiyle karides kitosana kıyasla daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Kitinin biyolojik ekstraksiyonunda, fermantasyon yolu dışında deproteinizasyon basamağının iyileştirilebilmesi adına enzimatik yöntemlerde denenmiştir.

Younes *et al.* (2012) çalışmalarında, karides kabuklarından kitin ekstraksiyonunda farklı proteaz enzimlerini uygulamışlardır. *Bacillus mojavensis* A21 ile deproteinizasyonda en uygun enzim/substrat oranı, sıcaklık ve inkübasyon süresini belirlemek için üç değişkenli ve üç seviyeli bir deney tasarımı kullanılmıştır. Optimal şartlar, 60°C sıcaklıkta 6 saatlik inkübasyon süresi ve 7,75 U/mg'lik enzim/substrat oranı şeklinde belirlenmiştir. Deneysel olarak optimize edilmiş bu şartlarda gerçekleştirilen demineralizasyon verimi, literatürde verilen değerlerden daha yüksek olup 88 ± 5 olarak belirlenmiştir.

Bir diğer çalışmada ise, Younes *et al.* (2014) karides işletmeciliği yan ürünlerinden, enzimatik deproteinizasyon aracılığıyla kitin eldesi için farklı mikrobiyal ve balık iç organ proteazlarının deproteinizasyon verimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. 20 U/mg enzim/substrat oranı kullanılarak 45°C'de 3 saat hidrolizden sonra en yüksek seviyede protein uzaklaştırması *Bacillus mojavensis* A21 ve *Balistes capriscus* proteazlarında sırasıyla 77 ± 3 ve 78 ± 2 şeklinde belirlenmiştir. Bu nedenle, bu iki proteaz kitin ekstraksiyonunda ve N-deasetilasyonla kitosan üretiminde ayrı ayrı kullanılmıştır. Elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin karakterizasyonu yapılmış ve kimyasal deproteinizasyon yoluyla elde edilen örneklerle karşılaştırılmıştır. Bütün kitin ve kitosanlar benzer spektrumlar sergilemiştir. Enzimatik yolla hazırlanan kitosanlar hemen hemen aynı asetilasyon derecesine sahiptir fakat kimyasal prosesle elde edilenle kıyaslandığında molekül ağırlıklarının daha yüksek olduğu görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılan karides kabukları, İstanbul'dan restoran atığı olarak temin edildi.

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmada aşağıdaki cihaz ve aletlerden faydalanılmıştır.

Buzdolabı	: Vestel
Steril Kabin	: Telstar Bio-II-A
Otoklav	: HMC Hirayama
UV-Spektrofotometre	: Beckman Coulter
Elektroforez Güç Kaynağı	: Thermo EC135-90
PCR cihazı	: Sensoquest Labcycler
Görüntüleme Sistemi	: Quantum Vilber Lournat
Santrifüj	: Hettich
Hassas terazi	: Ohaus Pioneer
Vortex	: Wisemix VM-10
pH metre	: Mettler-Toledo
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph
Otomatik pipet	: Eppendorf
Blender	: Waring
Etüv	: BINDER
Çalkalamalı İnkübatör	: ZHWY 2102C
Saf su cihazı	: MP Minipure
Mikroskop	: BOECO

3.1.2. Deneyisel Çalışmalarda kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanması

3.1.2.a. Lowry protein analizinde kullanılan çözeltiler

1 N NaOH Çözeltisi: 40 g sodyum hidroksit (NaOH (Sigma)) tartılıp 1 litre distile suda çözdürüldü.

0,1 N NaOH Çözeltisi: 4 g NaOH tartıldı ve 1 litre distile suda çözdürüldü.

0,8 N NaOH Çözeltisi: 32 g (0,8 mol) NaOH 1 litre distile suda çözdürüldü.

Lowry Reaktifi A: 0,2 g sodyum tartarat (Merck) ve 10 g sodyum karbonat (Sigma) tartıldı ve 55 ml 1 N NaOH içinde çözdürülüp toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Lowry Reaktifi B: 2 g sodyum tartarat ve 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 100 ml 0,1 N NaOH içinde çözdürüldü.

Lowry Reaktifi C: Ticari Folin&Ciocalteu fenol reaktifinin (Sigma) distile suya 1/2 oranında (v/v) katılmasıyla taze olarak hazırlandı.

3.1.2.b. Kjeldahl azot tayininde kullanılan çözeltiler

Derişik Süfürik asit çözeltisi: %96 saflıktaki H_2SO_4 kullanıldı.

1 N HCl çözeltisi: 8 ml HCl, 992 ml distile su ile karıştırıldı.

%40'lık NaOH çözeltisi: 400 g NaOH, 1 litre distile suda çözdürüldü.

%4'lük Borik asit çözeltisi: 40 g Borik asit (Merck) 1 litre distile suda çözdürüldü.

3.1.2.c. Bakteri izolasyonu için kullanılan çözeltiler

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

3.1.2.d. Enzim aktivitelerinde kullanılan çözeltiler

- **Proteaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**

0,1 M Tris/HCl tamponu (pH:7): 3 g Tris (Sigma) 250 ml'den daha düşük distile su içerisinde çözündürüldü ve HCl asit ile pH 7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim distile suyla 250 ml'ye tamamlandı.

0,11 M Trikloroasetik asit (TCA): 4,5 g TCA (Sigma) tartılıp 250 ml distile suda çözündürüldü.

%0,65'lik kazein çözeltisi: 0,65 g kazein (Sigma) 100 ml 0,1 M Tris/HCl (pH:7)'de çözündürüldü.

0,5 M Sodyum karbonat (Na_2CO_3): 13,25 g sodyum karbonat 250 ml distile suda çözündürüldü.

0,5 M Folin&Ciocalteu fenol reaktifi: Doğrudan 0,5 M'lık folin reaktifi kullanıldı.

- **Kitinaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**

0,2 M Sodyum fosfat tamponu (pH:7): 6 g sodyum fosfat (Sigma) 250 ml'den daha az distile suda çözündürülüp pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra toplam hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

%0,1 kitin-azure: 0,05 g kitin azure (Sigma) 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH:7) ile karıştırıldı.

3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

Tryptone Soy Agar (TSA) Besiyeri: 37 g TSA (LabM) 1 litre distile suda çözdürüldü ve otoklavda steril edildi.

Tryptone Soy Broth (TSB) Besiyeri: 30 g TSB (LabM) 1 litre distile suda çözdürüldü ve otoklavda steril edildi.

Bakteri İzolasyonu için Topraklı Besiyeri: 0,1 g toprak örneği, 0,5 g glukoz, 0,5 g karides kabuğu ve 100 ml distile su ile karıştırıldı.

Luria Bertani (LB) Agar: 35 gr Luria Bertani Agar besiyeri 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra otoklavda steril edildi.

Kabuklu Besiyeri (5 g/l Glukoz): 0,25 g karides kabuğu, 0,25 g glukoz ve 50 ml distile su karıştırılıp otoklavda steril edildi.

3.1.4. Bakterinin moleküler analizi için kullanılan çözeltiler

50 mM, pH:8 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi: 1,46 g EDTA 90 ml distile suda çözdürüldü ve pH 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

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

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

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

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

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

- **Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler**

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

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

3.2. Yöntemler

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

3.2.1. Karides kabuğunun kurutulması ve toprak örneklerinin toplanması

İstanbul'dan restoran atığı olarak temin edilen yaş karides kabukları 90°C'ye ayarlanmış olan etüvde 2 gün boyunca kurutuldu. Kurutulan karides kabukları blender ile öğütülerek toz haline getirildi.

Erzurum-Üniversite, Erzurum-Şükrüpaşa, Erzurum-Yıldızkent, Erzurum-Horasan, Iğdır, Trabzon, Samsun, Aksaray, Gaziantep, Antalya, Muğla, Balıkesir ve İstanbul şehirlerinde yüzeyden 10 cm derinlikte toprak örnekleri alınıp örnek kaplarına toplandı.

3.2.2. Toprakta bakteri izolasyonu

Farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinden bakteri izolasyonu için topraklı besiyeri hazırlanarak 30°C'de, 150 rpm'de 4 gün çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besiyerleri %0,9'luk tuz çözeltisiyle 6 kat seyreltilerek son seyreltme tüpünden 800 µl katı besiyerine (TSA) aktarıldı. İki gün oda sıcaklığında kolonilerin gelişmesi beklendi. Ardından katı besiyerinde gelişen karışık kültürde, morfolojik olarak farklı olduğu düşünülen bakteriler yeni katı besiyerine aktarılıp saflaştırma yapıldı. Daha sonra saf petri 30°C'lik etüvde 2 gün inkübasyona bırakılarak kolonilerin gelişmesi sağlandı. Yeterli inkübasyonun ardından petri parafilmle sarılarak +4°C'de saklandı.

3.2.3. Saflaştırılan bakterilerde proteaz ve kitinaz aktivite tayini

Proteaz ve kitinaz enzim aktivitelerini belirlemek için öncelikle kabuklu besiyeri hazırlandı ve topraktan saflaştırılan bakterilerin ekimi yapıldı. 30°C'de 2 gün 150 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 2. günün sonunda bakterilerin geliştiği sıvı besiyerinden 2 ml falcon tüplere alınarak 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant, enzim çözeltisi olarak kullanıldı ve aktiviteler belirlendi.

Proteaz aktivite tayini, Yildirim *et al.* (2017) tarafından gerçekleştirilen, substrat olarak kazeinin kullanıldığı yönteme göre yapıldı. 0,5 ml enzim çözeltisine 100 mM Tris-HCl (pH:7) tampon çözeltisiyle hazırlanan %0,65'lik kazein çözeltisinden 2,5 ml eklendi ve tüpler 30 C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Bakterinin ekilmediği kontrol besiyeri k r olarak kullanıldı. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 110 mM TCA çözeltisinden 2,5 ml eklendi. Tüpler 30 C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatanttan 1 ml alınarak yeni tüplere aktarıldı.  zerine 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisinden 2,5 ml, 0,5 M Folin-Ciocalteu reaktifinden ise 0,5 ml eklendi. 37 C'de 30 dakika inkübasyonun ardından spektrofotometrede 660 nm'de k re karşı absorbans ölçüldü.

Kitinaz aktivite tayini Ramirez *et al.* (2004) tarafından yapılan yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. 1 ml enzim çözeltisi  zerine 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH:7) ile hazırlanan %0,1'lik kitin-azire çözeltisinden 1 ml eklendi ve 30 C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakterinin ekilmediği kontrol besiyeri k r olarak kullanıldı. İnkübasyonun sonunda tüpler 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve 595 nm'de spektrofotometrik olarak k re karşı absorbans ölçüldü.

Spektrofotometreden elde edilen absorbans değerlerine göre saflaştırılan bakteriler içerisinde çalışmanın amacına göre maksimum proteaz ve minimum kitinaz aktiviteye sahip olan BAT-1 kodlu bakteriden, sekans analizi için DNA saflaştırması ve klonlama çalışmaları yapıldı.

3.2.4. Karides kabuğunun içerik analizi

Ekstraksiyon işlemi öncesinde kullanılan başlangıç kabuğunun içerik analizi yapıldı. Aynı şekilde, biyolojik kitin ekstraksiyonu için besiyerine eklenen karides kabukları uygun inkübasyon süresinin sonunda mikrobiyal gelişimin gerçekleştiği sıvı besiyerinden süzülerek sıvı fazdan ayrıştırıldı. Elde edilen katı kısım 90 C'de 12 saat kurutuldu. Kurutulan kabuk üzerinden içerik analizleri yapıldı ve başlangıç kabuğu içerikleri baz alınarak %DP, %DM ve kitin verimleri (%) hesaplandı.

