T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA DENİZİ VE İZMİT KÖRFEZİ'NDEN ALINAN İZOLAT ÖRNEKLERİYLE KARİDES KABUĞU ATIKLARINDAN ENZİMATİK KİTOSAN ELDESİ VE HİDROJEL OLARAK KULLANIMI

ÇİSEL DİKKULAK BAYRAM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA DENİZİ VE İZMİT KÖRFEZİ'NDEN ALINAN İZOLAT ÖRNEKLERİYLE KARİDES KABUĞU ATIKLARINDAN ENZİMATİK KİTOSAN ELDESİ VE HİDROJEL OLARAK KULLANIMI

ÇİSEL DİKKULAK BAYRAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ YOSUN MATER

GEBZE

2022

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

ENZYMATIC CHITOSAN PRODUCTION FROM SHRIMP SHELLS WASTES WITH ISOLATE SAMPLES FROM THE SEA OF MARMARA AND IZMIT GULF AND ITS USE AS HYDROGEL.

ÇİSEL DİKKULAK BAYRAM

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR. YOSUN MATER

GEBZE
2022

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 11/ 09 /2020 tarih ve 2020/ 43 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/ 07/ 2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Çisel Dikkulak Bayram'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üyesi Yosun Mater

ÜYE : Prof. Dr. Nihal Bektaş

ÜYE : Doç. Dr. Günnur Demircan

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
…..…/…..…/..…..… tarih ve ……/……... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Kitin doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir ve kabuklu deniz canlılarının ve böceklerin kabuklarında, mantarlar, bazı alglerin çeperlerinde bulunur. Kitinin alkali deasetilasyonundan ise kitosan oluşur. Kitin ve kitosan arasındaki temel farklardan biri çözünürlüğüdür. Kitosan suda çözünmezken sulu asitlerin çoğunda çözünür. Kitin ise çok daha az sayıda çözücüde çözünür [Wang, 2020]. Kitinin sert, elastik olmayan ve çözünmesi zor yapısı nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Kitosanın ise çözünürlüğünün yanı sıra biyolojik olarak toksik olmaması, biyouyumluluğu ve biyoaktivitesi gibi özelliklerinden dolayı gün geçtikçe daha önemli bir doğal polimer haline gelmektedir.

Kitinden kitosan eldesinde kullanılan ilk yöntem olan kimyasal yöntemde güçlü asit ve bazların kullanılması hem çevre için hem de üretilen kitosanın saflığı açısından sorun teşkil etmektedir. İkinci yöntemde ise bakterilerin ürettiği kitin deasetilaz enzimi ile canlıların kabuklarında bulunan kitini kitosana dönüştürmesini sağlayıp kitosanı ortamdan izole etmektir. Böylece daha saf bir kitosan elde ederken çevreye zarar vermemek mümkündür. Bu çalışamada İzmit Körfezi ve Marmara Denizi'nden izole edilmiş deniz bakterileri kullanılarak enzimatik yöntemle kitosan üretimi yapılmıştır. Bakterilerin besi yerlerine kitin kaynağı olarak karides kabukları eklenmiştir. Ardından kitin deasetilaz enzimi üretim yetenekleri test edilerek büyük miktarda üretime geçilmiştir.

Kitosan kimyasal özellikleri nedeniyle hidrojel oluşturmak için çok uygun bir moleküldür. Jelleşme herhangi bir toksik molekülü gerektirmediğinden, klinik uygulamalar için güvenlidir [Bhattarai vd., 2010]. Bu çalışmanın ikinci kısmında enzimatik üretim sonucu elde edilen kitosandan hidrojel yapılmıştır. Hidrojel yapımında 3 farklı metottan yararlanılmış ve her metotta ticari kitosan ile karşılaştırma yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitin, Kitosan, Deniz mikroorganizmaları, Karides kabuğu, Atık geri dönüşümü, Hidrojel.

SUMMARY

Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature and is found in the shells of shellfish and insects, fungi and algae. Chitosan is formed from the alkaline deacetylation of chitin. One of the main differences between chitin and chitosan is its solubility. Its use is limited due to the hard, inelastic and difficult-to-dissolve nature of the chitin. Chitosan is becoming an important natural polymer due to its solubility, non-toxicity, biocompatibility and bioactivity.

In the chemical method, which is the first method used to obtain chitosan from chitin, causes a problem both for the environment and for purity of the produced chitosan. In the second method, the chitin deacetylase enzyme produced by the bacteria converts the chitin found in the shells into chitosan. In this study, chitosan production was carried out by enzymatic method using marine bacteria isolated from the Gulf of Izmit and the Sea of Marmara. Shrimp shells were added to the broth of bacteria as a source of chitin. Their chitin deacetylase enzyme activities were tested.

Chitosan is a very suitable molecule for forming hydrogels due to its chemical properties. Since gelation doesn't require any toxic molecules, it is safe for clinical applications [Bhattarai et al., 2010]. In the second part of this study, hydrogel was made from chitosan obtained as a result of enzymatic production. Three different methods were used in hydrogel production and comparisons were made with commercial chitosan in each method.

Keywords: Chitin, Chitosan, Marine microorganisms, Shrimp shell, Waste recycling, Hydrogel.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başından sonuna kadar bizden desteğini esirgemeyen gerek fikren gerek fiziksel olarak her zaman yardımcı olan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Yosun MATER'e sevgi ve saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı benimle birlikte yürüten, her zaman ve her konuda desteğini ve sevgisini gösteren, sevgili eşim Ertuğrul BAYRAM'a yıllardır benimle birlikte verdiği emek ve paylaştığımız bir hayat için teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Küçüklüğümden beri hayallerimi gerçekleştirmeme olanak sağlayan biricik aileme ve her fikrimi dinleyip, bana yol gösteren, çocukluğumdan beri yanımda olan sevgili dostum Büşra CENGİZ'e teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin amacı	2
2. KİTİN	4
2.1. Kitin Kaynakları	5
3. KİTOSAN	7
4. KABUK GERİ DÖNÜŞÜMÜ	9
5. KİTİNDEN KİTOSAN ELDESİ YÖNTEMLERİ	10
5.1. Kimyasal Metot	10
5.2. Enzimatik Metot	10
6. KİTİN DEASETİLAZ	12
7. HİDROJEL	13
8. KİTOSAN KULLANIM ALANLARI	15
8.1 Antibakteriyal Kullanımı	15
8.2 Yara İyileştirici	15
8.3 Gen Transferi	15
8.4 İlaç İletimi	16
8.5 Gıda Paketleme	17
8.6 Suyun Ağır Metallerden Arındırılması	17
8.7 Doku Mühendisliği	18
9. MATERYAL	19

9.1. Kimyasal Malzemeler 19
9.2. Cihazlar 19
9.3 Sarf Malzemeleri 19
10. YÖNTEM 20
10.1. Bakterilerin Seçilmesi 20
10.2. Bakterilerin Büyütülmesi 20
10.3. Karides Kabuklarının Hazırlanması 22
10.4. Karides Kabuğu İçeren Besi Yerine Ekim 22
10.5. Kitin Deasetilaz Varlığının Belirlenmesi 23
10.6. Kitosan İzolasyonu 26
10.7. Yüksek Miktarda Üretim 27
10.8. Hidrojel Oluşturulması 29
10.8.1. PEG/Kitosan Çözeltisi ile Hidrojel Oluşturulması 29
10.8.2. Soğutma Metotu ile Hidrojel Oluşturulması 30
10.8.3. PEG/ Kitosan'ın Farklı Derişimleriyle Hidrojel Oluşturulması 30
11.SONUÇLAR 31
11.1. Kitosanın Kantitatif Tayini: FT-IR analizi 31
11.2. Kitosan Kalitatif Tayini 32
11.3. Kitosan İzolasyonu Sonrası Tartım Sonuçları 33
11.4. Büyük Ölçekli Üretim Sonuçları 34
11.5. Hidrojel Sonuçları 36
11.5.1. PEG/Kitosan Çözeltisi ile Oluşturulan Hidrojel 36
11.5.2. Soğutma Metotu ile Hidrojel Oluşturulması 38
11.5.3. PEG/Kitosan'ın Farklı Derişimleriyle Hidrojel Oluşturulması 39
12. TARTIŞMA 43

KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 55
EKLER 56

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklamalar
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ºC	: Derece santigrat
Ca^{+2}	: Kalsiyum iyonu
$CaCO_3$	: Kalsiyum Karbonat
CDA	: Kitin Deasetilaz
CH_3COOH	: Asetik asit
cm	: Santimetre
COL	: Kolajen
CS	: Kitosan
DA	: Degree of Acetylation (Asetilasyon derecesi)
dH_2O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FTIR	: Fouirer Transform Infrared Spectrophotometer
GC	: Gas Chromotography
H_2SO_4	: Sülfirik asit
HCl	: Hidroklorik asit
HNO_3	: Nitrik asit
HPCE	: High Performance Capillary Electrophoresis
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
İK	: İzmit Körfezi
kDa	: Kilodalton
Mg^{+2}	: Magnezyum iyonu
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MR	: Metil Kırmızısı
N	: Normal

NAG	: N-asetil glikozamin
NaOH	: Sodyum hidroksit
NB	: Nutrient Broth
NEXAFS	: Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure
NH_2	: Azanide
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
OH	: Hidroksit
PEG	: Polietilen glikol
PVA	: Polivinil alkol
rpm	: Revolutions Per Minute
SEM	: Scanning Electron Microscopy
TLC	: Thin Layer Chromotography
TSB	: Triptik Soy Broth
TSI Agar	: Üç Şekerli Demirli Besi yeri
UDP	: Uridin difosfat
VP	: Voges Proskauer
WAXS	: Wide-angle X-ray scattering
XRD	: X-ray crystallography

