

**BATIK KÜLTÜRDE STERİL OLMAYAN
KOŞULLARDA FUNGAL KİTOSAN ÜRETİMİ**

Özden CANLI TAŞAR

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Serkan ERDAL
2015
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BATIK KÜLTÜRDE STERİL OLMAYAN
KOŞULLARDA FUNGAL KİTOSAN ÜRETİMİ**

Özden CANLI TAŞAR

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BATIK KÜLTÜRDE STERİL OLMAYAN
KOŞULLARDA FUNGAL KİTOSAN ÜRETİMİ

Doç. Dr. Serkan ERDAL danışmanlığında, Özden CANLI TAŞAR tarafından hazırlanan bu çalışma 06/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu . 08.10.2015. tarih ve 01.1.17... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bap projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2013/309

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

ÖZET

Doktora Tezi

BATIK KÜLTÜRDE STERİL OLMAYAN KOŞULLARDA FUNGAL KİTOSAN ÜRETİMİ

Özden CANLI TAŞAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serkan ERDAL

Kitosan, gıda ve beslenmede, materyal bilimlerinde, biyoteknolojide, eczacılıkta, tarım ve çevre korumasında çeşitli uygulama potansiyeline sahip çok yönlü bir maddedir. Ticari olarak deniz kabuklularının kabuklarında bulunan kitinin deasetilasyonu yolu ile elde edilir. Ayrıca Zygomycetes sınıfı mantarların hücre duvarlarında bulunmaktadır. Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı, steril olmayan şartlar altında yeni bir izolat olan *Rhizopus oryzae* PAS17 suşu ile kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Taguchi deney dizaynı (DD) metodu optimizasyon işlemi için kullanılmıştır. Kitosan üretimi üzerine önemli etkileri olan bazı besinsel ve çevresel faktörler çalışılmıştır. Öncelikle, steril olmayan koşulların sağlanması amacıyla fermentasyon ortamının sıcaklık ve pH değerleri araştırılmıştır. Ardından, melas miktarı (g/l), MgSO₄.7H₂O (g/l), inokulum miktarı, çalkalama hızı ve fermentasyon süresi optimizasyonda kullanılacak faktörler olarak belirlenmiştir. Optimal çalışma sıcaklığı 15°C ve pH 4,5 olarak belirlenmiştir. Taguchi DD ile optimize edilmiş fermentasyon ortamında elde edilen biyokütle miktarı 11,07 g/l, çözünmeyen alkali materyal (Ç.A.M.) miktarı 4,77 g/l ve kitosan miktarı 1,59 g/l'dir. Araştırma sonucunda, *R. oryzae* PAS17 suşu ile steril olmayan şartlar altında, biyokütle bakımından %14,4 ve Ç.A.M. bakımından %33,3 oranında verimle kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda kullanılan Taguchi D.D.'nin kitosan üretimini geliştirmek için uygun bir metod olduğu görülmüştür. Steril olmayan şartların kullanımı ve karbon kaynağı olarak melasın kullanımı ile daha düşük maliyetli ve daha yüksek verimli kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir.

2015, 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kitosan, melas, Taguchi DOE, *Rhizopus oryzae*, steril olmayan koşullar

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

FUNGAL CHITOSAN PRODUCTION IN SUBMERGED CULTURE IN NON-STERILE CONDITIONS

Özden CANLI TAŞAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Discipline of General Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serkan ERDAL

Chitosan is a versatile substance used in many different industries such as, food and nutrition, material sciences, biotechnology, nanotechnology, pharmaceuticals, agriculture and environmental protection industries. It is commercially produced by deacetylation of chitin of marine crustaceans. It also exists in cell walls of Zygomycetes class of fungi. In this study, use of molasses as carbon source for chitosan production by a newly isolate named *Rhizopus oryzae* PAS17 in non-sterile fermentation conditions was investigated. Taguchi design of experiment (DOE) method was employed in optimization process. Firstly, temperature and pH values of the fermentation medium were studied to obtain non-sterile conditions. Then, the factors used in optimization process were determined as molasses value (g/l), MgSO₄.7H₂O value (g/l), inoculum value, agitation speed and fermentation period. Optimum temperature and pH of the fermentation medium were obtained as 15°C and 4,5 pH. Optimized fermentation conditions by Taguchi DOE carried out 11,07 g/l of biomass, 4,77 g/l insoluble alkali materials (I.A.M.) and 1,59 g/l chitosan. Consequently, chitosan production was achieved by *R. oryzae* PAS17 in non-sterile conditions as approximately about 14,4% of yield in terms of biomass and about 33,3% of yield in terms of I.A.M. It was suggested that use of Taguchi DOE in optimization process is an appropriate method for enhancement of chitosan production. Use of non-sterile conditions and molasses as carbon source caused lower production cost with higher yield of chitosan production.

2015, 82 pages

Keywords: Chitosan, molasses, Taguchi DOE, *Rhizopus oryzae*, non-sterile conditions

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu alışma boyunca desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrubesinden her fırsatta istifade ettiğim değerli hocam ve danışmanım, Sayın Doç. Dr. Serkan ERDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü konuda desteklerinden ve ilgilerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarından Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya ve tüm bölüm elemanlarına, ayrıca, yardımlarını ve dostluklarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nevzat ESİM'e, Sayın Arş. Gör. Dr. Yağmur ÜNVER'e ve Dr. Derya YANMIŐ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında maddi manevi her konuda yanımda olan ve benden destek ve ilgilerini esirgemeyen çok kıymetli anneme, babama, kardeşime, sevgili yeğenlerim Reyvan ve Yasir DURAN ile kızım şevval TAŞAR'a ve değerli eşim Yrd. Doç. Dr. G. Erhan TAŞAR'a şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve bu çalışmayı 2013/309 no'lu proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

Özden CANLI TAŞAR

Ocak, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kitosanın Tanımı.....	1
1.2. Melasın Tanımı, Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	5
1.3. Taguchi Yönteminin Tanımı ve Kısa Tarihçesi.....	7
1.4. Steril Olmayan Koşulların Özellikleri ve Kullanımı.....	10
1.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Tekniği.....	10
1.6. <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin Genel Özellikleri.....	11
1.7. Araştırmanın Amacı.....	12
2. KURAMSAL TEMELLER.....	13
2.1. Kitosanın Kullanım Alanları.....	13
2.1.1 İlaç endüstrisi.....	13
2.1.2. Biyolojik ayırıştırma, biyomoleküllerin immobilizasyonu ve enerji kaynakları.....	18
2.1.3. Doku mühendisliği.....	20
2.1.4. Gıda endüstrisi.....	23
2.1.5. Çevre koruması ve kirlilik kontrolü.....	26
2.2. Biyoteknolojide Kitosanın Kullanımı Üzerine Yapılan Çalışma Örnekleri.....	27
2.3. Taguchi Deney Dizaynı Uygulama Yöntemi.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kullanılan fungus.....	34
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler.....	35
3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar.....	36

3.2. Yöntem	37
3.2.1. Kullanılan fungusun izolasyonu ve tanılanması.....	37
3.2.2. Fermentasyon ortamının sıcaklığının belirlenmesi	39
3.2.3. Fermentasyon ortamının pH'sının belirlenmesi.....	39
3.2.4. Melasta toplam şeker tayininin yapılması	39
3.2.5. Melasta protein tayininin yapılması	41
3.2.6. Taguchi D.D.'nin hazırlanması	42
3.2.7. Kitosanın ekstraksiyonu	43
3.2.8. FT-IR analizi	46
3.2.9. Verilerin analizi	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. Araştırmada Kullanılacak Fungusun Seçimi ve Belirlenmesi.....	47
4.2. Fermentasyon Ortamının Sıcaklığının <i>R. oryzae</i> PAS17'nin Biyokütle ve Kitosan Üretimine Etkisi	48
4.3. Fermentasyon Ortamının pH'sının <i>R. oryzae</i> PAS17'nin Biyokütle ve Kitosan Üretimine Etkisi	49
4.4. Melasın Toplam Şeker ve Protein Miktarı	50
4.5. Taguchi D.D. ile Elde Edilen Sonuçlar	50
4.6. ANOVA Testi Sonuçları	53
4.7. FT-IR Analizi Sonuçları	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
5.1. Mikroorganizmaların Genel Besin İhtiyaçları ve Mevcut Çalışma İçin Substrat Seçimi.....	56
5.2. Araştırmada Kullanılan Fungusun İzolasyonu	57
5.3. Steril Olmayan Kültür Şartlarının Sağlanması Amacıyla Fermentasyon Ortamının Sıcaklık ve pH'sının Etkilerinin Değerlendirilmesi....	59
5.4. Taguchi D.D. Uygulaması ile <i>R. oryzae</i> PAS17 ile Gerçekleştirilen Kitosan Üretimi Üzerine Optimal Faktörlerin Etkilerinin Değerlendirilmesi	62
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A°	Absorbans
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram
g/l	Gram/Litre
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
mPa	Milipaskal
N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen
sn	Saniye
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
A.Ş.	Anonim Şirketi
BKBD	Bir Kerede Bir Değişken
BSA	Bovin Serum Albümin
Ç.A.M.	Çözünmeyen Alkali Materyal
D.D.	Deney Dizaynı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNSA	Dinitro Salisilik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EOQC	European Organization for Quality Control
ε-PL	ε-polilisin
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GAG	Glukozaminoglikan
GI	Gastro İntestinal
IR	İnfra red
ITS	Internal Transcribed Spacer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Patates Dekstroz Agar
PGA	Poli Glikolik Asit
PP	Polipropilen
rpm	Dakikadaki dönme sayısı (Round per minute)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
S/G	Sinyal/Gürültü
TAE	Tris Asetik asit EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitin ve kitosanın açık yapısal formülü.....	4
Şekil 3.1. Kitosan üretimi için kullanılan izolat PAS-17.....	34
Şekil 3.2. Şeker tayini için kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik	42
Şekil 3.4. Kitosanın çöktürülmesi işlemi	45
Şekil 4.1. Sıcaklığın <i>R. oryzae</i> PAS17'nin biyokütle ve kitosan üretimi üzerine etkisi	49
Şekil 4.2. Sıcaklığın <i>R. oryzae</i> PAS17 adlı izolatının biyokütle ve kitosan üretimi üzerine etkisi.....	50
Şekil 4.3. <i>R. oryzae</i> PAS17 suşunun Taguchi L16 (4 ⁵) D.D. ile elde edilen biyokütle sonuçlarının S/G ortalaması	53
Şekil 4.4. FT-IR spektrumu ile ticari kitosan ve elde edilen kitosanın karşılaştırılması.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi.....	6
Çizelge 3.1. 10 ng kalıp DNA için 50 µl PCR karışımı.....	38
Çizelge 3.2. PCR programı	38
Çizelge 3.3. Kitosan üretiminin optimizasyonu için belirlenen faktörleri ve seviyeleri	43
Çizelge 4.1. İzolatların taranması sonucunda elde edilen biyokütle, kitosan ve verim oranları sonuçları ^{1,2}	47
Çizelge 4.2. Taguchi L16 (4 ⁵) D.D. tablosu ve S/G sonuçları.....	51
Çizelge 4.3. Taguchi D.D. ile elde edilen biyokütle sonuçları ve Ç.A.M ile Kitosan değerleri.....	52
Çizelge 4.4. Taguchi D.D. sonuçları için ANOVA değerleri	54
Çizelge 4.5. S/G oranı büyük olan iyidir karakteristiğine göre elde edilen yanıt tablosu	54

1. GİRİŞ

1.1. Kitosanın Tanımı

Son yıllarda gıda, ilaç, kozmetik endüstrileri gibi pek çok alanda uzun dönemde sağlık problemlerine sebep olan kimyasal koruyucuların etkisini azaltacak ve tekrar kullanım sağlayacak alternatif antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip olan ve doğal yöntemlerle üretilen maddelerin araştırılması yaygın hale gelmiştir. Bu amaçla, doğada en yaygın olarak bulunan polimerler üzerine yapılan araştırmalar sürekli artmaktadır. Selüloz, β -1,4 bağlı D-gluko-piranozun polimeri, kitin ise β -1,4-glukozidik bağıyla bağlı bir glukoz türevi olan N-asetil-D-glukozaminin yüksek moleküler ağırlıklı lineer bir polimeridir. Selüloz ve kitin yapısal olarak birbirlerine çok benzeyen ancak selülozda C-2 pozisyonunda bulunan hidroksi grubun yerine kitinde asetamido grubu bulunmaktadır. Selüloz ve kitin sırasıyla, yeryüzünde bitki ve hayvanlarda bulunan ve organizmayı koruyucu etkisi büyük makromoleküllerdir (Kaş 1997; Chatterjee *et al.* 2005; Kurita 2006; Honarkar and Barikani 2009). Kitin; algler, protozoonlar, böcekler, halkalı solucanlar, yumuşakçalar, eklembacaklılar, yuvarlak solucanlar, su yosunları, kılıççeneliler, kilitliler ve mantarlar gibi canlıların yapısına katılmaktadır. Kitin yalnızca ticari olarak deniz kabuklularının dış iskeletlerinden elde edilmektedir. Özellikle yengeç ve karides gibi canlıların kabukları, deniz kökenli gıda endüstrisinde atık olarak bulunduğundan kolay ulaşılabilen bir kitin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kitin, α kitin ve β kitin olmak üzere iki farklı formdan oluşmaktadır. Deniz kabuklularının dış iskeletinde %15-40 oranında α kitin bulunur. β kitin ise α kitinden daha azdır ve sillilerin zırhlarında ve diyatomların dikenlerinde bulunur. β kitin genel olarak α kitinden az miktarda, sillilerin zırhlarında ve diyatomelerin dikenlerinde bulunur. β kitin çoğunlukla mürekkep balıklarının kalemlerinden üretilmektedir (Chaussard and Domard 2004; Kurita 1997, 2006). Kitin aynı zamanda mantarların hücre duvarlarının genel bileşenlerinden biri olan ve sporlar ile misellerin yapısal zarlarına katılan bir polisakkarittir.

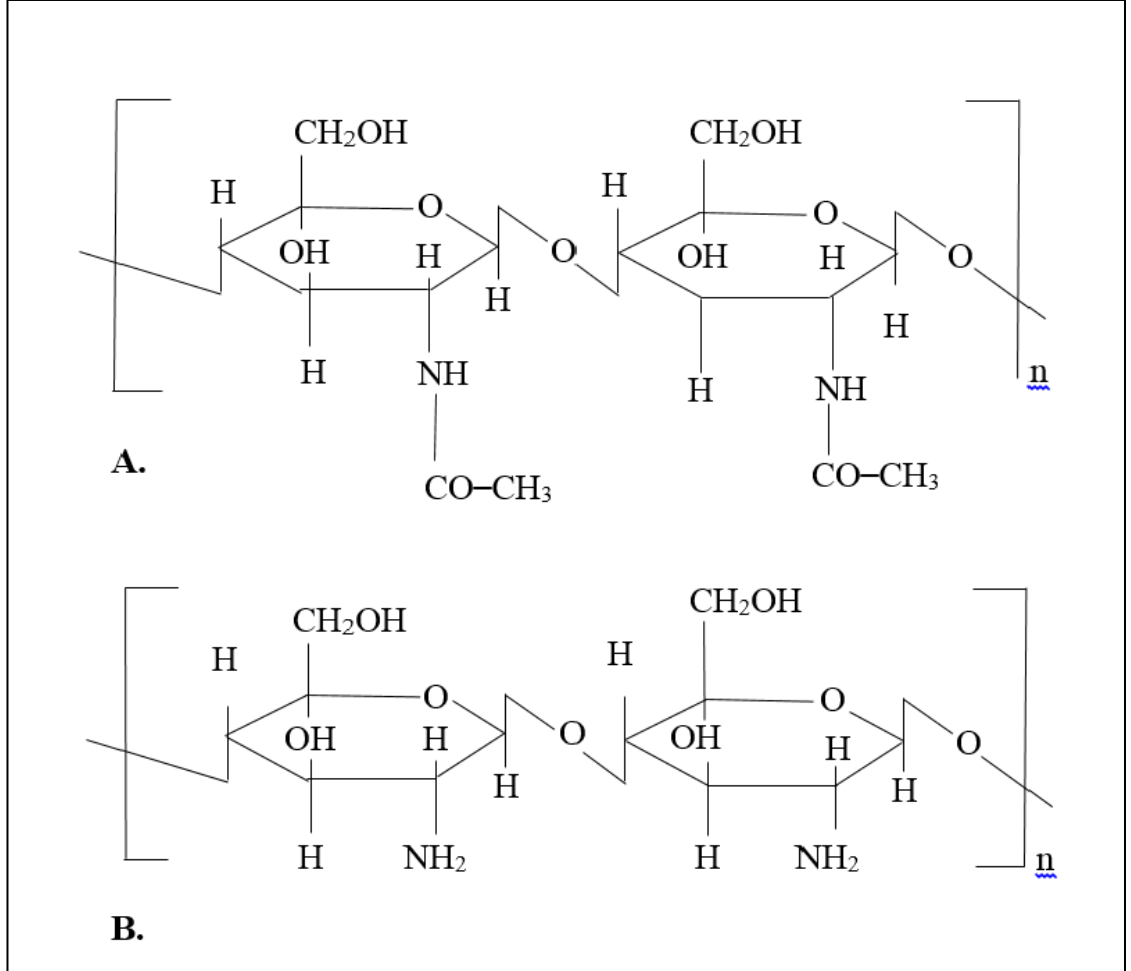
Kitosan, yapısal olarak β -1,4-D-glukozaminin N-asetil-D-glukozamine bağlanmasıyla oluşan lineer bir polimerdir ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Rouget tarafından 1859 yılında keşfedilen ve moleküler ağırlığı 50-2000 kDa arasında değişen polikasyonik bir polisakkarittir (Lindahl and Hook 1978; Kaş 1997; Chatterjee *et al.* 2005; Jiang 2011; Uçan ve Mercimek 2013). Kitin bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında alkalik uygulaması sonucunda deasetile olarak kitosana dönüşmektedir. Alkalik uygulamasından sonra fungal hücre duvarı materyalleri kitosan, glukoz ve kitosan ve glukozun kovalent bağlı olduğu kitosan-glukoz kompleksini oluşturmaktadır. Her ne kadar kitosan ve glukoz, β -glukozidik yapısına sahip olsalar da, iki polisakkarit arasındaki bağ α -glukozidik bağ türündedir. Glukoz, ayrıştırma işleminden sonra sediment oluşturarak kitosandan ayrılır. Kitosan ise serbest halde süpernatant içerisinde bulunur (Nwe and Stevens 2002). Bazı mantarlar sahip oldukları kitin-deasetilaz enziminin aktivitesi ile hücre duvarlarından kitosan izolasyonunda kullanılmaktadır (McGahren *et al.* 1984; George *et al.* 2011).

Ticari kitin kaynağı olarak daha çok deniz kabuklularının atık kabukları kullanıldığından, bu yolla elde edilen kitin için mevsimsel sınırlama, üretim sürekliliği, ürünün kitosana dönüşümü için kullanılan kimyasal yöntemlerin, üretilen kitosan için sınırlı endüstriyel uygulama alanı sunması gibi çok sayıda problem ortaya çıkmaktadır (Jeuniaux 1986). Öte yandan, demineralizasyon, deproteinizasyon, dekolarizasyon ve deasetilasyon aşamalarını içeren kimyasal proseslerin uygulanmasıyla da kitosan elde edilmektedir (Ak Kalut 2008; Songa *et al.* 2008; Roberts 2009; George *et al.* 2011; Uçan ve Mercimek 2013). Kitosan katı haldeyken şeffaf, kokusuz, tatsız ve sarımsı-beyaz renge sahip bir moleküldür. Kitinin çözünmemesine karşın, kitosan zincirinde bulunan serbest amin gruplardan dolayı bu grupların, protonasyonu pH 6,0'dan büyük asetik, laktik, malik, formik asit gibi sulu organik çözeltilerde kitosan çözünebilirken; sülfürik ve fosforik asit gibi inorganik asitlerde çözünmesi sınırlıdır. Kitosanın çözünebilirliği ve aktivitesi, üretildiği kaynağa, deasetilasyon derecesine ve moleküler ağırlığına bağlıdır (Goy *et al.* 2009; Jiang 2011; Kumirska *et al.* 2011; Xie 2011; Uçan ve Mercimek 2013).

Kitosanın deasetilasyon derecesi %40-98 oranları arasında bulunur ve üretim koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, sadece pH 9,0 ve üzerinde çözünebilir olduğu, buna karşın yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, pH 6,5 ve altında çözünür olduğu, nötral ve alkali pH değerlerinde çözünmediği gösterilmiştir. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanlar; glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi organik ve inorganik asitlerle tuz oluşturarak çözünür. Bununla birlikte, kitosanın hücre duvarından ekstraksiyonunda sadece asetik asit kullanıldığında kitosanın hücre duvarından bütünüyle saflaştırılmasının mümkün olmadığı Zamani *et al.* (2007) tarafından rapor edilmiştir. Asit içerisinde çözünen kitosan, lineer polielektrolit özellik kazanır ve negatif yüklü yüzeylerle kuvvetli etkileşim gösterir. Pozitif yüklü bir polimer olduğu için, negatif yüklü proteinler, anyonik polisakkaritler ve nükleik asitler gibi moleküller ile etkileşime girip çökelti oluşturabilir (Singla and Chawla 2001; Özbaş Turan 2006).

Kitosan, gıda ve beslenmede, materyal bilimlerinde, biyoteknolojide, eczacılıkta, tarım ve çevre korumasında çeşitli uygulama potansiyeline sahip çok yönlü bir maddedir. Gıda endüstrisinde sentetik koruyucuların yerine kitosan gibi biyolojik yönden aktif, biyomakromolekül ve türevlerinin kullanımı ile gıda güvenliğinin artırılması amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra ilaç endüstrisinde son yıllarda plastik yerine kitosan tabanlı biyofilm kullanımı giderek artmaktadır. (Rinaudo 2006; Shi *et al.* 2006; Hein *et al.* 2008; Aranaz *et al.* 2009; Honarkar *et al.* 2009; Kong *et al.* 2010; Dash *et al.* 2011; Anitha *et al.* 2014). Kitosan toksik değildir. Biyoyumluluğu-biyobozunurluğu yüksektir ve adsorpsiyon özelliği vardır. Bu yüzden diş macunu, el ve vücut kremleri, şampuanlar, kolesterol düşürücü serumlar, hücre enzim immobilizeri, kontakt lens üretimi ve göz bandajlarının yapısına girerek biyoteknoloji, gıda ve tarım endüstrisi, ilaç sanayii ve daha birçok önemli sektörde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca kitosan türevleri kuvvetli antibakteriyel ve antifungal özelliğe, bivalent mineralleri şelatlama yeteneğine sahip olduklarından dolayı ticari dezenfektan maddelerin yapısına katılırlar. Buna ilaveten kitosan ile kitinin, konakçının savunma sistemini aktive ederek patojen organizmaların yayılmasını önlediği bildirilmiştir (El-Ghaouth *et al.* 1992; Sudarshan *et al.* 1992; Chen *et al.* 2002; Alper 2003). Şekil 1.1'de sırasıyla A. ile kitin

ve B. ile kitosanın açık formülleri gösterilmektedir (Akbuğa 1995; Kaş 1997; Thanou *et al.* 2001; Dureja *et al.* 2001; Özbaş Turan 2006).



Şekil 1.1. Kitin ve kitosanın açık yapısal formülü

Zygomycetes sınıfı mantarlar diğer mantarlara göre özel bir hücre duvarı yapısına sahiptir. Zygomycetes sınıfı mantarın hücre duvarlarında %50'ye varan oranlarda kitosan bulunmaktadır (Gow and Gadd 1995; Ruiz-Herrera 1992). Bu sınıf mantarlarda kitosan, glukuronik asit, fosfatlar ve proteinlere ek olarak hücre duvarının ana bileşenlerinden biridir. Bu grup mantarlarda glukoz sadece sporelerde yer alırken, fosfat ise hücre duvarlarında bulunmaktadır (Ruiz-Herrera 1992; Gow and Gadd 1995; Zamani *et al.* 2007, 2010). Çoğu mantarın hücre duvarında yapısal polisakkarit olarak

kitin bulunurken, Zygomycetes grubu mantarlarda büyük oranda kitosan vardır (Arcidiacono and Kaplan 1992; Nadarajah *et al.* 2001; George *et al.* 2011).

1.2. Melasın Tanımı, Özellikleri ve Kullanım Alanları

Melas şeker sanayii yan ürünü olarak elde edilen ve endüstride sıklıkla kullanılan, kolay ve ucuz temin edilebilen bir maddedir. Şeker kristal halde elde edildikten sonra arta kalan koyu kahve renkli madde olan melas, büyük oranda şeker kamışından (*Saccharum officinarum*) ve şeker pancarından (*Beta vulgaris*) elde edilmektedir. 1990'lı yıllarda melas üretiminin 46 milyon ton olduğu bildirilmiştir (Ediz 2004; Ünver 2010). Ülkemizde, Erzurum, Konya, Amasya, Ankara gibi illerde devlete ve özel sektöre ait çok sayıda şeker fabrikası bulunmaktadır. Üretilen melasın çoğu şeker pancarından elde edilmektedir. Ülkemizde melas, hayvan yemi, sirke, hamur mayası, meyve suyu sanayisinde kullanılmaktadır. Ayrıca devlete bağlı şeker fabrikaları (Türkşeker A.Ş.) bünyesinde Erzurum, Amasya, Eskişehir ve Turhal'da bulunan şeker fabrikalarında melastan etanol üretimi gerçekleştirilmektedir (Türkşeker 2011). Kalın bir kıvama ve içerisindeki partiküllerden kaynaklanan özel bir kokuya sahip olan, kahverengiden koyu kahverengiye doğru farklı renklerde bulunan, sıcak ve soğuk suda tamamen çözünebilen melas, sıvı halde bulunmaktadır. Ortalama içeriği aynı olsa da melasın elde edildiği şeker pancarının yetiştiği iklim, toprak koşulları ile depolama ve şeker eldesi işlemlerine bağlı olarak bileşiminin değişebildiği belirlenmiştir. Melasın bileşimi, şeker pancarının kalitesine ve işleme teknolojisine bağlı olarak da farklılık göstermektedir. Melasın içerisinde yaklaşık %15 oranında su, %45-50 oranında sakkaroz, %1,0-2,5 oranında indirgen maddeler, %0,8-1,2 oranında rafinoz, %0,2-1,0 oranında invert şeker, %1,2 oranında uçucu asitler, %4-8 oranında pigmentler ve %6-10 oranında kül bulunmaktadır (Ulubaş 1991; Göksungur 1998, 2004; Bolobova and Kondrashchenko 2000; Ünver 2010; Gao *et al.* 2011). Asetik asit, propiyonik asit, formik asit ve bütirik asit melasta bulunan başlıca organik asitlerdir. Potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, sodyum, sülfat, klor ve fosfat mineralleri melasta bulunan başlıca inorganik bileşiklerdir. Bunların yanında melasta, biyotin, pantotenik asit, inositol, nikotinik asit, riboflavin, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler bulunmaktadır (Göksungur 1998;

Ünver 2010). Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi Çizelge 1.1’de verilmiştir (Burrows 1970; Anonymous 1982; Ünver 2010).