3.2.4.a. Lowry yöntemi ile karides kabuğunda protein analizi

Protein tayini için kullanılan Lowry yönteminin esası, folin reaktifinin aromatik aminoasitlerle indirgenmesine dayanmaktadır. Yöntemin hassasiyeti 1-200 μg 'dır (Lehninger *et al.* 2005). Çalışmada standart olarak BSA (Bovine serum albumin) çözeltisi kullanıldı (0,5 mg/ml). Standartların hazırlanışı Çizelge 3.1'de verilmiştir. Reaktif karışımı için 25 ml 0,8 N NaOH, 18 ml Lowry reaktifi A ve 2 ml Lowry reaktifi B karıştırıldı.

Çizelge 3.1. Lowry protein analizi için standart çözelti

	BSA Çözeltisi (μl)	Distile Su (μl)	BSA Derişimi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Std 1	0	600	0
Std 2	20	580	16,7
Std 3	50	550	41,7
Std 4	100	500	83,3
Std 5	200	400	166,7
Std 6	300	300	250
Std 7	400	200	333,3

Karides kabuğu katı olduğundan kabuk içeriğinde bulunan proteinin sıvı ortama aktarılması için 0,1 g kurutulmuş olan kabuktan tartılıp 60°C'de 3 saat 10 ml 1 N NaOH çözeltisiyle muamele edildi ve bu sayede proteinlerin sıvı kısma geçmesi sağlandı. 3 saat sonra örnekler süzülerek sıvı kısım 100 kat seyreltildi. Ardından protein analizine geçildi. Yöntemin protokolü Çizelge 3.2'de verildiği gibi gerçekleştirildi (Robyt and White 1987).

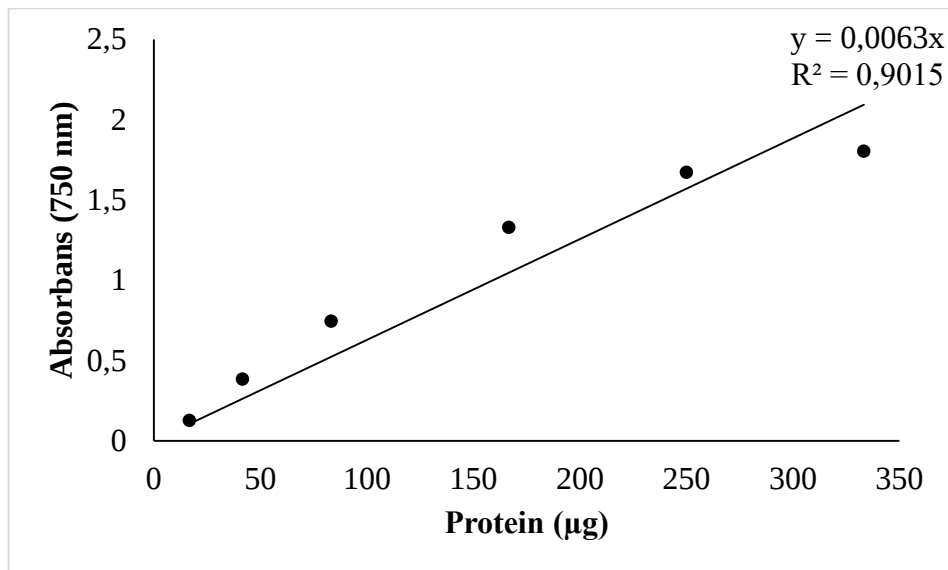
Çizelge 3.2. Lowry protein tayin yöntemi

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Örnek
%24'lük TCA çözeltisi (µl)	240	240	240	240	240	240	240	240
Hızlıca vortexlenip, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant döküldü ve tüpler süzgeç kağıdına ters çevrilip 1-2 dakika kurutuldu.								
Reaktif Karışımı (µl)	450	450	450	450	450	450	450	450
Lowry Reaktifi C (µl)	300	300	300	300	300	300	300	300

Lowry Reaktifi C, 1-2 dakika zaman aralığıyla 2 kez eklenip karıştırıldı.

30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi ve 750 nm'de köre karşı absorbens ölçüldü (1 numaralı standart kör olarak kullanıldı)

Hazırlanan standart çözeltilerinden ölçülen absorbens değerlerinin protein konsantrasyonlarına karşı grafiği çizilerek standart eğri denklemi elde edildi (Şekil 3.1) ve protein analizine ait veriler bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Ayrıca, ekstraksiyon işlemi ile gerçekleştirilen protein gideriminin ortaya koyulması için Besiyerinden geri alınan kabuktaki kalıntı protein miktarı da belirlenerek başlangıç kabuğundaki protein içeriğine göre ekstraksiyon sonrası deproteinizasyon yüzdeleri (%DP) hesaplandı.



Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart eğri grafiği

3.2.4.b. Kül tayini

Kül tayininde kullanılacak olan krezeler, 8 saat kromik asit içerisinde bekletildi. Ardından krezeler yıkandı ve 12 saat 85°C'ye ayarlanan etüvde bekletildi. Böylece krezede bir önceki numuneden kalan kalıntılar uzaklaştırıldı. Kurutulmuş krezelerin boş tartımları yapılarak kaydedildi. Daha sonra krezelere, başlangıç ve ekstraksiyon sonrası besiyerinden geri alınıp kurutulan örneklerden 0,5 g koyularak 550°C'de 3 saat bekletildi ve böylece örneğin içerisindeki organik bileşikler uzaklaştırılarak kül elde edildi. Kül fırınından çıkarılan krezeler pens yardımıyla dikkatlice desikatöre alınarak soğumaya bırakıldı. Soğuyan krezelerin tartımları kaydedildikten sonra örneklerin kül yüzdeleri ve %DM oranları hesaplanarak başlangıç kabuğundan mineral giderim yüzdeleri ortaya koyuldu.

3.2.4.c. Kjeldahl yöntemi ile azot tayini

Kjeldahl yöntemi yaş yakma, distilasyon ve titrasyon olmak üzere üç aşamalı bir yöntemdir. Yaş yakma ünitesinde, cihazın makro tüpleri içerisine analizi yapılacak olan kabuk örneklerinden 1 g koyuldu. Ardından, üzerine en az 20 ml olacak şekilde derişik sülfürik asit ve 1 tablet kjeldahl katalizörü eklendi. 430°C'de en az 3 saat yakıldı ve yakma işleminden sonra numuneler soğumaya bırakıldı. Daha sonra tüplerin üzerine 50 ml distile su dikkatlice eklenerek reaksiyon durduruldu. Cihazın distilasyon-titrasyon düzeneğine tüpler yerleştirildi ve 50 ml NaOH, 80 ml H₃BO₃ eklendi. NaOH ile reaksiyona girdikten sonra açığa çıkan amonyak gazı distilasyon düzeneğinde yoğunlaşarak borik asitin olduğu reaksiyon kabına toplandı. Çözeltide meydana gelen pH değişimini dengelemek için HCl asit çözeltisiyle geri titrasyon yapılarak harcanan asit miktarı kaydedildi. Titrasyon işleminde harcanan asit miktarından numune içerisindeki azot yüzdesi belirlendi.

3.2.5. Bakteriden genomik DNA izolasyonu

- TSB sıvı besiyerinde ön kültürü yapılan BAT-1 bakterisinden 2 ml eppendorf tüpüne alındı ve 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüplerin üst fazı dökülerek altta kalan pellet üzerine 480 µl 50 mM EDTA (pH=8) eklenip pipetaj yapıldı.
- Ardından bu karışımın üzerine 120 µl 10 mg/ml lizozim eklenerek iyice karışması sağlandı ve 30°C’de 1 saat süre ile inkübe edildi.
- Karışım 2 dk süreyle 13000 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Daha sonra tüplerin üzerine 600 µl Nükleer Lizis Solüsyonu eklenerek, pipetajlandı.
- Karışım 80°C’de 5 dk süre ile inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğuması beklendi.
- Karışımın üzerine 3 µl RNase A eklenerek rak alt üst edildi ve 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Karışımın tekrar oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve üzerine Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklenerek 20 saniye süre ile vortexlendi. Ardından 5 dk buzda bekletildi.
- Örneklerle 30 saniye süre ile 13000 rpm’de çöktürme işlemi uygulandı.
- Bir sonraki adımda süpernatant 600 µl izoproponal bulunan yeni eppendorf tüplerine aktarıldı ve tüplerde pellet oluşuncaya kadar eppendorflar alt üst edildi.
- Tüpler 13000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice döküldü. Eppendorflara %70’lik etil alkol (EtOH)’den 600 µl eklenip yavaşça alt üst edilerek 13000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi.
- Tüplerdeki üst faz dökülerek etanol tamamen uzaklaşuncaya kadar 37°C’de 15-20 dk boyunca inkübe edildi.
- Tüplerin üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu ilave edildi ve 1 saat süre ile 65°C’de inkübasyona bırakılarak içlerinde genomik DNA bulunan eppendorf tüpler kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

3.2.6. 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizi

Bakterilerde tür tespiti için genellikle genomik DNA'dan elde edilen 16S rRNA gen bölgesi filogenetik bilgi sağlamada kullanılmaktadır. Bu amaçla bakteriden genomik DNA izolasyonu aşamasından sonra PCR ile 16S rRNA gen bölgesi evrensel primerler kullanılarak amplifiye edildi.

Çizelge 3.3'de verilen reaktif miktarlarına göre PCR reaksiyon karışımı hazırlandı ve Çizelge 3.4'de verilen PCR protokolüne göre gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi (Adıgüzel 2006).

Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı

Reaktif	Miktar (µl)
PCR Buffer (Sigma)	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
Primer 1	3
Primer 2	3
Taq DNA Pol.	0,3
DMSO	1,2
ddH ₂ O	12,1
Kalıp DNA	5

Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR Programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	-

3.2.7. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %1'lik agaroz hazırlanıp mikrodalgada 2-3 dk kaynatıldı. Daha sonra jelin ilk sıcaklığı gittikten sonra etidyum bromür eklendi ve tarakların yerleştirildiği elektroforez tankına dökülerek donması beklendi. Elektroforez tankı uygun seviyeye kadar 1X TAE ile dolduruldu. Jelin ilk kuyusuna DNA markırı (New England Bio Labs, N0550S) olarak 10 kb'lık markır yüklendi (100-10000 baz çifti). Her bir örnek için 1 µl 6X yükleme tamponu ve 4 µl 16S rRNA PCR ürünü pipetle karıştırılarak jele yüklendi. 75 voltta 50 dakika jel yürütüldü ve görüntüleme için Quantum Vilber Lournat cihazında PCR sonuçlarının görüntülenmesi yapıldı.

3.2.8. Klonlama

1. Kompetent hücrenin hazırlanması

- *Escherichia coli* JM101 suşu stok kültürden çizgi ekim yöntemiyle canlandırıldı, gelişen kültürden tek bir koloni alınarak LB besiyerine aktarıldı ve 37°C'de 1 gece çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Gelişen kültürden 300 µl alınarak 2700 µl steril saf su ile seyreltildi ve 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı.
- Hazırlanan kültürden alınması gereken miktar,

$$\frac{(30 \times 0,1)}{(Absorbans Değeri \times 10)} \quad (3.1)$$

bağıntısı ile hesaplandı. Bu eşitlikte, 30 hazırlanacak miktar (ml), 0,1 sabit değer, 10 ise seyreltme faktörüne karşılık gelmektedir.

- 30 ml LB broth besiyerine hesaplanan miktara göre kültürden eklenilerek, optik yoğunluk (600 nm'de) değerleri 0,4-0,5'e gelinceye kadar kültür 37°C'de inkübe edildi.

- Yeterli yoğunluğa ulaşan kültür 4400 rpm’de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice döküldü, Hücre pelleti üzerine buzdolabında bekletilen soğuk 100 mM CaCl₂ çözeltisinden 10 ml ilave edilerek 30-45 dakika buzdolabında bekletildi.
- Bekleme süresinden sonra 4400 rpm’de (4°C) 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice döküldü. Ardından pellet üzerine soğuk 100 mM CaCl₂’den 2 ml eklendi ve bir gece boyunca buzdolabında bekletildi (Arslan 2017).