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
3.1:	Kitin ve kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi [Goy et al., 2009].	8
5.1:	Kitin deasetilasyonunun reaksiyon mekanizmasının şematik gösterimi [Bastiaens et al., 2019].	11
10.1:	Karides kabuklarının etüv içinde kurutulması.	22
10.2:	Nutrient Broth ve karides kabuğu içeren besiyerinde büyütülmüş bakterilerin kontrolle karşılaştırıldığında p-nitro asetanilid emdilirilmiş Whatmann kağıtları eklendikten sonra kağıtların renk değişimleri.	24
10.3:	Nutrient agar ve karides kabuğu içeren besiyerine ekilmiş bakterilerin p-nitroasetanilid emdilirilmiş Whatmann kağıtları eklendikten sonra besiyerlerindeki renk değişimlerinin kontrolle karşılaştırılması.	25
10.4:	Erlenlere alınmış İK3-235 kodlu bakterinin NB ve Kitosan içeren besiyerinde büyümesi ve kontrolle karşılaştırılması sonucunda besiyerinin renk değişimi bakteri miktarının yoğunluğunu göstermektedir.	28
10.5:	Cam Petri disklerinde kurutulmuş İK3-235'ten elde edilen kitosan beyaz toz halinde görülmektedir.	29
11.1:	Şekilde 650-4000 arası spektrumda seçilen bakteri örneği olan İK3-235'in ve ticari kitosanın FT-IR grafikleri gösterilmektedir. Dalgalanmalar oldukça benzerdir.	31
11.2:	Petri kabında kurutulmuş çökelti üzerine 2-3 damla iyot/potasyum iyodür çözeltisi ilave edildikten ve karışım 2-3 damla %1 H_2SO_4'le asitlştirildikten sonra renk değişimi görülmektedir.	32

11.3:	Kontrol olarak belirlenen ticari kitosanın parçacık boyutu, miktarı ve saflığı daha fazla olduğu için daha yoğun olarak gözükmektedir. Taneciklerin renk değişimi aynı olduğu için kitosan varlığının kalitatif tayininin yapılmıştır.	33
11.4:	Üstteki fotoğraflada A-1 ve B-1'de çözünmeden önceki kitosanlar, alttaki fotoğrafta A-2 ve B-2'de çözüldükten sonra kitosanlar görülmektedir.	35
11.5:	PEG/Kitosan çözeltisiyle hazırlanmış hidrojellerin ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosanın karşılaştırılması.	36
11.6:	PEG 20000 ve kitosanla hazırlanan hidrojel SEM fotoğrafları. A- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, B- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma, C- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, D- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma.	37
11.7:	Ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosanın -80 'de bekletildikten sonra.	37
11.8:	PVA ve kitosanla hazırlanan hidrojel SEM fotoğrafları. M- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, N- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma, P- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, R- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma.	38
11.9:	Ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosan ve PEG'den hazırlanan hidrojellerin kuruduktan sonra Petri kaplarındaki görüntüsü.	40

11.10: Ticari kitosan ve PEG'in 2:1 ve 4:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen hidrojelin 1000X ve 5000X'te çekilen SEM görüntülerinin karşılaştırılması. 41

11.11: İK3-235'ten elde edilen kitosan ve PEG'in 2:1 ve 4:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen hidrojelin 1000X ve 5000X'te çekilen SEM görüntülerinin karşılaştırılması. 42

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
2.1:	Kitin kaynağı olarak kullanılan organizmalar, biyokütlenin yeri ve kitin yüzdesi [Bastiaens et al., 2019].	5
10.1:	TSB'ye ekim sonrasında üreme sonuçları (+: üreme var, - üreme yok, NA: çalışmadan çıkarılanlar)	21
10.2:	Üreme miktarlarına göre + üreme, ++ çok üreme,- üreme yok şeklinde sınıflandırılmıştır.	22
10.3:	Renk değişimine göre "+ renk değişimi var (açık sarı), ++ renk değişimi var (koyu sarı), - renk değişimi yok" şeklinde sınıflandırılmıştır.	26
11.1:	Kitosan izolasyonu sonrası tartım sonuçları.	34

1. GİRİŞ

Glikobiyoloji, son yıllarda yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlarla dikkat çekmeye başlayan bir alan olmuştur. Temelde sakkaritlerin incelenmesi, biyokimyasal, fizyolojik ve biyoteknolojik olarak değerlendirilmesini içerir. Glikobiyoloji dalındaki çalışmalar arttıkça poliksakkaritlerin önemi anlaşılmış ve kullanım alanları yaygınlaşmaya başlamıştır. Doğal polimerler; doğada bolca bulunmasının haricinde, biyobozunurluk, biyouyumluluk, yenilenebilirlik ve sürdürülebilirlik gibi çevreci özelliklerinden dolayı kompozitlerin hazırlanmasında yapay polimerlerden çok daha çekicidir [Lu et al. 2013].

Doğada en çok bulunan polisakkarit selülozdur. Hemen ardından ise kitin gelmektedir. Kitin bitişik polimer zincirlerindeki asetamid grupları arasında oluşan hidrojen bağları ile sert, elastik olmayan ve doğada kendi başına çözünemeyen bir karbonhidrattır. Bu nedenle kullanımı oldukça sınırlıdır.

Kitinin asetilasyon derecesine (DA: degree of acetylation) bağlı olarak çeşitli oligosakkaritler oluşmaktadır. Deasetilasyon seviyesi %50'nin üstünde kitosan olarak kabul edilir. Kitosanın (CS) kitinin deasetile edilerek elde edilmesinden kaynaklı olarak aktif bağ yapıcı özelliği vardır.

CS, fiziksel ve mekanik özelliklerinin yanı sıra biyolojik olarak toksik olmaması, parçalanabilirlik, biyouyumluluk ve biyoaktivite gibi benzersiz özelliklerinden dolayı giderek daha önemli bir doğal polimer haline gelmektedir. Bu nedenle CS kullanımının hem çevresel hem de endüstriyel öneme sahiptir [Nie et al., 2016].

Kitosan eldesi bir dizi ayrı çalışma gerektirmektedir. Bu aşamada çeşitli kitin kaynaklarından (mantarlar, deniz kabukluları ve böceklerden) elde edilen kitinli yapılar belirli süreçlerden geçirilerek parçalanır ve oluşan kütleye kimyasal veya enzimatik müdahale gerekir. Kitine kimyasal olarak yüksek alkali veya asidik ortamda, yüksek sıcaklıkla muamele sonucunda sırasıyla demineralizasyon, deproteinizasyon ve deasetilasyon aşaması uygulanır ki bu durumda kullanılan bazik veya asidik malzeme, sonuçta oluşan kitosan üzerinde kalıntılar bırakır. Bu kalıntılar bazen toksik etki yaratabilir ve çoğu zaman medikal alanda kullanımını engeller.

Doğada mevcut kitini parçalamak için denizlerde ve karalarda çeşitli enzim yolaklarına sahip bakteri, mantar ve mayalar bulunmaktadır [Islam et al., 2020]. Kitinin sindirilmesi için kitin deasetilaz ve kitinaz enzimleri hücre-içi ve hücre-dışı olarak bu canlılar tarafından üretilmektedir.

Kitosanın birçok kullanım alanı vardır. Farmakolojik kullanımdan su arıtımına veya tarıma kadar çeşitlendirilebilir. Bunlardan biri de hidrojel oluşturulmasıdır.

Hidrojellerin hidrofilik yapıları onları üç boyutlu ağlarında büyük miktarda su tutabilmelerini sağlar. Doğal hidrojeller, yüksek su emme kapasiteleri, uzun ömürlü olmaları ve çeşitli kaynaklardan elde edilebilmeleri nedeniyle sentetik ürünlere tercih edilmeye başlanmıştır [Ahmed, 2015]. Kitosan; biyouyumluluk, biyobozunurluk, immün yanıt oluşturmaması, doğal antibakteriyel aktivite ve işlenebilirlik özellikleri nedeniyle hidrojel oluşturulmaya oldukça uygundur.

1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı

Endüstriyel ve bilimsel gelişmeler sayesinde dünya çapında geri dönüşümü yapılabilen biyomalzemeler ve bunların geri dönüşümü üzerine çalışmalar yaygınlaşmıştır. Bu çalışmalarda ilgi çeken bir kaynak olarak polisakkaritler son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Doğada bolca bulunan kitin ise dikkat çekici özelliklere sahiptir. Bununla beraber kitinin kullanımındaki dezavantajları minimuma indirmek için kitin türevlerinin kullanımı araştırılmaktadır. Bunlardan en ilgi çekeni ise kitosandır.

Kitosan kullanımı, çevre için oldukça fayda sağlarken hazırlık aşamasında tercih edilen kimyasal metotlar bazı dezavantajlara sahiptir. Yüksek sıcaklıklarda asit ve baz uygulamaları nedeniyle kitosandan ayrıştırılamayan kalıntılar kitosanın biyomalzeme olarak kullanımını kısıtlar. Doğanın içerisinde mevcut canlı kaynaklara yönelerek ve bu canlı kaynakların sahip olduğu metabolik aktiviteler kullanılarak bu dezavantajları ortadan kaldırmak mümkündür. Enzimatik metot sayesinde kitinin doğada olduğu gibi sindirilmesi ve kitosan elde edilmesi ile bu kalıntılardan kurtulmak mümkündür.

Biz de bu çalışmamızda enzimatik metot kullanarak medikal alanda kullanılabilirliği olan kitosan elde edilmesi amaçlanmıştır. Enzimatik metot için

faydalanacağımız bakteriler ise daha önce İzmit Körfezi ve Marmara Denizi'nden izole edilmiş deniz bakterileri koleksiyonumuzda yer alan izolatlar [Gül Şeker, 2009; Gül Şeker ve Mater, 2009; Mater ve Taşdan, 2018] olacaktır. Bu sayede yerel türlerin kitosan üretme yeteneği test edilmiş ve asit-baz uygulamasından dolayı hem kitosanda oluşacak kalıntı miktarı hem de az kimyasal kullanımından dolayı çevreye verilecek zarar en aza indirgenmiştir. Bununla birlikte kitin kaynağı olarak karides kabukları tercih edildiği için organik atık geri dönüşümü sağlanmıştır. Ayrıca karides kabuğu kullanımı maliyeti azaltmış ve biyomalzemelerin endüstriyel kullanımını daha avantajlı hale getirmiştir.