Çizelge 1.1. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi

Bileşen	% oranı
Kuru madde	78-85
Toplam şeker	48-58
Toplam azot	0,2-2,8
Kül	8,7
Fosfor (P ₂ O ₅)	0,02-0,07
Kalsiyum (CaO)	0,15-0,7
Magnezyum (MgO)	0,01-0,1
Potasyum (K ₂ O)	2,2-5,0
Sodyum	1
Klor	0,9
Toplam karbon (C)	28-34
Kükürt (SO ₃)	0,3-0,4
Toplam inorganik madde	4-11
Toplam lipit	0
Toplam lif	0
Mineral ve Vitaminler	µg/g
Bakır	13
Çinko	40
Biyotin	0,01-0,13
Pantotenik asit	7
Manganez	10
Riboflavin	0-0,75
Pridoksin	2,3-5,6
Folik asit	0,21
Demir	117

Çizelge 1.1. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi (devamı)

Bileşen	% oranı
Tiamin	1-4
Nikotinamid	37-51

Melas hem mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde oldukça elverişli bir substrattır hem de kolay ve ucuz temin edilebilme özelliği nedeniyle oldukça fazla tercih edilmektedir.

Fermentasyon ortamında başlıca karbon kaynağı olarak kullanılan melas, içerdiği diğer maddeler yönünden de ortamın zenginleşmesine imkân vermektedir. Bu nedenle melasın endüstriyel üretimlerde kullanım alanı oldukça geniştir. *Escherichia coli*'den etanol üretimi (Akbas *et al.* 2014), *Pseudomonas denitrificans* ile B₁₂ vitamini üretimi (Li *et al.* 2013), *Aspergillus niger* ile glukonik asit üretimi (Sharma *et al.* 2008), *Saccharomyces cerevisiae* ile biyoetanol üretimi (Siqueira *et al.* 2008), biyogaz üretimi (Lee *et al.* 2014), *Lactobacillus delbrueckii* ile laktik asit üretimi (Dumbrepatil *et al.* 2008), *Zymomonas mobilis* ile etil alkol üretimi (Cazetta *et al.* 2007), *Actinobacillus succinogenes* ile süksinik asit üretimi (Liu *et al.* 2008) melas ile yapılan çalışmalardan sadece birkaçıdır.

1.3. Taguchi Yönteminin Tanımı ve Kısa Tarihçesi

Bilindiği gibi, bir ürünün üretim sürecinde en önemli kıstaslardan biri kalitedir. Eskiden kalite kavramı pek fazla bilinmemekle birlikte, ürünlerin muayenesi kalitenin belirlenmesinde etkili olmuştur. Bununla birlikte üretim maliyetlerinde artışa sebep olduğundan, geçmişte üretilen her ürün için yapılan muayene faaliyetleri üretici işletmeler tarafından istenmeyen bir işlem olarak görülmekteydi. 1980'li yıllara kadar genellikle göz ardı edilen kalite kavramı, gelişen teknoloji ile birlikte ürünlerde aranılan özelliklerin başında gelmektedir. Kalite, Avrupa Kalite Kontrol Organizasyonu (European Organization for Quality Control, EOQC) tarafından "Bir malın ya da hizmetin tüketicinin isteklerine uygunluk derecesi" şeklinde tanımlanmaktadır (Özüak

2008). Kalitenin belirli sınırları bulunmamakta, aksine gün geçtikçe tüketicilerin istekleri doğrultusunda bu sınırlar gittikçe genişlemektedir. Bu amaçla üreticiler kalitenin artırılması amacıyla belirlenmiş bir hedefe ulaşmak amacıyla tasarlanan teknikler ve yapılan faaliyetler bütünü olan kalite kontrolünü kullanmaya başlamışlardır. Birçok kalite uzmanı, kalitenin artırılmasında, ürünün kontrol aşaması yerine üretim sürecinin tasarlanması aşamasında daha iyi verim elde edileceğini düşünmektedir. Bu yolla üretilen ürünlerin, üretim sürecinden sonra iyi veya kötü olarak sınıflandırılmasından daha uygun bir maliyet gerektireceği kesindir. Kalitenin geliştirilmesinde deney tasarımı tekniklerinin kullanılması ile üretim süreçlerindeki değişkenliğe sebep olan faktörlerin tespit edilerek, ortadan kaldırılmaları mümkün hale gelmektedir. Bu şekilde gerçekleşen üretimler kararlı bir hal almaktadır (Şanyılmaz 2006).

Kalitenin artırılması amacıyla eski yöntemlerden olan klasik deney tasarımı uygulamaları endüstriyel şartlar altında verim bakımından çok kıymetli uygulamalar değildir. Bir ürünün üretim sürecinde, kalite üzerine etkin olan faktörlerin sayısı arttığından, kullanılan deney sayısı, iş ve insan gücü, enerji sarfiyatı da giderek artmaktadır. Bu da endüstriyel üretimler için istenmeyen bir durumdur (Taylan 2009). Dünya genelinde meydana gelen savaşlar ve yıkımlar sonrasında toparlanmaya çalışan ve günümüzde etkin ekonomiye sahip olan ülkelerde 1900'li yılların başından itibaren ortaya konan kalite kavramlarının çoğu istatistiğe dayandırılmaktadır. Bu nedenle günümüzde kaliteli ürün elde edilmesi için istatistik uygulamaları kaçınılmaz hale gelmiştir (Hamzaçebi 2000; Şanyılmaz 2006; Baynal 2007).

Japonya'da 1980'li yıllardan sonra teknolojinin ilerleme nedeni incelenirken, bir makine mühendisi olan Dr. Genichi Taguchi tarafından 1940'lı yıllarda geliştirilen ve endüstriyel şartlarda deney tasarımı mümkün kılan Taguchi yöntemi etkili olduğu belirlenmiştir. Taguchi yönteminde kesirli faktöriyel tasarımı kullanılarak deney sayısının azaltılması dolayısıyla verimin artması sağlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra Japonya'da telefon sisteminin geliştirilmesinde aktif rol oynayan Dr. Taguchi, Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan bir telefon şirketinin kullandığı sistemin

aynısının Japonya’da kurulması için oluşturulan projenin, merkezin büyüklüğüne bağlı olarak ön görülen süre olan 20 yıl yerine, sağlam tasarım ve kesirli faktöriyel tasarım yöntemlerini kullanarak sadece 4 yılda tamamlanmasını sağlamıştır. Kalite alanındaki en iyi ödüllerden olan Deming ödülü Dr. Taguchi’ye bu başarısından dolayı verilmiştir (Şirvancı 1997). Bunun yanında, Japon imparatoru endüstriye yaptığı katkılardan dolayı Dr. Genichi Taguchi’ye ödül vermiştir.

Dr. Taguchi kaliteyi “Ürünün müşteriye ulaştıktan sonra toplumda meydana getirdiği kayıp” şeklinde tanımlamaktadır (Okutan 1995). Kaliteyi geliştirmek için temeli deney tasarımına dayanan Taguchi yöntemine, ortogonal diziler ve sağlam (robust) tasarım gibi kavramlar eklenmiştir. Taguchi yöntemi kalite kaybını dikkate alarak, deneysel dizayn tekniklerini bir araya getiren bir yöntemdir. Kalite sistemini üretim öncesi (off-line, çevrim dışı) ve üretim süreci (on-line, çevrim içi) olarak ikiye ayıran Taguchi yöntemi, ürünün kalitesinin üretim öncesindeki aşamanın sorunsuz ve iyi bir şekilde gerçekleşmesine imkân tanımaktadır (Ranjit 1990; Şanyılmaz 2006; Yıldırım 2011). Taguchi yönteminde amaç, hedef değer etrafındaki değişkenliğin azaltılması sonucu, üretim maliyetinin düşürülerek verimin artırılmasıdır. Bu yöntem sayesinde deney öncesi yapılan çalışmalar sonucunda kalite sabit tutularak, deney sayısında önemli derecede azalma gerçekleşmiştir (Fowkles and Creeveling 1995; Kağnıcıoğlu 1998; Ross 1998; Taylan 2009; Majdzadeh-Ardakani *et al.* 2010; Dadkhah *et al.* 2014). Kalite kaybının müşteride olumsuz etki yaptığı bilinen bir gerçek iken, Taguchi yönteminin bu kaybı engellemeye yönelik yaklaşımı, bu yöntemi diğer kalite kontrol yöntemlerinden ayırmaktadır. Canıyılmaz (2001) yaptığı çalışmada, geleneksel kalite anlayışının maliyeti artırdığını, ancak Taguchi deney tasarımının maliyeti azalttığını ve geleneksel kalite anlayışına göre kalitenin kontrolle sağlanırken, Taguchi deney tasarımına göre kalitenin ancak tasarım aşamasında sağlandığını bildirmektedir. Taguchi yönteminde ürünün üretim aşamasında performans karakteristiklerinin belirlenip ölçülmesi önerilmektedir. Hedef değer olan performans karakteristiğinin ideal değerinde oluşan sapma ne kadar azalır, ürünün kalitesi de o oranda artmaktadır (Altınbilek Ünal 2001). Diğer yandan, ürünün üretim öncesi ve üretim sürecinde tasarlanması sonucunda ürünün üretimde ve sonrasında kalite kontrol fonksiyonları azalmaktadır. Bu şekilde tasarruf

edilmesi sebebiyle Taguchi yöntemi vazgeçilmez bir istatistiki yöntem olarak kabul edilmektedir (Loncher and Matar 1990; Gencel 2007).

1.4. Steril Olmayan Koşulların Özellikleri ve Kullanımı

Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen üretimlerde, üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla, yeni izolatların keşfi, substrat olarak atık ve/veya ucuz ham maddelerin kullanımı, matematiksel modelleme tekniklerinin uygulanması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, son yıllarda bazı araştırmacılar, düşük sıcaklık ve düşük pH'da mikroorganizmaların gelişme yeteneğinden faydalanmak ve kendi antimikrobiyal bileşenlerini üretmesini sağlamak suretiyle, üretim maliyetlerinin düşürülmesini amaçlayan çalışmalar yapmışlardır (Sarris *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013; Aydoğan *et al.* 2014; Santamauro *et al.* 2014).

Jolly *et al.* (2006) çalışmalarında, kullandıkları mikroorganizmanın, fermentasyon ortamının sıcaklığını ve pH'sını düşürerek mikroorganizmanın pulkerriminik asit ve 2-feniletanol maddelerini sentezlenmesini ve bu şekilde kontaminasyon olmadan daha düşük maliyetli şarap üretiminin gerçekleşmesini sağlamışlardır.

Yang *et al.* (2013) bisfenol A ve diklofenak maddelerinin uzaklaştırılması amacıyla geliştirdikleri fungal membranın steril olmayan koşullarda çalışabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada beyaz köklü küf türü olan *Trametes versicolor* kullanılmış ve bu zararlı bileşiklerin atık sulardan uzaklaştırılmasında biyoparçalanma ve biyoadsorbsiyon yöntemleri steril olmayan şartlarda gerçekleştirilmiştir.

1.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Tekniği

İnfrared (kızıl ötesi, IR) spektroskopisi ile ilgili ilk çalışmalar 1905 yılında W. Coblentz tarafından yapılmıştır (Coblentz 1908; Turhan 2008). Taramalı IR spektrometrelerinde herhangi zamanda sadece monokromatör tarafından seçilen dalga boyundaki bilgi ölçülür. FT-IR cihazlarında monokromatör kullanılmaz ve ışık kaynağından gelen bütün

frekanslar örnek ile aynı anda etkileşime girmektedir. Bu sayede, spektrum, frekans ölçeği yerine zaman ölçeğinde elde edilmektedir. FT-IR tekniğinde sinyal formatında elde edilen bilgiye interferogram adı verilmektedir. İnterferogram infrared spektrumunu oluşturan frekansların tamamını içermekte, buna karşın, fazla miktarda dalga boyu içerdiğinden oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Cihazda bulunan bilgisayar yardımıyla ters fourier transformu adını alan matematiksel işlemle interferogram frekans ölçeğindeki bilgilere dönüştürülür. FT-IR spektroskopisi ile katı, sıvı ve gaz örnekleri için çok ilginç kalitatif ve aynı zamanda kantitatif bilgiler elde edilebilmektedir. Aynı zamanda, IR spektroskopisi gibi her dalga boyunun tek tek taranması gerekmediğinden, spektrum birkaç saniye içerisinde alınmaktadır (Erdik 1998; Turhan 2008; Pavia *et al.* 2009; Özkan 2011).

Son yıllarda ilerleyen teknoloji ile FT-IR spektroskopi kullanımı yaygınlaşmaktadır. FT-IR spektroskopi yöntemi ile minimum örnekle hızlı çalışma imkanı sağlandığından özellikle gıda uygulamalarında kullanılmaktadır (Vlachos *et al.* 2006).

1.6. *Rhizopus oryzae*'nin Genel Özellikleri

Mantarlar (Fungi) aleminin, Mucorales takımı, Mucoraceae familyası üyelerinden olan *Rhizopus oryzae* beyaz hifsi yapıda pamuk yığını şeklinde bir görünüme sahiptir. Hiflerinde septum bulunmaz ve sporangioforun çıktığı bölgede, kök görevi yapan ve küfün besin içerisine giren kısmı olan “rizoidler” bulunur. Sporangioforların ucunda bulunan sporangiumlar siyah renktedir. Genellikle sebze, meyve ve diğer gıda maddelerinde bozulmaya yol açan ve fırsatçı insan patojeni olan bir türdür. Mukormikozis hastalığına yol açan etkenlerin başında *R. oryzae* geldiği bilinmektedir. (Bulut 2001; Petrikos *et al.* 2012; Gardiner *et al.* 2015).

Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı fermentasyonlarda *R. oryzae* kültürasyon şartlarına ve glukozun kullanımına bağlı olarak çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. *R. oryzae*'nin kontrolünde son metabolit üretiminde anahtar maddenin oksijen olduğu bilinmektedir. Yeterli miktardaki oksijen desteği ile laktat dehidrojenaz

enziminin pirüvatın yüksek oranda laktata dönüşümünü gerçekleştirdiği bilinmektedir. Diğer yandan düşük miktarda oksijenin laktat üretimini azalttığı, buna karşılık, oksijensiz solunum yoluyla etanol oluşumunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Skory 2000, 2003). Endüstriyel öneme sahip pek çok maddenin (ksilanaz enzimi, laktik asit, fumarik asit, lipaz enzimi, monoolein, fenolik bileşikler, etil bütirat, proteaz enzimi, vs.) üretiminde *R. oryzae*'den faydalanılmaktadır (Sun *et al.* 2012; Taskin *et al.* 2012; Yu *et al.* 2012; Grosso *et al.* 2013; Dey and Kuhad 2014; Ghattas *et al.* 2014; Hsiao *et al.* 2014; Su *et al.* 2014; Zhizhuang *et al.* 2014).

1.7. Araştırmanın Amacı

Rhizopus oryzae PAS17 suşu düşük sıcaklıktaki ortamlardan izole edilen funguslar içinde melas ortamında en yüksek oranda kitosan üretimi gerçekleştirdiği için araştırmamızda tercih edilmiştir. *Rhizopus oryzae* PAS17 suşu kullanılarak steril olmayan şartlar altında kitosan üretiminin deneysel dizayn yöntemlerinden olan Taguchi uygulaması ile optimizasyonu amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kitosanın Kullanım Alanları

2.1.1. İlaç endüstrisi

Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin yerine daha etkin hale getirilen nanoteknolojik anti-kanser ilaçları ve gen taşıyıcı sistemlerinde kitosanın kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Bao *et al.* 2011). Nanopartiküllerle gerçekleştirilen ilaç taşıma sistemleri, nanometre boyutlarındaki partiküllerin kanser hücrelerindeki kan damarlarından direkt girişleri sayesinde kanser tedavisini geliştirmektedir. Bu amaçla antikanser ilaçların kapsülleme işlemlerinde doğal polimerlerin kullanımları tercih edilmektedir. Doğal polisakkaritlerden olan kitosan aynı özellikteki aljinat ile birlikte, biyobozunurluk, biyoyumluluk, toksik olmayan ve biyoyapışkan özellikleri sayesinde nanopartiküllü ilaç taşıma sistemlerinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Bhunchu and Rohsitthisak 2014).

Nanoteknolojinin kullanımıyla birlikte ağız yoluyla alınan insülinin dağılımı ile ilgili ortaya çıkan sorunların çözümü için uzun zamandır yapılan araştırmalarda çeşitli doğal polimerler kullanılmaktadır. Damar içi yolla verilen insülin genelde hasta tarafından kabul edilmekte ancak, ağız yoluyla alınan insülinin faydası aynı şekilde gerçekleşmemektedir. Ağız yoluyla alınan insülinin yapısına katılan doğal polimerlerin biyoyumluluk-biyobozunurluluğunun bulunması, bağışıklık cevabı oluşturmaması ve toksik olmaması gerekmektedir. Mukhopadhyay *et al.* (2012) ağız yoluyla alınan insülinin yapısına katılan kitosan ve kitosan nanopartiküllerinin, insülinin etkin bir şekilde taşınmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Gastrointestinal (GI) sistemin ağır asidik şartlarına dayanıklı insülin geliştirilmesi için bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Mide ve bağırsakta bulunan ağır asidik pH ve proteolitik enzimler gibi kimyasal bariyerler GI sisteminde dışarı salınan insülinin etkin bir şekilde emilimini sınırlandırmaktadır. Partikül büyüklüğüne bağlı olarak bağırsak çevresinin emilim

durumu seçici olmakta ve epitel hücrelerinin bazolateral kısımlarından insülinin alımında bir bariyer olmaktadır. Nanopartiküller ise bu bariyerlerin aşılması ve insülinin etkin bir şekilde dağıtılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle kitosan nanopartikülleri ağız yoluyla alınan insülinin dağıtılmasında kullanılmaktadır (Mukhopadhyay *et al.* 2012).

Polikatyonik ve uzun zincirli yapısından dolayı kitosan doğal antimikrobiyal bir yapıya sahiptir. Kitosanın moleküler ağırlığında meydana gelen bir artış, inhibe edilen mantar sayısında artışa neden olmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastaların derilerinin yüzeysel mantar enfeksiyonlarına karşı oldukça hassas oldukları bilinmektedir. Diyabetik, şişman ve belli antifungal ilaçlara direnç kazanmış kişiler risk grubunu oluşturmakta ve bu durumda meydana gelen enfeksiyonlar kronik hale gelebilmektedir. Öte yandan bu hastaların tedavilerinde kullanılan maddelerin yan etkilerinin azaltılması, patojen mikroorganizmaların direnç oluşturamayacağı yeni ajanların belirlenmesi ve özellikle tedavi için kullanılacak antifungal proteinler üzerine yapılan araştırmalar giderek artmaktadır. Evrim (2013) bir antifungal çeşidi olan K5 tipi maya toksik proteinini saf halde izole ederek Panomycocin olarak adlandırmıştır. Çalışmada Panomycocin, terapötik proteinlerin enkapsüle edilmesinde kullanılan ve toksik etkisi bulunmayan etkili bir taşıyıcı sistem olan kitosan içeren nanopartiküller ile enkapsülasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırma sonucunda, yüzeysel deri enfeksiyonlarına sebep olan dermofitlere karşı güçlü fungisidal yeteneğine sahip bir proteinin topikal bir preparat haline getirilmesine olanak sağlanmıştır.

Yetkin (2001) kronik diş eti hastalığı bulunan hastaları gruplara ayırarak %15 metronidazol içeren %1'lik kitosan jel ile diş taşı temizliği ve kök düzeltmesi ile yalnız diş taşı temizliği ve kök düzeltmesi işlemlerinin klinik parametreler üzerine etkisini değerlendirmiştir. Kronik periodontitis tedavisinde kitosan jelinin tek başına ve diş taşına sebep olan patojenlere karşı etkin bir antibiyotik ile beraber kullanılabileceği belirlenmiştir.

Gastrik enfeksiyonların başında gelen *Helicobacter pylori*, dünya nüfusunun yaklaşık %50'sinde gastrik mukoza içerisinde kolonize olan bir bakteri çeşididir. Kronik hale gelen *H. pylori* enfeksiyonu ülser, gastrik kanser gibi hastalıklarla da ilgilidir. Tedavi amacıyla günümüzde kullanılan yöntemlerin çoğu hastaların yaklaşık %20'sinde başarısızlıkla sonuçlanan antibiyotik tabanlı terapilerden oluşmaktadır. Doğal ve katyonik bir polisakkarit olan kitosanın *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Kitosan muko-yapışkan özelliği sayesinde, gastrik taşınma amacıyla çoklu elektrot kompleksleri veya antibiyotik kapsülleme tekniği ile mikro/nanopartiküllerin içerisinde kullanılmaktadır. Fakat alternatif moleküllerin birlikteliği de mümkündür. Kitosanın antimikrobiyal bağlanma özelliği sayesinde *H. pylori*'nin bağlanması ve konakçı organ olan mideden ayrıştırılması amacıyla kullanımı önerilmektedir (Goncalves *et al.* 2014).

Deri içerisinde ilaç taşınımında kullanılan maddeler kitosan ile geliştirilerek modifiye edilmiştir (Thacharodi and Rao 1996). Model ilaç olarak nifedipine ve propranolol hidroklorid kullanılarak kitosan-kollajen bileşiği içeren membranlar test edilmiştir. Ganji and Abdekhodaie (2010) ısıya duyarlı kitosan aşılınmış poli laktik-ko-glikolik asit membranları geliştirmişlerdir. Çalışmada moleküler ağırlığı $2,5 \cdot 10^5$ ve desasetilasyon derecesi %82,5 olan kitosanın, kitosan aşılınmış poli laktik-ko-glikolik asit membran üretiminde kullanılabileceği gösterilmiş ve bu membranların ısıya cevap verebilen ilaç taşıma ajanları olarak kullanımlarının uygun olduğu bildirilmiştir. Li *et al.* (2002) oksitlenmiş glukoz-çapraz bağlı N-alkillenmiş kitosan membranlarıyla ilaç nüfuz etme çalışmaları için vitamin B₂'yi model ilaç olarak kullanmışlardır.

Kemik dolgu maddesinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla antibiyotik bağlı kitosan filmleri üretilmektedir. Antibakteriyel analizler, kitosan filmlerinin bakteriyel gelişimi mükemmel bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca sitotoksisite, parçalanma ve *in vivo* değerlendirmeler ilaçla bağlanmış kitosan filmlerinin etkinliğini artırdığını göstermektedir (Noel *et al.* 2008). Birbirine bağlı kitosan-sodyum aljinat bileşiği çok yüksek sıcaklığa dayanıklı ve kontrollü ilaç salınımı profili gösteren bir bileşiktir (Ke *et al.* 2010).

Ho *et al.* (2009) heparin fonksiyonlu kitosan-aljinat yapı iskelesi ile bağlanmış temel fibroblast büyüme faktörünü geliştirmişlerdir. Çalışma, heparinin sıkı bir şekilde kitosan-aljinat polielektrolit bileşiğine immobilize edilebileceğini ve bu sistemin doku onarımında potansiyel iyileştirici bir yöntem olabileceğini göstermektedir.

Yaralanma olayı, incinme sonrasında ortaya çıkan ve doku kaybının derinliğine bağlı olarak, geri dönüşümlü veya dönüşümsüz bir sonuçtur. Enfeksiyon oluşumu yaraların onarımında önemli bir engel oluşturmaktadır. Enfekte olan yaralar antimikrobiyal ajanları içeren materyallerle muamele edilir. Bu amaçla farklı sentetik ve doğal polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerler, aljinat, jelatin, kollajen, kitin, kitosan vs. içermektedir. Kitinöz materyallerin yara iyileştirilmesi uygulamalarında kullanıldığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Anitha *et al.* 2014). Çözücü ile astarlanmış kitosan membran metodu yaraların iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hazırlanan membranların Bactigras (antiseptik yara örtüsü) kullanan hastalar üzerinde yara iyileştirme etkileri araştırılarak, pozitif kontrol olarak ve kitosan membranla muamele edilen hastaların granülasyon tabakasında rejenerasyonu ve epitel dokularının yenilenmesinde artış elde edildiği bildirilmiştir (Azad *et al.* 2004). Çözücü ile astarlama metodu kullanılarak elde edilen kitosan-soya membranların epitel doku onarımını ve epidermal tabaka oluşumunu hızlandırarak bir hafta içerisinde yaranın iyileşmesini sağladığı rapor edilmiştir (Santos *et al.* 2013).

Marreco *et al.* (2004) elde ettikleri kitosan membranların mekaniksel kuvvet, morfoloji ve sitotoksitesi üzerine farklı sterilizasyon yöntemlerinin etkilerini analiz etmiştir. Sterilizasyon amacıyla etilen dioksit gazı, gama radyasyonu ve %70'lik etanole batırma yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda etilen dioksit gazının en uygun sterilizasyon tekniği olduğu tespit edilmiş ve diğer yöntemlerin morfolojide değişikliğe sebep olduğu ve hücreler için toksik oldukları bulunmuştur. De Queiroz *et al.* (2003) faz-inversiyon tekniği ile hazırlanan bölgesel bir anti-enfektif ilaç olan nitrofurazone ile poli vinil alkol/kitosan laktat karışımını hidrojeller ile birleştirmiştir. İlacın mekanik özellikleri ve membrandan *in vitro* ilaç salınımı gibi özellikleri değerlendirilmiştir. Membran sürdürülen ilaç salınım profili göstermiştir. Membranın

mükemmel mekaniksel kuvvet ile sıçanlarda oluşturulan yaralarda ileri *in vivo* deneylerde değerlendirmesi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, bu materyallerin yara örtüsü olarak kullanılabileceği önerilmiştir.