2. Ligasyon İşlemi

0,2 ml’lik tüplerde bir araya getirilen ligasyon karışımı (Çizelge 3.5’de verilen) 16°C’de 13-15 saat süre ile inkübe edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C’de muhafaza edildi.

Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Miktar (µl)
2X Ligasyon buffer	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA ligaz	1

3. Transformasyon işlemi

- Eppendorf tüplerine buzdolabında bekletilen kompetent hücrelerden 200 µl eklendi ve tüplerin üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü aktararak 30 dk boyunca buzdolabında bekletildi.
- Buzdan alınan örnekler önceden 42°C’ye ayarlanmış olan su banyosunda 2 dk ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tüplerin üzerine 200 µl LB besiyeri eklenerek 37°C’de 1 saat 40 dakika bekletildi.
- Bekleme süresinde otoklavlanmış amfisilinli katı besiyeri buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve ardından steril kabinde X-Gal ve IPTG’den 40’ar µl petrilere eklendi.

- Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra petrilerin tam ortasına, inkübasyondan çıkartılan ligasyon ürünü ve kompetent hücre karışımından 150 µl ekildi ve drigalski özesi ile karışım petride iyice yayıldı. Ardından örnekler 37°C’de yaklaşık 14 saat süre ile inkübe edildi.

4. Kolonilerin seçimi ve sıvı kültüre aktarma

14 saat boyunca inkübasyona bırakılan petriler +4°C’de bir gece bekletildi. Petrilerde mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlendikten sonra beyaz koloniler steril bir pipet ucu ile alınıp içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere aktarıldı. Daha sonra 37°C’de bir gece boyunca inkübe edildi.

5. Koloni PCR için Hazırlık ve PCR Reaksiyon Şartları

- Uygun inkübasyon şartlarında Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde geliştirilen kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı.
- Bir sonraki işlemde ısı şokuna maruz bırakmak amacıyla öncelikle 10 dk su banyosunda kaynatıldı ve ardından 2 dakika buzda bekletildi.
- Tüplerdeki karışım 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak PCR basamağına geçildi.
- PCR işlemi için Çizelge 3.6’da verilen bileşenler ve miktarlara göre PCR karışımı hazırlandı ve tüpler PCR cihazına yerleştirilerek Çizelge 3.7’de verilen programa göre koloni PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. Koloni PCR’da kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
Tampon (MgCl ₂ ’li)	3
dNTP mix	0,6
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dH ₂ O	16,1
DMSO	1,2
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
Taq DNA Polimeraz	0,3
Süpernatant	3

(T7 Primer: 5’-AATACGACTCACTATAG-3’

SP6 Primer: 5’- ATTTAGGTGACACTATAG-3’)

Çizelge 3.7. Koloni PCR programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

PCR işleminin ardından %1’lik agaroz jel hazırlanarak jele; markır, içerisinde istenen genin bulunduğu pozitif kontrol, istenen genin bulunmadığı negatif kontrol ve PCR ürünleri yüklendi. Ardından 90 voltta 1 saat yürütüldü. İşlemin sonunda jel görüntüleme sisteminde bantlar görüntülendi ve istenen aralıkta bant veren koloniler belirlenerek plazmit izolasyonu işlemi için amfisilinli LB broth sıvı besiyerine inoküle edildi.

6. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega (A1330) izolasyon kiti kullanıldı. Protokole göre;

- Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilen kültürlerden 4 ml alınarak 11000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonundan 250 µl eklendi ve pipetlenerek homojenize edildi.
- Tüplerin üzerine 250 µl Cell Lysis Solution eklenerek alt üst edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Ardından 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu karışıma eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışıma 350 µl Nötralizasyon çözeltisinden ilave edildi ve 13000 rpm’de 10 dk süre ile santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası süpernatanttan yaklaşık 650-750 µl alınarak içerisinde kolon bulunan eppendorf tüpüne aktarıldı ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Ardından kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklenip tekrar 1 dk 13000 rpm’de santrifüjlendi.
- Kolonun üzerine 250 µl Wash Solution ilave edilip tekrar 2 dk 13000 rpm’de santrifüjlendi ve tüplerde alta geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Tekrar 1 dk 13000 rpm’de oda ısısında santrifüjlendikten sonra kolon yeni bir tüp içerisine aktarılarak üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi ve 1 dk 13000 rpm’de santrifüj edildi.
- Son aşamada kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ölçüm yapılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi (Arslan 2017).

7. Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsa da, istenilen bölgenin klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla örnekler EcoRI ile kesime tabi tutuldu (Baltacı 2015).

8. Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

- 998 µl saf su ve 2 µl plazmit karışımının 260 nm'deki optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü.
- $A_{260} \times 50$ (sabit katsayı) $\times 500$ (dilüsyon oranı) bağıntısına göre plazmit konsantrasyonu, 100-200 ng olacak şekilde ayarlandı.
- Uygun konsantrasyona sahip tüplerden 30-50 µl alınarak sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

9. DNA dizi analizine göre sonuçların değerlendirilmesi

Sekansa gönderilen firmanın sayfasından indirilen sonuçlar BioEdit programı ile analiz edildi ve FASTA formatına çevirildi. Sekans dizisi içerisindeki primerler ve vektöre ait kısımlar çıkarıldı. Daha sonra diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi. Ardından NCBI'nin BLAST veri tabanı yardımıyla izolatımızın mevcut bakteri türleri ile olan benzerlik oranlarına göre tür tespiti yapıldı.

3.2.9. Optimizasyon Çalışmaları

3.2.9.a. Kitin Ekstraksiyonu için optimal pH'nın belirlenmesi

İzolatın ön kültürü hazırlanıp, 1 gün boyunca 30°C'de 150 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Ardından kabuklu besiyeri hazırlanarak pH'ları sırasıyla 5,6,7,8,9 değerlerine ayarlandı. Hazırlanan erlenler otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra erlenlerin yeterince soğuması beklendi ve BAT-1 ön kültüründen 1 ml besiyerlerine aktarıldı, ardından 30°C'de 150 rpm'de 2 gün çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 2. günün sonunda falcon tüplere alınan 2 ml'lik sıvı besiyeri 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant kullanılarak proteaz ve kitinaz aktivitelerin spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Aynı zamanda kabukların protein içerikleri belirlenerek %DP değerleri hesaplandı.

3.2.9.b. Kitin ekstraksiyonu için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi

Önceki bölümlerde anlatıldığı gibi bakterinin ön kültürü hazırlandı. Sırasıyla litrede 5, 10, 20, 40, 60 ve 80 kabuk konsantrasyonu içeren kabuklu besiyeri hazırlandı, pH 7'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra izolatın ön kültüründen 1 ml, yeterince soğuyan besiyerlerine aktarıldı, ardından 30°C'de 150 rpm'de 2 gün çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 2. günün sonunda falcon tüplere 2 ml sıvı besiyerinden alınarak 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant kullanılarak proteaz ve kitinaz aktivitelerin spektrofotometrik ölçümleri yapıldı ve kabukların protein içerikleri belirlenerek %DP değerleri hesaplandı.

3.2.9.c. Kitin ekstraksiyonu için optimal KH_2PO_4 ve MgSO_4 konsantrasyonlarının belirlenmesi

Çalışmadan önce bakterinin ön kültürü hazırlandı. Sırasıyla, litrede 0,5-1-1,5-2 KH_2PO_4 içeren ve KH_2PO_4 içermeyen kontrol örneği ile yine aynı oranlarda MgSO_4 içeren ve içermeyen kontrol örneği olmak üzere toplam 10 erlende kabuklu besiyeri hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve sterilizasyonun ardından yeterince soğuyan besiyerlerine ön kültürden eşit hacimde (1 ml) ekim yapıldı. 30°C'de 150 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra falcon tüplere alınan 2 ml'lik sıvı besiyeri 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından, süpernatant kullanılarak proteaz ve kitinaz aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü ve kabukların protein içerikleri belirlenerek %DP değerleri hesaplandı.

3.2.9.d. Kitin ekstraksiyonu için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Bakterinin ön kültürü bir gün önceden hazır edildikten sonra 60 g/l kabuk konsantrasyonunda kabuklu besiyeri hazırlandı, pH 7'ye ayarlandı ve otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra yeterince soğuyan sıvı besiyerine bakterinin ön kültüründen 1 ml ekildi. 30°C'de 150 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Sırasıyla; 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerin sonunda falcon tüplere alınan 2 ml'lik sıvı besiyeri

6000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant, enzim çözeltisi olarak kullanıldı ve proteaz ve kitinaz aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. İnkübasyon denemesinin ardından besiyerindeki kabuk geri alınarak içerik analizleri gerçekleştirildi ve %DP, %DM ve kitin verimleri hesaplandı.

Aynı zamanda, inkübasyon süresi denemesinde demineralizasyon etkinliğinin ortaya koyulabilmesi için bakterinin organik asit üretme kapasitesi belirlendi. Bunun için 5 gün boyunca spektrofotometrik olarak laktik asit analizi yapıldı. Laktik asit analizi için 50 µl kültür sıvısı 2 ml %0,1’lik FeCl_3 çözeltisi ile karıştırıldı ve 390 nm’de absorbanları ölçüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kabuk İçeriği Analizleri

Çalışılan başlangıç kabuğunun yüzdece bileşenlerinin belirlenmesi için gerekli analizler yapılmıştır. Lowry yöntemi ile kabuk içerisindeki protein yüzdesi, kül tayini ile mineral yüzdesi ve kjeldahl yöntemi ile azot miktarından kitin yüzdesi hesaplanmıştır. Ekstraksiyon veriminin ortaya koyulabilmesi adına işleme tabii tutulan kabukların da içerik analizleri yapılmıştır. Bütün analizlerden sonra başlangıç ve son kabuktan elde edilen içerik yüzdelerine göre kitin ekstraksiyon verimleri hesaplanmıştır.

4.2. Topraktan Bakteri İzolasyonu

Çalışmada kullanılan karides kabukları kurutulup öğütüldükten sonra (şekil 4.1) Erzurum-niversite, Erzurum-şkrpaşa, Erzurum-Yıldızkent, Erzurum-Horasan, Iğdır, Trabzon, Samsun, Aksaray, Gaziantep, Antalya, Muğla, Balıkesir, İstanbul olmak üzere toplam 13 farklı bölgeden (şekil 4.2) temin edilen topraklardan bakteri izolasyonu yapıldı (şekil 4.3).