Son olarak da üretilen kitosandan hidrojel elde ederek kullanımı ticari kitosan ile karşılaştırılmıştır. Hidrojel elde edilirken 3 farklı yöntem denendiği için en hızlı ve kullanılabilir yöntem belirlenmiş ve gelecekte kullanımının yaygınlaşması için yol gösterici veriler elde edilmiştir.

2. KİTİN

Fransız doğa tarihi profesörü Henri Braconnot, 1811'de kitini keşfetti. 1823'te Odier kitinin böceklerde ve bitkilerde de bulunduğunu keşfetmiştir [Khoushab, 2010].

Kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi-β-d-glukoz (NAG) monomerleri ile β (1,4) bağları ile bağlanır. Kitin mantarların ve alglerin hücre duvarlarında, böceklerin kabuklarında, deniz kabuklu canlılarının kabuklarında bulunur. Kabuklar üç temel elementten oluşur: (1) Kitin, (2) mineraller ve (3) proteinler. Kitin bir iskelet görevi görürken, mineraller (inorganik karbonat tuzları) kabuklara gerekli gücü verir. Proteinler kabukları canlı bir doku haline getirir ve kitin-protein kompleksleri ise fibröz bir yapıya sahip olmasını sağlar [Kaur and Dhillon, 2013].

Kitin doğada 3 farklı formda bulunur. En çok bulunan form, hemen hemen tüm kabuklular, böcekler, mantarlar ve maya hücre duvarlarında bulunan α-kitindir [Garvasi et al., 1988]. α-Chitin, β-chitin'e göre daha stabildir. γ-chitin ise α ve β'nın karışımıdır.

Kitin birçok karmaşık yapının bir parçası olarak bulunur. Böcek dış iskeletleri büyük ölçüde kitin-protein komplekslerinden oluşur. Kabuklu canlıların kabukları genellikle protein ve büyük oranlarda kalsiyum karbonat içerir [Foster and Webber, 1961].

Saf kitin beyaz veya sarımsı, kokusuz ve tatsızdır. Kitin, gıda, ilaç veya malzeme endüstrilerinde kullanım avantajı sağlayan biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerine sahiptir. Kitinin doğada bulunduğu bazı canlılar ve vücut oranına göre miktarı Tablo 2.1' de verilmiştir [Bastiaens et al., 2019].

Doğada kitin genelde saf halde bulunmaz, nanoorganize kitin proteinleri, kitin pigmentleri veya kitin-mineral kompozit biyomalzemeler olarak görülür. Kitin, uzun zamandır araştırılan bir polimer olmasına karşın yapısal karmaşıklığı yüzünden birçok hassas yöntem (NEXAFS, FTIR, Raman, NMR, kolorimetri, TLC, GC, HPLC, HPCE, XRD, WAXS) geliştirilmiş ve tıp ve biyoteknoloji uygulamaları için kapsamlı araştırmalar devam etmektedir [Tsurkan et al., 2021].

Bazı böcek ve mantar türlerinde kitini şeker substratları olarak glikoz ve glikozun depolanmasını sağlayan glikojen veya trehalozu kullanan bir biyosentetik

yöntem vardır. Önce N-asetilglukozamin ve UDP-N-asetilglukozamin oluşumu, sonrasında ise UDP-N-asetilglukozamin kullanılarak kitin polimerizasyonundan oluşur. N-asetilglukozamin ve UDP-N-asetilglukozamin oluşumu sitoplazmada gerçekleşirken kitin sentezi ise plazma zarında gerçekleşir. Bu yolakta görev alan enzimler glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (EC 2.6.1.16), UDP-N acetylglucosamine pirofosforilaz (EC 2.7.7.23) ve kitin sentaz (EC 2.4.1.16)'dır. Kitin üretim hızı oldukça yavaştır [Merzendorfer, 2011].

Birçok mantar türü, büyüme evresindeyken veya çevresel strese yanıt olarak hücre duvarında yüksek oranda korunmuş bütünleyici zar proteinleri olan kitin sentaz enzimleri bulunur. Bu enzimlerin çoklu bulunması sayesinde farklı bölgelerde kitin üretebilir [Latgé, 2007].

Kabuklu canlılar büyürken, kitinli yapıların bozunması ve sentezi ile gerçekleştirildiği bir döngüye sahiptir. Kitin sentezi, kitinazların (E.C. 3.2.1.14) gerçekleştirdiği bozunma işlemiyle ilerler. Bu işlemde kitinazlar, kitinin polisakkarit zincirinin ortasındaki glikozidik bağı kopararak N-asetilglukozamin oligomerlerini serbest bırakır [Rocha et al., 2012].

Kitin asidik müdahale veya kitin deasetilaz enzimi ile muamele sonrasında deasetile olur. Deasetilasyondan sonra üretilen polisakkarit kitosan olarak adlandırılır ve tamamen modifiye edilmiş polimerik bir formudur. *Absidia sp., Mucor sp., Rhizopus sp., Rhizomucor sp.* ve *Gongronella sp.* gibi *Zygomycetes sp.* hücre duvarlarının %20 ila %50'si kitin ve kitosandan meydana gelmektedir [Thomas et al.,2020].

2.1. Kitin Kaynakları

Tablo 2.1: Kitin kaynağı olarak kullanılan organizmalar, biyokütlenin yeri ve kitin yüzdesi.

Tür	**Biyokütle türü**	**Kuru ağırlıktaki kitin %'si**	**KAYNAK**
Kral yengeç *(Paralithodes)*	Tüm vücut	35	*Khor ve Wan, 2014*

Tablo 2.1: Devam.

Cancer Crab *(Cancer pagurus)*	Kutikula	72.1	*Khor ve Wan, 2014*
Karides *(Palaemon fabricius)*	Kabuk	22	*Tronsmo vd., 1993*
Pembe Karides *(Penaeus duorarum)*	Kabuk	23.72	*Plassard vd., 1983*
Dev Kaplan Karidesi *(Penaeus monodon)*	Kabuk	10	*Park vd., 2010*
Istakoz *(Humarus Volgaris)*	Kabuk	17	*Tronsmo vd., 1993*
Bal arısı *(Apis mellifera)*	Dış iskelet	2.5	*Park vd., 2010*
Kalamar *(Cephalopoda sp.)*	Pen	20-40	*Hajji vd., 2014*
Mürekkep balığı *(Sepia spp.)*	Kabuk	7.4	*Laval vd., 2007*
Kültür mantarı	Hücre duvarı	43.8	*Renault vd., 2009*
Mucor rouxii	Hücre Duvarı	50.1	*Nadarajah vd., 2006*
Rhizopus oryzae	Tüm kütle	14.6	*El Ghaouth vd., 1992*

3. KİTOSAN

Kitinin alkali deasetilasyonu kitosanı oluşturur. Kitosan (CS), β-(1→4)-2-asetamido-D-glukoz ve β-(1→4)-2-amino-D-glukoz birimlerinden oluşan katyonik bir polisakkarittir. Bir glukozaminoglikandır ve glukozamin ve N-asetilglukozamin olmak üzere iki yaygın şekerden oluşur [Bakshi, 2020]. Kitin en az %50 deasetilasyon seviyesinde kitosan olarak adlandırılabileceği kabul edilmektedir [Thomas et al., 2013]. Şekil 3.1'de gösterilmektedir [Goy et al., 2009].

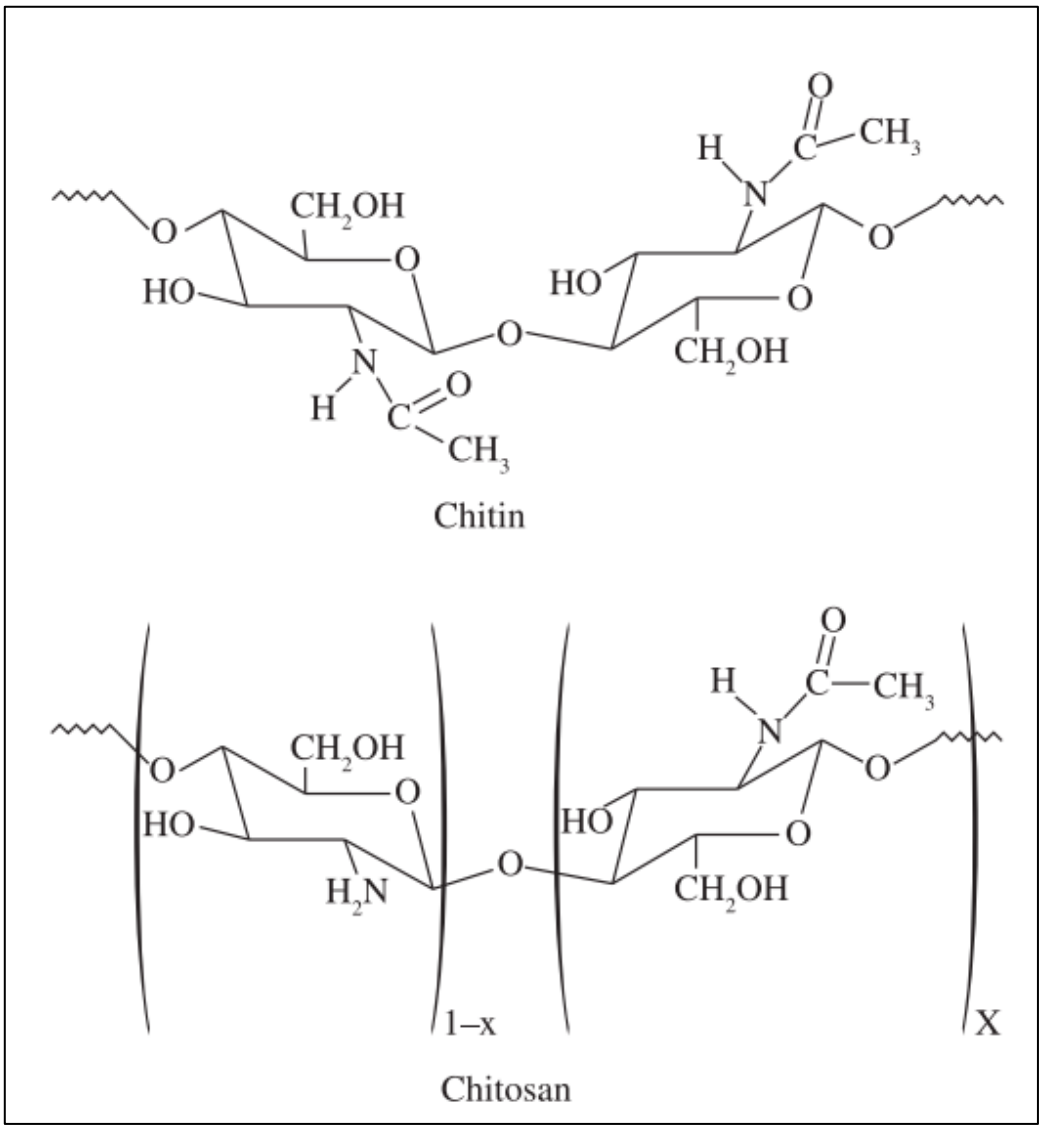
CS, kristal formundayken pH 7'nin üzerindeki sulu çözeltide çözünmez. Ancak seyreltik asitlerde (pH <6) glukozamin üzerindeki protonlanmış serbest amino grupları sayesinde çözünür [Madihally ve Matthew, 1999]. D-glukozamin tekrar ünitesinin C-2 pozisyonunda $–NH_2$ grubunun protonlanmasıyla çözünme gerçekleşir.