Kitin/kitosanın deasetilasyon derecesini ters etkileyen özellikler, çözünürlük, viskozite ve biyouyumluluktur. Biyolojik parçalanabilme özelliği moleküler ağırlığının tam aksine asetilasyon derecesiyle doğrudan ilgilidir. Antimikrobiyal, analjezik, hemostatik özellikleri, artan kitin ve kitosan tabanlı sistemlerin asetilasyon derecesine ters etkili olarak çalışmakta; ayrıca, moleküler ağırlıkta oluşan artışlar ile geçişlerin artması ve yapışkanlık özelliği artmaktadır. Sonuç olarak *N*-asetilasyon derecesi, kristallinite, parçalanma ve moleküler ağırlık kitin/kitosan membran ve yapı iskelelerinin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini büyük oranda etkilemektedir (No *et al.* 2002; Rinaudo 2006; Aranaz *et al.* 2009; Weinhold *et al.* 2009; Kong *et al.* 2010; Tsao *et al.* 2010; Dash *et al.* 2011; Domard 2011; Kumirska *et al.* 2011; Anitha *et al.* 2014).

Kitin ve kitosan 5-floro urasile bağlanarak tümörler için terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Yine normal olarak kullanılan 5-floro urasilden daha az yan etkiye sebep olduğu da bildirilmiştir. Kitin/kitosan kullanılan antitümör ajanlarının diğer polisakkaritlerden daha az toksik etkiye sebep olduğu rapor edilmiştir (Ouchi 1990; Ouchi *et al.* 1990). Sülfatlanmış kitosan yüksek oranda antitrombojenik aktivite göstermektedir. Kanın pıhtılaşmasının engellenmesi amacıyla heparin benzeri görev yapan kitin/kitosan sistemleri geliştirilmiştir (Seiichi *et al.* 1994). Kitosanın çapraz bağlanmasıyla geliştirilen bir hidrojel, pH'ya bağlı salınımı gerçekleştiren cimetidine ilacının yapısında kullanılmaktadır. Kitosan içerikli jelin hidrolizasyonu pH 7,0'den yukarı değerlerde gerçekleşmezken, asidik pH'da görev yapmaktadır (Kang De *et al.* 1994). Çapları 250 nm civarında olan nanokürecikler içerisinde bulunan antineoplastik ajan olan 5 floro urasilin salınım oranı kitosanın deasetilasyon derecesi ve diğer örtü polisakkaritleri tarafından kontrol edilmektedir (Yuichi *et al.* 1994).

2.1.2. Biyolojik ayrıştırma, biyomoleküllerin immobilizasyonu ve enerji kaynakları

Kitosan hücreler arası maddeye benzerliği sebebiyle buğday rüşeymi aglütininin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. SDS-PAGE yöntemiyle %100 saflıktaki buğday rüşeymi %70 verimle elde edilmektedir (Senstad and Mattiason 1989). Kalsiyumla birleşmiş karboksimetil kitin, D ve L-fenilalanin gibi nötral amino asitlerin özel şiral Emiliminde kullanılmaktadır. Ayrıştırma işlemi L-fenilalaninin α -karboksil gruplarının kalsiyum tarafından bloke edilmesiyle gerçekleşmektedir. 33 etilen glikol diglisidil eterin çapraz bağlanmasıyla oluşturulan suda çözünmeyen anyon değiştirici bir membran, kitosan ve polivinil alkolün kullanımıyla yapılmıştır. Bu membran nükleik asit bazlarının yoğunluk gradientlerinin aksine çalışarak seçici taşınmalarında rol almaktadır (Tadashi *et al.* 1993). Kitin ve kitosan çapraz bağlı gluteraldehit membranları su/etanol buharının sızma tekniği ile ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemle en yüksek ayrıştırma faktörü olan 6000 ayrıştırma faktörü elde edilmiştir (Motonobu *et al.* 1994). Yeni geliştirilen mikroporlu bir kitosan-boya afinite membran ile polieter sülfonun, protein ayrıştırılmasında yararlı bir şekilde kullanılabildiği bildirilmiştir. Faz inversiyon metodunun kullanılmasının ardından Cibacion mavisi F3GA boyasının membrana tutturulması ile gerçekleştirilmektedir (Xianfang and Eli 1996; Felse and Panda 1999).

Lipaz bağlama etkinliklerine göre araştırılan altı farklı materyal arasından kitosanın en yüksek verimle immobilize lipazı bağladığı bildirilmiştir (Jei *et al.* 1990). Endo 1,4- β -ksilanaz enziminin immobilizasyonu için kullanılan hidrojel boncukları, kitosan ile ksantan arasında gerçekleşen etkileşimle hazırlanmaktadır. En yüksek immobilize olmuş ksilanaz enzimi aktivitesi serbest enzimden %60-70 oranında daha yüksek aktivite göstermektedir (Dumitru and Esteban 1997; Felse and Panda 1999).

Gıda endüstrisinde suya verilen zararlı gıda boyalarının adsorbsiyonunda kitosandan faydalanılmaktadır. Kitosanın doğal bir polimer olmasından dolayı boya adsorbsiyonunda kullanımı ile alternatif bir çevre dostu adsorbsiyon yöntemi ortaya çıkmıştır. Bu alanda boya giderimi için kitosan uygulamasında yüzey alanı ve porosite

özelliklerinden dolayı bazı sorunlar oluşmaktadır. Esquerdo *et al.* (2014) megaporöz yapıda geliştirdikleri kitosan yapı iskelesini kullanarak gıda boyalarının çözeltilerden uzaklaştırılması amacıyla kullanımını araştırmışlardır. Çalışmada kızılötesi spektroskopisi, elektron mikroskopisi ve yapısal karakteristikleri tespit etmişler ve yapı iskelesi ile boya arasında gerçekleşen etkileşimleri değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar por büyüklüğünün 50-200 µm boyutlarında olduğunu, porositesinin %92,2±1,2 civarında olduğunu ve özel yüzey alanının 1135±2 m²/g olduğunu göstermiştir. Bu megaporöz kitosan yapı iskelesinin iyi yapısal karakteristiğe sahip olduğu ve yüksek adsorbsiyon kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir (Esquerdo *et al.* 2014).

Endüstri atık maddelerinden sıvı yağların geri dönüşümü amacıyla manyetik özellikli kitosan nanopartikülleri yağı kendisine bağlamak suretiyle bir ayrıştırma materyali olarak potansiyel oluşturmaktadır. Alışıl gelmiş yağ ayrıştırma yöntemlerinden sonra geliştirilen yeni CoFe₂O₄-kitosan nanopartikülleri mükemmel bir biyoparçalanma ve yüksek seviyeli kontrol edilebilme olanağı sunmaktadır. Elektron mikroskopisi tekniği ile elde edilen sonuçlar, küp şeklindeki manyetik CoFe₂O₄ nanopartiküllerinin küre şeklindeki kitosan nanopartikülleriyle sarılmış halde olduğunu göstermiştir. CoFe₂O₄-kitosan nanopartiküllerinin boyutlarının 100 nm'nin altında olduğu belirlenmiştir. Bu yöntemle yağ-su ara yüzeyinde ultra düşük seviyelerde ara yüzey gerilimi oluşması sağlanarak aynı zamanda tuza karşı dayanıklı bir yağ ayrıştırma sistemi geliştirilmiştir (Zheng and Lian 2015).

Doğal enerji kaynaklarının giderek azalmasıyla birlikte alternatif enerji kaynakları arayışları hızla artmaktadır. Yenilenebilir ve çevre dostu enerji kaynakları için yapılan çalışmalar, yakıt hücrelerinin keşfine sebep olmuştur. Yakıt hücresi, bir yakıtta depolanmış olan kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren bir elektrokimyasal ayardır. Alternatif enerji kaynakları arasında bulunan ve kullanım alanları giderek artan yakıt hücrelerinin imalat sürecinde kullanılan materyallerin uygun özellikte malzemeler olması yönünde yapılan araştırmalar, orta derecedeki sıcaklıklarda hidrojen polimer elektrolit yakıt hücresi, direkt metanol yakıt hücresi, alkalik yakıt hücresi ve biyoyakıt hücresinin membran elektrolitleri ve elektrotlarının yapımında ucuz ve doğa dostu bir

polimer olan kitosanın etkin bir şekilde kullanıldığını göstermektedir (Ma and Sahai 2013).

2.1.3. Doku mühendisliği

Kitin ve kitosan, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen yapısıyla tıbbi uygulamalarda kullanılmak üzere pek çok avantaja sahiptir. İlaç taşınma sistemlerinde, gen terapisinde, doku mühendisliği ve yaraların iyileştirilmesinde bu biyomateryallerin membranlar, süngerler, jeller, mikro ve nanopartiküller ve nanofiberler gibi farklı formlarda kolaylıkla işlenebildikleri için yaygın şekilde kullanımları artmaktadır (Anitha *et al.* 2014). Doku mühendisliğinde biyolojik bozunabilen bir yapı iskelesi yeni doku gelişiminin uyarılması ve uyum sağlaması için geçici bir iskelet olarak görev yapabilmektedir.

Li *et al.* (2005) doğal olarak elde edilen kitosan ve aljinat polimerlerinin önemli derecede geliştirilmiş mekaniksel ve biyolojik özelliklerini araştırmışlardır. Geliştirilmiş mekanik özelliğinin kitosan ve aljinatın kompleks yapısının şekillenmesiyle ilgili olduğu belirtilmiştir. Kemik oluşturan osteoblast hücreleri kitosan-aljinat iskelesine bağlanarak, kemik oluşumu ve kalsifiye matriksin dolmasını gerçekleştirmiştir. *In vivo* çalışmalar hibrid iskelenin yüksek derecede doku uyumluluğuna sahip olduğunu göstermiştir. Kalsiyum depolanmasının implantasyondan sonra dört hafta gibi kısa bir sürede gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Kıkırdak doku dejenerasyonu genetik anormalliklerde, travma veya cerrahi müdahale gerektiren durumlarda meydana gelen bir bozukluktur. Kıkırdak dokunun rejenerasyonu işleminde uyarıcı etki gösteren glukozaminoglikanlarla (GAG) benzer etkiye sahip olan kitosanın kondrojenesis (kıkırdak doku yapımı) işleminde araştırılmıştır. Liyofilize halde elde edilen kitosan mikroporöz yapıdaki iskelenin içerisine yerleştirilerek, domuz kondrositleri ile bu iskelelere aşılama yapılmıştır. Çalkalamalı duvar biyoreaktöründe 28 gün içerisinde kondrojenesis için analiz edilmiştir (Nettles *et al.* 2002). Singh *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, kitosan hibrit yapı iskelelerine bovin serum albüminin

(BSA) apraz bağlanmasıyla daha iyi bir kıkırdak doku mühendisliği uygulaması yöntemi olarak kullanmışlardır. Çapraz bağlayıcı maddeler olarak formaldehid ve sodyum tripolifosfat kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyon ve doğrudan bağlama yöntemleri ile BSA, gelişim faktörü olarak rol almıştır.

Tendon ve ligamentler, yaralanma ile oluşan hasarın sebep olduğu doku kaybının miktarını, kanama ve anatomik bölgesi nedenleriyle başarılı iyileşme gösteren hücre altı dokulardır. Hiyaluronik asitle kaplı kitosan fiberleri tendon ve ligamentlerin tedavisinde mekanik kuvveti artırma sağlamıştır (Funasoki *et al.* 2005; Shearn *et al.* 2011; Kishore *et al.* 2012).

Kitosan ve kitin, cilt/deri doku mühendisliğinde doku rejenerasyonunu hızlandıran hemostazis ve fibroblastların kollajen fibrilleri uyarması özellikleri nedeniyle yaygın bir Şekilde cilt yerine geçen materyallerde kullanılmaktadır (Taravel and Domard 1995, 1996; Cho *et al.* 1999; Ma *et al.* 2001). Pamukfiber tip formunda bulunan kitosanın yaradaki iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (Ueno *et al.* 1999).

Biyolojik zellikleri nedeniyle kitin ve kitosan karaciğer doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Karaciğer dokusunun hücreler arası matriksinin esas maddesini oluşturan GAG'lar kitin ve kitosanın yapısında bulunduğundan karaciğer doku mühendisliğinde kullanılan membran/yapı iskelesi yapımında bunlardan yararlanılmaktadır. Kitosan/kollajen matriksi çapraz bağlama ile hazırlanarak yüksek hepatosit ve kan uyumu göstermektedir (Li *et al.* 2003a; Wang *et al.* 2003, 2005; Piscioneri *et al.* 2011). Fruktozla bağlanmış kitosan yapı iskelesi karaciğer doku mühendisliği için geliştirilmiştir. Fruktozun asialoglikoproteinlerin (galaktoz artıklarının kaldırılmasında görevli olan protein) reseptörleri için özel bir bağ olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Li *et al.* 2003a, b). Diğer bir çalışmada miroporz kitosan/galaktozilatlanmış hiyaluronik asit bileşimi olan yapı iskelelerinin albümin sekresyonu, üre sentezi ve amonyağın uzaklaştırılması gibi önemli karaciğer fonksiyonlarını gösterdiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar her ne kadar kitin/kitosan membranların ve yapı iskelelerinin karaciğer doku mühendisliğinde uygulanabilirliğini

gösterebilir, analizler *in vitro* şartlarla sınırlı kalmaktadır. Daha sonra sürekli kültürle biyoreaktör sistemlerinin kullanımlarıyla *ex vivo* çalışmalar ile *in vivo* ve klinik çalışmaların faydalı olacağı düşünülmektedir.

Kitosan ve plateletler (kan pulcukları) sırasıyla ilk olarak 1859 yılında C. Rouget ve 1881'de G. Bizzozero tarafından bulunmuştur. Deniz diyatomları ve kabuklularından üretilen plateletlerin yüksek hemostatik aktiviteye sahip olmasından ötürü yara örtüsü yapımında kullanımının araştırılması yaklaşık yüz yıl sonra gerçekleşmiştir (Muzzarelli 1977; Coller 1984; Gravela 1989; Paweletz 2001; Ribatti and Crivellato 2007; Muzzarelli *et al.* 2012; Busillachi *et al.* 2013). Farklı kaynaklardan elde edilen kitin/kitosan fiberler hemostatik aktivite yönünden diğer kitosan çeşitleriyle karşılaştırılmıştır. Özellikle diyatom kitin/kitosan fiberlerinin çok yüksek hemostatik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Fischer *et al.* 2007).

Kitin ve kitosanın biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle sinir doku rejenerasyon uygulamaları için yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Periferik sinir sisteminin onarımını düzenlediği için kitosan membranlarının sinir doku hücrelerine bağlanması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Haipeng *et al.* 2000; Anitha *et al.* 2014). Bunge (1994) ve Yuan *et al.* (2004), sinir sisteminde aksonların Büngner bantlarına rejenerasyonunu gerçekleştiren Schwann hücrelerinde kitosan fiberlerinin ileri derecede bir tutunma, göç ve proliferasyona sebep olduğunu rapor etmişlerdir. İletken membranların biyouyumluluk gösteren doğal yapısı, iletken olmayan yapı iskeleleriyle karşılaştırılabilir. İletken membranlar, elektriksel uyarılar olamadığında bile Schwann hücrelerinin tutunması, yayılması ve çoğalmasını sağlamaktadır. Buna ilaveten, elektriksel uyarılar sinir gelişim faktörü ve beyin-türevli nörotrofik faktörler gibi proteinlerin ekspresyonu ve salınımını artırmaktadır (Huang *et al.* 2010). Az sayıdaki klinik çalışmalar, kitosan yapı iskelelerinin çevresel sinir hücresi/sinir dokusu defektlerinin tamirinde rol aldığını bildirmiştir. Hasta bir insanın dirseğinde bulunan 35 mm uzunluğundaki sinir bozulmasının kitosan/poli (glikolik asit) (PGA) kullanımıyla düzeltildiği rapor edilmiştir. Üç yıllık gözlem dönemi boyunca motor ve duyu fonksiyonlarının sonraki implantasyonu yavaş bir şekilde toparladığı

görülmüştür (Fan *et al.* 2008). Benzer bir uygulama 55 yaşında bir erkek hastanın sağ ön kol kısmında oluşan 30 mm boyundaki bir sinir defektinin kitosan/PGA ile implantasyondan 36 ay sonra düzeldiğini göstermiştir (Gu *et al.* 2012). Bu memnun edici sonuçlar suni kitosan/PGA sinir parçalarının sinir rejenerasyonu için ümit vadeden bir uygulama olduğunu göstermiştir. Bütün bu çalışmalar, hücre tabanlı düzenleyiciler veya biyomateryallerin modifikasyonlarının, hücrelerin onarımı ve bozulmuş hücrelerin rejenerasyonunda kullanılabileceğini kanıtlamaktadır (Fan *et al.* 2010; Anitha *et al.* 2014).

2.1.4. Gıda endüstrisi

Gıda maddelerinin üretim aşamasından tüketiciye ulaşması arasında geçen sürede gıdalarda gerçekleşen bozulmaların azaltılması amacıyla, doğal antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip olan, biyobozunur özellikte olan, toksik olmayan ve kolay elde edilebilen yenilebilir film ve kaplamalarda polisakkarit ve protein bazlı olan maddelerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Gıda takviyesi olarak kullanılan kitosanın, su, yağ ve boya bağlama yeteneği ve emülsiyonlaştırma özelliği göstermesi nedeniyle herhangi bir sürfaktan maddeye gerek duyulmaksızın sabit emülsiyonların hazırlanmasında etkin bir şekilde kullanımı artmaktadır. Kitosan film kaplamalarının, sebze meyve gibi ürünlerin çürümesinin önlenmesi amacıyla tirozinaz enzimini aktive ettiği ve bu şekilde muhafaza edilen ürünlerin raf ömürlerinin ciddi şekilde uzadığı tespit edilmiştir. Et, balık ve deniz mahsülleri gibi düşük sıcaklıklarda saklanması gereken gıda maddelerinin, psikrofilik mikroorganizmalar tarafından bozulmalarını önlemek amacıyla kullanılan kitosan kaplamalı filmler, orta derecede su geçirgenliğine sahip olması, düşük oksijen, azot ve karbondioksit geçirgenliği ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle gıda endüstrisi için önemli avantajlar sunmaktadır. Özellikle kabuklu deniz mahsullerinin raf ömürlerinin uzatılmasında deniz kabuklularının yapısında bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosandan etkin bir şekilde yararlanılmaktadır. Bunun yanında, gıdaların bozulma göstergelerinden olan esmerleşmenin giderilmesi amacıyla kullanılan sülfidlerin yerine de alternatif madde olarak kitosan kullanımı giderek artmaktadır (Gennadios *et al.* 1997; Shahidi *et al.*

1999; Caner *et al.* 2007; Chaiyakosa *et al.* 2007; No *et al.* 2007; Ak Kalut 2008; Aşık 2009; Koç ve Özkan 2011; Uçan ve Mercimek 2013).

Kitosanın mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp. ve *Vibrio* sp. gibi birçok bakterinin gelişiminin inhibisyona uğradığını göstermektedir. Gıda ürünlerine kitosan içeren muhafaza ürünlerinin eklenmesi mikroorganizmalar tarafından oluşan hasarların geciktirilmesine sebep olmaktadır (Gagne 1993; Tsai *et al.* 2002; No *et al.* 2006; Bostan vd 2007; Hongpattarakere and Riyaphan 2008; Uçan ve Mercimek 2013). Hazır gıdalarda mikroorganizmaların üremesinin durdurulması amacıyla kullanılan kitosanın etkisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Aldemir and Bostan (2009) yaptıkları çalışmada farklı seviyelerde kitosan içeren köfte hamurundan hazırlanan köfte örneklerinin polietilen filmle kaplandıktan sonra 4°C’de 8 gün boyunca saklamışlardır. Bu süre boyunca duyusal ve mikroorganizma sayıları yönünden yapılan analizler, kitosan kullanılan örneklerin kullanım miktarına bağlı olarak kontrol grubuna karşı mikrobiyal üremenin yavaşladığını ve raf ömrünün arttığını göstermiştir. Eklenen kitosan miktarının 100 mg/kg’den az olmamak üzere doğal bir katkı olarak yararlı olabileceği gösterilmiştir.

Yenilebilen kaplamalar nem transferini azaltmakta, sınırlı oksijen alımı, daha az solunum, etilen üretiminin ertelenmesi, antioksidan ve antimikrobiyal ajanlar gibi fonksiyonel içerikleri taşıması gibi özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Elsabee *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada kitosan ve kitosan/pektin çoklu tabakalı paketleme yöntemi ile domateslerin 20x20 cm boyutlarındaki kitosan/pektinden oluşan 12 tabakalı modifiye edilmiş polipropilen (PP) filmlerden oluşan paketler üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmada normal bir PP içeren pakete, kitosan/pektin kaplamalı PP paket ve havada bekletilen 50 g ağırlığında domatesler koyularak buzdolabında 4°C’de bekletmişlerdir. 13 gün sonra örneklerin durumlarına bakılmış ve kitosan/pektin kaplamalı örnekler dışındaki örneklerde kök enfeksiyonuna rastlandığı bildirilmiştir.

Gıda patojenlerine ve hasar veren organizmalara karşı oldukça etkili katyonik bir biyopolimer olan ϵ -polilisin (ϵ -PL) gıdalarda kullanılan bir antimikrobiyal maddedir. Chang *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada katyonik ϵ -PL'nin, gıdalarda kullanılan çeşitli biyopolimerle olan etkileşimlerini belirlemişlerdir. Seçilen biyopolimerler anyonik yapıda olan karragenan, aljinat ve pektin; nötral yapıda olan dekstran ve katyonik yapıda olan kitosandır. Oluşan etkileşimlerin belirlenmesinde izotermal titrasyon kalorimetri metodu, mikro elektroforez uygulaması ve turbidite ölçümlerinden yararlanılmıştır. Elde edilen verilen doğrultusunda katyonik ϵ -PL'nin katyonik veya nötral biyopolimerlerle çok az miktarda etkileşime girdiği veya kompleks oluşturduğu, ancak katyonik ϵ -PL'nin anyonik biyopolimerle kuvvetli elektrostatik etkileşimler ve kompleks oluşturduğu tespit edilmiştir.

Yenilebilir biyofilmlerin yapımlarında mekanik ve fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla süt proteini, soya proteini, kollajen ve jelatin gibi proteinler, nişasta, aljinat, selüloz ve kitosan gibi polisakkaritlerle birleştirilmektedir (Silva *et al.* 2007; Haider *et al.* 2008; Pereda *et al.* 2008; Elsabee and Abdou 2013).

Nişasta ve kitosan arasındaki başlıca farklardan biri glukozid bağlantısıdır. Nişastada bulunan α (1, 4) bağı yerine kitosanda β (1, 4) bağı bulunmaktadır ve doğal bir polimer olan kitinin hidroksil grubunun ikinci karbonu yerine amin grubu bulunduğundan asetillenmiş haldedir. Genellikle amin grubu moleküler ağırlığın artışına sebep olmaktadır. Ancak su, kitosanın yapısında bulunan hidroksil grubuna amin grubundan daha güçlü bir şekilde bağlanmaktadır. Bu nedenle su moleküllerinin serbest kalması amin grubunun aracılığı ile gerçekleşmektedir (Elsabee and Abdou 2013). Fernandez *et al.* (2004) yaptıkları çalışmada sıvı kitosan-amilaz nişasta filmlerinin polyollerle plastisize ederek fiziksel stabilite ve nem soğurması özelliklerini araştırmışlardır. Yüksek, orta ve düşük moleküler ağırlıklı kitosanı amilozca zengin mısır nişastasası ile gliserol ve i-ertiritol varlığında ko-film oluşturucusu olarak kullanmışlardır.

Kitosan-buğday proteinli filmler farklı protein konsantrasyonlarında translutaminaz enziminin varlığında veya yokluğunda çapraz bir bağlama ajanıyla pH 6'da

hazırlanmaktadır. Kitosan ile yapılan buğday proteini filmlerinde filmlerin ana bileşeni kitosandır. Kitosan miktarı sabit tutulurken, laktozca zengin kurutulmuş buğday ürününden elde edilen protein spray şeklinde uygulanmaktadır. Filmin son halinde protein:kitosan oranı 1:9 olacak şekilde ayarlanmaktadır (Pierro *et al.* 2006).

2.1.5. Çevre koruması ve kirlilik kontrolü

Dünyanın en bol bulunan ve en ucuz biyopolimerlerinden olan kitosanın atık sularda meydana gelen kirlilikle mücadelede kullanımı için yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Atık suların arıtımı amacıyla kullanılan tutuklayıcı maddelerle karşılaştırıldığında katyonik özellikte olması, yüksek tutuklama kapasitesine sahip olması, makromoleküler yapısı, bol bulunması ve ucuza mal olması gibi özellikleri nedeniyle kitosanın değeri artmaktadır. Atık sulardan boyaların uzaklaştırılmasında kitosan tabanlı tutuklayıcıların kullanılması üzerine yapılan çalışmalar mekanik ve fiziksel karakteristiklerinin modifiye edilmesiyle kitosanın tutuklama özelliklerinde artış olması amaçlanmaktadır (Muzzarelli *et al.* 2012; Vakili *et al.* 2014).

Kitosan jeller ve açıl türevlerinin sahip oldukları hidrofobik grupları sayesinde laboratuvar atıklarından metil turuncusu boyasının kaldırılmasında etkin bir şekilde yararlanılmaktadır (Toshihiro *et al.* 1988). Kitin, kitosan ve kitosan içeren hücre duvarları, tekstil endüstrisinin atık sularında bulunan asidik boyaların uzaklaştırılması işleminde kullanılmaktadır (Joseph 1994). Kitin ve kitosan atık sulardan azo boyalarının giderilmesi işleminde de etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Shimizu *et al.* (1995) yaptıkları çalışmada model olarak kullanılan bir monoazo boyası olan krom viyolenin gideriminde çinko veya kadmiyum ilavesiyle adsorbsiyon etkisinde artış olduğu bildirilmiştir. Atık sulardan doğrudan boya uzaklaştırılması amacıyla çapraz bağlı kitosan fiberleri geliştirilmiştir. Yoshihide *et al.* (1997) model boya olarak brilliant sarısını kullanarak atık sulardan boyanın giderimini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla farklı akış oranları, yatak uzunlukları, etkin konsantrasyonlar ve sıcaklık değerleri araştırma parametreleri olarak belirlenmiş ve optimizasyon yapılmıştır.