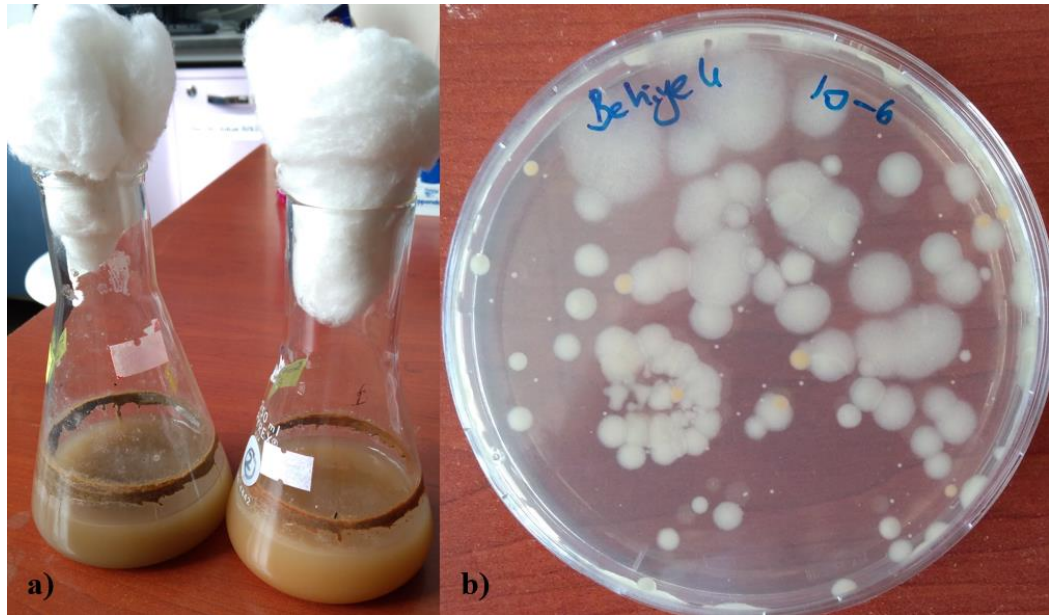


şekil 4.1. Kurutulmuş (a) ve toz haline getirilmiş (b) karides kabukları



Şekil 4.2. Toprak örneklerinin alındığı iller

Kurutulup öğütülen karides kabukları bakteri izolasyonu için hazırlanan topraklı besiyerine eklendi ve uygun inkübasyon süresi sonunda gelişimini tamamlayan bakteriler katı besiyerine alındı. Ardından koloni oluşumlarının gözlemlendiği karışık kültürden (Şekil 4.3) koloni morfolojisi ve mikroskop görüntülerinden yola çıkılarak (Şekil 4.4) farklı olduğu düşünülen toplam 35 bakteri izole edildi (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. Bakteri izolasyonu için hazırlanan topraklı besiyeri (a) ve 6 kat seyreltilen besiyerinin TSA'ya aktarıldığı kültür (b)

Çizelge 4.1. Toprakta saflaştırılan bakterilerin kodları

Örneğin Alındığı Yer	Saflaştırılan Bakteri Kodları	Örneğin Alındığı Yer	Saflaştırılan Bakteri Kodları
Erzurum Üniversite	BB-3	Samsun	BSA-1
	BB-4		BSA-2
	BB-7	Aksaray	BA-1
	BB-8		BA-2
	BB-9	Muğla	BM-1A
	BB-10		BM-1B
Erzurum Yıldızkent	BY-1		BM-2
	BY-2		BM-3
Erzurum Şükrüpaşa	BŞ-1	Gaziantep	BM-4
	BŞ-2		BG-1
	BŞ-3		BG-2
Erzurum Horasan	BH-1	Balıkesir	BBA-1
	BH-2		BBA-2
Trabzon	BT-1	Antalya	BAT-1
	BT-2		BAT-2
	BT-3	İstanbul	Bİ-1
İğdir	BI-1		Bİ-2
	BI-2		

4.3. Proteaz ve Kitinaz Aktivitesine Göre Uygun Bakterinin Seçilmesi

Saflaştırılan tüm bakterilerin kabuklu besiyerindeki gelişiminin ardından (Şekil 4.4) alınan kültür sıvılarından bölüm 3.2.3’de verilen protokole göre proteaz ve kitinaz aktivitelerin belirlendiği ve kitin veriminin hesaplandığı sonuçlar Çizelge 4.3’de verildi.



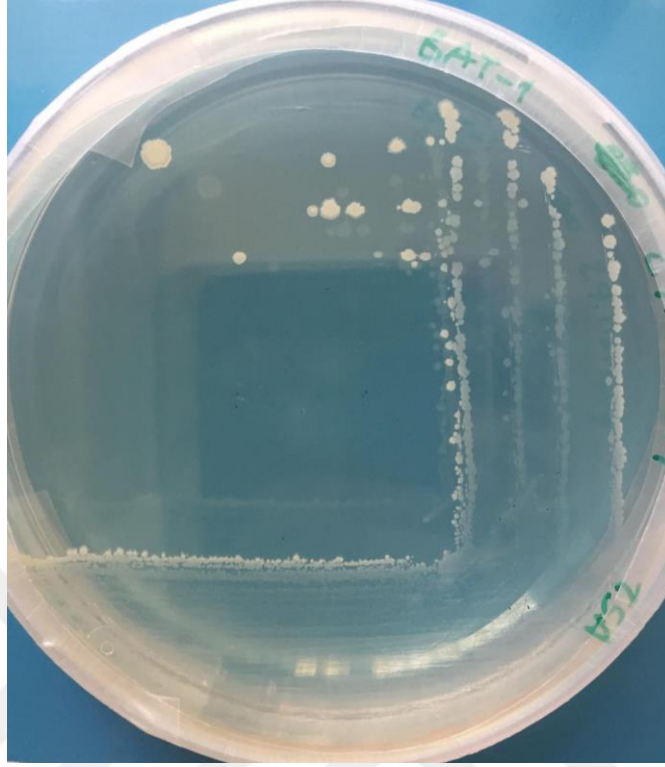
Şekil 4.4. Bakteri seçimi için hazırlanan kabuklu besiyeri

Çizelge 4.2. Saflaştırılan bakterilerin proteaz ve kitinaz aktivite sonuçları

KABUKLU BESİYERİ							
BAKTERİ KODLARI	Proteaz Aktivite	Kitinaz Aktivite	Kitin Verimi (%)	BAKTERİ KODLARI	Proteaz Aktivite	Kitinaz Aktivite	Kitin Verimi (%)
BI-1	0,139	-0,01	1,6	BT-2	0,163	-0,012	1,88
BI-2	0,924	-0,003	10,63	BA-1	0,066	-0,017	0,76
BY-1	0,133	-0,015	1,53	BA-2	1,082	-0,048	12,4
BY-2	0,058	0,025	0,98	BSA-1	0,219	-0,038	2,5
BH-1	0,109	-0,006	1,25	BSA-2	0,06	0,044	0,7
BH-2	0,059	0,125	0,68	BBA-1	0,618	-0,039	7,2
BŞ-1	0,039	-0,001	0,45	BBA-2	0,043	0,052	0,5
BŞ-2	0,686	-0,013	7,9	BAT-1	1,46	-0,061	16,8
BŞ-3	0,095	0,114	1,1	BAT-2	0,017	0,002	0,2
BG-1	0,056	-0,024	0,65	Bİ-1	0,008	-0,018	0,1
BG-2	0,028	-0,041	0,32	Bİ-2	0,136	0,057	1,56
BM-1A	0,611	-0,027	7,03	BB-7	0,024	0,202	0,27
BM-1B	0,037	-0,039	0,42	BB-8	0,401	0,008	4,5
BM-2	0,029	0,037	0,33	BB-9	0,019	0,207	0,2
BM-3	0,68	-0,04	7,82	BB-10	0,884	-0,009	10,17
BM-4	0,11	0,155	1,26	BB-3	0,472	0,139	5,43
BT-1	0,041	0,001	0,47	BB-4	0,023	0,057	0,26

(Kültür koşulları: pH: 8, inkübasyon süresi 2 gün, 5 g/l kabuk konsantrasyonu, sıcaklık 30 °C, 0 g/l KH₂PO₄, 0 g/l MgSO₄, çalkalama hızı 150 rpm)

İzole edilen 35 bakteri içerisinde en yüksek proteaz ve en düşük kitinaz aktiviteye sahip olan BAT-1 kodlu bakterinin geliştiği kabuklu besiyerine eklenen başlangıç kabuğunun miktarı 0,25 g (5 g/l karides kabuğu) iken ekstraksiyon işleminden sonra besiyerinden geri alınan en son kabuk miktarı 0,117 g'dır. Son kabuktaki kitin yüzdesinden hesaplanan kitin miktarı 0,042 g'dır. Kitin verimi (%)=(Son kabuktaki kitin ağırlığı / Prosese giren kabuğun ağırlığı)x100 hesabına göre (Rao and Stevens 2005), elde edilen değerler üzerinden kitin verimi=(0,042/0,25)x100 eşitliği ile hesaplanmış ve verim %16,8 bulunmuştur. İzolatın proteaz ve kitinaz aktiviteleri için ölçülen absorbans değerleri ise sırasıyla 1,46 ve -0,061 bulunmuştur.



Şekil 4.5. BAT-1 kodlu bakterinin inkübasyon süresi sonunda petride oluşturduğu kolonileri

Elde edilen proteaz ve kitinaz aktivite sonuçlarına göre çalışmanın amacına uygun olarak kitinaz aktivitenin olmadığı ve aynı zamanda en yüksek proteaz aktiviteye sahip olan BAT-1 kodlu bakteri, tezin diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçildi. Ardından bu bakterinin sekans analizi ve optimizasyon çalışmalarına geçildi.



Şekil 4.6. BAT-1 kodlu bakterinin 40X büyütmedeki mikroskop görüntüsü

4.4. Sekans Analizi Sonuçları

Macrogen firması tarafından analiz edilen 16S rRNA sekans verileri sonucu NCBI'dan elde edilen benzerliğe göre izolatımızın türü *Paenibacillus jamilae* (Gen Bank No:MN176658) olarak belirlenmiştir.

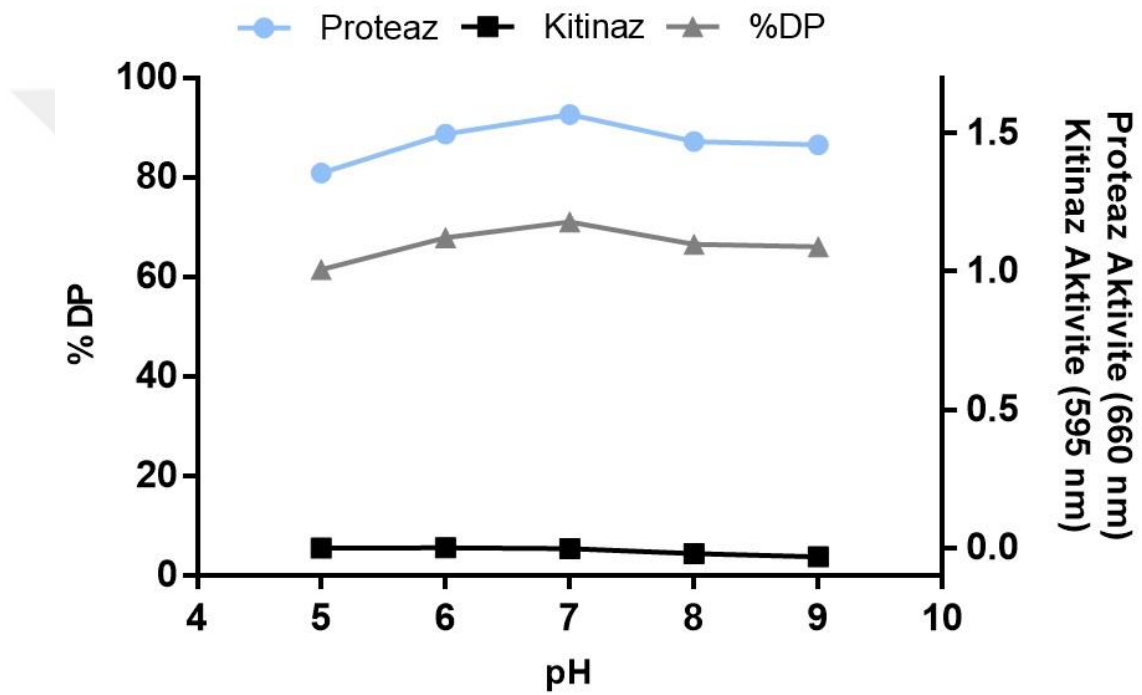
4.5. Optimizasyon Denemeleri

Kabuktan maksimum verimle kitinin geri kazanımı için proteaz ve kitinaz aktivitelerin yanısıra %DP verimi baz alınarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Amaç, en yüksek proteaz ve en düşük veya hiç kitinaz aktivitenin olmadığı parametre değerlerinin belirlenmesidir.

4.5.1. Kitin ekstraksiyonu için optimal pH'nın belirlenmesi

Kitin ekstraksiyon verimini arttırabilmek adına proteaz aktivitenin en yüksek olduğu, kitinaz aktivitenin ise olmadığı optimum pH değerinin belirlenebilmesi için bölüm

3.2.9.a’da anlatılan şekilde deney düzeneği oluşturuldu ve sırasıyla 5,6,7,8,9 pH değerleri denendi. Elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4) izolatın maksimum proteaz aktivite, dolayısıyla maksimum %DP verimi sergilediği pH değeri 7 olarak bulundu. Ayrıca çalışılan hiçbir pH değerinde kayda değer kitinaz aktivite görülmedi. Çalışmanın diğer basamaklarında besiyeri pH’sı 7’ye ayarlanarak optimizasyon denemelerine devam edildi.