Kitosanın deasetilasyonu derecesi (DA), yük yoğunluğu ve çözünürlük açısından çok önemlidir. Kitosan zincirindeki pozitif yüklerin sayısı ile çözünürlüğü arasında paralellik vardır. Kitosanın sahip olduğu iyonik kuvvet ve zincirdeki asetil gruplarının dağılımının da çözünürlük üzerinde etkisi bulunmaktadır. Kitosan zincirindeki amino grubunun kimyasal modifikasyonu kolaylaştırmasından ve moleküle bazı spesifik işlevler kazandırmasından dolayı, kitinin uygulama açısından en önemli türevidir [Rinaudo, 2006].

Kitosanın, kitinin deasetile edilerek elde edilmesinden dolayı aktif bağ yapıcı özelliğe sahiptir. Bu sebeple birçok çalışmada; metaller veya organik ve inorganik bileşikler kullanarak modifikasyonlar denenmiş ve çeşitli alanlardaki uygulamalara konu olmuştur. Örneğin; kıkırdak dokusu onarımı veya oluşturma için hyalüronik asit, kondiritin sülfat [Denizuere et al., 1998], kemik onarımı için çeşitli inorganikler [Tao et al., 2020], farklı dokulara hitap etmek ve kitosanın esneklik, tutuculuk, hidrofiliklik gibi özelliklerini değiştirmek için pektin [Tian et al., 2020], aljinat [Venkatesan et al., 2014], poli-lizin [Niepel et al., 2019] gibi farklı moleküller kullanılmıştır [Nie et al., 2016].

Kitinden kitosan eldesinde deasetilasyonun kontrol edilmesi viskozite, çözünürlük ve biyolojik aktivite gibi faydalı özelliklerinin ayarlanabilmesine olanak sağlar. Medikal uygulamalarda kitosanın fonksiyonelliğini kaybetmeden suda veya

organik çözücülerde çözünebilmesi gerekmektedir. Yapısı ve işlevi ile ilgili olduğu için kitosanın çözünürlüğünü ayarlayabilmek çok önemlidir [Kardas et al., 2012]



Şekil 3.1. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi.

4. KABUK GERİ DÖNÜŞÜMÜ

Plastik ürünlerin kullanımını azaltmak için biyolojik olarak çözünebilen maddelerin kullanımı tercih edilebilir. Plastik kullanımına atık yönetimi yöntemleri ve biyobazlı biyobozunur maddelerle, petrokimyasal plastiklere sağlam bir alternatif oluşturulabilir. Kitosan ise plastik yerine kullanılabilecek fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanında biyobozunur olması ve atıklardan elde edilebiliyor olması ile değerlendirilmesi gereken büyük potansiyellerden biri olarak görülebilir.

Kitin, ticari olarak Hindistan, Japonya, Polonya, Norveç ve Avustralya'da üretilen bir malzemedir. Doğada yılda 1010 ila 1012 tona kadar kitin üretilmektedir. 2015 yılında dünya yumuşakça ve kabuklu hayvan üretimi 24 milyon tondur. Kabuklu balık işleme endüstrisi yaklaşık 8,5 milyon ton atık üretir ve karides işleme yaklaşık 100 bin ton atık oluşturur. Bu nedenle kitin ulaşılabilirliği oldukça kolay bir kaynaktır [Bakshi et al., 2020].

Kitosan, yıllık 10 gigatondan (1×10^9) fazla ve selülozdan sonra en bol bulunan ikinci doğal biyopolimerdir [Harish Prashanth and Tharanathan, 2007]. Dünya’da her yıl deniz habitatlarından 13.000.000 tondan fazla kabuklu hayvan avlanmaktadır. Bu ağırlığın büyük çoğunluğunu oluşturan kabukların tamamı atık olarak çevreyi kirletmektedir. Bu atıklar kitin ve kitosana dönüştürüldüğü zaman benzersiz özelliklere sahip olup endüstride kullanım için çok fazla imkan sağlamaktadır.

Kitosan üretimi için iki farklı yöntem kullanılır: Kimyasal ve enzimatik yöntem. İki yöntemde de deasetile etmek temel amaçtır. Kimyasal yöntemde güçlü asit ve baz uygulaması yapılır. Bu kitosan üretim yöntemi, milyonlarca galon bazik ve asidik kalıntı üretir. Ayrıca herhangi bir işleme tabi tutulmadan çevreye boşaltıldığı için çevre kirliliğine sebep olur [Kumar and Malik, 2020]. Ayrıca çoğu zaman elde edilen kitosanın üzerinde asit ve baz kalıntıları kalır. Bu da medikal işlemlerde kullanımını kısıtlar. Bu sebeplerden mikroorganizmaların kitosan üretiminde yeni bir kaynak olabileceği düşünülmüştür. Buradan da ikinci yöntem olan Enzimatik yöntem ortaya çıkmıştır. Enzimatik yöntemde, mikroorganizmaların ürettiği kitin deasetilaz enzimi ile kitinin kitosana dönüştürülmesi sağlanır.

5. KİTİNDEN KİTOSAN ELDESİ YÖNTEMLERİ

5.1. Kimyasal Metot

Kabuklu canlılardan kitin elde etmek için metot temelde birkaç basamakta oluşur:

- Kabukların hazırlanması: dH_2O ile yıkanır.
- Demineralizasyon: Minerallerin uzaklaştırılması işlemidir. Kabuktaki $CaCO_3$ 2-3 saat boyunca HCl ile reaksiyona sokulur. Bu işlem için %10 w/v'ye kadar konsantrasyonlarda HCl kullanılır. HNO_3, H_2SO_4, ve CH_3COOH gibi bileşiklerle yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır.
- Deproteinizasyon: Proteinlerin uzaklaştırılması işlemidir. 65- 100 °C'de, 12 saat, %10 w/v'e kadar sulu NaOH solüsyonu ile reaksiyona sokularak kabukta bulunan protein ve kitin harici organik bileşikler uzaklaştırılır.
- Deasetilasyon: Kitinin %40-%50 (a/a) NaOH gibi ısıtılmış bir alkali çözeltisi ile kitosana dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir [Kou et al., 2021].
- Dekolorasyon: Pigmentlerin uzaklaştırılmasıyla renk giderilmesi işlemidir. Pigmentleri çıkarmak için aseton veya başka bir organik çözücü karışımı kullanılır.

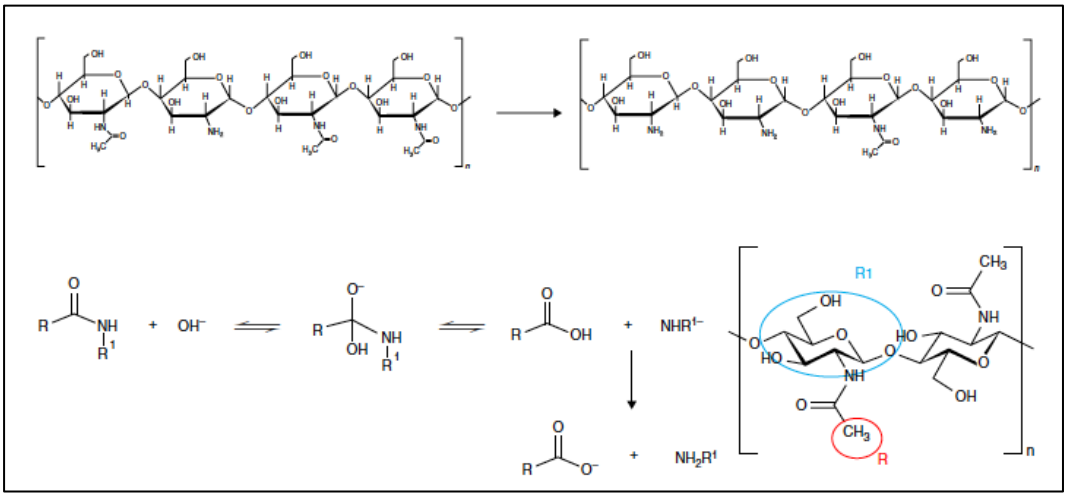
5.2 Enzimatik Metot

Enzimatik polimer sentezinin, sentez adımlarını kısaltması ve reaktif kullanımını azalttığı için sağlık ve güvenlik açısından avantaj sağlar. Enzimatik yöntemler, kimyasal yöntemlerde benzer demineralizasyon aşamaları gerçekleştirilir. Kabuktaki $CaCO_3$'ı ayrıştırmak için asit kullanılır. [Ruiz and Corrales, 2017] fakat deproteinizasyon ve deasetilasyon reaksiyonlarında yüksek sıcaklıklar kullanılmaz ve enzimlerden faydalandığı için 25-59 °C yeterlidir.