2.2. Biyoteknolojide Kitosanın Kullanımı Üzerine Yapılan Çalışma Örnekleri

Kurita (2006) yaptığı çalışmada alışlagelmiş kitosan üretim yöntemi olan deniz kabuklularının kullanımları yerine fungal kitosan üretimi işleminin daha pahalı olduğunu belirtmiş, ancak gelecekte kuvvetli alkali uygulamalarının yerine bu yöntemin daha kullanışlı olabileceğini bildirmiştir. Bu amaçla teklif edilen alternatif kitin kaynaklarının, kitosan üretimi amacıyla daha büyük ölçekli ve istenen yapıda olması için yeni çalışmalar yapılmaktadır. Küflerden elde edilen kitosan, deniz kabuklularından elde edilen kitosana oranla daha kararlı ve daha fazla istenen fizikokimyasal özelliklere sahip olduğundan ve laboratuvar koşullarında bütün yıl boyunca mevsimsel kısıtlamalara maruz kalmadan istenildiği zaman üretimi yapılabildiğinden cazip bir alternatif kaynak haline gelmiştir. Dahası fermantasyon şartlarının değiştirilmesi ile farklı moleküler ağırlığına sahip kitosan elde edilebilmektedir. Küflerin fermantasyonu sonrasında hücre duvarlarında doğal olarak üretilen kitosan ekstrakte edilerek endüstride kullanılmaktadır (White *et al.* 1979; McGahren *et al.* 1984; Arcidiacono and Kaplan 1992; Rane and Hoover 1993; Nadarajah *et al.* 2001).

Göksungur (2004) yaptığı çalışmada deney dizayn yöntemlerinden olan yüzey tepki metodunu kullanarak şeker pancarı melasından kitosan üretimini gerçekleştirmiştir. Üretici mikroorganizma olarak *Rhizopus oryzae*'nin kullanıldığı çalışmada çalkalamalı kültür ve çalkalamalı fermentörde yapılan kültür uygulanmıştır. Çalkalamalı erlenlerde yapılan kültürde muamele görmüş ve muamele görmemiş melas sentetik ortam ile birlikte besiyerini oluşturmuştur. Çalkalamalı fermentörde ise muamele görmemiş melas ile sentetik ortam besiyerini oluşturmuştur. Erlenlerde yapılan kültürde geç ekspanansiyel fazda bulunan *R. oryzae* en yüksek verimde kitosan üretimi (961 mg/dm³) gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tamamında %8-10 oranında biyokütle ve %32-38 oranında çözünmeyen alkali materyal kitosan olarak ekstrakte edilmiştir. Çalkalamalı fermentörde en yüksek kitosan üretimi eldesi için merkezi düzenleme dizaynı kullanılarak çeşitli fermentasyon parametleri (havalandırma oranı, çalkalama hızı ve başlangıç şeker konsantrasyonu) çalışılmıştır. Sonuçlar uygulanan bu parametrelerin hepsinin kuvvetli bir şekilde kitosan üretimi üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca

kullanılan parametrelerin arasında oluşan pozitif ve negatif etkileşimlerin de kitosan üretimine etki ettiği görülmüştür.

Chatterjee *et al.* (2005), *Mucor rouxii* tarafından üretilen kitosanın fiziko-kimyasal karakterizasyonunu çalışmışlardır. Üç farklı besiyeri kullanarak kitosan üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda, melas tuz ortamı, patates dekstroz ortamı ve maya ekstraktı-pepton-glukoz ortamı arasından en yüksek verimli kitosan üretiminin melas tuz ortamı ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Nem, protein miktarı ve özel rotasyon gibi özelliklerinin çok fazla farklılık göstermediğini, ancak kristal oluşturma özelliklerinde önemli derecede değişiklik olduğu belirtilmiştir.

Chatterjee *et al.* (2008), peyniraltı suyu ile bitki büyüme hormonlarından giberellik asit, indol asetik asit, indol-3-bütirik asit ve kinetin ilavesinin *R. oryzae* ile gerçekleştirilen kitosan üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada bitki büyüme hormonlarının *R. oryzae*'de hem miselsel büyümeyi hem de kitosan üretimini artırdığını bildirmişlerdir. En yüksek verimin giberellik asitin 0,1 mg/l oranında kullanıldığında %32 oranında miselsel büyümeyi ve %14 oranında kitosan içeriğini artırdığını bildirmişlerdir. Bunun yanında ortama peynir altı suyu ilavesiyle birlikte kitosan üretiminin %50 oranında artabildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bitki büyüme hormonlarının kitosanın deasetilasyon derecesini değiştirmedeğini fakat kitosanın moleküler ağırlığının artırılması suretiyle kalitesinin arttığını rapor etmişlerdir.

Asachi *et al.* (2011), *Mucor indicus* tarafından yapılan etanol ve kitosan üretimi üzerine fungal otolizatin bir besin takviyesi olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan küfün ekstraktı otoliz için üretilmiş ve maya ekstraktı kültür ortamında geliştirilmiş etanol üretiminin yerine kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. 10 g/l oranında ekstraktın en yüksek oranda etanol (0,47 g/g) üretimini ve üretimin maya ekstraktı içeren ortamdan daha yüksek oranda gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

George *et al.* (2011), tıbbi bitkilerden endofitik mantarları izole ederek bunlardan kitosan ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Endofitik mantar olarak izole ettikleri *Aspergillus flavus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Cladosporium cladosporoides* gibi türlerden kitosan üretimi yapmışlardır. Küflerin biyokütlesinden elde edilen kitosan, alkali (NaOH) ve asit (asetik asit) uygulamaları sonrasında ekstrakte edilmiştir.

Kleekayai and Suntornsuk (2011), *Rhizopus oryzae* tarafından, patates kabuğu ve düşük kaliteli patates cipsinin işlenmesi ile kitosan üretimini gerçekleştirmişlerdir. Fermente edilen patates kabukları 5 gün sonunda en yüksek verimi vermişlerdir. Kültür ortamının kitosan üretimi için optimizasyonu sağlanarak en iyi ekstraksiyon şartlarının %46 oranında sodyum hidroksit kullanımı ile 13 saatte ve %2 oranında asetik asit ile 8 saatte muamele sonunda elde edilmiştir. Fungal kitosan özelliklerinin deasetilasyon derecesinin %86-90 oranında olduğu, moleküler ağırlığının 80-128 kDa ve viskozitesinin 3,1-6,1 mPa olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *R. oryzae* tarafından gerçekleştirilen kitosan üretiminde patates kabuğunun düşük maliyetli bir substrat olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Heidary Vinche *et al.* (2013), buğday hidrolizatını kullanarak *Mucor hiemalis* ile kitosan ve etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Etanol üretiminde kullanılan mikroorganizmaların yüksek glukoz ve etanol toleransının en önemli ihtiyaçlardan olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada filamentöz bir mantar olan *M. hiemalis* ile yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip buğday ve nişasta hidrolizatları etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, çok yüksek glukoz konsantrasyonunda (190 g/l) bile mantarın yüksek bir tolerans gösterdiği ve 50 g/l oranında etanol üretiminin gerçekleştiği görülmüştür. Etanolün yanında kıymetli bir diğer madde olan kitosanın prekürsörü olan glukozaminin de %37,3-46,7 oranlarında hücre duvarlarında bulunduğu belirtilmiştir.

Tayel *et al.* (2011), *Aspergillus niger*'in sitrik asit üretiminden sonra kalan atık biyokütlesini fungal kitosan ekstraksiyon kaynağı olarak kullanmışlardır. Üretilen kitosan %89,6 oranında deasetilasyon göstermiş, 25,000 dalton moleküler ağırlıklı, %1'lik asetik asit çözeltisinde %97 oranında çözünürlüğe sahip olduğu tespit edilmiş ve

karidesten elde edilen standart bir kitosan ile FT-IR mikroskopi tekniğiyle karşılaştırılabilir olduğu belirlenmiştir. Fungal kitosan, pamuk bir kumaş parçasına emdirilip kurutulduktan sonra çeşitli testlere tabi tutulmuştur. Bu testlerden sonra pamuklu kumaş parçasının *E. coli* ve *Candida albicans*'a karşı kuvvetli derecede bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, fungal kitosan ile muamele edilen kumaşlar pek çok tıbbi ve hijyenik uygulamada kullanılabilecek uygun bir materyal olarak önerilebileceği bildirilmiştir.

Tocci *et al.* (2011) iyi bilinen tıbbi bir bitki olan *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* kök kültürlerinin kitosan ve ksantondan zengin ekstraktının antifungal aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yedi günlük ekstratların kitosan ile muamelesi sonrasında *Candida* spp., *C. neoformans* ve dermofitlerin üzerine yüksek antifungal aktivitesi olduğunu belirlemişlerdir.

Jaime *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada kitinin deasetile edilmiş türevi olan ve doğada yenilenebilir ve bol bulunan bir oligosakkarit olan kitosanın, yüksek oranda antimikrobiyal özelliklerini ve bakteri, maya ve küf hücre zarlarından geçişinin veya engellenmesinin üzerinde durmuşlardır. Kitosanın antifungal şeklinde davranışını açıklamaya çalışmak amacıyla üç farklı kemogenomik deney oluşturmuşlardır. Sonuç olarak ARL1 genin membran geçişini düzenlediğini, kitosan oligosakkariti tarafından indüklenen hücre zarı geçişi ve hasarına karşı korumayı sağlamadığını tespit etmişlerdir.

Vinche *et al.* (2012) mikroorganizmalar tarafından yapılan etanol üretiminde yüksek glukoz ve etanol toleransının en önemli gereksinimler olduğunu belirterek, *Mucor hiemalis* ile etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bunun yanında da değerli bir madde olan kitosanın üretiminde öncü rol oynayan glukozaminin bu küfün hücre duvarında %37,3-46,7 oranlarında bulunduğunu belirtmişlerdir. Peña *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada kitosanın *Candida albicans* üzerine olan etkilerini ve mantarın antifungal aktivitesinin şartlarını araştırmışlardır. Çalışmada düşük konsantrasyonlarda bulunan kitosanın fungistatik veya antifungal özellikleri ile maya hücrelerine geçişinin araştırılması gerekliliği ortaya çıkarılmıştır.

Zhang *et al.* (2012) *Aspergillus niger* HQ-1 suşunu kullanarak selüloz enzimi üretimi yapmış ve selülozların kitosanın hidrolizasyonu için kısmi karakterizasyonunu çalışmışlardır. *A. niger* HQ-1 suşu katı hal fermentasyonuna bırakılmış ve selüloz üretimi optimize edilmiştir. Daha sonra elde edilen ham selüloz enzimi kitosanın hidroliz edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada nem içeriği, yetiştirme sıcaklığı ve başlangıç kültür pH'sı Plackett-Burman deney dizaynı kullanılarak selüloz aktivitesi en yüksek seviyede elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kitosan hidroliz için başlangıç pH'sının 5,6 ve sıcaklığın da 50°C olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında kitosanolitik aktivitenin Mn^{+2} , Mg^{+2} gibi bazı metal iyonları tarafından artırıldığı ve Zn^{+2} ile Ba^{+2} gibi bazı metal iyonları tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir.

Naghdi *et al.* (2014) fungal kitosan saflaştırma tekniklerinden olan iki aşamalı seyreltik sülfürik asit uygulamasının, fosfatın uzaklaştırılması için oda sıcaklığında hücre duvarlarına yapılan ön uygulama ve yüksek sıcaklıklarda fosfat içermeyen hücre duvarından kitosanın ekstraksiyonunun, kitosanın moleküler ağırlığında ciddi bir azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ön uygulamada kullanılan fosfatın hücre duvarından giderimi işleri (%90 oranında) ve hücre duvarından geri kazanımı (%89 oranında) işleminin ardından, kitosanın depolimerizasyonunun önlenmesi için sıcak sülfürik asit ekstraksiyonu yerine oda şartlarında bir saat veya 50°C'de 30 dk süreyle laktik asit uygulamasının en yüksek verimle kitosan eldesini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, mantarların hücre duvarlarından kitosanın ekstrakte edilmesinden önce fosfatın uzaklaştırılması işleminde en iyi seçeneğin sülfürik asit olduğu, buna ek olarak ön uygulama yapılan hücre duvarlarından kitosanın ekstraksiyonunda yüksek çözünürlüğü ve önemsenmeyecek moleküler ağırlığı sayesinde laktik asit kullanımının etkin olduğu belirtilmiştir.

Zhang *et al.* (2014) *Rhizopus japonicus* M193 ile kitin deasetilaz ve kitosan üretimi için fermentasyon şartlarının optimizasyonunu çalışmışlardır. Kitinin kitosana biyolojik dönüşümünde görevli enzim olan kitin deasetilaz enziminin üretiminin geliştirilmesi için besinsel ihtiyacı sıvı kültür şartlarında araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan parametreler (glukoz oranı, inokulum miktarı, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, kültür zamanı) bir

İstatistiksel deney dizayn yöntemi olan Plackett-Burman dizaynının kullanımıyla uygun seviyelerde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların kullanımlarıyla mikroorganizmanın fermentasyon şartları %2,5 oranında kitin, 5 g/l oranında glukoz, %5 oranında inokulum materyali, 0,6 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve beş günlük kültür zamanı Taguchi deney dizaynının kullanımıyla optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

2.3. Taguchi Deney Dizaynı Uygulama Yöntemi

Kültür şartlarının optimizasyonu ve kullanılan substratların en uygun konsantrasyonlarda seçimi bir fermentasyon sürecinin, ekonomik ve kolay uygulanabilirliğini etkileyen en önemli faktördür. Mikrobiyal yolla gerçekleştirilen üretimlerde optimizasyon amacıyla genellikle klasik ‘bir kerede-bir değişken (BKBD)’ yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, optimizasyonda kullanılacak parametrelerin, her deney safhasında bir tanesi sabit tutularak diğerlerinin etkisi sırayla araştırılmaktadır. Bu nedenle bu yöntem çok faktör içeren optimizasyonlar için uygun değildir. Diğer yandan BKBD uygulaması sadece zaman-harcayıcı değil, aynı zamanda faktörler arasında varsa meydana gelen etkileşimleri elimine ettiğinden gerçek optimum değerlerin bulunmasını engelleyen bir yöntemdir. Klasik optimizasyon yöntemlerinin sebep olduğu kısıtlama durumu, istatistiksel dizaynların (faktöriyel dizayn olarak da adlandırılır) kullanımlarıyla ortadan kaldırılmaktadır (Nyanhongo *et al.* 2002; Rao *et al.* 2008). İstatistiksel yöntemlerin uygulanması klasik optimizasyon metodu olan BKBD uygulaması ile karşılaştırıldığında daha güçlü ve kullanışlı bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır (Ghanem *et al.* 2000). Biyoteknolojik fermentasyon işlemlerde besinsel ve çevresel şartların optimizasyonu ile uygun substratların en uygun konsantrasyonlarda seçimi birincil derecede önem taşımaktadır. Çalışmalarda kullanılan materyallerin ucuz ve yüksek elde edilebilirlik özelliklerinin olması gerekir ki, bu sayede fermentasyon sürecinin ekonomik ve kolay olması sağlanmaktadır.

Taguchi yönteminin temeli deney tasarımına dayanmaktadır. Bu yöntemde hedefe ulaşmak için, ikincil kayıp fonksiyonu kullanılarak ortaya çıkan kaybın ölçülmesi önerilmektedir. Optimum parametre durumu, çevresel faktörler için ürünün daha

“sağlam (robust)” olmasını gerçekleştiren ve hedefe daha yakın sonuç veren parametrelerin oluşturulması anlamına gelmektedir. Bu nedenle, parametre dizaynı, aynı zamanda “sağlam dizayn” olarak tanımlanmaktadır. Taguchi yönteminin parametre dizaynı, statik ve dinamik karakteristikler olmak üzere iki bölümde incelenebilmektedir. Bu iki dizayn, sinyal faktörünü kullanma yöntemine göre ayrılmaktadırlar. Sinyaldengürültüye (S/G; Signal/Noise) oranı küçük olan iyi, nominal olan iyi ve büyük olan iyi şeklinde üç farklı performans karakteristiği bulunmaktadır. Taguchi yönteminin dinamik sisteminde performansı etkileyen duyarlılık, doğrusallık ve çeşitlilik olmak üzere üç kıstas bulunmaktadır. (Ross 1996; Hınıslioğlu and Bayrak 2004; Hsieh *et al.* 2005; Gencel 2007; Taylan 2009).

Taguchi D.D. ürün geliştirmede ve proses performansının artırılmasında kullanılan istatistiksel kalite geliştirme tekniklerinden biridir. Taguchi D.D. yüksek kalitede fakat düşük maliyetle üretim sağlar. Bu yöntem laboratuvar şartları sonucunda elde edilen optimize şartların gerçek ortamlarda da uygulanabilmesine fırsat tanır (Rao *et al.* 2008; Tan *et al.* 2005). Bu istatistiksel yöntem, optimum analiz ayarlarında deneysel sonuçların anlamını açıklamak üzere yerini alan performans karakteristiği olarak değerlendirilen S/G oranını kullanmaktadır. Taguchi ürünün sağlamlığının ölçümünde deney tasarımında elde edilen sonuçlar S/G oranı başka bir deyişle, performans istatistiği oranına çevrilerek değerlendirilmektedir. S/G oranı çalışma esnasında kontrol edilemeyen faktörlerle çalışma kabiliyeti ve kalite kaybının öngörülmesinin sağlanması amacıyla kullanılmaktadır. Bu oran, sonuçların ortalama ve varyanslarını ele alır ve maksimize edilmelidir. Bu oran bir hedef değerine etki eden, daha büyük olan-daha iyidir, daha küçük olan-daha iyidir ve nominal olan-daha iyidir olmak üzere üç farklı karakteristik kategoriye açıklar. Bu üç farklı kalite değerleri, hedeflendiği değere göre farklı şekillerde hesaplanmaktadır. Bir üretim işleminin optimizasyonu için üç aşamadan oluşan uygulamaya sahip olan Taguchi yönteminde, ilk olarak sistem dizaynı, ikinci olarak parametre dizaynı ve son olarak tolerans dizaynı göz önüne alınarak deneyler şekillenmektedir. Elde edilen sonuçlar varyans analizi (ANOVA) testi ile teyid edilmektedir (Phadke 1989; Peace 1993; Fowkles and Creeveling 1995; Hsieh *et al.* 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan fungus

Steril olmayan şartlar altında düşük sıcaklıklarda gelişen fungusların tespiti için Erzurum'un farklı yerlerinden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen 120 izolattan etkin olan 20 izolat içerisinde en yüksek verimi gerçekleştiren PAS17 kodlu fungus kullanılmıştır. Şekil 3.1'de PAS17 izolatı gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kitosan üretimi için kullanılan izolat PAS17

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler: amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma-Aldrich, Germany); potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, Germany), magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Reaktif, Türkiye); demir II sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany); sülfürik asit (H_2SO_4 , Riedel-de Haën, Germany); hidroklorik asit (HCl , Riedel-de Haën, Germany); sodyum hidroksit (NaOH , Sigma-Aldrich, USA) laktik asit (Boehringer Ingelheim, Germany); ticari kitosan (Sigma-Aldrich, USA).

Çalışmada kullanılan diğer malzemeler ve hazırlama yöntemleri aşağıda belirtilmiştir:

Melas: Erzurum Şeker Fabrikası'ndan (Erzurum, Türkiye) temin edilen melas, çeşitli oranlarda sulandırılarak şeker miktarı ölçümünden sonra kullanılmıştır.

Patates Dekstroz Agar (PDA): Fungal mikroorganizmaların izolasyonu ve saf kültürde yetiştirilmesi için kullanılmıştır. 1000 ml distile su içerisine 39 g PDA (Oxoid, England) eklenerek otoklavda 121°C 'de 1,5 atm basınç altında 20 dk süreyle steril edilmiştir. 45°C 'ye kadar soğutulmuş steril petri kaplarına dökülmüştür ve daha sonra kullanım amacıyla 4°C 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

PCR analizi için: Agaroz jel, ITS1 ve ITS4 primerleri, su, tris asetat (TAE) tamponu, deoksinukleosid trifosfat (dNTP), magnezyum klorür (MgCl_2), DNA markırı ve PureLink® Genomic DNA Mini Kit kullanılmıştır.

Ön çalışmalar için kullanılan kontrol besiyeri içeriği g/L: 30 ml/l melas; 3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Çalışmanın başlangıcında izolatların taranması (screening), uygun sıcaklığın ve uygun pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla kontrol besiyeri kullanılarak, BKBD metoduyla sıcaklık ve pH optimizasyonu sağlanmıştır. İnokülüm materyali olarak mikroorganizma 10°C 'de 15 gün süreyle PDA

plaklarında inkübe edildikten sonra 4 mm çaplı disk delici ile alınıp, batık kültüre aktarılarak kullanılmıştır.

İzolatlar arasından en yüksek miktarda kitosan üretimini gerçekleştiren mikroorganizmanın taranması amacıyla kullanılan kontrol besiyerinin çalışma sıcaklığı 10°C, pH 5,0, çalkalama hızı 100 rpm ve inkübasyon süresi 4 gündür.

Sıcaklığın optimizasyonundan sonra, pH'nın optimizasyonu amacıyla kullanılan kontrol besiyerinin çalışma sıcaklığı 15°C, çalkalama hızı 100 rpm ve inkübasyon süresi 4 gündür.

Çalışmalar 250 ml'lik erlenlerde batık kültür içerisinde 100 ml'lik besiyeri ile gerçekleştirilmiştir ve tüm deneyler üç tekrar halinde yürütülmüştür.

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıda belirtilen alet ve cihazlar kullanılmıştır:

İnkübatör	(Mettler E 410, GERMANY)
Otoklav	(HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
Buzdolabı	(Vestel L3303, TÜRKİYE)
Spektrofotometre	(Shimadzu UV Mini 1240, JAPAN)
FT-IR Spektrometresi	(Perkin Elmer, USA)
Çalkalayıcı inkübatör	(Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
Manyetik karıştırıcı	(Chiltern HS-31, UK)
Etüv	(Philip-Harris, ENGLAND)
Saf su cihazı	(Nüve, NS 112, TÜRKİYE)
Steril kabin	(Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
pH metre	(Hanna Instruments HI 8314, USA)
Hassas terazi	(Denver Instruments, USA)

Santrifüj cihazı	(Hettich Universal 320 R, GERMANY)
Mikroskop	(Boeco BM 180, GERMANY)
Homojenizatör	(IKA T 25 Digital Ultra Turrax, GERMANY)
PCR cihazı	(Sensoquest, KOREA)
Yatay elektroforez	(Biorad Mini-Sub Cell GT, US)
Disk delici	(Isolab, GERMANY)

3.2. Yöntem

3.2.1 Kullanılan fungusun izolasyonu ve tanınması

Çalışmada kullanılan fungusun izolasyonu için Erzurum'un farklı yerlerinden alınan toprak örneklerinden seri dilüsyonlar yapılmıştır (Nakayama 1981). İzolasyon işlemleri, standart ve moleküler tekniklere göre yapılmıştır. Fungusların dilüsyonu amacıyla %3'lük melas içeren PDA plaklarına ekimler yapılmıştır. Elde edilen 120 izolat arasından 20 tanesi etkin gelişim göstermiştir. Bu nedenle tarama (screening) çalışmalarında 20 izolat kullanılmıştır. Melas içeren besiyerinde en uygun gelişimi gösteren suş olan PAS17 kodlu fungus, sonraki çalışmalarda kullanılmak ve identifikasyonu yapılmak amacıyla birer aylık aralıklarla yeni ortamlarına aktarılmış ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

İzolatların tanınması klasik ve moleküler metodlara göre yapılmıştır. Filamentsi fungusların klasik yöntemlere göre identifikasyonu için olgun kültürler yatık PDA üzerinde 25°C'de inkübe edilerek, Von Arx (1981) ve Domsch *et al.* (1993) tarafından bulunan tanılama anahtarına göre tanımlanmıştır.

Moleküler tekniklere göre yapılan tanılama işleminde PAS17 nolu izolataın 18S rRNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla izolat PDA besiyerine ekilerek bir hafta inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresinin sonunda katı besiyerinden bir öze dolusu hücre alınarak PureLink® Genomic DNA Mini Kit ile ürün talimatları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA,

bütünlüğü ve saflığı açısından %0,8'lik agaroz jelde 75 V'de 45 dakika boyunca yürütülerek gözlenmiştir. DNA amplifikasyonu, optimize edilmiş 50 µl'lik reaksiyon karışımında ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde, Çizelge 3.1'de belirtilen bileşenler sırasıyla 0,2ml'lik PCR tüpüne konulmuştur. Elde edilen DNA'nın Çizelge 3.2'de belirtilen şartlara göre çoğaltımı yapılmıştır.

Çizelge 3.1. 10 ng kalıp DNA için 50 µl PCR karışımı

Madde	Miktar
Su	32,5 µl
Tampon çözeltisi	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	3 µl
Primer (F; ITS1)	2 µl
Primer (R; ITS4)	2 µl
DNA örneği	2 µl
Taq DNA Polimeraz enzimi	0,5 µl
Toplam:	50 µl

Çizelge 3.2. PCR programı

PCR Durumu	
95°C	2 dk
95°C	30 sn
56°C	1 dk
72°C	1 dk
72°C	10 dk
4°C	∞

PCR işleminin ardından, çoğaltılan DNA fragmentleri, %1 lik 1xTAE tamponu içinde DNA markırı ile yürütülmüş ve ticari bir firma aracılığıyla DNA dizi analizi yaptırılmıştır. DNA dizi analiz sonucu, BLASTN 2.2.26 programı kullanılarak GenBank'ta bulunan ribozomal sekanslar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Zhang *et al.* 2000).

3.2.2. Fermentasyon ortamının sıcaklığının belirlenmesi

Çalışmaların başlangıcında öncelikli olarak, düşük sıcaklıklarda gelişen mikroorganizmaların elde edilmesi ile çalışma sıcaklığı aralığı araştırılmıştır. Bu nedenle, mikroorganizmalar melas içeren kontrol besiyerinde 5-35°C aralığında taranmış ve en iyi gelişimi gösteren izolat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Fermentasyon ortamının pH'sının belirlenmesi

Steril olmayan koşulların sağlanması amacıyla uygun pH aralığı için ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla kitosanın üretimi için uygun sıcaklığın belirlenmesinden sonra seçilen izolat olan PAS17 adlı mikroorganizma için pH değerleri 3.0-8.0 aralığında araştırılmıştır.