Şekil 4.7. Proteaz ve kitinaz aktivitelerde optimal pH’nın belirlenmesi

(Kültür koşulları: 5 g/l kabuk konsantrasyonu, sıcaklık 30 °C, inkübasyon süresi 2 gün, 0 g/l KH₂PO₄, 0 g/l MgSO₄, çalkalama hızı 150 rpm)

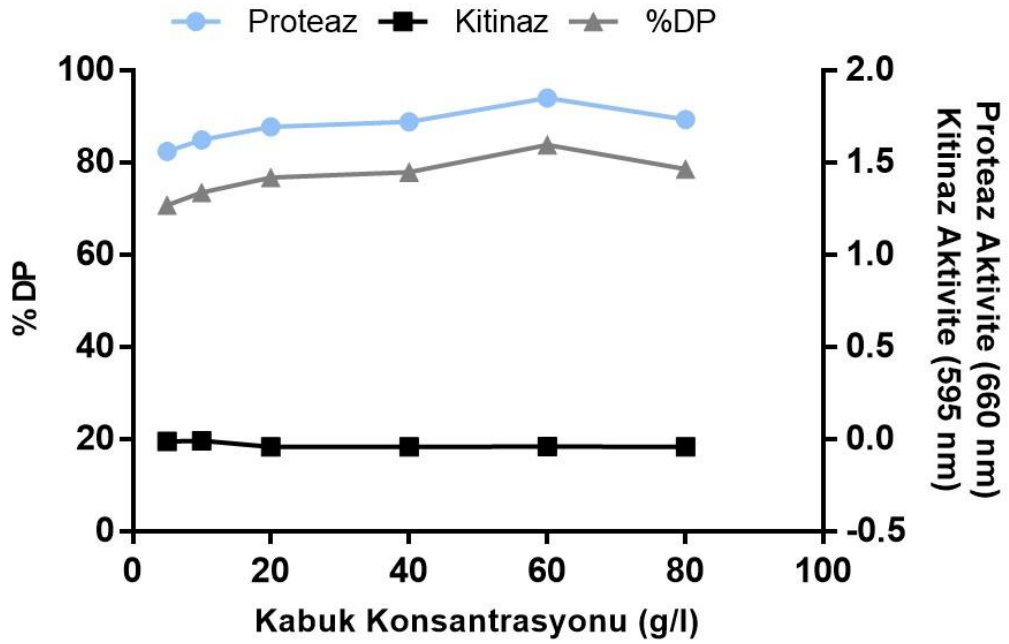
Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerinde elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri

pH	Proteaz Aktivite (660 nm)	Kitinaz Aktivite (595 nm)	%DP
5	1,356	-0,002	61,45
6	1,497	0	67,84
7	1,567	-0,003	71,01
8	1,469	-0,021	66,57
9	1,457	-0,034	66,03

(%DP: Deproteinizasyon verimi)

4.5.2. Kitin Ekstraksiyonu için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi

Kitin ekstraksiyonunda maksimum verim elde etmek için proteaz aktivitenin en yüksek, kitinaz aktivitenin ise en düşük olduğu optimum kabuk konsantrasyonu denemesi bölüm 3.2.9.b’de izah edildiği şekilde gerçekleştirildi ve sırasıyla litrede 5, 10, 20, 40, 60 ve 80 kabuk konsantrasyonu değerleri denendi. Elde edilen proteaz aktivite sonuçları Şekil 4.8 ve Çizelge 4.5’de verildi ve sonuçlar değerlendirildiğinde izolatin en yüksek proteaz aktivite, dolayısıyla en yüksek %DP verimi gösterdiği kabuk konsantrasyonu litrede 60 olarak belirlendi. Bununla birlikte, çalışılan hiçbir konsantrasyonda kitinaz aktivite de kayda değer bir değişiklik görülmedi.



Şekil 4.8. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal kabuk konsantrasyonunun belirlenmesi (Kültür koşulları: pH:7, sıcaklık 30 °C, inkübasyon süresi 2 gün, 0 g/l KH_2PO_4 , 0 g/l MgSO_4 , çalkalama hızı 150 rpm)

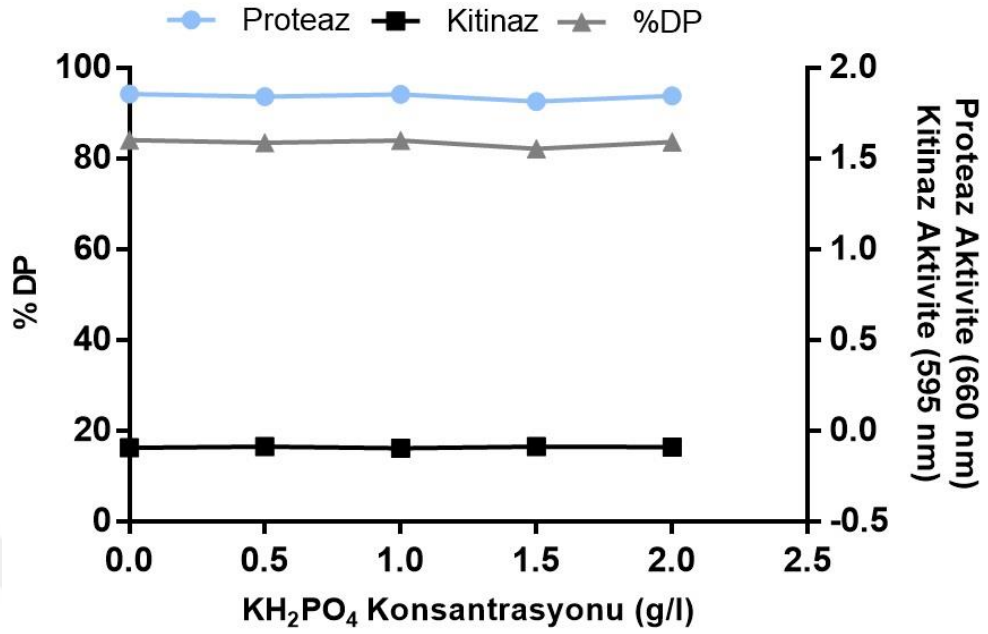
Çizelge 4.4. Farklı kabuk konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri

Kabuk Konsantrasyonu (g/l)	Proteaz Aktivite (660 nm)	Kitinaz Aktivite (595 nm)	%DP
5	1,56	-0,013	70,7
10	1,621	-0,01	73,46
20	1,693	-0,043	76,72
40	1,719	-0,042	77,9
60	1,849	-0,041	83,79
80	1,733	-0,043	78,53

(%DP: Deproteinizasyon verimi)

4.5.3. Kitin ekstraksiyonu için optimal KH_2PO_4 ve MgSO_4 konsantrasyonlarının belirlenmesi

Kitin ekstraksiyonunda maksimum verim elde etmek için mineral (KH_2PO_4 ve MgSO_4) konsantrasyonlarının proteaz ve kitinaz aktiviteler üzerine etkisi bölüm 3.2.9.c'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi ve KH_2PO_4 optimizasyonu için elde edilen enzim aktiviteleri ve %DP değerleri Şekil 4.9 ve Çizelge 4.6'de verildi. Aynı şekilde MgSO_4 optimizasyonu için elde edilen değerler Şekil 4.10 ve Çizelge 4.7'da gösterildi. Sonuçlara göre, hem KH_2PO_4 hem de MgSO_4 minerallerinin kitin ekstraksiyon verimine etki etmediği görüldü.



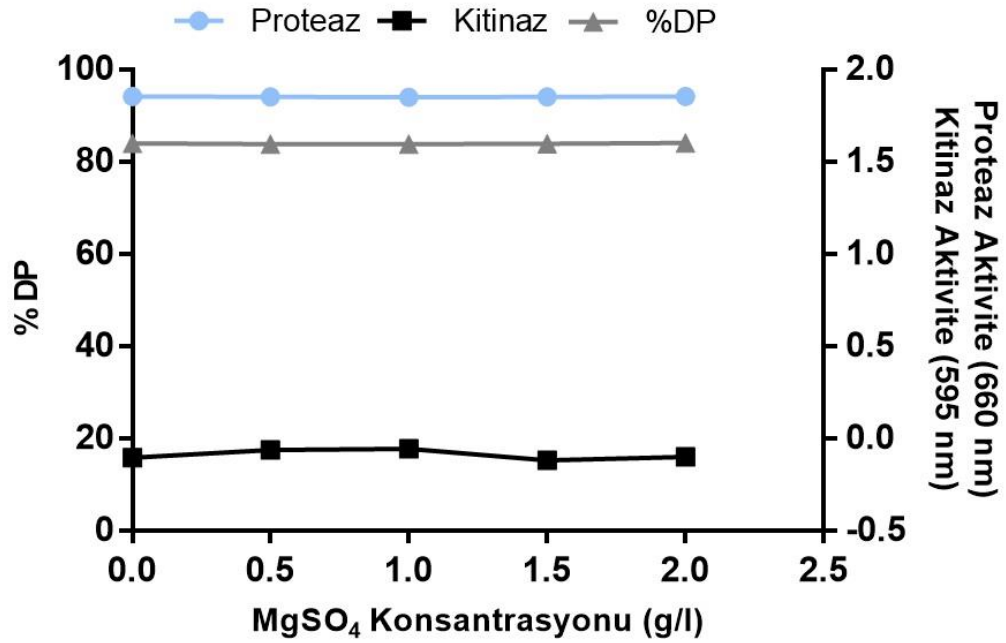
Şekil 4.9. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal KH₂PO₄ konsantrasyonunun belirlenmesi

(Kültür koşulları: 60 g/l kabuk konsantrasyonu, sıcaklık 30 °C, pH 7, inkübasyon süresi 2 gün, 0 g/l MgSO₄, çalkalama hızı 150 rpm)

Çizelge 4.5. Farklı KH₂PO₄ konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri

KH ₂ PO ₄ Konsantrasyonu (g/l)	Proteaz Aktivite (660 nm)	Kitinaz Aktivite (595 nm)	%DP
0	1,855	-0,095	84,06
0,5	1,841	-0,088	83,42
1	1,853	-0,097	83,96
1,5	1,813	-0,089	83,15
2	1,845	-0,091	83,6

(%DP: Deproteinizasyon verimi)



Şekil 4.10. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal MgSO₄ konsantrasyonunun belirlenmesi

(Kültür koşulları: 60 g/l kabuk konsantrasyonu, sıcaklık 30 °C, pH 7, inkübasyon süresi 2 gün, 0 g/l KH₂PO₄, çalkalama hızı 150 rpm)

Çizelge 4.6. Farklı MgSO₄ konsantrasyonlarında elde edilen proteaz, kitinaz aktiviteler ve %DP değerleri