Kabuklu atıklarından proteinlerinin uzaklaştırılması için proteolitik enzimlerin kullanılmasına dair ilk çalışmalarda [Takeda and Abe, 1962], [Takeda and Katsuura,

1964] ve [Broussignac, 1968] tuna proteinaz, papain veya bakteriyal proteinaz denenmiştir. Bu enzimlerle müdahale sonrasında yaklaşık %5 civarında kitin ile birlikte protein de bulunmuştur [Kuzgun ve Inanlı, 2013].

Kitin deasetilaz kitinden kitosan eldesi için kullanılan bir enzimdir. Bazı bakteri ve mantar türlerinin kitin deasetilaz ürettiği bilinmektedir. Çoğu mantar türünün kitin deasetilaz üretme yetenekleri kısıtlıdır. Bu yüzden başka bakteri türleri ile çalışılarak kitin deasetilaz üretimi arttırılabilir. Kitinin bakteriler tarafından kitosana biyotransformasyonu, ekonomik ve çevre dostu bir yöntem olarak umut vadetmektedir [Kaur et al., 2012]. Şekil 5.1'de [Bastiaens et al., 2019] kitin deasetilasyonunun reaksiyon mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 5.1: Kitin deasetilasyonunun reaksiyon mekanizmasının şematik gösterimi.

6. KİTİN DEASETİLAZ

Doğada kitin genellikle endo-kitinazlar, ekzo-kitinazlar ve kitosazların karışımları kullanılarak hücre dışı olarak monomerlere ve dimerlere ayrıştırılır. Bu enzimlerin aktivitesi sonucu kitin monomerlere kadar ayrıştırılacaktır. Kitin deasetilazlar (CDA), kitinin amino grubunun deasetilasyonuyla kitini kitosana dönüştüren hidrolaz tipleridir. CDA, hidrofobik ve kristal haldeki biyopolimer kitinin, katyonik biyopolimere, kitosana dönüştürülmesini sağlar**.**

Kitin deasetilaz (EC 3.5.1.41) enzimi, karbonhidrat esteraz ailesi 4'ün (CE-4s) üyelerinden biridir. Bu ailenin üyeleri, birincil yapılarında "NodB homoloji alanı" veya "polisakkarit deasetilaz alanı" olarak atanan korunmuş bir bölgeyi paylaşır [Zhao et al., 2010].

Deniz bakterileri, kitinin bulunması, kitinli substratların bulunması, kitinin oligosakkaritlere indirgenmesi, oligosakkaritlerin taşınması ve katabolize etmesi için karmaşık sinyal iletim sistemlerine sahiptir [Keyhani et al., 1999]. Kitini kullanılabilir hale getirmek için ise çeşitli enzimler kullanabilirler. Kitinazlar, β-1,4-N-asetilglukozaminin dallanmamış bir polimeri olan kitinin hidrolizini katalize eder [COPEN et al., 1998]. Kitin deasetilazlar, kitinin N-asetamido bağlarını hidrolize ederek onu kitosana dönüştürürler [Tsigos et al. 2000].

CDA, kitin içindeki N-asetilglukozaminin asetamido gruplarının hidrolizini katalize ederek, kitosanın bir glukozamin polimerine dönüşümünü destekleyen bir enzimdir [Ghormade et al., 2010]. Ekstraselüler olarak salgılanır. CDA'lar deniz ve toprak bakterilerinde, bazı mantarlarda, birkaç böcek türünde ve nadiren de olsa virüslerde tanımlanmıştır [Schmitz et al., 2019].

7. HİDROJEL

Hidrojeller, yapısal özelliklerini korurken yüksek miktarda suyu bünyesinde barındırabilen hidrofilik özelliğe sahip polimerik ağlardır. Hidrojeller iki kategoriye ayrılır:

Kimyasal hidrojeller, polimer zincirlerinin birbirine kovalent bağlarla bağlanmasıyla oluşur.

Fiziksel hidrojeller, polimer zincirlerinin birbirine; hidrojen bağları veya iyonik bağlarla bağlanması ile veya moleküller arası hidrofobik birleşmeler gibi ikincil kuvvetlerle oluşur [Liu et al., 2016].

Hidrojeller, yapısının esnekliği ve su emme özelliği düşünüldüğünde canlı dokularına oldukça benzerdir. Hidrojellerin büyük bir kısmı kimyasal yapılarından dolayı fiziksel olarak değişkendirler.

Çok katmanlı hidrojeller, karmaşık iç yapıya sahiptirler ve kimyasal ve fiziksel özellikleri çeşitli varyasyonları sayesinde esneklik kazanabilir [Wu and Gong, 2011].

Çok katmanlı hidrojeller doku mühendisliği uygulamaları [Elisseeff, 2008], ilaç iletimi, [Chen et al., 2007], hücre kültürü ve hücre biyoreaktörleri [Dai et al., 2009] için uygulama alanı sağlar. Ayrıca bu katmanlı yapı, hücrelerin organize edilmesine ve doğal dokuların taklit edilesine olanak sağlar [Nie et al., 2019].

İki tür kitosan hidrojel vardır: kimyasal ve fiziksel hidrojel.

Kimyasal hidrojeller, kitosan zinciri boyunca bağlı serbest amonyumlar sayesinde kovalent bağlarla çapraz bağlanır. Bu bağlanma için farklı moleküller kullanılabilir. Örneğin: Formaldehit [Singh et al., 2006], glutaraldehit [Bhattarai et al., 2010], veya genipin gibi çapraz bağlama ajanları veya çeşitli reaktif kimyasal işlevlere sahip diğer bileşikler bulunur [Du et al., 2015]. Bu moleküllerin biyouyumlulukları kesin olmadığı için kullanımı medikal alanda istenmeyen sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Fiziksel yöntemde, kitosanın protonlanmış amonyumu ile yüksek moleküler ağırlıklı diğer polimerden gelen anyonik yükler arasındaki elektrostatik etkileşimler sayesinde polielektrolit kompleksleri ile hidrojel oluşturabilir. Bu hidrojellerde düşük

mekanik özelliklerinden dolayı bozunmaları kimyasal hidrojellerden daha hızlı olabilir [Peers et al., 2020].

Polisakkaritler hidrojel yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Nişasta, karboksimetilselüloz, aljinat, karagenan ve kitosan hidrojel hazırlamak için çokça kullanılmaktadır [Pella et al., 2018].

Kitosanın elastik olması ve çözünürlüğünün yanı sıra biyolojik olarak toksik olmaması, biyouyumluluğu ve biyoaktivitesi gibi özellikleri ile kullanımı yaygınlaşmaktadır. Kitosanın çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanımına izin verdiği ve biyouyumlu olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir.

Ayrıca kitosan, bazı insan enzimleri, özellikle lizozim tarafından metabolize edilir ve yüzeyindeki pozitif yükler sayesinde biyo-yapışkan olarak adlandırılır [Berger et al., 2004]. Bütün bu özellikleriyle hidrojel olarak kullanılma potansiyeli yüksektir.

8. KİTOSAN KULLANIM ALANLARI

Kitosanın kullanım alanları da üretim şekli geliştikçe çeşitlenmektedir. İnorganik moleküller ve/veya inorganik nano ölçekli yapı taşları ile kombinasyonu kitosanın kullanım avantajını da arttırmaktadır [Marpu and Benton, 2018].

8.1. Antibakteriyal Kullanımı

Düşük moleküler ağırlıklı kitosan, güçlü antibakteriyel özelliklere sahiptir ve ayrıca insan vücudu için zararsızdır. Yapılan çalışmalar, kitosanın önemli antifungal ajan da olduğunu göstermektedir. Böylelikle eşsiz bakteri ve mantar öldürücü yapısı ile yaraların tedavisi için kullanılabilir [Bano et al., 2017]. Kitosanın, amino yüklü grupların metallerle etkileşime girdiği mükemmel metal bağlama yeteneklerine sahip olduğu iyi bilinmektedir. Mikroorganizma hücre duvarında bulunan amino grupları ile Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi iki değerlikli iyonlar arasındaki etkileşim, toksinlerin üretimini önler ve bakteri üremesini engeller. [Kravanja vd., 2019]. Bakteri hücre yüzeyindeki makromoleküllerin negatif yüklü rezidülerine karşı CS'nin polikatyonik yapısı antibakteriyal bir tabaka olarak kullanımına olanak sağlar [Sudharsan et al., 1992].

8.2. Yara İyileştirici

Yapılan çalışmalarda kitosan aljinat kompozit yara örtüsü, büyük gözeneklilik ve su emerek şişme özelliği göstermiştir ayrıca yara bölgesinin nemli ortamının korunmasına yardımcı olmuştur. Hücre büyümesi konusunda destekleyici bir etkisi vardır [Yu et al., 2018]. Hücreye nüfuz eden bir peptit olan Oligoarginin, R8 ile modifiye edilmiş COL/CS jel kompoziti, *S. aureus* büyümesini inhibe etme özelliği göstermiştir ve bu özelliği ile yaralarda yüksek bir iyileşme oranı sağlamıştır. Bu da kitosan bazlı kompozitlerin medikal alanlarda kullanımı için olanak sağlamaktadır [Li et al., 2019].