3.2.4. Melasta toplam şeker tayininin yapılması

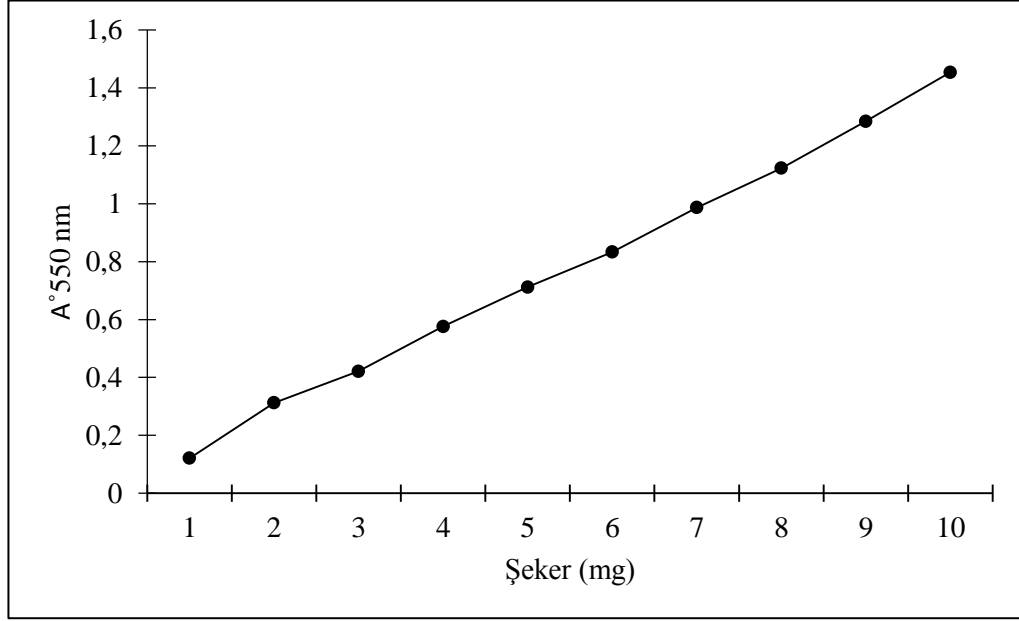
Toplam şeker miktarı tayini için standart olarak glukozun kullanıldığı dinitro-salisilik asit (DNSA) metodu uygulanmıştır (Miller 1959). Metod melasın ön muamele öncesi ve sonrası içerdiği şeker miktarına bağlı olarak oluşan kahverengi rengin spektrofotometrede 550 nm'de absorbansının okunması esasına dayanmaktadır (Miller 1959; Sidal *et al.* 2000; Temür 2008; Canlı 2009; Ünver 2010).

Şeker tayini için kullanılacak DNSA çözeltisi; 1 gram DNSA, 20 ml 2 N NaOH ve 50 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra, 30 gram Rochelle tuzu (potasyum sodyum

tartarat tetrahidrat) eklenerek, son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Kona *et al.* 2001).

Şeker tayini için önce bir standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik hazırlamak için 10 tüp ve kör olarak kullanılmak üzere 1 tüp hazırlanmıştır. 100 mg glukoz 100 ml saf su içinde çözülerek glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Tüplere sırasıyla bu çözeltiden 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml ve 10 ml konmuştur (yani 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg ve 10 mg glukoz konmuş olmaktadır). Daha sonra her tüpe 2 ml DNSA eklenmiş ve son hacimleri 15 ml'ye tamamlanarak vortekste karıştırıldıktan sonra 90°C'de 20 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler sıcak su banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığına soğutulmuştur. Oluşan kahverengi rengin absorbansı spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda köre karşı üç tekrar şeklinde okunmuş, elde edilen absorbansların ortalamaları kullanılarak şeker tayini için bir standart grafik hazırlanmıştır. Hazırlanan standart grafik Şekil 3.2'de verilmiştir.

Hazırlanan %1'lik melas solüsyonunun ilk olarak muamele edilmemiş haliyle şeker miktarı ölçümü yapılmıştır. Ardından pH'sı 10 N HCL ile 2'ye ayarlanarak sukroz hidrolizi için 90°C'de 40 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Hidroliz işleminden sonra oda sıcaklığına soğutulan solüsyonun pH'sı 10 N NaOH ile 6'ya ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra solüsyon 5000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek oluşan pelet uzaklaştırılmıştır (Bhosale 2001; Ünver 2010). Şeker tayini için elde edilen süpernatanttan 0,1 ml üzerine 2 ml DNSA çözeltisi ilave edilmiş ve son hacim saf su ile 15 ml'ye tamamlanmıştır. Kör olarak ise bir tüp içine 2 ml DNSA çözeltisi konup üzeri 15 ml'ye tamamlanmıştır. Çalkalanan tüpler sıcak su banyosunda 90°C'de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpler sıcak su banyosundan çıkarılarak soğutulmuş ve oluşan kahverengi rengin absorbansı, spektrofotometrede köre karşı 550 nm'de üç tekrar şeklinde okunmuş ve daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanılarak şeker miktarı belirlenmiştir.

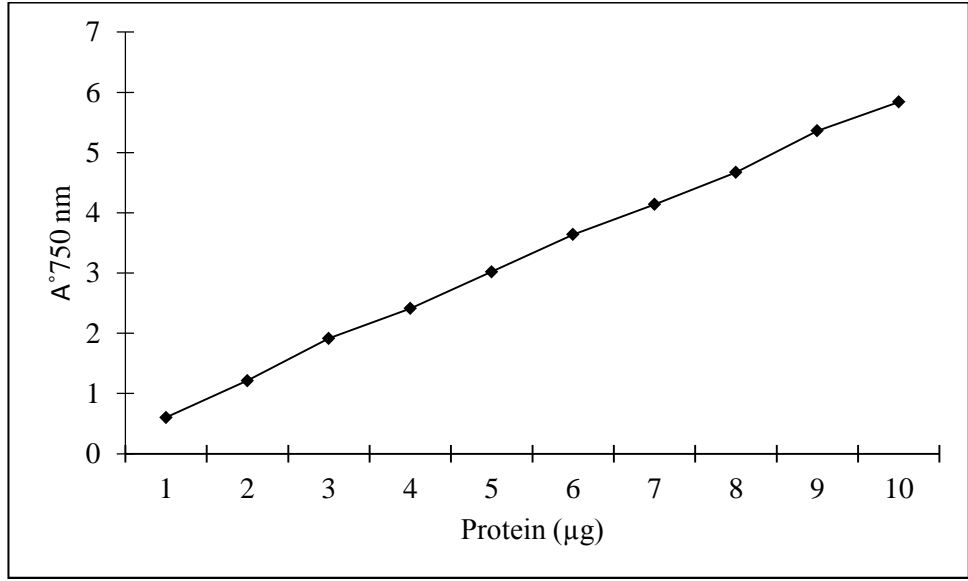


Şekil 3.2. Şeker tayini için kullanılan standart grafik

3.2.5. Melasta protein tayininin yapılması

Protein tayini amacıyla Lowry metodu kullanılmıştır. Yöntemin temeli, alkali ortamda bir bakır-protein kompleksi oluşması ve kompleksin fosfomolibdat-fosfowolframmat (Folin Ciocalteu fenol) reaktifini indirgeyerek yoğun bir mavi yeşil renk oluşturması esasına dayanmaktadır (Lowry *et al.* 1951).

Protein tayini için 0,5 ml %1'lik melas solüsyonu, 5 ml alkali bakır reaktifine (Alkali bakır reaktifi; %0,5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve %1 sodyum potasyum tartaratın 1 ml'si, %2 sodyum karbonat ihtiva eden 50 ml 0,1 M NaOH içine katılarak hazırlanır) katılarak çözelti 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 0,5 ml Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş) hızlıca eklenerek karıştırılmıştır. Bu çözelti 30 dk inkübe edilerek absorbansı 750 nm'de ölçülmüştür. Serum albumin kullanılarak hazırlanan standart grafik Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.2.6. Taguchi D.D.'nin hazırlanması

Çalışmanın sıcaklığı ve pH, steril olmayan koşullarda çalışmaya uygun ortam hazırlanması amacıyla, klasik bir yöntem olan BKBD metoduna dayanılarak optimize edilmiştir. Daha sonra, elde edilen optimal sıcaklık ve pH değerlerinin kullanımıyla, kitosan üretimini etkileyen faktörler olarak çalışmada, melas miktarı (ml/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ miktarı (g/l), inokulum miktarı, çalkalama hızı ve inkübasyon süresi seçilmiştir ve ön çalışmalar sonucunda etkin olan 4 seviye ile çalışmalar düzenlenmiştir. Çizelge 3.3'te optimizasyon için seçilen faktörler ve uygun seviyeleri belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Kitosan üretiminin optimizasyonu için belirlenen faktörleri ve seviyeleri

No	Faktör	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3	Seviye 4
1	Melas (ml/l)	30	50	70	90
2	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/l)	0,1	0,3	0,5	0,7
3	İnokülüm (mm çap)	4	6	8	10
4	Çalkalama (rpm)	100	150	200	250
5	Süre (gün)	4	6	8	10

Çalışmada kitosan üretiminin en yüksek olması istendiği için performans istatistiğinin daha büyük olan-iyidir karakteristiğine göre D.D. elde edilmiştir. Bu amaçla, aşağıda gösterilen denkleme göre yapılan hesaplamalar ile sonuçlar elde edilmiştir.

$$S/G = -10 \log_{10} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1/Y_i^2 \right]$$

Yukarıda gösterilen denklemde n bir deneysel kombinasyondaki tekrar sayısını ve Y_i değeri i.'nci deneydeki performans değerini göstermektedir. Bütün deneyler üç tekrar halinde yapılmıştır ve ortalama sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır.

3.2.7. Kitosanın ekstraksiyonu

Biyokütle oluşumunun kitosan üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra kitosanın ekstraksiyonu için farklı yöntemler uygulanmıştır ve en verimli şekilde kitosanın eldesi amacıyla Naghdi *et al.* (2014)'e göre ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elde edilen biyokütle 40°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş ve tartılmıştır. Toz haline getirilen biyokütle üzerine proteinlerin giderilmesi amacıyla (deproteinizasyon) 0,5 M NaOH (30 ml/g) eklenerek otoklavda 121°C'de 20 dk bekletilmiştir (Zamani *et al.* 2007). Elde

edilen materyal artık çözünmeyen alkali materyal (Ç.A.M.) olarak adlandırılmaktadır. Ç.A.M. 5000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilerek nötral pH elde edilinceye kadar saf suyla, ardından etil alkolle yıkanarak 40°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Elde edilen Ç.A.M. içeriğinde bulunan fosfatın giderilmesi amacıyla oda sıcaklığında 0,1 N laktik asit (100 ml/g kuru Ç.A.M.) kullanılarak 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilerek katı faz ayrılmıştır. Fosfatı giderilmiş olan Ç.A.M.'ın üzerine daha sonra kitosanın depolimerizasyonunu azaltmak amacıyla klasik sülfürik asit yöntemi ve sülfürik asitte düşük sıcaklıklarda kitosanın çözünmemesi nedeniyle Naghdi *et al.* (2014) tarafından geliştirilen yönteme göre 0,1 N laktik asit eklenerek 50°C'de 30 dk süreyle 150 rpm'de çalkalanmıştır. Şekil 3.4'te Ç.A.M.'ın laktik asitle muamelesi sonucunda elde edilen karışım ve kitosanın çöktürülmesi işlemleri gösterilmiştir. İşlemler sırasıyla; Ç.A.M.'ın laktik asitle muamele edilmesi (a), muamele sonrası pH ölçümü (b), 2 N NaOH ile pH'nın 8-10'a çıkarılması (c) ve kitosanın çöktürülmesi (d) olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Kitosanın çöktürülmesi işlemi

Elde edilen çözünmeyen pelet (kitosan), 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek bertaraf edildikten sonra süpernatant içerisinde bulunan kitosan, 2 N NaOH ile pH’nın 8-10’a çıkarılarak çöktürülmesiyle elde edilmiştir. Daha sonra karışım tekrar 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş, nötral pH’ya gelinceye kadar saf su ve ardından alkolle yıkanmış ve 40°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur.

3.2.8. FT-IR analizi

Numunenin yapısal gruplarının tanımlanması amacıyla, potasyum bromid (KBr) ile oluşturulan şeffaf peletler Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrometresi ile ölçülmüştür. Dalga boyu $4000-550\text{ cm}^{-1}$ arasında değişmektedir.

3.2.9. Verilerin analizi

Çalışmada sıcaklık ve pH değerlerinin optimizasyonu klasik BKBD metoduna göre yapıldığından, elde edilen sonuçlar Duncan çoklu karşılaştırmalı testi uygulanarak IBM Statistics SPSS 20.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler Minitab 16.0 programı ile analiz edilmiş ve etki değerlerinin araştırılmasında, varyans analizi (ANOVA; analysis of variance) yapılarak sonuçlar yorumlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Araştırmada Kullanılacak Fungusun Seçimi ve Belirlenmesi

Ön çalışmalarda kullanılan besiyeri ile elde edilen 20 etkin izolat arasından en yüksek oranda biyokütle ve kitosan oluşturan izolatin seçimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların taranması sonucunda elde edilen biyokütle, kitosan ve verim oranları sonuçları^{1,2}

İzolatlar	Biyokütle (g/l)	Kitosan (mg/l)	Kitosan/Biyokütle (% Verim)
OC1	0,11 ^a	0,01 ^a	9,09 ^a
OC2	0,37 ^{ab}	0,03 ^a	10,3 ^c
OC3	1,02 ^f	0,10 ^f	10,7 ^d
OC4	0,24 ^a	0,02 ^a	9,5 ^a
OC5	0,65 ^c	0,06 ^{bc}	9,7 ^b
OC6	1,11 ^g	0,13 ^f	12,5 ^g
OC7	0,67 ^{cd}	0,06 ^{bcd}	9,8 ^b
OC8	1,03 ^f	0,12 ^{ef}	12,4 ^{fg}
OC9	1,05 ^f	0,12 ^f	12,3 ^g
OC10	0,68 ^{cd}	0,07 ^{bcd}	11,1 ^e
OC11	0,71 ^d	0,08 ^{cde}	10,9 ^d
OC12	0,87 ^e	0,09 ^{cde}	11,2 ^e
OC13	0,74 ^d	0,08 ^{de}	10,8
OC15	0,89 ^e	0,10 ^{ef}	11,4 ^e
OC17	0,63 ^c	0,06 ^{ab}	10,4 ^c
PAS5	0,35 ^{ab}	0,03 ^a	10,3 ^c
PAS6	0,54 ^c	0,06 ^{bcd}	11,3 ^e
PAS7	1,17 ^{gh}	0,13 ^f	12,1 ^f

Çizelge 4.1. İzolatlar ve biyokütle sonuçları^{1,2} (devamı)

İzolatlar	Biyokütle (g/l)	Kitosan (mg/l)	Kitosan/Biyokütle (% Verim)
PAS17	1,13 ^g	0,14 ^g	12,6 ^h
PAS21	0,87 ^{de}	0,11 ^f	12,1 ^{fg}

¹Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).

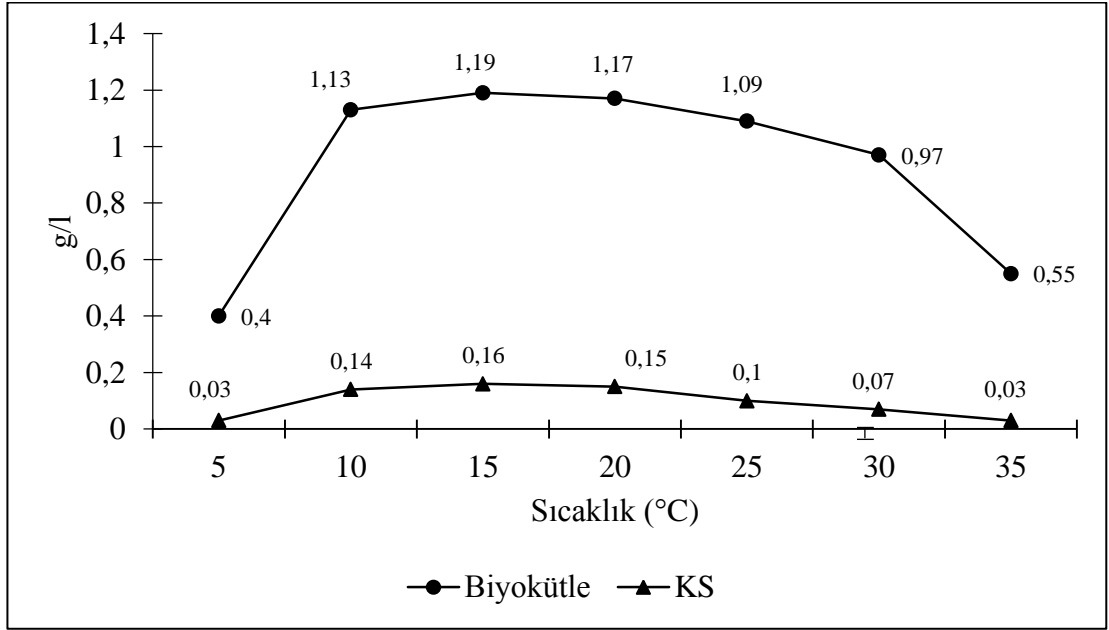
²Besiyeri içeriği: 30 ml/l melas; 3 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,1 g/l MgSO₄.7H₂O; 0,02 g/l FeSO₄.7H₂O. Fermentasyon ortamı: pH 5,0, 4mm çaplı disk delici ile alınan inokulum materyali, 100 rpm çalkalama hızı ve 4 gün inkübasyon süresidir.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi en yüksek biyokütle, kitosan üretimi ve verim PAS17 adlı izolattan elde edilmiştir. En düşük biyokütle üretimi OC1 adlı izolattan, en düşük verim ise OC4 adlı izolattan elde edilmiştir. PAS7 adlı izolat en yüksek biyokütle miktarını vermiş olmasına rağmen, gerek kitosan miktarı gerekse % verim bakımından en yüksek oranları gerçekleştirememiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere test küfü olarak PAS17 adlı izolat tercih edilmiştir.

Kullanılan klasik ve moleküler teknikler sonucunda yapılan tanılamada etkin suş olarak seçilen ve sonraki çalışmalarda yararlanılan PAS17 izolatının *Rhizopus oryzae* türü bir küf olduğu belirlenmiş ve gen bankasına *Rhizopus oryzae* PAS17 olarak kaydı yapılmıştır.

4.2. Fermentasyon Ortamının Sıcaklığının *R. oryzae* PAS17'nin Biyokütle ve Kitosan Üretimine Etkisi

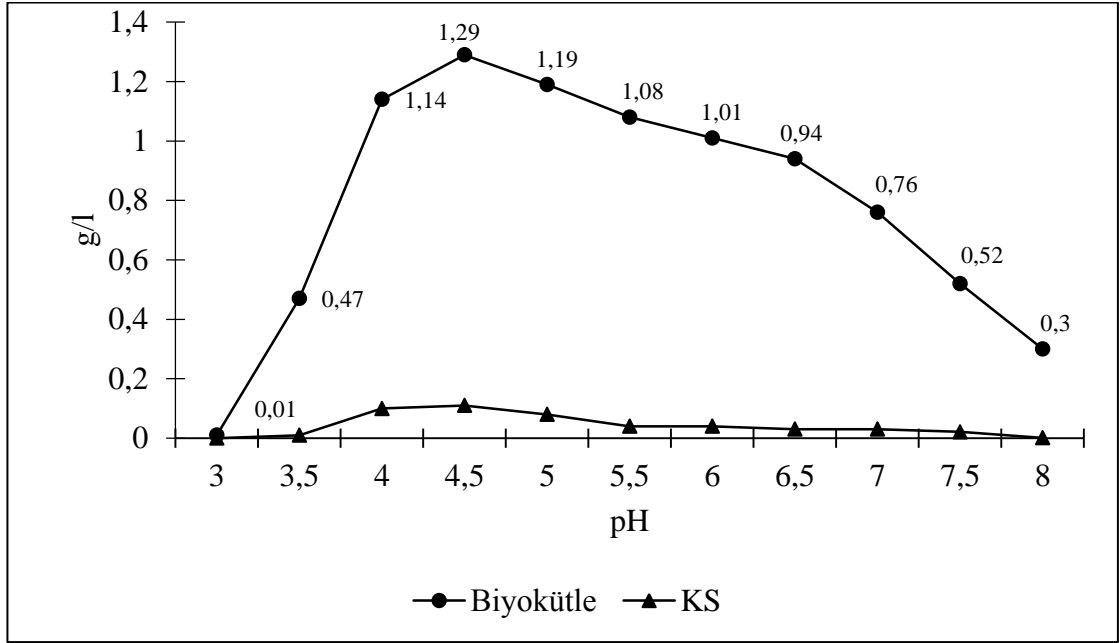
Çalışmanın sıcaklığının fungusun gelişimini uygun etkilemesinin yanında steril olmayan koşullar altında fermentasyon gerçekleştirilebilmesi amacıyla bakteriyel faaliyetten de etkilenmemesi gerektiği göz önüne alınarak, sıcaklığın optimizasyonu BKBD tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılacak optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 15-20°C aralığında tarama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sıcaklığın *R. oryzae* PAS17'nin biyokütle ve kitosan üretimi üzerine etkisi*
 *Besiyeri içeriği: 30 ml/l melas; 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
 Fermentasyon ortamı: pH 5,0, 100 rpm çalkalama hızı ve 4 gün inkübasyon süresidir.

4.3. Fermentasyon Ortamının pH'sının *R. oryzae* PAS17'nin Biyokütle ve Kitosan Üretimine Etkisi

Çalışmanın sıcaklığının 15°C olarak belirlenmesinin ardından, test küfünün gelişimini uygun etkilemesinin yanında, steril olmayan koşullar altında fermentasyon gerçekleştirilebilmesi amacıyla bakteriyel faaliyetten de etkilenmemesi gerektiği göz önüne alınarak, fermentasyon ortamının pH'sının optimizasyonu da sıcaklıkta olduğu gibi, BKBD tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 4.2'de *R.oryzae* PAS17 adlı izolatın pH 3,0-8,0 aralığındaki biyokütle ve kitosan üretimi gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Sıcaklığın *R. oryzae* PAS17 adlı izolatının biyokütle ve kitosan üretimi üzerine etkisi*

*Besiyeri içeriği: 30 ml/l melas; 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Fermentasyon ortamı: 15°C sıcaklık, 100 rpm çalkalama hızı ve 4 gün inkübasyon süresidir.

Şekil 4.2'den görüldüğü gibi en uygun *R. oryzae* PAS17 için en uygun fermentasyon ortamı pH 4,5 olarak belirlenmiştir. Kitosan üretimi bakımından en yüksek oran pH 4,5 değerinden elde edilmiştir.

4.4. Melasın Toplam Şeker ve Protein Miktarı

Yapılan çalışmalar sonucunda melasta 457 g/l şeker ve 76,1 g/l protein olduğu belirlenmiştir.

4.5. Taguchi D.D. ile Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmamızın başlangıcında yapılan ön araştırmalar sonucunda *R. oryzae* PAS17 suşu ile gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda elde edilen verilere göre biyokütle ve kitosan uygun sıcaklık 15°C ve pH 4,5'tir. Bu sonuçlar doğrultusunda kitosan üretimi için seçilen faktörler olan melas miktarı, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ miktarı, inokulum miktarı,

çalkalama hızı ve inkübasyon süresi dört seviyeli olarak seçilerek TAGUCHİ YÖNTEMİ'nin önerdiği beş faktörlü dört seviyeli olan L16 (4⁵) şeklindeki D.D. kullanılmıştır. *R. oryzae* PAS17 suşunun kullanımıyla gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen S/G oranları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Taguchi L16 (4⁵) D.D. tablosu ve S/G sonuçları

Deney no	Faktörler					S/G oranı
	Melas miktarı	MgSO ₄ . 7H ₂ O	İnokulum	Çalkalama	Süre	
1	1	1	1	1	1	2,08
2	1	2	2	2	2	4,38
3	1	3	3	3	3	6,44
4	1	4	4	4	4	2,71
5	2	1	2	3	4	13,17
6	2	2	1	4	3	16,01
7	2	3	4	1	2	8,10
8	2	4	3	2	1	12,11
9	3	1	3	4	2	12,01
10	3	2	4	3	1	12,52
11	3	3	1	2	4	20,94
12	3	4	2	1	3	19,45
13	4	1	4	2	3	15,60
14	4	2	3	1	4	15,03
15	4	3	2	4	1	15,75
16	4	4	1	3	2	12,96

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi en yüksek S/G oranı 20,94 değeriyle 11 no'lu D.D. sonucunda ve en düşük S/G oranı 2,08 olarak 1 no'lu D.D. sonucunda elde edilmiştir.