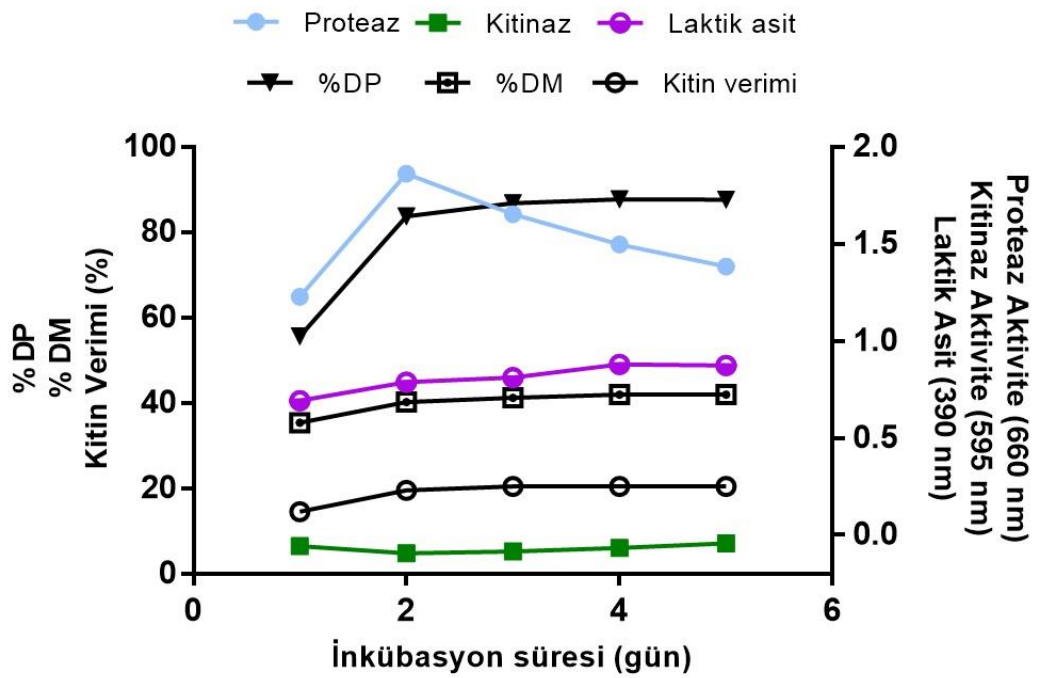
MgSO ₄ Konsantrasyonu (g/l)	Proteaz Aktivite (660 nm)	Kitinaz Aktivite (595 nm)	%DP
0	1,853	-0,106	83,97
0,5	1,85	-0,064	83,83
1	1,849	-0,058	83,78
1,5	1,852	-0,062	83,91
2	1,854	-0,102	84

(%DP: Deproteinizasyon verimi)

4.5.4. Kitin ekstraksiyonu için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi

Kitin ekstraksiyonunda maksimum verim elde etmek için proteaz aktivitenin en yüksek, kitinaz aktivitenin ise en düşük olduğu optimum inkübasyon süresi denemesi bölüm 3.2.9.d'de izah edildiği şekilde gerçekleştirildi. 5 gün boyunca ölçülen enzim aktiviteleri

ve Laktik asit absorbansları ile hesaplanan %DP, %DM ve kitin verimi sonuçları Şekil 4.11’de, ve Çizelge 4.8’de verilmiştir. Sonuçlara göre, inkübasyon süresinin kitinaz aktivite üzerinde kayda değer bir etkisi görülmemiştir. Proteaz aktivitenin maksimum olduğu inkübasyon süresi 2. gün olarak belirlenirken en yüksek %DP değeri ise 4.günde elde edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası, erlenlerden geri alınan kabuklardan gerçekleştirilen kitin içeriği analizine göre en yüksek proses verimi 4. günde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11. Proteaz ve kitinaz aktivite için optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi (Kültür koşulları: pH:7, 60 g/l kabuk konsantrasyonu, sıcaklık 30 °C, 0 g/l KH_2PO_4 , 0 g/l MgSO_4 , çalkalama hızı 150 rpm)

Çizelge 4.7. Farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen proteaz ve kitinaz aktiviteleri ile %DP, %DM, LA ve Kitin verimi (%) değerleri

İnkübasyon Süresi (gün)	Proteaz Aktivite (660 nm)	%DP	LA (390 nm)	%DM	Kitinaz Aktivite (595 nm)	Kitin Verimi (%)
1	1,227	55,6	0,692	35,4	-0,058	14,5
2	1,861	83,69	0,787	40,18	-0,095	19,56
3	1,653	86,82	0,811	41,21	-0,085	20,42
4	1,497	87,68	0,878	41,95	-0,067	20,46
5	1,384	87,66	0,874	41,95	-0,044	20,46

(%DP: Deproteinizasyon verimi, %DM: Demineralizasyon verimi, LA: Laktik asit absorbans değerleri)

Belirlenen optimum parametreler üzerinden (pH 7, 60 g/l karides kabuğu, 0 g/l KH_2PO_4 , ve 0 g/l MgSO_4) inkübasyon süresi denemesi ile 1 litre hacimde 5 gün boyunca kitin ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Prosesin kitin ekstraksiyon verimini ortaya koyabilmek için başlangıç kabuğun ve ekstraksiyon sonrası kabuğun içerik analizleri bölüm 3.2.4.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve elde edilen yüzdeler Çizelge 4.9'da verilmiştir. Başlangıçta prosese giren 60 g kabuğun %48'i yani 28,8 gramı proteindir. Ekstraksiyon işleminden sonra geriye kalan 27,3 g kabukta ise %13 yani 3,55 g kalıntı protein bulunmaktadır. Bu değerler üzerinden ekstraksiyon işlemi ile gerçekleştirilen protein giderimi 25,25 g'dır. 28,8 gram başlangıç proteinin 25,25 gramı giderildiğinden biyolojik ekstraksiyon ile gerçekleştirilen %DP verimi %87,67 şeklinde hesaplanmıştır. Aynı şekilde mineral giderimi de hesaplandığında, başlangıç kabuğunda %29 yani 17,4 g mineral bulunmakta iken son kabukta %37 yani 10,1 gram mineral bulunmaktadır. Dolayısıyla 17,4 gram mineralin 7,3 gramı biyolojik ekstraksiyon ile giderilmiş ve %DM verimi %41,95 olarak belirlenmiştir. Başlangıçta prosese giren 60 gram kabuğun %20,5'i yani 12,3 gramı kitindir. Ekstraksiyon sonrası geri alınan kabuktaki kitin yüzdesi ise %45 yani 12,28 gramdır. Ekstraksiyon verimi, Kitin verimi (%)=(Son kabuktaki kitin ağırlığı/Prosesse giren kabuğun ağırlığı) $\times$ 100 eşitliğine göre hesaplandığında %20,47 elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. Başlangıç kabuğu ve ekstraksiyon işlemi sonrası karides kabuğunun yüzdece bileşenleri

Bileşenler	Başlangıç Kabuğun Kuru Madde %'si	Ekstraksiyon Sonrası Kabuğun Kuru Madde %'si
Protein	48	13
Mineral	29	37
Kitin	20,5	45
Diğer (Lipit, Karotenoid vd.)	2,5	5

5. TARTIŞMA SONUÇ

Deniz ürünlerinin (yengeç, karides ve ıstakoz) tüketiminden kaynaklanan atık miktarındaki önemli artış, hem çevre hem de işleme tesisleri için bir sorun haline gelmiştir (Shahidi *et al.* 1999). Dünya çapında her yıl 6-8 milyon ton kabuklu atığı üretilirken, (FAO 2014) ülkemizde ise deniz ürünlerinin tüketimiyle bir yılda yaklaşık 2 bin ton kabuklu atığı ortaya çıkmakta ve bu atıkların herhangi bir değerlendirmesi bulunmamaktadır (TÜİK 2018). TÜİK değerlerine bakıldığında tüketilen kabuklu deniz ürünlerinin %99'unu karides oluşturmaktadır. Karides kabuğu, türlere ve mevsimsel değişikliklere bağlı olarak farklı oranlarda bulunan protein (%30-40) ve mineral (%30-50) içeriğiyle birlikte, en önemli kitin (%20-30) kaynağıdır (Arbia *et al.* 2013).

Kitinin deasetilasyon derecesi yaklaşık %50'ye ulaştığında (polimerin kaynağına bağlı olarak), sulu asidik ortamda çözünür hale gelir ve bu yapı kitosan olarak adlandırılır (Rinaudo 2006). Kitinin en basit ve en ucuz türevi olan kitosan, glukozamin üzerindeki serbest amino grupları sayesinde kitinin aksine organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözünebilmekte ve hem amino gruplarının hem de hidroksil grupları varlığı sayesinde birçok mekanik ve fiziksel özelliklerinin değiştirilmesinde kolayca kimyasal modifikasyonlara maruz kalabilmektedirler. Bu nedenle kitin, kitosan eldesinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Kumar 2000).

Kitin, doğada bol miktarda bulunan doğal polimerlerdir. Bu polimerlerin; biyoyumluluk, biyobozunurluk, non-toksitite ve adsorbsiyon gibi mükemmel özellikleri onları biyomateriyaller için uygun kılar, aynı zamanda sentetik polimerlere alternatif olarak endüstriyel uygulamalarda da dikkat çekmektedir (Tan *et al.* 2009).

Kabuklulardaki kitin, kararlı bir kabuk oluşturmak için biriken kalsiyum karbonat (CaCO_3) mineralleri ve proteinlerle kompleks bir ağ oluşturmuştur. Ayrıca, kitin ve protein arasındaki etkileşim oldukça kuvvetlidir. Bu nedenle, kabuklu deniz hayvanlarından elde edilen kitin izolasyonu, kabuğun iki ana bileşeni olan proteinlerin ve

inorganik kalsiyum karbonatın uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Horst *et al.* 1993).

Atık olarak nitelendirilen materyallerden kitinin geri kazanımı doğal polimerler olması yönüyle oldukça önemlidir. Kitin ekstraksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen kimyasal yöntemde, çok yüksek konsantrasyonda kullanılan asit ve baz çözeltileri hem doğada geri dönüşümü zor zararlı kimyasalların oluşumuna hem de ekstrakte edilecek olan kitinin kısmen deasetilasyonuna ve depolimerizasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle, kimyasal yöntem alternatif olarak biyolojik yöntem geliştirilmiştir. Biyolojik yöntemde ya mikroorganizmaların doğrudan kendileri ya da mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılmaktadır. Yaptığımız tez çalışmasında ise karides kabuklarından kitin ekstraksiyonunda daha çevre dostu bir yöntem olarak biyolojik ekstraksiyon için mikrobiyal metot tercih edilmiştir.

Şimdiye kadar bazı mikroorganizmaların kitin ekstraksiyon kapasitelerine dair yapılan çalışmalar araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* gibi sınırlı sayıda bakterilerin kitin ekstraksiyonunda kullanıldığı görülmüştür. Bu yüzden, mevcut çalışmamızda kitin ekstraksiyonu yapabilen, diğer bir ifadeyle kitin dışındaki protein gibi organik moleküllerle, kalsiyum gibi inorganik molekülleri uzaklaştırabilen yeni bakteri strainleri araştırılmıştır. Çalışmamızda, bu özelliğe sahip olan bakterilerin seçimi için düşük kitinaz aktivitenin yanı sıra yüksek proteaz aktiviteye sahip olan bakterilere odaklanılmıştır. Ön seçim aşamasında 0,1 g toprak örneği sadece kabuk ve glukozun bulunduğu besiyerine ilave edilmiş ve 30°C’de 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde, sadece sınırlı besinsel şartlarda gelişebilen ve bu ortama adapte olabilen bakterilerin izolasyonuna çalışılmıştır. 4 günlük sürenin sonunda TSA katı besiyerine ekim yapılmış ve 30°C’de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda morfolojik olarak farklı olan 2 ya da 3 koloniye rastlanılmıştır. Bu sonuç bize ön seçim aşamasında mevcut ortama adapte olamayan ya da sınırlı gelişim kapasitesi gösteren bakterilerin elimine olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, çalışmanın ileri aşamalarında bu dominant bakteriyel koloniler alt kültüre

alınarak saflaştırılmıştır. Bu şekilde, 13 farklı bölgeden alınan toprak örneklerinden toplam 35 bakteri suşu izole edilmiştir. Sonraki adımda aynı içeriğe sahip (kabuklu-glukozlu) olan besiyerinde bu 35 bakteri suşu proteaz ve kitinaz aktivitelerinin yanı sıra total kitin verimleri açısından değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda topraktan izole ettiğimiz 35 bakteri içerisinde yüksek proteaz ve düşük kitinaz aktivite ile %16,8'lik maksimum kitin verimine sahip bakterinin türü sekans sonucuna göre *Paenibacillus jamilae* olarak tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar araştırıldığında, bu zamana kadar kitin ekstraksiyonu için kullanılan mikroorganizmalar içerisinde *Paenibacillus jamilae* türüne ait ekstraksiyon çalışması bulunamamıştır. Bu tez çalışması, karides kabuklarının biyolojik kitin ekstraksiyonunda *Paenibacillus jamilae* bakterisinin kullanıldığı ilk çalışma olmaktadır. Singh (2010) tarafından yapılan çalışmada *Paenibacillus* sp. D1 suşundan termostabil kitinaz enzim üretiminde kültür şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilirken çalışmamızda izole ettiğimiz *Paenibacillus jamilae* türünde kitinaz aktivite gözlenmemiştir.