8.3. Gen Transferi

Kitosanın sahip olduğu amin gruplarının asidik ortamlarda pozitif yüklü olması, negatif yüklü mukozal yüzeyler veya DNA, RNA gibi genetik materyaller ve

negatif yüklü diğer moleküller ile güçlü bir elektrostatik etkileşim gerçekleştirmesine neden olur [Hejazi and Amiji M, 2003]. Bu sayede kitosan, transfeksiyon için bu moleküllerin hücre içindeki degredesyonunu engelleyerek gen aktarımı için bir taşıyıcı olarak kullanılmıştır [Choi et al., 2016] Kitosanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyonu seviyesinin biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri üzerinde etkisi vardır. Kitosan/DNA sisteminin transfeksiyon verimliliği ve bağlanma afinitesinin, moleküler ağırlık ve deasetilasyonu seviyesinin artışı korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [Lavertu et al., 2006]. Kitosanın yüksek moleküler ağırlığının (100 kDa) genetik materyallerle daha stabil polipleksler oluşturmasında, genetik materyallerin salınımını geciktirmesinde ve fiziksel şeklini sağlamasında birçok faydası olduğu görülmüştür [Köping-Höggård et al., 2004]. Ayrıca yüksek moleküler ağırlıklı kitosan, 7.4 pH'ta düşük çözünürlük, genetik materyallerin salınımının yavaş olması ve yüksek viskozite gibi olumsuz özellikler gösterir [Köping-Höggård et al., 2001]. Kitosan kullanılarak oluşturulan gen transfer sistemi için, optimal koşullar henüz oluşturulmamıştır. Umut verici çalışmalar devam etmektedir.

8.4. İlaç İletimi

Kitosan nanoparçacıklar stabilite, geçirgenlik, deforme olabilirlik ve tümör hücreleri tarafından alınabilmesi gibi özellikleri ile ilaç iletiminde tercih edilebilir [Key and Park, 2017].

Kitosan Mikroküre

Mikroküre dağıtım sistemi, daha uzun ömürlü olması, kontrollü ilaç salım hızı ve hedef spesifik olmasıyla ilacın etkili bölgedeki kontrolünü sağlar. Kitosan mikrokürelerinin yapımında, anyonlar (sülfat, fosfatlar, hidroksitler), çapraz bağlama, çözücü buharlaştırma, iyonik jelleşme, sprey kurutma, emülsiyon polimerizasyonu ve çökeltme/ kaoservasyon gibi karşı iyonlarla etkileşimi içerir [Sinha et al., 2004]. İlaç salım hızının ise polimer-ilaç oranına bağlı olduğu görülmüştür.

Kitosan Tablet

Kitosan jel oluşturma işlemi düşük maliyeti ve basit hazırlama metodu ile avantaj sağlar. Kitosan tabletlerin biyouyumlulukları, toksik olmamaları ve üç boyutlu

ağ yapısı sebebiyle ilaç salımının kontrol edilebilmesine olanak sağlar [Ofori-Kwakye et al., 2016].

Kitosan Nanopartikül

Nanopartiküllerin boyutlarının küçük olması, onları beyin bariyeri gibi engellerden geçebilmesine ve hedef bölgeye girebilmesine olanak tanır [Qi et al., 2004]. Kitosan nanoparçacıkların (CsNP'ler), katyonik olması sayesinde hedefe özgü hareket edebilmesi, ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasında büyük avantaj sağlar. Nanopartiküller, ayrıca mide-bağırsak boyunca ilaçların enzimatik bozunmasını önler [Ali and Ahmed, 2018].

8.5. Gıda Paketleme

Kitosanın bazı mantarlar (mayalar ve küfler), bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği çalışmalarla desteklenmiştir. Kitosanın antimikrobiyal özelliği sayesinde gıda koruyucu olarak kullanımı mümkündür [Haghighi et al., 2020]. Kitosanın film oluşturma yeteneği, düşük oksijen geçirgenliği ve toksik olmaması membranların ve kaplamaların üretilmesine, gıda koruyucusu olarak işlev görmesine olanak sağlar [Ferreira et al. 2016]. Fakat kitosanın suda çözünür olması, düşük mekanik ve sıcaklık stabilitesi gibi dezavantajları düşünüldüğünde plastikle karşılaştırıldığında ürünlerin raf ömrünün kısa olmasına neden olabilir. Bu sorunu çözmek için yapılan çalışmalarda farklı stratejiler denenmiştir. Örneğin: enzim müdahalesi [Águila-Almanza et al., 2019], yüzey kaplaması [Khwaldia et al., 2014], diğer polimerlerle karşılaştırma [Muxica et al., 2017] vb. Bu sayede gelecekte daha stabil bir kitosan yapısıyla gıda koruyucu olarak kullanılabilir.

8.6. Suyun ağır metallerden arındırılması

Çevre kirliliğinin artması ile suda da toksik maddeler birikmeye başlamıştır. Bu nedenle artan su arıtma ihtiyacı için organik ve inorganik sentetik polimerler kullanılmaya başlanmıştır [Lalov et al., 2001]. Bu polimerler, iyi antimikrobiyal aktiviteye ve üstün flokülasyon verimliliğine sahip olsalar da çevreye kalıcı etkileri vardır ve doğada parçalanamazlar. Bu malzemeler yerine çevre dostu ve

sürdürülebilir materyaller tercih edilmeye başlanmıştır. Kitosan, yüksek suda çözünürlüğü, hidroksil ve amino fonksiyonel gruplarının kimyasal reaktivitesi ve polimer zincirinin esnek yapısı nedeniyle su arıtımı için ideal bir materyaldir.

Geçtiğimiz yüzyılda endüstrilerin hızlı gelişimi, gıda ve su sistemlerimizdeki ağır metal seviyelerini artırdı. Ağır metaller için kitosanın yüksek adsorpsiyon potansiyelinden faydalı olabilir. Kitosan doğal su pıhtılaştırıcıdır ve sudaki bulanıklığı, rengi ve parçacıkları azaltabilir [Diaz et al., 1999]. Kitosan gibi doğal bir pıhtılaştırıcılar çamur işlemede önemli yer tutar. Kitosan organik kirleticilerin, ağır metallerin, bakterilerin uzaklaştırılmasında da etkilidir. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), içme suyunun arıtılması için kitosana resmi yetki vermiştir [Chopra and Ruhi, 2016].

8.7. Doku mühendisliği

Bir materyalin doku mühendisliğinde kullanılabilmesi için gerekli özellikler:

- Biyouyumluluğa sahip olması;
- Biyolojik olarak parçalanabilir olması;
- İmmünojenik olmama;
- Optimal mekanik mukavemet;
- Gözenekli yapısı sayesinde hücrelerin, gazların, metabolitlerin, besinlerin ve sinyal moleküllerinin taşınabilmesi.

Sentetik polimerlerin bir kısmı biyouyumlu değildirler ve bağışıklık cevabına neden olurlar veya toksik etkiye yaratırlar [Islam et al., 2020]. Bu yüzden doku mühendisliği çalışmalarında doğal polimerlere yönelim artmıştır. Kitosan, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük toksisite gibi özellikleri ayrıca gözenekli yapısı, bağışıklık tepkisi oluşturmaması ile doku üretiminde kullanım için çok iyi bir adaydır [Asghari et al., 2017].

Kitosan, lifler, süngerler ve hidrojeller gibi farklı formlarda kullanılabilme olasılığı nedeniyle kıkırdak doku mühendisliği [Domalik-Pyzik et al., 2019], çapraz bağlama yoluyla diğer polimerlere kolayca bağlanabildikleri için cilt dokusu mühendisliği için uygun biyomateryallerdir.

9. MATERYAL

9.1. Kimyasal Maddeler

Potasium phosphate dibasic (AFGScientific, 321171-1KG), Sodium Chloride (Merck, 1064041000), Potasium phosphate monobasic (AFGScientific, 292188-1KG), Potasyum iyodür (Tekkim, TK.200980.00252), Magnessium Sulfate Anhydrous (AFGScientific, 147616-1KG), Nutrienth Broth (Merck, 1054430500), Nutrienth Agar (Merck, 1054500500), Tryptic Soy Broth (Merck, 1054590500), Tryptic Soy Agar (Merck, 1054580500), Sodium Hydroxide (Merck, 1064620500), Lugol's Solution (111885), 4'-Nitroacetanilide (Alfa Aesar, A13539.14), Chitosan (Sigma Aldrich, 448877), Polyvinyl alcohol 40-88 (Fluka, 81386).

Karides kabuğu: Çeşitli balık restoranları ve balık pazarlarından temin edilmiştir.

9.2. Cihazlar

İnkübatör (Edmund-Bühler TH 15 inkübatör), santrifüj (Beckman Coulter Allegra 25r) (Gyrozen 1248 R santrifüj) Etüv (Binder ED 115 Etüv Avantgarde Line With Natural Convection), Biosafety Cabinet Class II A2, Manyetik karıştırıcı (IKA RCT Classic), -80 Dondurucu (Thermo Scientific™ Forma™ 88000 Series -86°C Upright Ultra-Low Temperature Freezers).

9.3. Sarf Malzemeleri

Beckmann santrifüj tüpü 50 ml No 357003, Whatman şırınga filtresi 0,2 μm, Isolab cam Petri 150 mm, Isolab 90 mm plastik Petri, Falcon tüp 50 ml steril, Isolab cam tüp 20 ml.

10. YÖNTEM

10.1. Bakterilerin seçilmesi

İlk olarak İzmit Körfezi ve Marmara Denizi'nden alınmış 698 deniz bakterisi içinden 22 izolat [Gul Seker ve Mater, 2009] biyokimyasal, yapısal ve fizyolojik özellikleri literatürde kitosan ürettiği bilinen bakterilerin özellikleri ile karşılaştırılarak seçilmiştir.