Yukarıda verilen D.D.'nin uygulanması ile elde edilen biyokütle, Ç.A.M., kitosan, kitosan/biyokütle (% verim) ve kitosan/Ç.A.M. (%verim) sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

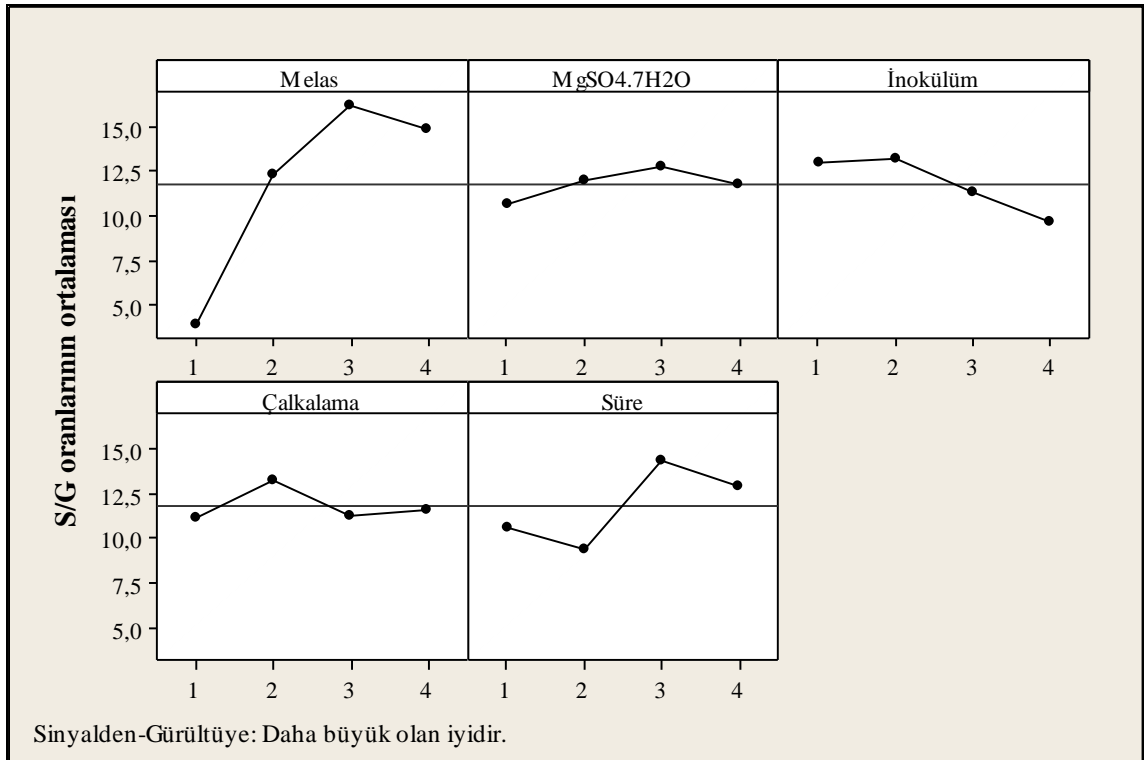
Çizelge 4.3. Taguchi D.D. ile elde edilen biyokütle sonuçları ve Ç.A.M. ile Kitosan değerleri

Deney no	Biyokütle (g/l)	Ç.A.M. (g/l)	Kitosan (g/l)	Kitosan/Biyokütle (% Verim)	Kitosan/Ç.A.M. (% Verim)
1	1,29	0,48	0,11	8,4	22,6
2	1,66	0,65	0,16	9,7	24,3
3	2,11	0,76	0,22	10,5	28,7
4	1,38	0,61	0,13	9,3	21,4
5	4,56	1,69	0,53	11,7	31,3
6	6,31	2,31	0,72	11,5	31,1
7	2,58	0,91	0,25	9,8	27,7
8	4,04	1,26	0,37	9,1	29,2
9	3,11	1,14	0,35	11,2	30,6
10	4,24	1,31	0,40	9,4	30,5
11	10,67	4,53	1,50	14,1	33,1
12	9,49	4,04	1,31	13,7	32,4
13	6,03	2,14	0,67	11,2	31,3
14	5,64	1,83	0,49	9,7	26,7
15	4,13	1,47	0,37	9,1	25,5
16	4,07	1,41	0,38	9,4	26,8

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi 16 farklı deney dizaynı ile yapılan çalışmalar, birbirinden oldukça farklı sonuçlar oluşturmuştur. En az biyokütle oluşumu (1,29 g/l) 1 no'lu D.D.'nin kullanımıyla, en yüksek biyokütle oluşumu (10,67 g/l) ise 11 no'lu D.D.'nin kullanımıyla gerçekleşmiştir. S/G oranının “daha büyük olan iyidir” performans karakteristiği kullanıldığı için en yüksek S/G oranı (20,94) 11 no'lu D.D.'nin kullanımıyla, en düşük S/G oranı (2,08) ise, 1 no'lu D.D.'nin kullanımıyla elde edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda Taguchi yönteminin tahmin ettiği D.D.'nin S/G oranlarına bakılarak son deneyler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'te gösterilen S/G oranlarının ortalamasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda öngörülen D.D. sonuçları için

faktörler sırasıyla, 3, 3, 2, 2 ve 3 olacak şekilde yani 70 ml/l melas, 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, inokulum miktarı 6 mm çaplı disk delici ile alınan spor sayısı ($6,7 \times 10^6$ spor/disk), 150 rpm çalkalama hızı ve 8 gün inkübasyon süresidir. Bu D.D.'nin uygulanması ile elde edilen biyokütle oranı 11,07 g/l, öngörülen değer olan 11,17 g/l oranına yakın bulunmuştur. Optimize edilmiş fermentasyon ortamı ile elde edilen Ç.A.M. ve kitosan miktarları sırasıyla, 4,77 g/l ve 1,59 g/l'dir. Sonuç olarak, PAS17 suşu ile steril olmayan şartlar altında, düşük sıcaklık ve düşük pH değerlerinde, biyokütle bakımından %14,4 ve Ç.A.M. bakımından %33,3 oranında verimle kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3. *R. oryzae* PAS17 suşunun Taguchi L16 (4^5) D.D. ile elde edilen biyokütle sonuçlarının S/G ortalaması

4.6. ANOVA Testi Sonuçları

Taguchi yönteminin Çizelge 4.4'de Taguchi D.D. sonuçları için elde edilen ANOVA değerleri gösterilmiştir. Buradan görüldüğü gibi en yüksek etkiyi melas yapmıştır

(%57,7). En az etki ise %4,32 oranıyla $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ tarafından gerçekleştirilmiştir. İkinci sırada etkin faktör olan süre değeri, kitosan üretimi üzerine çalkalama ve inokulum miktarından daha fazla etki göstermiştir. Sonuç olarak, PAS17 suşu ile gerçekleştirilen kitosan üretiminde en etkin faktörün melas, diğer bir deyişle karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Taguchi D.D. sonuçları için ANOVA değerleri

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Ayarlanmış Kareler Toplamı	Ayarlanmış Kareler Ortalaması	Yüzde Dağılım (%)
Melas	3	66,67	66,67	22,51	57,7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3	4,98	4,98	1,66	4,32
İnokulum	3	14,61	14,61	4,87	12,6
Çalkalama	3	7,37	7,37	2,45	6,37
Süre	3	21,97	21,97	7,32	19,1
Artan hata	0				
Toplam	15	115,62			

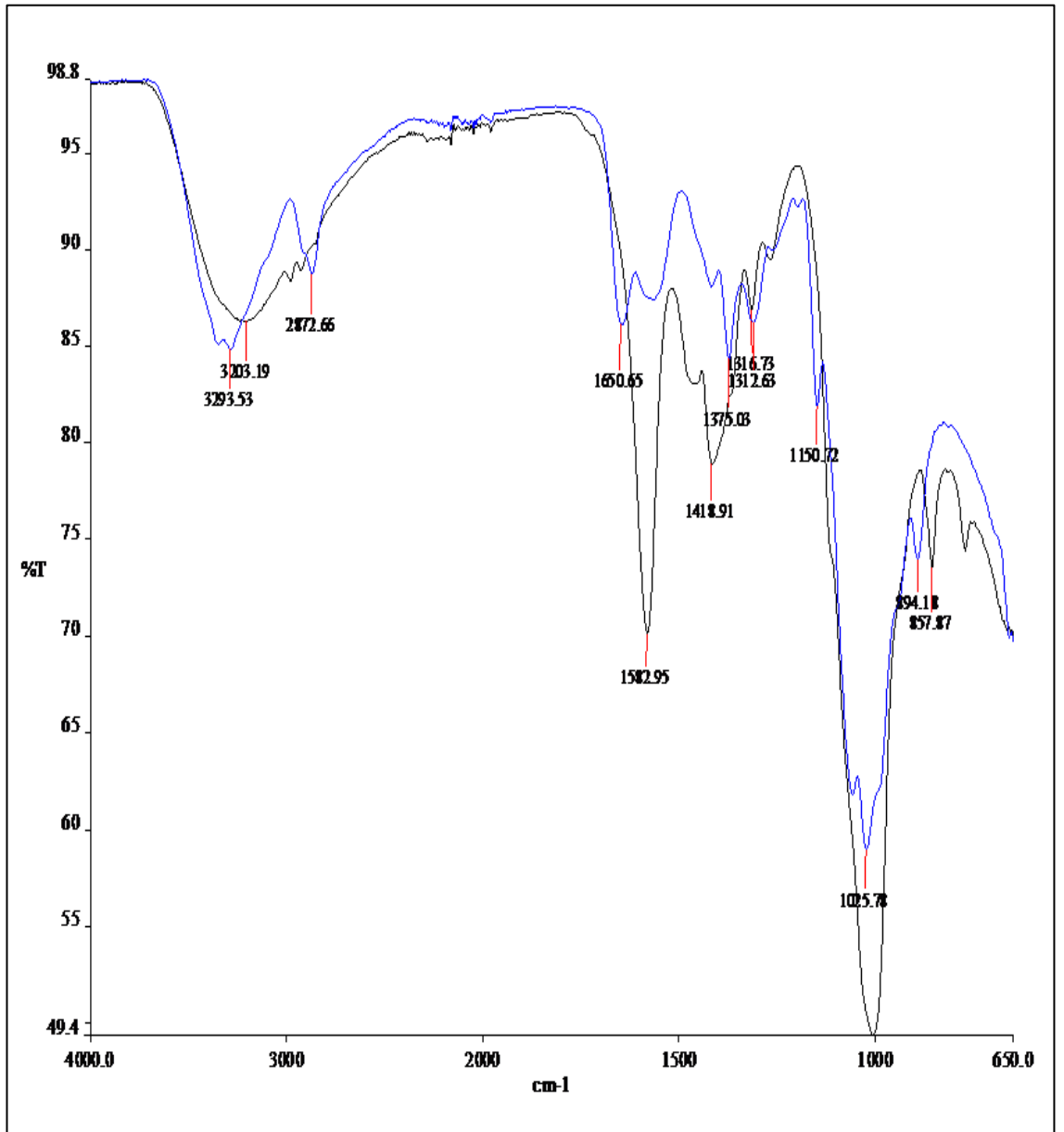
Çizelge 4.5'te kitosan üretimi için S/G oranı büyük olan iyidir karakteristiğine göre elde edilen yanıt tablosu sonuçları gösterilmiştir. Çizelge 4.5'ten görüldüğü gibi, melas en fazla üçüncü seviyede, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ üçüncü seviyede, inokulum miktarı ikinci seviyede, çalkalama değerinin ikinci seviyede ve süre değerinin üçüncü seviyede en yüksek yanıtı verdiği ANOVA testi ile teyid edilmiştir. Bu şekilde S/G oranlarının uygulanması ile en yüksek kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. S/G oranı büyük olan iyidir karakteristiğine göre elde edilen yanıt tablosu

Seviye	Melas	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	İnokulum	Çalkalama	Süre
1	3,908	10,71	13,001	11,170	10,620
2	12,351	11,98	13,193	13,261	9,367
3	16,234	12,81	11,400	11,279	14,378
4	14,841	11,81	9,739	11,623	12,968
Delta	12,326	2,096	3,454	2,092	5,011
Oranı	1	4	3	5	2

4.7. FT-IR Analizi Sonuçları

Çalışmada elde edilen kitosanın (mavi çizgi ile gösterilen) doğruluğunun teyid edilmesi amacıyla ticari bir kitosan olan ve karides kabuklarından elde edilen örnek (siyah çizgi ile gösterilen) karşılaştırılmıştır. Şekil 4.4'te FT-IR sonucu gösterilmektedir. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi absorpsiyon pikleri kitosan varlığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.4. FT-IR spektrumu ile ticari kitosan ve elde edilen kitosanın karşılaştırılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Mikroorganizmaların Genel Besin İhtiyaçları ve Mevcut Çalışma İçin Substrat Seçimi

Mikroorganizmalar büyüme ve gelişmek için karbon, oksijen, hidrojen, azot, kükürt, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir gibi makroelementlere ihtiyaç duymaktadır. Bu elementlerden, karbon (C), oksijen (O), hidrojen (H), azot (N), kükürt (S) ve fosfor (P) karbonhidratların, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısına katılmaktadır. C, hücrelerde yapı elemanı ve temel enerji kaynağı olarak da kullanılmaktadır. N, aminoasitlerin, pürinlerin, pirimidinlerin, enzim kofaktörlerinin, bazı karbonhidrat ve lipidlerin sentezinde kullanılırken, P nükleik asitlerin, fosfolipitlerin, ATP'nin, birçok kofaktörün ve bazı proteinlerin yapısında yer almaktadır. S, sistein, metiyonin, biyotin ve tiyaminin gibi aminoasitlerin yanı sıra bazı karbonhidratların sentezi için gereklidir. Potasyum (K^+), protein sentezinde görev alan enzimler dahil bir çok enzimin aktivitesi için gereklidir. Magnesium (Mg^{+2}) bir çok enzim için kofaktör olarak işlev görmesi ve ATP ile kompleks yapmasının yanı sıra ribozomları ve hücre zarlarını stabil hale getirme gibi özelliklere de sahiptir. Demir (Fe^{+2}), sitokromların bir kısmını oluşturur, elektron taşıma proteinleri ve enzimler için de bir kofaktör olarak işlev görür. Diğer taraftan, sodyum (Na) elementi de bir makroelement olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu elemente mikroorganizmaların hepsi değil sadece bazıları ihtiyaç duymaktadır. Makroelementlerin yanı sıra mikroorganizmalar manganez, çinko, kobalt, molibden, nikel ve bakır gibi bazı mikroelementlere de ihtiyaç duyabilmektedirler. Mikroelementler enzimlerin ve kofaktörlerin bir parçası olup, protein yapısının muhafaza edilmesine ve reaksiyonların katalizine yardım eder. Örneğin, manganez (Mn^{+2}) fosfat gruplarının transferini katalizleyen çok sayıda enzime yardım eder, kobalt ise vitamin B₁₂'nin yapısına katılır (Brock *et al.* 1994; Prescott *et al.* 2002). Mikroorganizmalar bu elementlere ihtiyaç duyduklarından dolayı, mikroorganizmaları laboratuvar şartlarında geliştirirken bu elementleri içeren organik yada inorganik maddeler besiyerlerine katılmaktadır. Bu doğrultuda, C ihtiyacını karşılamak için

mikroorganizmaların kültür ortamlarına glikoz, laktoz ve sukroz gibi şekerler ya da bu şekerleri içeren melas, mısır maserasyon sıvısı ve peynir altı suyu gibi organik maddeler eklenmektedir. Melas, mısır maserasyon sıvısı ve peynir altı suyu mikroorganizmalara karbon kaynaklarının yanında, azotlu bileşikleri, vitaminleri ve bazı makro ve mikro elementleri de sağlamaktadır (Hamano and Kilikian 2006; Dhillon *et al.* 2007; Aksu and Eren 2007; Joshi *et al.* 2008). Ayrıca, amonyum klorür, amonyum sülfat ve sodyum nitrat gibi inorganik tuzlarda mikroorganizmaların azot ihtiyacını karşılamak için besiyerlerine katılmaktadır. Makroelementler olan S, P, Mg, K, Ca ve Fe ile mikroelementler olan Mn, Zn, Co ve Cu besiyerlerine ayrıca MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, FeSO₄, MnSO₄, CoSO₄, ZnSO₄ ve CuSO₄ gibi mineral tuzlar şeklinde de katılmaktadır (Taskin and Kurbanoglu 2011; Saghafian 2013).

Melas; şeker endüstrisinde şeker pancarı ve şeker kamışından şeker üretimi sonucu ortaya çıkan atık bir üründür. Şeker pancarı melasının içeriği şeker, mineral maddeler (Mg, Mn, Al, Fe ve Zn) azotlu bileşikler (aminoasit, protein vb.) ve vitaminler bulunmaktadır. Zengin besinsel içeriğinden dolayı da mikrobiyal çalışmalarda etil alkol, polisakkarit, karotenoid, enzim, laktik asit, sitrik asit, tek hücre proteini gibi değerli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Ergun and Mutlu 2000; Kalogiannis *et al.* 2003; Survase *et al.* 2007; Liu *et al.* 2008; Razmovski and Vucurovic 2011; Taskin *et al.* 2012). Yapılan bazı çalışmalarda melasın mikrobiyal yolla kitosan üretiminde substrat olarakta kullanılabileceği belirtilmektedir (Göksungur 2004). Bununla birlikte, literatürde soğukta yaşayan mikroorganizmalar için steril olmayan kültür koşulları altında kitosan üretiminde melasın substrat olarak kullanılabilirliğini gösteren bir çalışma yer almamaktadır. Bu yüzden mevcut çalışmada substrat olarak melas kullanılmıştır.

5.2. Araştırmada Kullanılan Fungusun İzolasyonu

Yeni doğal ürünleri veya halihazırda bilinen ürünleri daha yüksek verimle üreten mikroorganizmaların keşfi sağlık, gıda ve diğer birçok endüstri için büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla araştırmacılar, daha üretken mikroorganizmaların keşfi için

toprak, su, bitki vb. materyalleri izolasyon kaynağı olarak kullanmaktadır. Örneğin, daha yüksek miktarlarda organik asit, enzim, polisakkarit, etil alkol, antibiyotik, karotenoid, lipid, biyosümfaktant gibi endüstriyel bakımdan büyük öneme sahip maddeleri üreten mikroorganizmaların farklı kaynaklardan izolasyonuna yönelik çalışmalar artan bir yoğunlukta devam etmektedir (Rao *et al.* 2008; Yateem *et al.* 2010; Taskin and Erdal 2011; Kitcha and Cheirsilp 2013; Kawaguchi *et al.* 2013; Taskin *et al.* 2013; Aydogan *et al.* 2014). Yine bazı çalışmalar bitki büyümesini teşvik etme ya da biyolojik parçalama yeteneği yüksek olan mikroorganizmaların izolasyonuna yönelik olarak gerçekleştirilmektedir (Mohite *et al.* 2011; Rashid *et al.* 2012). İzolasyon çalışmalarında ayrıca yüksek sıcaklıklarda gelişebilen termofilik mikroorganizmalarda hedeflenebilmektedir (Ifrij and Ögel 2002; Li and Zhang 2005; Joshi *et al.* 2008; Mehta *et al.* 2012). Bazı izolasyon çalışmaları ise soğukta gelişebilen psikrofilik yada psikrotolerant mikroorganizmaların izolasyonuna yönelik olmaktadır (Ray *et al.* 1992; Kasana *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2009).

Mevcut çalışmada yüksek miktarda kitosan üretme yeteneğine sahip yeni filamentli küflerin izolasyonu ve en iyi izolatla steril olmayan kültür koşulları altında üretim çalışmalarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Steril olmayan koşulların oluşturulabilmesi için üretimde kullanılan besiyerlerinin ve ekipmanların sterilizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmanın ortam kaynaklı diğer kontaminant organizmalara oranla, kültür ortamında daha yüksek gelişme potansiyeli gösterme yeteneğinden faydalanılmıştır. Bunun için, üretim ortamının sıcaklığının ve başlangıç pH'sı düşük tutularak çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmanın sıvı kültürde düşük sıcaklıkta etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için de test mikroorganizması olarak düşük sıcaklıkta yüksek büyüme performansı gösteren bir filamentli küf türü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bu küfün izolasyonu, topraktan gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sırasında, üç temel nokta göz önünde bulundurulmuştur. Bunlardan birincisi izole edilmesi düşünülen küflerin melas ortamında gelişebilmesi, diğer bir ifadeyle melas sukrozunu etkili bir şekilde kullanabilmesi ve içerisinde bulunan gelişmeyi inhibe edici maddelerden en az seviyede etkilenmesi; ikinci ve üçüncü önemli noktalar ise, izole edilecek olan küfün düşük sıcaklıkta ve düşük pH'da

yüksek gelişme potansiyeli gösterebilmesiydi. Çalışmada, bu üç nokta göz önüne alınarak izolasyon çalışmaları tek karbon kaynağı olarak melası içeren ve pH 5 değerine ayarlanmış besiyerinde ve 4°C gibi düşük sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. 10-15 günlük inkübasyon süresinin sonunda petriler üzerinde gelişme gösteren koloniler belirlenmiş ve alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Bu şekilde yaklaşık olarak melası kulanabilen ve düşük sıcaklık ve pH'da gelişme gösteren 120 farklı küf izolatu elde edilmiştir.

Araştırmacılar izole ettikleri mikroorganizmalardan en üretken olanını seçerken tarama adını verdikleri bir prosedürün uygulanmasını önermektedirler. Bu prosedürde izole edilen çok sayıda mikroorganizma aynı kültür koşulları altında sıvı ya da katı kültürlerde geliştirilmekte ve belirlenen inkübasyon süresinin sonunda kültür ortamından alınan örneklerin analizleri yapılmaktadır. Analizler sonunda hedeflenen ürünü en iyi verimle üreten mikroorganizma seçilmekte ve takip eden aşamalarda kullanılmaktadır. Bu prosedür sayesinde de iş yükünün azaltılması amaçlanmaktadır (Erdal and Taskin 2010; Taskin and Erdal 2011; Alnahdi 2012; Bizuye *et al.* 2013). Tarama çalışmaları toplam 120 izolat arasında en yüksek miktarda kitosan üreten izolatu PAS17 olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bazı izolatların PAS17'ye oranla daha yüksek miktarda biyomas üretme kapasitesine sahip olduğu görülse de, onların kitosan miktarları daha düşük bulunmuştur. Bu durum elde edilen kitosan verimleri göz önüne alındığında daha da açık bir şekilde ortaya çıkmıştır. Örneğin, maksimum kitosan miktarının (1,59 g/l) yanı sıra, maksimum kitosan verimine (%14,4) PAS17 adlı izolat ile ulaşılmıştır.

5.3. Steril Olmayan Kültür Şartlarının Sağlanması Amacıyla Fermentasyon Ortamının Sıcaklık ve pH'sının Etkilerinin Değerlendirilmesi

Mikrobiyal fermentasyon çalışmaları genellikle steril besiyerlerinde ve steril kültür koşulları altında gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, araştırmacılar uygun mikroorganizmalar seçildiğinde çalışmaların steril olmayan besiyerlerinde ve steril olmayan kültür koşulları altında da gerçekleştirilebileceğini ileri sürmektedirler. Besiyerlerinin steril edilmemesi sayesinde de enerjiden ve zamandan tasarruf elde

edilebileceği bilinmektedir. Özellikle, endüstriyel ölçüde üretimin gerçekleştirildiği besiyerlerinin hacminin çok fazla olduğu ve bunların steril edilmesi içinde çok fazla elektrik enerjisine ihtiyaç duyulduğu göz önüne alındığında besiyerlerinin steril edilmeden kullanılmasının üretimde maliyeti büyük ölçüde azaltacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, steril olmayan besiyerlerinde veya koşullar altında üretim gerçekleştirildiğinde bakteriler başta olmak üzere kültürde istenmeyen mikrobiyal kontaminasyonların meydana gelebileceği bildirilmektedir. Buna bağlı olarak, kültürde esas mikroorganizmanın resesif durumda kalabileceği veya hiç gelişemeyeceği belirtilmektedir. Nihayetinde de, kültürde üretilmek istenen ürünün veriminin düşeceği açıklanmaktadır (Saghafian 2013; Taskin *et al.* 2013).

Steril olmayan besiyerlerinde üretimi gerçekleştirmek içinse mikroorganizmaların sıcaklık ve pH toleransı gibi özelliklerinden faydalanılmaktadır. Örneğin, Qin *et al.* (2009) topraktan 55°C'de gelişme özelliğine sahip olan termofilik özelliğe sahip *Bacillus* sp.'yi izole etmiş ve 45-60°C gibi yüksek sıcaklıklarda steril olmayan koşullar altında laktik asit üretimini gerçekleştirmiştir. Benzer şekilde, termofilik mikroorganizmalarla hidrojen üretimi steril olmayan koşul altında gerçekleştirilmiştir (De Vrije *et al.* 2009). Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretim çalışmalarında mikroorganizmanın termofilik özelliğinden faydalanılmış ve diğer istenmeyen mezofilik ve psikrofilik özelliğe sahip kontaminantların gelişmesi engellenmeye çalışılmıştır. Sıcaklığın yanı sıra steril olmayan koşullar altında üretim sırasında mikroorganizmanın geliştiği pH derecesinden faydalanılabilmektedir. Örneğin asidik ortamlarda yaşayan bir mikroorganizma ile steril olmayan koşullarda bir çalışma gerçekleştirilirken ortamın pH'sı düşürülmekte ve bu şekilde zayıf asidik, nötral yada bazik pH'larda gelişen mikrobiyal kontaminantlar engellenmeye çalışılmaktadır (Libra *et al.* 2003). Santamauro *et al.* (2014) kültür ortamının sıcaklığının düşük tutulması ve bu ortamda sınırlı besinin bulunması sayesinde kültür ortamında istenmeyen kontaminasyonların engellenebildiği ve bu ortamda *Metschnikowia pulcherrima* mayası ile lipid üretiminin gerçekleştirilebildiği belirtilmiştir.

Mevcut çalışmada, steril olmayan besiyeri ve kültür koşulları altında kitosan üretimini

gerçekleştirmek için test küfünün soğukta ve düşük pH'da gelişme potansiyelinden faydalanılmıştır. Elde edilen sonuçlar test küfünün maksimum biyomas ve kitosan içeriğine 15°C'de ulaştığını göstermiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda kademeli olarak küf gelişiminin azaldığı görülmüştür. Özellikle, 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hücre büyümesinin ve dolayısıyla da küf biyomasının azaldığı tespit edilmiştir. Örneğin, 35°C'de kültürde küf gelişiminin olmadığı görülmüştür. Ayrıca aynı test küfünün sıvı kültürde 5°C'de gelişebildiği ve agar besiyerinde de 4°C'de izolasyonunun gerçekleştirilebildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmada kullanılan test küfünün psikrotolerant özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Çünkü literatürler psikrofilik organizmaların gelişimleri için sıcaklık üst sınırının 20°C olduğu bu değer üzerinde yaşayamadıkları fakat psikrotolerant olanların 20°C'den daha yüksek sıcaklıkları tolere edebildiği belirtilmektedir. Düşük sıcaklık olarak bu mikroorganizmaların 0°C ve 5°C civarında yaşadığı hatta bazı psikrofilik olanların 0°C'nin altında da gelişme gösterebildiği açıklanmaktadır (Kasana *et al.* 2008; Satyanarayana and Kunze 2009). Diğer taraftan, elde edilen sonuçlar 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların sadece biyokütle içeriğini değil, aynı zamanda kitosan içeriğini de önemli derecede azalttığını ortaya çıkarmıştır. Hatta kitosan içeriği artan sıcaklığa bağlı olarak daha fazla olumsuz etkilenmiştir. Örneğin, kitosan içeriği/biyokütle içeriği olarak tanımlanan kitosan verimi Şekil 4.1'den de anlaşılacağı üzere, artan sıcaklığa bağlı olarak azalmıştır. Çalışmada, kültür ortamının sıcaklığının ortamdaki kontaminasyon derecesinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Kontaminasyon ölçüsünün belirlenmesi için ışık mikroskobu altında kültürden alınan örneklerin bakteriyel incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık denemeleri sırasında kültür ortamının pH 5'e ayarlandığında 5°C ve 10°C'lik sıcaklıklarda kontaminasyonun hiç olmadığı tespit edilmiştir. Aynı pH'da 15°C'de çok az kontaminasyon görülürken, 20°C'de orta seviyede ve üzerindeki sıcaklıklarda ise aşırı kontaminasyon belirlenmiştir. Bu yüzden, sonraki deneyler için maksimum kitosan veriminin elde edildiği 15°C'lik sıcaklık seçilmiştir.