Kitin ekstraksiyon veriminin artırılmasında kültür parametrelerinin optimizasyonu önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bu noktada, yapılan literatür araştırmalarına göre inkübasyon süresi, pH, kabuk ve mineral konsantrasyonları ekstraksiyon verimini etkileyen önemli parametreler olarak kabul edilmektedir. Yaptığımız tez çalışmasında da bu parametrelere paralel olarak optimizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının ilk adımında çalışmanın amacına göre en uygun optimum pH araştırılmıştır. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere izolatın maksimum proteaz aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan pH aralığında kitinaz aktivitede kayda değer bir değişiklik gözlenmemiştir. Aguilera *et al.* (2008) tarafından yapılan çalışmada *P. jamilae* ile eksopolisakkarit üretimi için tespit edilen optimum pH ve sıcaklık değerleri, sırasıyla 7 ve 30°C olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, Cha *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmaya göre *P. jamilae* BRC15-1 suşundan selüloz enzim üretimi için kültür şartlarında pH parametresi denenmiş ve optimal pH 7 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, çalışmamızda elde ettiğimiz optimal pH değeri,

literatürde var olan çalışmalarla kıyaslandığında *P. jamilae*'nin en yüksek enzim aktivitesi ve ideal kültür şartları olarak belirlenen pH değeri ile örtüştüğünü göstermektedir.

Diğer bir parametre olarak kabuk konsantrasyonu araştırılmış ve Şekil 4.8'de görüldüğü gibi kültür ortamındaki en uygun kabuk konsantrasyonu litrede 60 bulunmuştur. Bu kabuk konsantrasyonu değerinde, proteaz aktivite maksimum iken kitinaz aktivitede önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiştir. Dolayısıyla kültür ortamına eklenen karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu, maksimum proteaz ve minimum kitinaz aktivite ile yüksek verimde gerçekleştirilmiştir.

Diğer bir optimizasyon basamağında kültür ortamına eklenen düşük konsantrasyonlardaki KH_2PO_4 ve MgSO_4 minerallerinin etkisi incelenmiş ve Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görüldüğü üzere çalışılan minerallerin hem proteaz hem de kitinaz aktiviteleri üzerinde kayda değer bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu durum kabukta yeterli miktarda magnezyum, fosfor, kükürt gibi minerallerin mevcut olması ile açıklanabilir. Zaten çalışmada demineralizasyon amaçlandığı için her hangi bir mineral takviyesine ihtiyaç duyulmaması olumlu bir sonuç olarak tespit edilmiştir.

Optimizasyon denemelerinin son basamağında en uygun inkübasyon süresi araştırılmış ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 2. günün sonunda maksimum proteaz aktiviteye ulaşıldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, Doan *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada *Paenibacillus* sp. TKU042 bakteri suşunda, proteaz aktivite kalamarlı besiyerinde incelenmiş ve %1,5 kalamar tozu ve %1 demineralize yengeç kabuğu tozunun bulunduğu besiyerinde en yüksek proteaz enzim aktivitesi 2 günlük inkübasyon süresinde bulunmuştur. İkinci günden itibaren gözlenen absorbans düşüşü muhtemelen enzimin aktivite kaybetmesinden dolayı gerçekleşmektedir. Proteaz aktivitenin absorbansında meydana gelen azalmaya rağmen enzim aktivitesi sıfırlanmadığından kabuktaki proteinler parçalanmaya devam etmekte ve bunun sonucunda da %DP değerinde artış gerçekleşmektedir. Fakat 4. günden sonra %DP veriminde her hangi bir değişiklik görülmemektedir. Bunun sebebi olarak, besiyerinde kalan kabukların boyut

farklılıklarından dolayı enzimin kalıntı proteinlere ulaşamaması gösterilebilir. Sonuç olarak, 60 g/l kabuk konsantrasyonunda optimal parametreler üzerinden gerçekleştirilen biyolojik kitin ekstraksiyonunda ulaşılabilecek maksimum deproteinizasyon verimi 4. gün olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra inkübasyon süresi boyunca kitinaz aktivitede herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. İnkübasyon denemesi sonunda besiyerinden geri alınan kabuğun ve başlanığıç kabuğun yüzde bileşenleri üzerinden ekstraksiyon işleminin %DP, %DM ve kitin verimi hesaplanmıştır.

Başlanığıç ve son kabuğun bileşen yüzdeleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Bu içerik yüzdeleri, literatürde Aytekin (2007) tarafından yapılan tez çalışmasında verilen kabuk içeriği ve Legarreta *et al.* (1996b) tarafından verilen kabuk yüzdeleriyle kıyaslandığında tutarlı olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmamızın sonucunda %DP, %DM ve kitin verimi değerleri sırasıyla %87,67, %41,95 ve %20,47 şeklinde hesaplanmıştır. Optimizasyon işleminden önceki elde ettiğimiz proses verimi %16,8 iken optimal değerler üzerinden gerçekleştirilen ekstraksiyonun verimi %20,47 şeklinde hesaplanmıştır, dolayısıyla yaptığımız optimizasyon ile verimi arttırdığımız görülmektedir. Prameela *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada probiyotik bakteriler kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde %89 deproteinizasyon, %69 demineralizasyon verimi elde edilmiştir. Bir başka çalışmada Liu *et al.* (2014), *Bacillus licheniformis* 21886 suşu ile karides atıklarından kitin ekstraksiyonunda %87 deproteinizasyon ve %93,5 demineralizasyon verimine ulaşmıştır. Das and Ganesh (2010) yengeçten kitin eldesinde gerçekleştirdikleri modifiye metotla ham kitinden %22,6-20,15 verim elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Bahasan *et al.* (2017) çalışmalarında fermente süt ve ekmekten izole ettikleri bakterilerin farklı oranlarda besiyerine ekilmesi durumunda kitin ekstraksiyonu üzerine etkisini incelemiştir. Bunun için iki farklı karides türü kullanılmış ve karides kabuklarının biyolojik ekstraksiyonundan elde ettikleri kitin verimleri %13-16 aralığında hesaplanmıştır. Bu literatür bilgilerine göre, elde ettiğimiz %DP ve kitin verimi değerleri önceki çalışmalarla örtüşmektedir. Ancak demineralizasyon verimimiz oldukça düşüktür. Literatür bilgilerinde araştırıldığı üzere, karides kabuklarından kitinin geri kazanımı basamaklarında en zor olan aşama deproteinizasyon aşamasıdır. Bunun sebebi, kabuğun daha dayanıklı ve daha sağlam

olabilmesi adına protein ve kitin molekülleri arasında gerçekleşen kuvvetli ba  lar sonucu güçlü bir kompleks yapının ortaya çıkmasıdır. Bu yüzden, çalışmamızda asıl odak noktamız, deproteinizasyon basamağının iyileştirilebilmesi için proteaz enzim aktivitesini arttıracak optimizasyon denemeleridir. Bu tez doğrultusunda gerçekleştireceğimiz bir sonraki çalışmada topraktan izole ettiğimiz bakterilerin içerisinden yüksek oranda organik asit üreten yani yüksek demineralizasyon verimine sahip olan bakterinin seçimiyle, tezde kullandığımız, yüksek proteaz aktiviteye sahip olan izolatımızın ko-kültürü yapılması durumunda hem yüksek deproteinizasyon hem de yüksek demineralizasyon verimine diğer bir ifadeyle yüksek kitin ekstraksiyon verimine ulaşılabilir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aguilera, M., Quesada, M.T., del Águila, V.G., Morillo, J.A., Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sánchez, M., 2008. Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresour Technol*, 99(13), 5640-5644.
- Anthonsen, M.W., Vårum, K.M. and Smidsrød, O., 1993. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 22(3), 193-201.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Aranday-García, R., Saimoto, H., Shirai, K. and Ifuku, S., 2019. Chitin biological extraction from shrimp wastes and its fibrillation for elastic nanofiber sheets preparation. *Carbohydrate Polymers*, 213, 112-120.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L. and Amrane, A., 2013. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 12-25.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Atwood, H.L., Sandeman, D.C. and Bliss, D.E., 1982. *The Biology of Crustacea: Neurobiology, Structure and Function*. Academic Press New York.
- Aytekin, O., 2007. Kabuklu Katı Deniz Ürünü (*Penaeus* sp.) Atığından Kitin Kazanımı, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Aytekin, O. and Elibol, M., 2010. Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(3), 393-399.
- Bahasan, S.H.O., Satheesh, S. and Ba-Akdah, M.A., 2017. Extraction of chitin from the shell wastes of two shrimp species *Fenneropenaeus semisulcatus* and *Fenneropenaeus indicus* using microorganisms. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(4), 390-405.
- Basurco, B., Carballo, J. and Lem, A., 2014. Seafood in Mediterranean countries. *International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), CIHEAM-MEDITERRA*, 173-202.
- Brzeski, M., 1987. Chitin and chitosan-putting waste to good use. *Infofish International*, 5(87), 31-33.
- Cha, Y.L., Yoon, Y.M., Yoon, H.Y., Kim, J.K., Yang, J.Y., Na, H.-B., Ahn, J.W., Moon, Y.H., Choi, I.H. and Yu, G.D., 2015. Optimization of Cellulase Production from *Paenibacillus jamilae* BRC 15-1. *KSBB Journal*, 30(6), 283-290.

- Chakravarty, J., Yang, C.L., Palmer, J. and Brigham, C.J., 2018. Chitin extraction from lobster shell waste using microbial culture-based methods. *Applied Food Biotechnology*, 5(3), 141-154.
- Chen, H., 2001. Isolation of chitin from shrimp shells deproteinized by *Candida parapsilosis* CCRC 20515. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 3, 114-120.
- Choorit, W., Patthanamane, W. and Manurakchinakorn, S., 2008. Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Bioresour Technol*, 99(14), 6168-6173.
- Cira, L., Huerta, S., Guerrero, I., Rosas, R. and Shirai, K., 2000. Scaling up of lactic acid fermentation of prawn wastes in packed-bed column reactor for chitin recovery. *Advances in Chitin Science*, 4, 2-27.
- Conklin, D.E., 1983. The role of micronutrients in the biosynthesis of the crustacean exoskeleton. *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition.*, Delaware, ABD.
- Croisier, F. and Jerome, C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- da Silva, C.P., Bezerra, R.S., Santos, A.C.O.d., Messias, J.B., de Castro, C.R.O.B. and Carvalho Junior, L.B., 2017. Biological value of shrimp protein hydrolysate by-product produced by autolysis. *LWT*, 80, 456-461.
- Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.Y. and Hamblin, M.R., 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(7), 857-879.
- Das, S. and Ganesh, E.A., 2010. Extraction of chitin from trash crabs (*Podophthalmus vigil*) by an eccentric method. *Curr. Res. Biol. Sci.*, 2(1), 72-75.
- Doan, C., Tran, T., Nguyen, V., Nguyen, A. and Wang, S.-L., 2018. Conversion of squid pens to chitosanases and proteases via *Paenibacillus* sp. TKU042. *Mar Drugs*, 16(3), 83.
- Duan, S., Zhang, Y.X., Lu, T.T., Cao, D.X. and Chen, J.D., 2011. Shrimp waste fermentation using symbiotic lactic acid bacteria. *Advanced Materials Research*.
- Dun, Y., Li, Y., Xu, J., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y. and Zhao, S., 2019. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 420-426.
- Fagbenro, O.A., 1996. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*, 29(7), 595-599.
- FAO, 2014. *The State of Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Farkas, A., Salánki, J. and Varanka, I., 2003. Crustaceans as biological indicators of heavy metal pollution in Lake Balaton (Hungary). *Hydrobiologia*, 506-509(1-3), 359-364.
- Flores-Albino, B., Arias, L., Gómez, J., Castillo, A., Gimeno, M. and Shirai, K., 2012. Chitin and L (+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(7), 1193-1200.
- Francisco, F.C., Simora, R.M.C. and Nuñal, S.N., 2015. Deproteinization and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of