Bu amaçla literatür taraması yapılmış ve daha önce literatürde kitosan ürettiği bilinen mikroorganizmalardan; *Bacillus megaterium* [Pelletier and Sygusch, 1990], *Bacillus licheniformis* [Bindal and Gupta, 2016], *Bacillus cereus* [Ravikumar and Perinbam, 2016], *Bacillus subtilis* [Huang et al., 1992], *Bacillus licheniformis* [Bhat et al., 2019], *Bacillus amyloliquefaciens* [Zhou et al., 2010], *Saccharomyces cerevisiae* [Christodoulidou et al., 1996], *Corynebacterium kutscheri* [Panchani et al., 2020], *Aspergillus flavus* [Narayanan et al., 2016] türlerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmış ve benzer özellikleri listelenmiştir. İzolatların "Gul Seker, 2009" çalışmasında Gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi, TSI agarda üremeleri, IMVIC testi, Indol testi, VP testi, Sitrat testi, Karbonhidrat kullanım testi, dekarboksilaz testi yapılmış olduğu için özellikleri bilinmektedir. Bu özellikler yukarda verilmiş olan mikroorganizmalarla karşılaştırılmış ve en çok benzerliğe sahip olan 22 izolat seçilmiştir.

10.2. Bakterilerin Büyütülmesi

Tryptic Soy Broth hazırlanmıştır (Tablo EK B.1.). -20°C'den alınan bakteriler hazırlanan Tryptic Soy Broth'a ekildiler. Ekilen bakteriler 37°C'de 48 saat büyütülmüştür.

37°C'de büyüme göstermeyen bakteriler için 30°C'de tekrar ekim yapıldı (Tablo 10.1). Büyümeyen bakterilerle devam edilmedi. Ardından çalkalamalı inkübatörde stoktan tekrar ekimleri yapıldı.

Tablo 10.1: TSB'ye ekim sonrasında üreme sonuçları (+: üreme var, - üreme yok, NA: çalışmadan çıkarılanlar)

Kod	**37 °C TSB (48 saat)**	**30 °C TSB (48 saat)**	**30 °C TSB 200 rpm 48 saat**
İK1-9	-	+	-
İK1-11	-	+	+
İK1-15	-	-	NA
İK1-18	-	-	NA
İK1-34	-	+	+
İK1-43	-	+	+
İK1-51	-	+	+
İK1-55	-	+	+
İK1-91	+	+	+
İK1-159	+	+	+
İK1-168	-	+	+
İK2-181	-	+	+
İK2-189	+	+	+
İK2-235	-	+	+
İK2-237	-	+	+
İK3-301 (26)	-	+	+
İK3-301 (27)	-	+	+
İK3-332	-	+	+
İK4-421	-	+	+
M1-A124	-	+	+
M1-A170	+	+	+
İK1-42	-	+	+

10.3. Karides Kabuklarının Hazırlanması

Balık restoranlarından ve balık pazarlarından alınan karides kabuklarının iç kısımları ayıklandı ve kabuklar distile su ile yıkandı. Distile su ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Yıkanan kabuklar -20°C'ye kaldırıldı. 24 saat sonra kurutma kağıdına alınan kabuklar 60 °C'de 24 saat kurutuldu. Kurutulan kabuklar el ile ezilerek toz haline getirildi.

Şekil 10.1: Karides kabuklarının etüv içinde kurutulması.

10.4. Karides Kabuğu İçeren Besi Yerine Ekim

50 ml Nutrient Broth'a 0.5 gr karides kabuğu olacak şekilde 250 ml'lik Erlen'lere ekim yapılmıştır. 30°C'de 24 saat ve 72 saat sonunda kontrol edilmiştir. Sonuçlar Tablo 10.2'de verilmiştir.

Tablo 10.2: Üreme miktarlarına göre + üreme, ++ çok üreme, - üreme yok şeklinde sınıflandırılmıştır.

Kod	NB+ Karides kabuğu (24 saat)	NB+ Karides kabuğu (48 saat)	Stok NB
İK1-9	-	-	-
İK1-11	+	+	+
İK1-34	+	+	+
İK1-43	+	+	+
İK1-51	+	++	+

Tablo 10.2: Devam.

İK1-55	+	+	+
İK1-91	+	+	+
İK1-159	+	+	+
İK1-168	-	+	+
İK2-181	+	+	+
İK2-189	+	++	+
İK2-235	+	+	+
İK2-237	+	++	+
İK3-301 (26)	+	+	+
İK3-301 (27)	+	++	+
İK3-332	+	++	+
İK4-421	+	+	+
M1-A124	-	+	+
M1-A170	+	+	+
İK1-42	+	+	+

10.5. Kitin Deasetilaz Varlığının Belirlenmesi

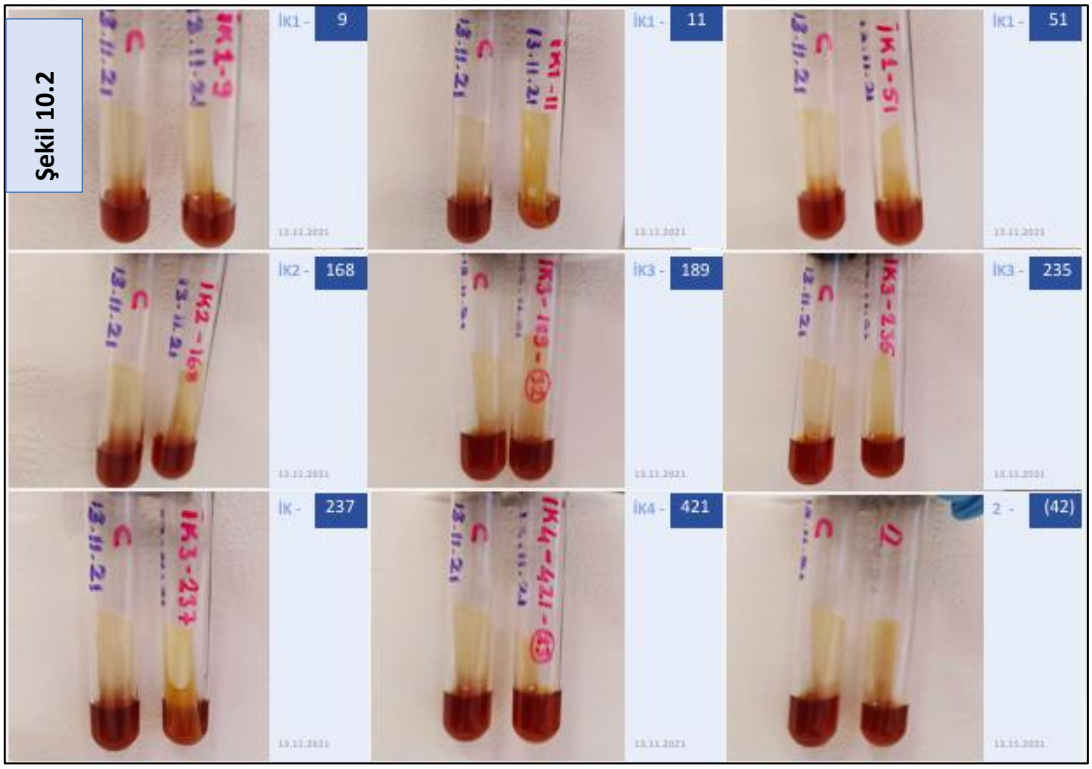
P-nitroasetanilid ile desteklenmiş kitin agar ve broth besi yerinde sarı rengin oluşması, kitosan oluşumunun ilk kanıtı olan kitin deasetilazın varlığını gösterir [Panchani et al.,2020].

5 gr p-nitroasetanilidin 100 ml etanol içinde çözülmesiyle p-nitroasetanilid çözeltisi hazırlandı. Whatman #1 filtre kağıdı şeritleri kesildi. Bu şeritler, p-nitroasetanilid çözeltisine batırıldı ardından kurutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı [Kaur et al., 2012].

Tryptic Soy Broth, Nutrient Broth ve Tryptic Soy Agar hazırlandı. Seçilen 20 bakteri NB, TSB ve TSA besi yerlerine ekildi.

Kurutulan filtre kağıtları daha önce ekimi yapılmış bakterilerin bulunduğu cam tüplere batırıldı ve Petri platelere koyuldu. 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan

sonra, şeritte sarı rengin gelişmesi, ilgili bakteri izolatında kitin deasetilaz enziminin varlığını gösterir.



Şekil 10.2: Nutrient Broth ve karides kabuğu içeren besiyerinde büyütülmüş bakterilerin kontrolle karşılaştırıldığında p-nitro asetanilid emdilirilmiş Whatmann kağıtları eklendikten sonra kağıtların renk değişimleri.

Şekil 10.3: Nutrient agar ve karides kabuğu içeren besiyerine ekilmiş bakterilerin p-nitroasetanilid emdilirilmiş Whatmann kağıtları eklendikten sonra besi yerlerindeki renk değişimlerinin kontrolle karşılaştırılması.

Tablo 10.3: Renk değişimine göre “+ renk değişimi var (açık sarı), ++ renk değişimi var (koyu sarı), - renk değişimi yok” şeklinde sınıflandırılmıştır.