Sıcaklığın ardından test küfü için kültür pH'sının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'den görülebileceği gibi maksimum kitosan içeriğine ve verimine pH 4,5 değerinde ulaşılmıştır. Sıcaklık 15°C'de sabitlenip, pH 5,0'ten 4,5'a indirildiğinde,

kültürdeki bakteri kontaminasyonunun tamamen engellendiği belirlenmiştir. Bu yüzden takip eden deneyler 15°C sıcaklık ve pH 4,5'te gerçekleştirilmiştir.

5.4. Taguchi D.D. Uygulaması ile *R. oryzae* PAS17 ile Gerçekleştirilen Kitosan Üretimi Üzerine Optimal Faktörlerin Etkilerinin Değerlendirilmesi

Araştırmacılar ürünlerin üretim sürecinden önce yapılacak kontrollerin, üretim süresinde yapılacak kontrollerden daha etkili ve üreticinin lehine sonuçlar elde edilebileceğini göstermek amacıyla deney tasarımı yöntemlerinden faydalanmaktadırlar. Deney tasarımlarında üretime etki eden faktörlerin optimal seviyelerinin belirlenmesi ortak amaç olmasına rağmen, kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanan üretim maliyeti ve verim yüzdesi oldukça değişkenlik göstermektedir. Uygulama şekillerine göre deney tasarımları klasik yöntemler, Shainin yöntemi ve Taguchi yöntemi olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Klasik yöntemlerde tek faktörlü deneyler, çok faktörlü deneyler, tam faktöriyel deneyler ve kesirli faktöriyel deneyler kullanılmaktadır. BKBD yöntemi tek faktörlü deneylere örnek verilirken, birden fazla faktörün yanıt değişkeni üzerindeki etkisinin olası tüm kombinasyonlarının yapıldığı ve dolayısıyla deney sayısının arttığı tasarımlara çok faktörlü deneyler örnek verilebilir. Bütün faktörlerin tüm seviyeleri arasında gerçekleşen kombinasyonların elde edildiği sistem ise tam faktöriyel deneylerle yapılmaktadır. Tam faktöriyel deneylerde üretim ile ilgili bütün faktörlerin etkileşimi tamamen belirlendiğinden, maksimum bilgi elde edilmesine rağmen, deney sayısının fazlalığı, iş ve enerji yükünün artması sonucu ortaya çıkan üretim maliyetleri bu deney tasarımının etkin bir şekilde uygulanmasına olanak sunmamaktadır (Gunst and Mason 1991; Montgomery 1997; Gencel 2007). Shainin yönteminde, deneylerin tasarımında kullanılmak üzere teşhis ve değişimin azaltılması konusunda bazı araçlar geliştirilmiştir. Bu araçların kullanımı sonucunda sıfır değişimin sağlanabileceği ve güçlü sonuçlar elde edilebileceği belirtilmiştir. Taguchi yaklaşımının dışında değişimi azaltma konusunda Shainin yönteminde kullanılan pozitif kontrol (positrol) tekniği ile mühendisin bir kontrolü yapmadan önce o kontrolü hangi cihazla veya aletle yapacağı, kimin yapması gerektiği ve hangi sıklıkta ne zaman yapılmasının gerektiği konusunda bir plan yapması belirlenmektedir (Bhote 1991; Gencel 2007).

Taguchi'nin geliştirdiği deney tasarımında kullanılan değişkenin (varyans) indirgenmesi durumu, istatistik ve mühendislikte büyük katkı sağlamıştır. Batıda bulunan istatistikçiler tarafından eleştiriler almış bir yöntem olmasına rağmen, ABD'de bulunan pek çok istatistikçi bu yöntemi kullanarak başarılı sonuçlar almıştır. Taguchi yöntemine Japonya'da "kalite mühendisliği", batıda ise "robust tasarım" isimleri verilmektedir. Ayrıca ürünün en iyilenmesi esnasında elde edilen diğer sonuçların büyük bir değere sahip olduğu konusunda istatistikçiler arasında genel bir fikir birliği bulunmaktadır (Baynal 2003).

Mevcut çalışmada Taguchi D.D.'nin kullanımının avantajlarının oldukça fazla olduğu görülmüştür. Örneğin 5 faktörün (melas miktarı, MgSO₄.7H₂O miktarı, inokulum miktarı, çalkalama hızı ve inkübasyon süresi), 4 seviyeli deneyleri Taguchi D.D. yerine tam faktöriyel deney tasarımı ile gerçekleştirilseydi, toplamda 4⁵=1024 tane deney yapılması gerekecekti. Oysa Taguchi D.D.'nin kullanımı ile bu sayı sadece 16 deney sayısına düşürülerek, tam faktöriyel deney tasarımının dezavantajlarından olan fazla deney sayısı buna bağlı olarak deneylerin tekrarının mümkün olmaması ile iş yükü ve enerji sarfiyatının önüne geçilerek üretim maliyetinin azaltılması gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında elde edilen ANOVA sonuçlarına bakılarak hangi faktörün kitosan üretimi sürecinde daha fazla etkiye sahip olduğu ve hangi faktörün daha az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca optimal şartlar dışında kalan deney düzeneklerinden elde edilen sonuçlar, daha sonra gerçekleştirilebilecek benzer çalışmalar için yol gösterici özelliğe sahip olmuştur.

Melasın farklı konsantrasyonlarda kullanımı sonucunda en iyi kitosan üretiminin 70 ml/l konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. *R. oryzae* suşu ile melas kullanılarak yapılan bir çalışmada, başlangıç şeker miktarı 40 g/l olarak kullanılmıştır. Elde edilen kitosan miktarı 0,961 g/l olarak ölçülmüştür. Mevcut çalışmada ise başlangıç şeker miktarı yaklaşık olarak 32 g/l olarak belirlenmiştir. Elde edilen kitosan miktarı ise optimal şartlarda 1,59 g/l olarak tespit edilmiştir. Bu şekilde Taguchi D.D.'nin kitosan üretimi için uygun bir optimizasyon aracı olarak kullanılabilirliği ortaya çıkmıştır.

Çalışmada kullanılacak karbon kaynağı olarak melasın seçiminden sonra kitosan üretimi üzerine etkili olan diğer faktörlerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kitosan üretimi için kullanılan besiyeri içeriğinde bulunan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ miktarının üretime etkisinin önemli olduğu belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2014). *R. japonicus* M193 suşu ile yapılan kitosan üretiminde en uygun $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ miktarının 0,6 g/l olduğu görülürken (Zhang *et al.* 2014), başka bir çalışmada *Mucor indicus* CCUG 22424 ile yapılan kitosan üretiminde 0,75 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kullanılmıştır (Asachi *et al.* 2011; Asachi and Karimi 2013). Bunların yanı sıra, *M. rouxii* (MTCC 386) ile yapılan bir çalışmada 0,01 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kullanılarak kitosan üretilmiştir (Chatterjee *et al.* 2005). Diğer yandan, *R. oryzae* ve bazı bakterilerle kitosan üretimi üzerine yapılan araştırmalarda, 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kullanılmıştır (Göksungur 2004; Kaur *et al.* 2012; Naghdi *et al.* 2014). Bu sonuçlar mevcut çalışmada bulunan optimal $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ değeri ile uygunluk göstermektedir. Kitosan üretiminde kullanılan inokulum miktarı fermentasyon süresinde verime etki eden faktörlerden biri olarak görülmektedir.

Mevcut çalışmada mikroorganizmanın iyi geliştiği ve istenen ürün olan kitosanın elde edilme yüzdesinin yüksek olduğu inokulum değerinin belirlenmesi amacıyla, kullanılan faktörlerden biri inokulum miktarı olarak seçilmiştir. Kitosan üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan inokulum değerleri oldukça farklılık göstermektedir. Fermentasyon esnasında kullanılan sıcaklık değeri de inokulum miktarı üzerine etki etmektedir. Diğer bir deyişle, *R. oryzae* ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda kullanılan fermentasyon sıcaklığı ve buna bağlı olarak, küfün inokulum olarak yetiştiği sıcaklık aralığı 25-30°C olarak uygulanmıştır. Bilindiği üzere mezofilik sıcaklıklarda çoğu mikroorganizma yaşayabilmektedir. Bu sebeple genellikle, inokulum olarak kullanılan sporların oluşumu yani sporulasyon durumu mezofilik sıcaklıklarda daha hızlı gerçekleşmektedir. Yapılan bir çalışmada 30°C sıcaklıkta 3 gün boyunca PDA plaklarında gelişen *Mucor rouxii* MTCC 386 suşu ile kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan inokulum materyali 5 mm çaplı disk açıcısı ile yaklaşık olarak $6,4 \times 10^6$ spor/disk olarak belirlenmiştir (Chatterjee *et al.* 2005).

R. oryzae ile yapılan bir çalışmada kitosan üretimi için kullanılan fermentörün çalkalama hızının en iyi derece olarak 338,93 rpm olduğu belirtilmiştir (Göksungur 2004). Diğer bir çalışmada *R. japonicus* ile gerçekleştirilen kitosan üretiminde 200 rpm değerinde çalkalama hızı kullanılmıştır (Zhang *et al.* 2014). Bunların yanında daha düşük çalkalama hızında ve sürede yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Chatterjee *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada, *R. oryzae* ile bitki büyüme hormonlarının küfün gelişimi ve kitosan üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kullandıkları çalkalama hızı 120 rpm ve fermentasyon süresi 3 gün ve fermentasyon ortamının sıcaklığı 30°C olarak belirtilmiştir. Başka bir çalışmada, 25°C sıcaklıkta, 150 rpm'de 12 gün süreyle fermentasyona bırakılan bir *A. niger* suşu ile kitosan üretimi yapılmıştır (Logesh *et al.* 2012). *R. oryzae* PAS17 suşu ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise 150 rpm çalkalama hızı ve 8 günlük fermentasyon süresi optimal şartlar olarak belirlenmiştir.

Endüstriyel üretimlerde ürünün yüksek verimle ve düşük maliyetle elde edilmesi esastır. Bu amaçla geliştirilen istatistik programlarının uygulanması ile elde edilen verimin artırılması yanında, iş gücü, zaman, üretim maliyeti ve kalite kaybının azaltılması hedeflenmektedir. Steril olmayan koşullar altında üretim maliyetinin daha fazla azaltılması sağlanmıştır. Bu amaçla mevcut çalışmada Taguchi D.D. kullanılarak, kitosan üretiminin ve verim artışının sağlanması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol amacıyla steril şartlar altında kitosan üretimi gerçekleştirilmiş, ortaya çıkan sonuçlar önceki değerlerle uyum göstermektedir. Araştırma sonucunda, *R. oryzae* PAS17 suşu ile steril olmayan şartlar altında, düşük sıcaklık ve düşük pH değerlerinde, biyokütle bakımından %14,4 ve Ç.A.M. bakımından %33,3 oranında verimle kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Taguchi D.D.'nin kullanımı ile endüstriyel öneme sahip farklı maddelerin sentezinin daha yüksek verimle ve daha ucuz bir maliyet ile gerçekleştirilebilmesi için daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbas, M.Y., Sar, T. and Ozcelik B., 2014. Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla* hemoglobin expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78 (4), 687-694.
- Akbuğa, J., 1995. A Biopolymer: Chitosan. *International Journal of Pharmaceutical Advances*, 1, 3-18.
- Ak Kalut, S., 2008. Enhancement of Degree of Deacetylation of Chitin in Chitosan Production, (Bachelor Thesis), Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources University, Malaysia Pahang.
- Aksu, Z. and Eren, A.T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107–113.
- Aldemir, T. and Bostan, K., 2009. Effects of chitosan on the microbiological quality of ready to cook meatball. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 35 (2), 13-21.
- Alnahdi, H.S., 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 71-74.
- Alper, S., 2003. Production and isolation of fungal chitosan by submerged fermentation. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Altınbilek Ünal, Y., 2001. Sanzıman giriş mili imalatındaki proses parametrelerine Taguchi metodunun uygulanması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Anitha, A.A., Sowmya, S., Sudheesh Kumar, P.T., Deepthi, S., Chennazhi, K.P., Ehrlich, H., Tsurkan, M. and Jayakumar, R., 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39, 1644-1667.
- Anonymous, 1982. Molasses market news. Market Summary 1981. AMS. USDA, Denver CO.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., 2009. Functional characterization of chitosan. *Current Chemistry*, 3, 203-230.
- Arcidiacono, S. and Kaplan, D.L., 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 281-286.
- Asachi, R., Karimi, K. and Taherzadeh, M.J., 2011. Fungal autolysate as a nutrient supplement for ethanol and chitosan production by *Mucor indicus*. *Biotechnology Letters*, 33 (12), 2405-2409.
- Asachi, R. and Karimi, K., 2013. Enhanced ethanol and chitosan production from wheat straw by *Mucor indicus* with minimal nutrient consumption. *Process Biochemistry*, 48, 1524-1531.
- Aşık, E., 2009. Sarımsak Yağı İçeren Kitozan Kaplamalarının Karideslerin Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Aydogan, M.N., Taskin, M., Canli, O., Arslan, N.P. and Ortucu, S., 2014. Tris–sucrose buffer system: a new specially designed medium for extracellular invertase production by immobilized cells of isolated yeast *Cryptococcus laurentii* MT-61. *Folia Microbiologia*, 59, 9-16.
- Azad, A.K., Sermsintham, N., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F., 2004. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 69, 216-222.
- Bao, H., Oan, Y., Ping, Y., Sahoo, N.G., Wu, T., Li, L., Li, J. and Gan, L.H., 2011. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. *Small*, 7 (11), 1569-1578.
- Baynal, K., 2003. Çok yanıtli problemlerin Taguchi yöntemi ile eniyilenmesi ve bir uygulama. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Baynal, K., 2007. Çok Yanıtli Problemlerin Optimizasyonunda Taguchi Yönteminin Kullanılması ve Alkollü İçkiler Sektöründe Bir Uygulama. Yüksek Lisans, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Bhosale, P., 2001. Studies on Yeast *Rhodotorula*, Its Carotenoids and Their Applications. PhD Thesis, University of Pune in Microbiology, Pune, India.
- Bhote, K.R., 1991. World Class Quality. Second edition, American Management Association.
- Bhunchu, S. and Rojsitthisak, P., 2014. Biopolymeric alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Pharmazie*, 69 (8), 563-570.
- Bizuye, A., Moges, F. and Andualem, B., 2013. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3, 375-381.
- Bolobova, A.B. and Kondrashchenko, V.I., 2000. Use of yeast fermentation waste as a biomodifier of concrete (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36, 205-214.
- Bostan, K., Aldemir, T. and Aydın, A., 2007. Kitosan ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37, 118-127.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 1994. *Biology of Microorganisms*. 7th edition, p. 122. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Bulut, Ş., 2001. *Rhizopus oryzae*'den laktik asit üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Bunge, R.P., 1994. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *Journal of Neurology*, 242, 519-521.
- Burrows, S., 1970. Baker's yeast. *The Yeasts*, Ed: Rose, A.H. and Harrison J.S. Academic Press, London and Newyork, 365-369.
- Busilacchi, A., Gigante, A., Mattioli-Belmonte, M., Manzotti, S. and Muzzarelli, R.A.A., 2013. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 98, 665-676.
- Caner, H., Yilmaz, E. and Yilmaz, O., 2007. Synthesis, characterization and antibacterial activity of poly(N-vinylimidazole) grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 69, 18-325.

- Canıylmaz, E., 2001. Kalite geliştirmede Taguchi metodu ve bir uygulama, Gazi Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Canlı, Ö., 2009. Koç Boynuzu Peptonu Kullanılarak *Aspergillus niger* Tarafından Glukoz Oksidaz Enzimi Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Scarmino, I.S., 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, 98, 2824-2828.
- Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K. and Vuddhakul, V., 2007. Comparing the efficiency of chitosan with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. *Food Control*, 18, 1031-1035.
- Chang, Y., McLandsborough and McClements, D.J., 2014. Interaction of cationic antimicrobial (ϵ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan, alginate, and pectin. *Food Research International*, 64, 396-401.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K. and Chatterjee, B.P., 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, 40, 395-400.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P. and Guha, A. K., 2008. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 120-126.
- Chaussard, G. and Domard, A., 2004. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules*, 5 (2), 559-564.
- Chen, Y.M., Chung, Y.C., Wang, L.W., Chen, K.T., Li, S.Y., 2002. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 37, 1379-1390.
- Cho, T.W., Cho, Y.N., Chung, S.H., Yoo, G. and Ko, S.W., 1999. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*, 20, 2139-2145.
- Coblentz, W., 1908. Supplementary Investigations of Infrared Spectra (The Carnegie Institution), Washington, Publication No: 97, 16.
- Coller, B. S., 1984. Bizzozero and the discovery of the blood platelets. *Lancet*, 804-806.
- Dadkhah, D., Navarchian, A.H. and Aref, L., 2014. Application of Taguchi Method to Investigate the Drug Release Behaviour of Poly (Acrylamide-co-Maleic Acid)/Montmorillonite Nanocomposite Hydrogels. *Advances in Polymer Technology*, 33 (4), 21426, 1-9.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M. and Chiellini, E., 2011. Chitosan a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress Polymer Science*, 36, 981-1014.
- De Queiroz, A.A., Ferraz, H.G., Abraham, G.A., Del Mar Fernández, M., Bravo, A.L. and Román, J.S., 2003. Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and in vivo behaviour. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64, 147-154.
- De Vrije, T., Bakker, R.R., Budde, M.A.W., Lai, M.H., Mars, A.E. and Claassen, P.A.M., 2009. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor*

- saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology and Biofuels*, 2, 12.
- Dey, T.B. and Kuhad, R.C., 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnology Reports*, 4, 120-127.
- Dhillon, G.S., Bansal, S. and Oberoi, H.S., 2007. Cauliflower waste incorporation into cane molasses improves ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 178. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 353-357.
- Domard, A., 2011. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 84, 696-703.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., 1993. Key to the genera. *Compendium of Soil Fungi*, IHW, Eching, Germany.
- Dumitru, S. and Esteban, C., 1997. Immobilisation of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. *Biotechnology Progress*, 13 (5), 539-545.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D., 2008. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 333-335.
- Dureja H., Tiwary A.K. and Gupta S., 2001. Stimulation of skin permeability in chitosan membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 213, 193-198.
- Ediz, N., 2004. Bazı Bacillus Cinsi Bakterilerin Melas Besiortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Elsabee, M.Z., Abdou, E.S., Nagy, K.S.A. and Eweis, M., 2008. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate Polymers*, 71 (2), 187-195.
- Elsabee, M.Z. and Abdou, E.S., 2013. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C* 33, 1819-1841.
- Erdal, S. and Taskin, M., 2010. Production of alpha-amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnology Letters*, 15, 5342-5350.
- Erdik, E., 1998. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, 2. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye.
- Ergun, M. and Mutlu S., 2000. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology*, 73, 251-255.
- Esquerdo, V.M., Cadaval Jr., T.R.S., Dotto, G.L. and Pinto, L.A.A., 2014. Chitosan scaffold as an alternative adsorbent for the removal of hazardous food dyes from aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 424, 7-15.
- Evrin, E., 2013. Panomycocin - Incorporated Chitosan - Tpp Nanoparticles: Preparation, Characterization and In Vitro Determination of Antifungal Activity against Human Dermatophytes. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fan, W., Gu, J., Hu, W., Deng, A., Ma, Y., Liu, J., Ding, F. and Gu, X., 2008. Repairing a 35-mm-long median nerve defect with a chitosan/PGA artificial nerve graft in the human: a case study. *Microsurgery*, 28, 238-242.

- Fan, J., Shang, Y., Yuan, Y. and Yang, J., 2010. Preparation and characterization of chitosan/galactosylated hyaluronic acid scaffolds for primary hepatocytes culture. *Journal of Materials Science: Materials Medicine*, 21, 319-327.
- Felse, P.A. and Panda T., 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, 20, 505-512.
- Fernandez, C.M., Karjalainen, M., Airaksinen, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinamaki, J., Colarte, A.I. and Yliruusi, J., 2004. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (1), 69-76.
- Fischer, T.H., Bode, A.P., Demcheva, M. and Vournakis, J.N., 2007. Hemostatic properties of glucosamine-based materials. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 80, 167-174.
- Fowlkes, W.Y. and Creveling, C.M., 1995. *Engineering methods for robust product design: Using Taguchi methods in technology and product development*. Reading, MA: Addison-Wesley.
- Funakosi, T., Majima, T., Iwasaki, N., Suenaga, N., Sawaguchi, N., Shimode, K., Minami, A., Harada, K., Tamura, H., Tokura, S. and Nishimura, S., 2005. Application of tissue engineering techniques for rotator cuff regeneration using a chitosan-based hyaluronan hybrid fiber scaffold. *American Journal of Sports Medicine*, 33, 1193-1201.
- Gagne, N., 1993. *Production of Chitin and Chitosan from Crustacean Waste and Their Use as a Food Processing Aid*. Master Thesis, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, Canada.
- Ganji, F. and Abdekhodaie, M.J., 2010. Chitosan-g-PLGA copolymer as a thermo sensitive membrane. *Carbohydrate Polymers*, 80, 740-746.
- Gao, X., Yang, Y. and Deng, H., 2011. Utilization of beet molasses as a grinding aid in blended cements. *Construction and Building Materials*, 25, 3782-3789.
- Gardiner, B.J., Simpson, I., Khuu, M.H., Kidd, S.E., Lo, C.H. and Jenkin, G.A., 2015. An unusual ulcer: A case of cutaneous mucor mycosis caused by *Rhizopus oryzae*. *Medical Mycology Case Reports*, 7, 8-11.
- Gencel, İ., 2007. Çok Yanıtlı Problemlerin Optimizasyonunda Taguchi Yönteminin Kullanılması ve Alkollü İçkiler Sektöründe Bir Uygulama. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Gennadios, A., Hanna, M.A. and Kurth, L.B., 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 337- 350.
- George, T.S., Guru, K.S.S., Vasanthi, N.S. and Kannan, P., 2011. Extraction, purification and characterization of chitosan from endophytic fungi isolated from medicinal plants. *World Journal of Science and Technology*, 1 (4), 43-48.
- Ghanem, N.B., Yusef, H.H. and Mahrouse, H.K., 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresource Technology*, 73, 113-121.
- Ghattas, N., Abidi, F., Galai, S., Marzouki, M.N. and Salah, A.B., 2014. Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase

- using immobilization techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 1-6.
- Goncalves, I.C., Henriques, P.C., Seabra, C.L. and Martins, M.C.L., 2014. The potential utility of chitosan micro/nanoparticles in the treatment of gastric infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12 (8), 981-992.
- Gow, N.A.R. and Gadd, G.M., 1995. *The Growing Fungus*. Chapman & Hall, London, UK.
- Goy, R.C., Britto, D. and Assis, O.B.G., 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247.
- Göksungur, Y., 1998. Melastan Laktik Asit Üretiminde Farklı Üretim Tekniklerinin Kullanılabilirliği ve Ortam Şartlarının Optimizasyonu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Göksungur, Y., 2004. Optimization of the production of chitosan from beet molasses by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 974-981.
- Gravela, E., 1989. Giulio Bizzozero. Torino, Italy: Allemandi C.
- Grosso, C., Ferreira-Dias, S. and Pires-Cabral, P., 2013. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of Food Engineering*, 115, 475-480.
- Gu, J., Hu, W., Deng, A., Zhao, Q., Lu, S. and Gu, X., 2012. Surgical repair of a 30 mm long human median nerve defect in the distal forearm by implantation of a chitosan-PGA nerve guidance conduit. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6, 163-168.
- Gunst, F. and Mason, R.L., 1991. *How to Construct Fractional Factorial Experiment*. American Society for Quality.
- Haider, S., Park, S.Y. and Lee, S.H., 2008. Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviors of a gelatin-chitosan blend membrane. *Soft Matter*, 4, 485-492.
- Haipeng, G., Yinghui, Z., Jianchun, L., Yandao, G., Nanming, Z. and Xiufang, Z., 2000. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 285-295.
- Hamano, P.S. and Kilikian, B.V., 2006. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 443-449.
- Hamzaçebi, C., 2000. Kalite yönetiminde Taguchi felsefesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Heidary Vinche, M., Asachi, R., Zamani, A. and Karimi, K., 2013. Ethanol and chitosan production from wheat hydrolysate by *Mucor hiemalis*. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 88, 255-260.
- Hein, S., Wang, K., Stevens, W.F. and Kjems, J., 2008. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. *Materials Science and Technology*, 24, 1053-1061.
- Hınıslıoğlu, S. and Bayrak, O.Ü., 2004. Optimization of early flexural strength of pavement concrete with silica fume and fly ash by the Taguchi method. *Civil Engineering and Environmental Systems*, 21, 79-90.