- crude chitin and chitosan. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 8(1), 107-115.
- Friedrich, M. and Tautz, D., 1995. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature*, 376(6536), 165-167.
- Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N. and Tokura, S., 1996. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 29(1), 29-34.
- Gachhi, D.B. and Hungund, B.S., 2018. Two-phase extraction, characterization, and biological evaluation of chitin and chitosan from *Rhizopus oryzae*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(11), 116-122.
- Gardner, K.H. and Blackwell, J., 1975. Refinement of the structure of beta-chitin. *Biopolymers*, 14(8), 1581-1595.
- Göksungur, Y., 2004. Optimization of the production of chitosan from beet molasses by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 79(9), 974-981.
- Gortari, M.C. and Hours, R.A., 2013. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 14-14.
- Hadley, N.F., 1986. The arthropod cuticle. *Scientific American*, 255(1), 104-113.
- Hajji, S., Ghorbel-Bellaaj, O., Younes, I., Jellouli, K. and Nasri, M., 2015. Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 167-173.
- Handayani, A.D., Sutrisno, Indraswati, N. and Ismadji, S., 2008. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresour Technol*, 99(10), 4414-4419.
- Herth, W. and Barthlott, W., 1979. The site of beta-chitin fibril formation in centric diatoms. I. Pores and fibril formation. *J Ultrastruct Res*, 68(1), 6-15.
- Hoffmann, K., Daum, G., Köster, M., Kulicke, W.-M., Meyer-Rammes, H., Bisping, B. and Meinhardt, F., 2010. Genetic improvement of *Bacillus licheniformis* strains for efficient deproteinization of shrimp shells and production of high-molecular-mass chitin and chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(24), 8211-8221.
- Horst, M.N., Walker, A.N. and Klar, E., 1993. The pathway of crustacean chitin synthesis. *The crustacean integument*, MN Horst and JA Freeman (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 113-150.
- Hülsey, M.J., 2018. Shell biorefinery: A comprehensive introduction. *Green Energy & Environment*, 3(4), 318-327.
- Johnson, E. and Peniston, Q., 1982. Utilization of shell fish wastes for producing of chitin and chitosan production. *chemistry and biochemistry of marine food product*. AVI Publ., Westport Connecticut.
- Jung, W., Jo, G., Kuk, J., Kim, Y., Oh, K. and Park, R., 2007. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 746-750.

- Khanafari, A., Marandi, R. and Sanatei, S., 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 5(1), 1-24.
- Khor, E., 2002. Chitin: a biomaterial in waiting. *Curr. Opin. Sol. State Mater. Sci.*, 6, 313-317.
- Khorrami, M., Najafpour, G., Younesi, H. and Hosseinpour, M., 2012. Production of chitin and chitosan from shrimp shell in batch culture of *Lactobacillus plantarum*. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 26(3), 217-223.
- Kim, W.J., Chun, W.Y., Park, J.S. and Lee, C.J., 2011. Characterization of mortar using calcified cell- CaCO_3 by microbial biomineralization. *Structures Congress American Society of Civil Engineers Structural Engineering Institute*.
- Kjartansson, G.T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K. and Weiss, J., 2006. Sonication-assisted extraction of chitin from North Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). *J Agric Food Chem*, 54(16), 5894-5902.
- Kumar, M.N.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Kurita, K., 1986. Chemical modifications of chitin and chitosan. Eds: R. Muzzarelli C. Jeuniaux and G. W. Gooday. *Chitin in nature and technology*, Springer US, 287-293.
- Le, T.H. and Nguyen, T.H., 2014. Biotechnological process of chitin recovery from shrimp waste using *Lactobacillus plantarum* NCDN4. *Journal of Vietnamese Environment*, 6(3), 251-255.
- Legarreta, G.I., Zakaria, Z. and Hall, G., 1996a. Lactic fermentation of prawn waste: Comparison of commercial and isolated starter culture. 399-406.
- Legarreta, I.G., Zakaria, Z. and Hall, G., 1996b. Lactic fermentation of prawn waste: Comparison of commercial and isolated starter cultures. Jacques Andre publishers: Lyon, France, 399-406.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A., 1992. Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370-397.
- Liu, P., Liu, S., Guo, N., Mao, X., Lin, H., Xue, C. and Wei, D., 2014. Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste. *Biochemical engineering journal*, 91, 10-15.
- Lodhi, G., Kim, Y.S., Hwang, J.W., Kim, S.K., Jeon, Y.J., Je, J.Y., Ahn, C.B., Moon, S.H., Jeon, B.T. and Park, P.J., 2014. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. *Biomed Res Int*, 2014, 654913.
- Lower, E.S., 1984. Polymers from the sea chitin and chitosan. *Manufacturing Chemist*, 55(10), 47.
- Mahmoud, N., Ghaly, A. and Arab, F., 2007. Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(1), 1-9.
- Mao, X., Guo, N., Sun, J. and Xue, C., 2017. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. *Journal of Cleaner Production*, 143, 814-823.

- Mao, X., Zhang, J., Kan, F., Gao, Y., Lan, J., Zhang, X., Hu, Z., Li, Y. and Lin, H., 2013. Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Biotechnology*, 22(4), 1023-1032.
- Mathur, N.K. and Narang, C.K., 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67(11), 938.
- Muzzarelli, R., 1977. Chitin. 1977. Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R.A., 1973. Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan. Eds. International series of monographs in analytical chemistry, Pergamon Press. New York.
- Muzzarelli, R.A.A., 1999. Chitin and Chitinases. Birkhäuser Basel, 340 p, Boston, Berlin.
- Neves, A.C., Zanette, C., Grade, S.T., Schaffer, J.V., Alves, H.J. and Arantes, M.K., 2017. Optimization of lactic fermentation for extraction of chitin from freshwater shrimp waste. *Acta Scientiarum. Technology*, 39(2).
- Nguyen, T.T., Barber, A.R., Corbin, K. and Zhang, W., 2017. Lobster processing by-products as valuable bioresource of marine functional ingredients, nutraceuticals, and pharmaceuticals. *Bioresour Bioprocess*, 4(1), 27.
- No, H.K. and Hur, E.Y., 1998. Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin. *J Agric Food Chem*, 46(9), 3844-3846.
- Oh, K.-T., Kim, Y.-J., Jung, W.-J. and Park, R.-D., 2007. Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Process Biochemistry*, 42(7), 1069-1074.
- Okafor, N., 1965. Isolation of chitin from the shell of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 101(2), 193-200.
- Ornum, J., 1992. Shrimp waste-must it be wasted. *Infofish International*, 6, 48-52.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L. and Shirai, K., 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*, 12(9), 3285-3290.
- Percot, A., Viton, C. and Domard, A., 2003. Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, 4(5), 1380-1385.
- Peter, M.G., 1995. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 32(4), 629-640.
- Phuvasate, S. and Su, Y.-C., 2010. Comparison of lactic acid bacteria fermentation with acid treatments for chitosan production from shrimp waste. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19(3-4), 170-179.
- Ploydee, E. and Chaiyanan, S., 2014. Production of high viscosity chitosan from biologically purified chitin isolated by microbial fermentation and deproteinization. *International Journal of Polymer Science*, 2014.
- Prameela, K., Murali Mohan, C., Smitha, P. and Hemalatha, K., 2010. Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1(3), 903-910.
- Ramírez, M., Rodríguez, A.T., Alfonso, L. and Peniche, C., 2010. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada*, 27(4), 270-276.

- Ramya, V.L., Sharma, R., Gireesh Babu, P., Patchala, S.R., Rather, A., Nandanpawar, P.C. and Eswaran, S., 2014. Development of chitosan conjugated DNA vaccine against noda virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of fish diseases*, 37(9), 815-824.
- Rao, M.S. and Stevens, W.F., 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80(9), 1080-1087.
- Rao, M.S. and Stevens, W.F., 2006. Fermentation of Shrimp Biowaste under Different Salt Concentrations with Amylolytic and Non-Amylolytic *Lactobacillus* Strains for Chitin Production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(1).
- Rao, M.S., Munoz, J. and Stevens, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 808-813.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W. and Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, 463(7284), 1079-1083.
- Rha, C., 1984. Chitosan as a biomaterial. 1. Annual MIT Sea Grant Lecture and Seminar: Biotechnology in the Marine Sciences, Cambridge, MA(USA).
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
- Robyt, J. and White, B., 1987. *Biochemical techniques: theory and practice*. Monterey: Brooks. Cole Publishing Company.
- Rudall, K. and Kenchington, W., 1973. The chitin system. *Biological Reviews*, 48(4), 597-633.
- Rudall, K., 1963. The chitin/protein complexes of insect cuticles. Eds: J. W. L. Beament, E. Treherne and V. B. Wigglesworth. *Advances in insect physiology*, Elsevier, Academic Press, 257-313.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N., Siddegowda, G.S., Sathisha, A.D. and Suresh, P.V., 2007. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresour Technol*, 98(8), 1642-1646.
- Shahidi, F. and Abuzaytoun, R., 2005. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in food and nutrition research*, 49, 93-137.
- Shahidi, F. and Synowiecki, J., 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J Agric Food Chem*, 39(8), 1527-1532.
- Shahidi, F., 1996. Role of Chemistry and Biotechnology in Value Added Utilization of Shellfish Processing Discards. *ChemInform*, 27(15), no-no.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, 10(2), 37-51.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Ohkouchi, K., Kitamura, K. and Okada, O., 1984. Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia* LC102. Academic Press: New York.

- Shukla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O.A. and Mamba, B.B., 2013. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46-58.
- Singh, A.K., 2010. Optimization of culture conditions for thermostable chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 2291-2298.
- Sini, T.K., Santhosh, S. and Mathew, P.T., 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research*, 342(16), 2423-2429.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A.A.Q., 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food chemistry*, 68(2), 147-152.
- Tan, M.L., Choong, P.F. and Dass, C.R., 2009. Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(1), 3-12.
- Thakur, V.K. and Thakur, M.K., 2014. Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(12), 2637-2652.
- Truong, T., Hausler, R., Monette, F. and Niquette, P., 2007. Fishery industrial waste valorization for the transformation of chitosan by hydrothermo-chemical method. *Journal of water science*, 20(3), 253-262.
- TÜİK, 2018. <http://www.tuik.gov.tr> (12.06.2019)
- Wang, S.L. and Chio, S.H., 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(7), 629-633.
- Winterowd, J. and Sandford, P., 1995. Chitin and chitosan. *Food Science and Technology*, 441-441.
- Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, J.B., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., Sala, E., Selkoe, K.A., Stachowicz, J.J. and Watson, R., 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314(5800), 787-790.
- Xuemei, Z. and Hawkins, S., 2002. Interactions of aquaculture and waste disposal in the coastal zone. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1(1), 8-12.
- Yang, J.K., Shih, L., Tzeng, Y.M. and Wang, S.L., 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5-6), 406-413.
- Younes, I. and Rinaudo, M., 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs*, 13(3), 1133-1174.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M. and Nasri, M., 2012. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*, 47(12), 2032-2039.
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K. and Nasri, M., 2014. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57-63.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Hayat İskenderun'da doğdu. İlk ve orta öğretimini İskenderun'da tamamladı. 2010 yılında girdiği Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden 2014 yılında bölüm birinciliği ve fakülte üçüncülüğü ile mezun oldu. 2017 yılında Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