- Ho, Y.C., Mi, F.L., Sung, H.W. and Kuo, P.L., 2009. Heparin-functionalized chitosan-alginate scaffolds for controlled release of growth factor. *International Journal of Pharmaceutics*, 376, 69-75.
- Honarkar, H. and Barikani, M., 2009. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chemistry*, 140, 1403-1420.
- Hongpattarakere, T. and Riyaphan, O., 2008. Effect of Deacetylation Conditions on Antimicrobial Activity of Chitosans Prepared from Carapace of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 1-9.
- Hsiao, N.W., Chen, Y., Kuan, Y.C., Lee, Y.C., Lee, S.K., Chan, H. and Kao, C.H., 2014. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 89-94.
- Hsieh, K.L., Tong, L.I., Chiu, H.P. and Yeh, H.Y., 2005. Optimization of a multi-response problem in Taguchi's dynamic system. *Computers and Industrial Engineering*, 49, 556-571.
- Huang, J., Hu, X., Lu, L., Ye, Z., Zhang, Q. and Luo, Z., 2010. Electrical regulation of Schwann cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 93, 164-174.
- Ifrij, I.H. and Ögel, Z.B., 2002. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose. *Biotechnology Letters*, 24, 1107-1110.
- Jaime, M.D.L.A., Lopez-Llorca, L.V., Conesa, A., Lee, A.Y., Proctor, M., Heisler, L.E., Gebbia, M., Giaever, M., Westwood, J.T. and Nislow, C., 2012. Identification of yeast genes that confer resistance to chitosan oligosaccharide (COS) using chemogenomics. *BMC Genomics*, 13, 267.
- Jeuniaux, C., 1986. Chitosan as a tool for the purification of water. In *Chitin in nature and Technology*; Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W. eds.; Plenum Press: New York, 551-567.
- Jei-Fu, S., Rey-Chang, C., Wang, F.F. and Wang, J.Y., 1990. Lipolytic activities of lipase immobilised on six selected supporting materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 35 (2), 132-137.
- Jiang, L., 2011. Comparison of Disk Diffusion, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing Of Five Chitosans, (Ms Thesis), Louisiana State University, China.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H. and Pretorius, I.S., 2006. The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production. *South African Society for Enology&Viticulture*, 27, 15-39.
- Joseph, A.L., 1994. Removing acid dyes from textile waste water using biomass for decolourisation. *American Dyestuff Reporter*, 83, 48-55.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99, 195-199.
- Kağnıcıoğlu, C.H., 1998. Üretim Öncesi Kalite Kontrolünde Taguchi Yöntemi ve Kükürtdioksit Giderici Sitrata Yöntemine Uygulanması. Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A. and Skaracis, G.N., 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*, 39, 249-256.
- Kang De, Y., Tao, P., Mei-Xuan, X., Chen, Y., Mattheus, G.F.A., Qi-ying, Z. and Lei, R., 1994. pH dependent hydrolysis and drug release of chitosan/polyether interpenetrating polymer network hydrogel. *Polymer International*, 34 (2), 213-219.
- Kasana, R.C., Kaur, B. and Yadav, S.K., 2008. Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 207-212.
- Kaş, H.S., 1997. Chitosan properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, 14, 689-711.
- Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V. and Bhardwaj, U., 2012. Isolation and characterization of chitosan-producing bacteria from beaches of Chennai, India. *Enzyme Research*, 2012, 1-6.
- Kawaguchi, M., Nonaka, K., Masuma, R. and Tomoda, H., 2013. New method for isolating antibiotic-producing fungi. *The Journal of Antibiotics*, 66, 17-21.
- Ke, G., Xu, W. and Yu, W., 2010. Preparation and properties of drug loaded chitosan-sodium alginate complex membrane. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 59, 184-191.
- Kishore, V., Bullock, W., Sun, X., Dyke W.S.V. and Akkus O., 2012. Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials*, 33, 2137-2144.
- Kitcha, S. and Cheirsilp, B., 2013. Enhancing Lipid Production from Crude Glycerol by Newly Isolated Oleaginous Yeasts: Strain Selection, Process Optimization, and Fed-Batch Strategy. *Bioenergy Research*, 6, 300-310.
- Kleekayai, T. and Suntornsuk, W., 2011. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (5), 1145-1154.
- Koç, B.E. ve Özkan, M., 2011. Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Gıda Dergisi*, 36 (3), 161-168.
- Kona, R.P., Qureshi, N., Pai, J.S., 2001. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78, 123-126.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Kumirska, J., Weinhold, M.X., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thoming, J. and Stepnowski, P., 2011. Influence of the chemical structure and physicochemical properties of chitin and chitosan based materials on their biomedical activity. In: Laskovski AN, editor. *Biomedical engineering, trends in materials science*. Rijeka, Croatia: InTech, 25-64.
- Kurita, K., 1997. B-Chitin and the reactivity characteristics. In: *Applications of Chitin and Chitosan*, Goosen MFA, ed. (Lancaster, PA: Technomic Publishing), 79-87.
- Kurita, K., 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8 (3), 203-226.

- Lee, J.Y., Yun, J., Kim, T.G., Wee, D. and Cho, K.S., 2014. Two-stage biogas production by co-digesting molasses wastewater and sewage sludge. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 2401-2413.
- Li, F., Liu, W.G. and Yao, K.D., 2002. Preparation of oxidized glucose-cross linked N-alkylated chitosan membrane and in vitro studies of pH-sensitive drug delivery behaviour. *Biomaterials*, 23, 343-347.
- Li, J., Pan, J., Zhang, L., Guo, X. and Yu, Y., 2003a. Culture of primary rat hepatocytes within porous chitosan scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 67, 938-943.
- Li, J., Pan, J., Zhang, L. and Yu, Y., 2003b. Culture of hepatocytes on fructose modified chitosan scaffolds. *Biomaterials*, 24, 2317-2322.
- Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K.D., Xiao, D. and Zhang, M., 2005. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 3919-3928.
- Li, K., Peng, W., Zhou, J., Wie, S. and Cheng, X., 2013. Establishment of beet molasses as the fermentation substrate for industrial vitamin B₁₂ production by *Pseudomonas denitrificans*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 1730-1735.
- Li, H., Zhang, X., 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression Purification*, 42, 153-159.
- Libra, A., Ferneti, C., Lorusso, V., Visigalli, M., Anelli, P.L., Staud, F., Tiribelli, C. and Pascolo, L., 2003. Molecular Determinants in the Transport of a Bile Acid-Derived Diagnostic Agent in Tumoral and Nontumoral Cell Lines of Human Liver. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319 (2), 809-817.
- Lindahl, U. and Hook, M., 1978. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annual Review of Biochemistry*, 47, 385-417.
- Liu, Y., Zheng, P., Sun, Z., Jin-Jun Dong, Y. and Zhu, L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99, 1736-1742.
- Logesh, A.R., Thillaimaharani, K.A., Kalaiselvam, M. And Raffi, S.M., 2012. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), 140-143.
- Loncher, R.H. and Matar, J.E., 1990. *Designing for Quality: An Introduction to the Best of Taguchi and Western Methods of Statistical Experimental Design*, First edition, Chapman and Hall, USA.
- Lowry, O.H., Rosebrouh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265-275.
- Ma, J., Wang, H., He, B. and Chen, J., 2001. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human fetal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 22, 331-336.
- Ma, J. and Sahai Y., 2013. Chitosan biopolymer for fuel cell applications. *Carbohydrate Polymers*, 92, 955-975.

- Majdzadeh-Ardakani, K., Navarchian, A.H. and Sadeghi, F., 2010. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 79 (3), 547-554.
- Marreco, P.R., da Luz Moreira, P., Genari, S.C. and Moraes, A.M., 2004. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 71, 268-277.
- McGahren, W.J., Perkinson, G.A., Growich, J.A., Leese, R.A. and Ellestad, G.A., 1984. Chitosan by fermentation. *Process Biochemistry*, 19, 88-90.
- Mehta, A., Kumar, R. and Gupta, R., 2012. Isolation of lipase producing thermophilic bacteria: optimization of production and reaction conditions for lipase from *Geobacillus* sp. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59, 435-450.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mohite, B.V., Pawar, S.P. and Morankar, A., 2011. Isolation, Selection and Biodegradation Profile of Phenol Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soil. *Bulletin of Environmental Contaminants Toxicology*, 87, 143-146.
- Montgomery, D.C., 1997. *Introduction to Statistical Quality Control*. John Wiley&Sons Inc., Canada.
- Motonobu, G., Ayahito, S. and Tsutomu, H., 1994. Separation of water/ ethanol vapour mixtures through chitosan and cross linked chitosan membranes. *Separation Science and Technology*, 29 (14), 1915-1923.
- Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D. and Kundu, P.P., 2012. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37, 1457-1475.
- Muzzarelli, R.A.A., 1977. *Chitin*. Oxford: Pergamon Press.
- Muzzarelli, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M. and Paoletti, M. G., 2012. A tribute to Henri Braconnot precursor of the carbohydrate polymers science on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012.
- Nadarajah, K., Kader, J., Mazmira, M. and Paul, D.C., 2001. Production of Chitosan by Fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (3), 263-265.
- Naghdi, M., Zamani, A. and Karimi, K., 2014. A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungalchitosan with intact molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 158-162.
- Nakayama, K., 1981. Sources of industrial microorganisms, in: H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), *Biotechnology, Microbial Fundamentals*, Verlag Chemie, Weinheim, 355-410.
- Nettles, D.L., Elder, S.H. and Gilbert, J.A., 2002. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, 8, 1009-1016.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H. and Meyers, S.P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- No, H.K., Kim, S.H., Lee, S.H., Park, N.Y. and Prinyawiwatkul, W., 2006. Stability and Antibacterial Activity of Chitosan Solutions Affected by Storage Temperature and Time. *Carbohydrate Polymers*, 65, 174-178.

- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z., 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72 (5), 87-100.
- Noel, S.P., Courtney, H.S., Bumgardner, J.D. and Haggard, W.O., 2008. Chitosan films a potential local drug delivery system for antibiotics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466, 1377-1382.
- Nwe, N. and Stevens, W.F., 2002. Chitosan isolation from the chitosan-glucan complex of fungal cell wall using amylolytic enzymes. *Biotechnology Letters*, 24, 1461-1464.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G., Zvauya, R., Read, J.S. and Steiner, W., 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology*, 84, 259-263.
- Okutan, E.G., 1995. Deneysel tasarımın taguchi yöntemleri ile karşılaştırılması ve uygulamalar. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ouchi, T., 1990. Design of biodegradable polymer-5-fluoro uracil conjugate exhibiting antitumour activities. *Polymeric Materials Science and Engineering*, 62, 412-415.
- Ouchi, T., Banba, T., Huang, T.Z. and Ohya, Y., 1990. Design of polysaccharide-5-fluoro uracil conjugates exhibiting antitumour activities. *Polymer Reprints*, 31 (2), 202-203.
- Özbaş Turan, S., 2006. Kitosan Esaslı Taşıyıcı Sistemler ile Deriden Gen Transferinin Araştırılması. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özkan, E., 2011. FT-IR Spektroskopisi Kullanarak Tahribatsız Tereyağı Kalitesi Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özüak, S., 2008. Taguchi Deney Tasarımlarının Excel Çizelge Arayüzleriyle Uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. and Vyvyan, J.R., 2009. *Introduction to Spectroscopy*, Cengage Learning, USA.
- Paweletz, N., 2001. From Galen to Golgi: Birth of the life sciences in Italy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 475-480.
- Peace, G. S., 1993. *Taguchi methods: A hands-on approach*. Reading, MA: Addison-Wesley.
- Peña, A., Sánchez, N.S. and Calahorra, M., 2013. Effects of chitosan on *Candida albicans*: Conditions for its antifungal activity. *Biomed Research International*, 2013, 1-15.
- Pereda, M., Aranguren, M.I. and Marcovich, N.E., 2008. Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107 (2), 1080-1090.
- Petrikkos, G., Skiada, A., Lortholary, O., Roilides, E., Walsh, T. and Kontoyiannis, P., 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (1), 23-34.
- Phadke, M. S., 1989. *Quality engineering using robust design*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

- Pierro, D., Chico, B., Villalonga, R., Marinello, L., Damiao, A.E., Masi, P. and Porta, R., 2006. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7 (3), 744-749.
- Piscioneri, A., Campana, C., Salerno, S., Morelli, S., Bader, A., Giordano, F., Drioli, E. and Bartolo, L.D., 2011. Biodegradable and synthetic membranes for the expansion and functional differentiation of rat embryonic liver cells. *Acta Biomaterialia*, 7, 171-179.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A., 2002. *Microbiology*, fifth edition. The McGraw-Hill Companies, page 96-98, New York, USA.
- Qin, J., Zhao, B., Wang, X., Wang, L., Yu, B., Ma, Y., Ma, C., Tang, H., Sun, J. and Xu, P., 2009. Non-Sterilized Fermentative Production of Polymer- Grade L-Lactic acid by a Newly Isolated Thermophilic Strain *Bacillus* sp. 2-6. *PLoS ONE*, 4 (2): e4359. doi: 10.1371/journal.pone.0004359.
- Rane, K.D. and Hoover, D.G., 1993. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Process Biochemistry*, 28, 115-118.
- Ranjit, K.R., 1990. A primer on the Taguchi method: Van Nostrand Reinhold.
- Rao, R.S., Kumar, C.G. and Prakasham, R.S., 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology Journal*, 3, 510-523.
- Rashid, S., Charles, T.C. and Glick, B.R., 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial Endophytes. *Applied Soil Ecology* 61, 217-224.
- Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S. and Shivaji, S., 1992. Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1918-1923.
- Razmovski, R. and Vucurovic, V., 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix, *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 378-385.
- Ribatti, D. and Crivellato, E., 2007. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leukemia Research*, 31, 1339-1341.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Roberts, G.A.E., 2009. Thirty Years of Progress in Chitin and Chitosan, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivates* ed: Struszczyk H., Poland, 13, 7-15.
- Ross, P.J., 1996. Taguchi techniques for quality engineering, McGraw – Hill International book company, ISBN 0-07-114663-6, 1-73.
- Ross, P.J., 1998. The role of Taguchi Methods and Design of Experiments in QFD. *Quality Progress*.
- Ruiz-Herrera, J., 1992. *Fungal Cell Wall. Structure, Synthesis and Assembly*, CRC Press: Boca Raton, FL.
- Saghafian, A., 2013. Steril olmayan koşullar altında psikrotolerant mayalarla peynir altı suyundan biyolipitlerin üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Santamauro, F., Whiffin, F.M., Scott, R.J. and Chuck, C.J., 2014. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotchnology for Biofuels*, 7 (34), 2-11.
- Santos, T.C., Hoering, B., Reise, K., Marques, A., Silva, S.S., Oliveira, J.M., Mano, J., Castro, A.G., Reis, R.L. and van Griensven, M., 2013. In vivo performance of chitosan/soy-based membranes as wound dressing devices for acute skin wounds. *Tissue Engineering A*, 19, 860-869.
- Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A. and Papanikolaou, S., 2013. Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 958-969.
- Satyanarayana, T. and Kunze, G., 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Atlantic Pub. & Distr. (P) Ltd., XXI, New Delhi, India, 744.
- Seiichi, T., Koki, I., Noria, N., Shin-Ichiro, N., Ikuo, S. and Ichiro, A., 1994. Selective sulphation of chitin derivatives for biomedical functions. *Journal of Macromoles Science, Pure and Applied Chemistry*, 31 (11), 1701-1718.
- Senstad, C. and Mattiason, B., 1989. Purification of wheat germ agglutinin using affinity flocculation and a subsequent centrifugation or flotation step. *Biotechnology and Bioengineering*, 34 (3), 387-393.
- Shahidi, F., Kamil, J., Arachchi, V. and Jeon, Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Food Science and Technology*, 10, 37-51.
- Sharma, A., Vivekanand, V. and Singh, R.P., 2008. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, 99, 3444-3450.
- Shearn, J.T., Kinneberg, K.R.C., Fyment, N.A., Galloway, M.T., Kenteri K., Wylie, C. and Butler, D.L., 2011. Tendon tissue engineering: progress, challenges and translation to the clinic. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interact*, 11, 163-173.
- Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y. and Cheng, T., 2006. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, 133, 185-192.
- Shimizu, Y., Kono, K., Kim, I.S. and Takagishi, T., 1995. Effects of added metal ions on the interaction of chitin and partially deacetylated chitin with an azo dye carrying hydroxyl groups. *Journal of Applied Biomaterials*, 5 (3), 245-254.
- Sidal, U., Kolonyaka, N. and Kurtonur, C., 2000. Pseudomonas sp. ile zeytinyağı fabrikası atığından biosürfektan elde edilmesi. *Turkish Journal of Biology*, 24, 611-625.
- Silva, S.S., Goodfellow, B.J., Benesch, J., Rocha, J., Mano, J.F. and Reis, R.L., 2007. Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*, 70 (1), 25-31.
- Singh, B.K., Sirohi, R., Archana, D., Jain, A. and Dutta, P.K., 2014. Porous Chitosan Scaffolds: A Systematic Study for Choice of Crosslinker and Growth Factor Incorporation. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64 (5), 242-252.
- Singla, A.K. and Chawla, M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, 53, 1047-1067.

- Siqueira, P.F., Karp, S.G. and Carvalho, J.C., 2008. Production of bioethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99, 8156-8163.
- Skory, C.D., 2000. Isolation and Expression of Lactate Dehydrogenase Genes from *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), 2343-2348.
- Skory, C.D., 2003. Induction of *Rhizopus oryzae* pyruvate decarboxylase genes. *Current Microbiology*, 47 (1), 59-61.
- Songa, R., Xuea, R., Hea, L.H., Liua, Y. and Xiaob, Q.L., 2008. The Structure and Properties of Chitosan/Polyethylene Glycol/Silica Ternary Hybrid Organic-Inorganic Films. *Chinese Journal of Polymer Science*, 26, 621-630.
- Su, F., Li, G., Zhang, H. and Yan, Y., 2014. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hydrophobic Carriers and Its Application in Biorefinery of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. *Bioenergy Research*, 7, 935-945.
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6 (3), 257-272.
- Sun, J., Zhu, J. and Li, W., 2012. L-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 47, 442-450.
- Survase, S.A., Saudagar, P.S. and Singhal, R.S., 2007. Use of complex media for the production of scleroglucan by *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156, *Bioresource Technology*, 98, 1509-1512.
- Şanyılmaz, M., 2006. Deneysel Tasarım ve Kalite Geliştirme Faaliyetlerinde Taguchi Yöntemi ile Bir Uygulama. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Şirvancı, M., 1997. Kalite için deneysel tasarımı Taguchi yaklaşımı. Literatür Yayınları, İstanbul, Türkiye.
- Tadashi, U., Takashi, K., Hiroji, N. and Izuru, Y., 1993. Transport of nucleic acid bases against their concentration gradients through quaternized chitosan membrane. *Carbohydrate Polymers*, 21 (4), 289-293.
- Tan, O., Zaimoglu, A.S. and Hinislioglu, S., 2005. Taguchi approach for optimisation of the bleeding on cementbased grouts. *Tunnelling and Underground Space Technology*, 20, 167-173.
- Taravel, M.N. and Domard, A., 1995. Collagen and its interaction with chitosan:II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials*, 16, 865-871.
- Taravel, M.N. and Domard, A., 1996. Collagen and its interaction with chitosan: III. Some biological and mechanical properties. *Biomaterials*, 17, 451-455.
- Taskin, M. and Erdal, S., 2011. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT-5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. *Journal of Science Food Agriculture*, 91, 1440-1445.
- Taskin, M. and Kurbanoglu, E.B., 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 826-834.
- Taskin, M., Esim, N. and Ortucu, S., 2012. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 773-779.

- Taskin, M., Ortucu, S., Unver, Y., Arslan, N.P., Algur, O.F and Saghafian, A., 2013. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* MBG-10 using starch-rich waste loquat kernels as substrate. *Starch*, 65 (3-4), 322-329.
- Tayel, A.A., Moussa, S.H., El-Tras, W.F., Elguindy, N.M. and Opwis, K., 2011. Antimicrobial textile treated with chitosan from *Aspergillus niger* mycelial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 241-245.
- Taylan, D., 2009. Taguchi Deneý Tasarımı Uygulaması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Temür, M., 2008. Muz Kabuğu Hidrolizatının Glutasyon Üretiminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Thacharodi, D. and Rao, K.P., 1996. Collagen-chitosan composite membranes controlled transdermal delivery of nifedipine and propranolol hydrochloride. *International Journal of Pharmacy*, 134, 239-41.
- Thanou M., Verhoef J.C. and Junginger H.E., 2001. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 91-101.
- Tocci, N., Simonetti, G., D'auria, F.D., Panella, S., Palamara, A.T., Valletta, A. and Pasqua, G., 2011. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 977-987.
- Toshihiro, S., Takaki, K. and Toshiro, I., 1988. Sorption of methyl orange by chitosan gels having hydrophobic groups. *Journal of Applied Polymer Science*, 36 (6), 1443-1451.
- Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C. and Pan, C.L., 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science*, 68, 170-177.
- Tsao, C.T., Chang, C.H., Lin, Y.Y., Wu, M.F., Wang, J.L., Han, J.L. and Hsieh, K.H., 2010. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel. *Carbohydrate Research*, 345, 1774-1780.
- Turhan, O., 2008. Bazı Organik Reaksiyonların ve Metal Ligant Etkileşmelerinin FT-IR ile Eşzamanlı İncelenmesi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Türkşeker, 2011. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş., Sektör Raporu, Ankara, 1-62.
- Uçan, F. ve Mercimek, A., 2013. Gıda Endüstrisinde Kitosanın Önemi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknolojisi Dergisi*, 1 (2), 79-85.
- Ueno, H., Yamada, H., Tanaka, I., Kaba, N., Matsuura, M., Okumura, M., Kadosawa, T. and Fujinaga, T., 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20, 1407-1414.
- Ulubaş, H., 1991. Şeker Pancarı Melasının Yükseltgenerek Diğer Kimyasal Maddelere Dönüştürülmesi. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Unver, Y., 2010. Koç Boynuz Peptonu ve Melas Kullanılarak *Rhodotorula Glutinis* İzolatı Tarafından Karotenoid Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Vakili, M., Rafatullah, M., Salamatina, B., Abdullah, Z.A., Ibrahim, M.H., Tan, K.B., Gholami, Z. and Amouzgar, P., 2014. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 113, 155-130.

- Vinche, M.H., Asachi, R., Zamani, A. and Karimi, K., 2012. Ethanol and chitosan production from wheat hydrolysate by *Mucor hiemalis*. *Chemical Technology and Biotechnology*, 88 (2), 255-260.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A. and Tegou, E., 2006. Application of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573-574, 459-465.
- Von Arx, J.A., 1981. Key to the orders of fungi, the genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, Hirschberg, Germany.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H. and van der Werf, M., 2003. Cross-linked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24, 3213-3220.
- Wang, X., Yan, Y., Lin, F., Xiong, Z., Wu, R., Zhang, R. and Lu, Q., 2005. Preparation and characterization of a collagen/chitosan/heparin matrix for an implantable bioartificial liver. *Journal of Biomaterials Science and Polymers*, 16, 1063-1080.
- Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M., Keddig, N., Matzke, M., Tartsch, B., Grunwald, I., Kubel, C., Jastorff, B. and Thoming, J., 2009. Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chemistry*, 11, 498-509.
- White, S.A., Farina, P.R. and Fultong, L., 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 323-28.
- Xianfang, Z. and Eli, R., 1996. Supported chitosan-dye affinity membrane and their protein adsorption. *Journal of Membrane Science*, 117, 271-278.
- Xie, H., 2011. Preparation of Low Molecular Weight Chitosan by Complex Enzymes Hydrolysis. *International Journal of Chemistry*, 3, 180-186.
- Yang, S., Hai, F.I., Nghiem, L.D., Nguyen, L.N., Roddick, F. and Price, W.E., 2013. Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 483-490.
- Yateem, A., Balba, M.T, Al-Shayji, Y. and Al-Awadhi, N., 2010. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria from Oil-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 11, 41-55.
- Yetkin, Z., 2001. Kronik periodontitisli hastalarda diştaşı temizliği ve kök düzeltmesi ile %1'lik kitosan jel, diştaşı temizliği ve kök düzeltmesi ile %15 metronidazol içeren %1'lik kitosan jel ve yalnız diştaşı temizliği ve kök düzeltmesi işlemlerinin klinik parametreler üzerindeki etkisinin karşılaştırmalı incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yıldırım, S., 2011. rn tasarımı geliştirilmesi: Taguchi Tasarımı. Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yoshihide, K., Hiroyuki, Y., Satoru, H. and Hiroaki, T., 1997. Breakthrough curve for adsorption of mercury (II) on polyaminated highly porous chitosan beads. *Water Science Technology*, 35, 97-105.
- Yu, S., Hunag, D., Wen, J., Li, S., Chen, Y. and Jia, X., 2012. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Biorsource Technology*, 114, 610-615.
- Yuan, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, X. and Gu, X., 2004. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*, 25, 4273-4278.

- Yuichi, O., Masahiro, S., Hironao, K. and Tatsuro, O., 1994. Release behaviour of 5-fluoro uracil from chitosan nanospheres immobilising 5-fluoro uracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity. *Journal of Macromolecules Science, Pure and Applied Chemistry Part A*, 31 (5), 629-642.
- Zamani, A., Edebo, L., Sjöström, B. and Taherzadeh, M.J., 2007. Extraction and Precipitation of Chitosan from Cell Wall of Zygomycetes Fungi by Dilute Sulfuric Acid. *Biomacromolecules*, 8, 3786-3790.
- Zamani, A., Edebo, L., Niklasson, C and Taherzadeh, M.J., 2010. Temperature Shifts for Extraction and Purification of Zygomycetes Chitosan with Dilute Sulfuric Acid. *International Journal of Molecular Science*, 11, 2976-2987.
- Zhang, Y., Muyrers, J.P.P., Testa, G. and Stewart, A.F., 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 18, 1314-1317.
- Zhang, H., Sang, Q. and Zhang, W., 2012. Statistical optimization of cellulases production by *Aspergillus niger* HQ-1 in solid-state fermentation and partial enzymatic characterization of cellulases on hydrolyzing chitosan. *Annal of Microbiology*, 62, 629-645.
- Zhang, H., Yang, S., Fang, J., Deng, Y., Wang, D. and Zhao, Y., 2014. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 101, 57-67.
- Zheng, X.F. and Lian, Q., 2014. Synthesis and Evaluation of CoFe₂O₄-Chitosan Nanoparticles in Enhanced Oil Recovery. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36 (2), 245-251.
- Zhizhuang, X., Grosse, S., Bergeron, H. and Lau, P.C.K., 2014. Cloning and characterization of the first GH10 and GH11 xylanases from *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8211-8222.
- Zhu, H.Y., Tian, Y., Hou, Y.H. and Wang, T.H., 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Molecular Biology Reports*, 36, 2169-2174.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden, 2006 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2007 yılından beri Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce ve orta derecede Arapça bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.