Kod	NB+ Karides kabuğu	NB+ Karides kabuğu + p-nitroasetanilid	TSB + Karides kabuğu	TSB+ Karides Kabuğu + p-nitroasetanilid	TSA+ Karides Kabuğu+ p-nitroasetanilid
İK1-9	+	+	+	-	+
İK1-11	+	++	+	-	+
İK1-34	+	+	+	-	+
İK1-43	+	++	+	-	+
İK1-51	+	++	+	+	+
İK1-55	+	++	+	+	+
İK1-91	+	+	+	+	+
İK1-159	+	+	+	+	-
İK1-168	-	+	+	+	+
İK2-181	+	++	+	+	+
İK2-189	+	+	+	+	++
İK2-235	+	+	+	+	++
İK2-237	+	++	+	+	+
İK3-301 (26)	+	+	+	+	-
İK3-301 (27)	+	++	+	+	++
İK3-332	+	++	+	+	++
İK4-421	+	+	+	+	+
M1-A124	+	++	+	+	++
M1-A170	+	++	+	+	+
İK1-42	+	++	+	+	+

10.6. Kitosan İzolasyonu

Kitosan tayini Kaur ve arkadaşlarının 2012 çalışmasından modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Beckmann tüplerine alınan bakteriler, 15 dakika boyunca 12000 rpm'de santrifüjlendi. Pelet bakteri, kitin ve kitosan karışımı içermekteydi. Bu peletlerin her birine 10 ml 0.1 N NaOH ilave edildi. Hücreler alkali muamelesi sırasında çözündürüldü. Tüpler tekrar 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

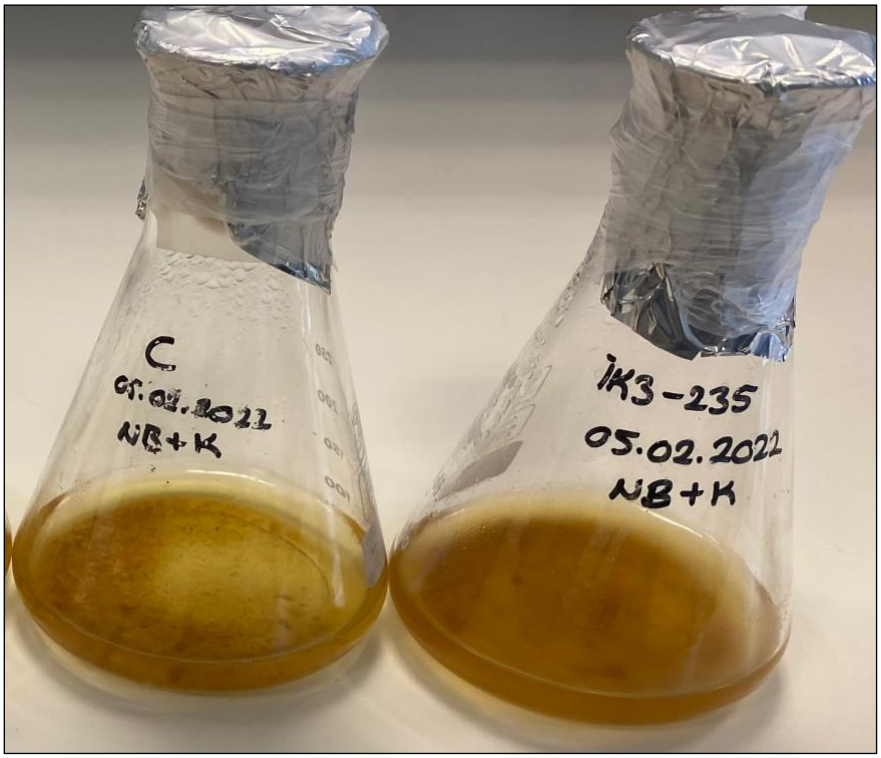
Süpernatantlar dikkatlice atıldı ve kitin, kitosan ve az miktarda hücre kalıntısı içeren topaklar 10 ml %2 asetik asit ile karıştırıldı ve karışımlar temiz test tüplerine alındı ve kitosanın içinde çözünmesi için gece boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı.

Tüplerin içeriği tekrar 12000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Pellet atıldı, tekrar cam tüplere alındı ve 10 ml süpernatant toplandı. İçindeki kitosan varlığı, 1 N NaOH ile nötralize edildikten sonra beyaz çökelti oluşumu ile kontrol edildi. Ardından 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek oluşan çökelti supernatant atılarak izole edilmiştir. Çökelti steril distile su ile yıkanmıştır ve az miktarda dH_2O içerisinde çözdürülmüştür. Petri disklere dökülerek kurumaya bırakılmıştır [Kaur et al., 2012].

Kurutulan kitosan çökeltileri tartıldı. Çıkan sonuçlar Ek 2'de verilmiştir. Ardından FTIR analizi gerçekleştirildi. FTIR analizine göre bakterilerin sonuçları karşılaştırılmış ve seçilen örnekler için büyük ölçekli üretime geçilmiştir.

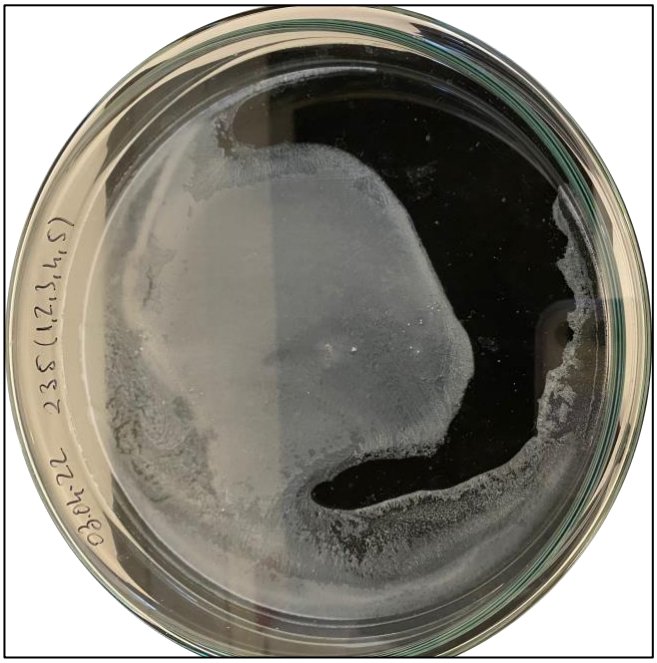
10.7. Yüksek Miktarda Üretim

Kitosan ürettiği düşünülen türler, kitin deasetilaz varlığının gösterildiği türler olarak belirlenmiştir. Karides kabuklu ortamda daha büyük miktarda kitosan üretebilmek için cam tüplerden 250 mL'lik Erlen'lere; 50 mL Nutrient Broth ve 0.5 gr karides kabuğu eklenerek besiyeri ortamı hazırlanmıştır. 200 µL bakteri hazırlanan besiyerine ekilerek 48 saat 30 °C'de büyütülmüştür. Bu bakteri türlerinden en çok üreyenlerden biri olan İK3-235 numaralı izolat sonraki denemeler için seçildi.



Şekil 10.4: Erlenlere alınmış İK3-235 kodlu bakterinin NB ve Kitosan içeren besi yerinde büyümesi ve kontrolle karşılaştırılması sonucunda besi yerinin renk değişimi bakteri miktarının yoğunluğunu göstermektedir.

Büyük ölçekli üretim sonucunda bölüm 10.6.'da bahsedilmiş olan kitosan izolasyonu tekrar yapılmıştır. Bu sayede elde edilen kitosan miktarı arttırılmış ve İK3-235 numaralı örnekten elde edilen kitosan cam Petri diskte kurutulmuştur. Ardından kazınarak ayrılmış ve %2'lik asetik asitte gece boyu çalkalamalı inkübatöre 150 rpm'de oda sıcaklığında çözülmüştür.



Şekil 10.5: Cam Petri disklerinde kurutulmuş İK3-235'ten elde edilen kitosan beyaz toz halinde görülmektedir.

10.8. Hidrojel Oluşturulması

10.8.1 PEG/Kitosan Çözeltisi ile Hidrojel Oluşturulması

Zeng ve arkadaşlarının 2003'te yapmış olduğu çalışmada kullanmış olduğu metot modifiye edilerek uygulanmıştır.

0.2 gr PEG 20000, 10 mL %2'lik steril asetik asit içerisinde oda sıcaklığında çözdürülmüştür. %2'lik 2.5 mL kitosan asetik asitte çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan ve PEG çözeltisi 1/1 oranında karıştırılmıştır. Aynı işlem hem İK3-235'ten elde edilen kitosan hem de ticari kitosan için gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan karışımlar Petri disklere dökülmüştür. Karışımlar 55 °C'de gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan membran örneklerine %2'lik NaOH çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Ardından NaOH distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Son olarak ticari kitosanla oluşturulmuş membran 2 saat, İK-235'ten elde edilmiş kitosanla oluşturulmuş membran 4 saat, 80 °C'lik su banyosunda PEG bileşenleri çözülene kadar tutulmuştur. Membranların su banyosunda kurutulma

süresi kenarlarının kalkmasıyla sonlandırılmıştır [Zeng et al., 2004]. Elde edilen bulgular sonuç bölümünde yer almaktadır.

10.8.2. Soğutma Metotu ile Hidrojel Oluşturulması

Figueroa-Pizano ve arkadaşlarının 2020'deki çalışmasında uygulamış olduğu metot modifiye edilerek uygulanmıştır.

%2'lik kitosan çözeltisi, 10 ml %2'lik steril asetik asitte gece boyu çözdürülerek hazırlanmıştır. 1 gr PVA, 10 ml dH_2O içerisinde 80 °C'de 1 saat karıştırılarak %10'luk PVA solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan ve PVA solüsyonları 1/1 oranında manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında homojenize olana kadar karıştırılmıştır. Bu işlemler hem İK3-235 hem de ticari kitosan için yapılmıştır.

Elde edilen karışım Petri plağına dökülmüştür. Ardından örnekler oda sıcaklığında 30 dakika degaze edilmiştir. Oluşanmaya başlayan hidrojeller +4'de 20 saat bırakılmıştır. Ardından -20 °C'de 20 saat ve -80 °C'de 20 saat tutulmuştur. Bu işlem bir döngüdür. 3. Döngüden sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Tekrar -80 °C'de 20 saat bekletilmiş ve son olarak -46 °C'de 48 saat tutulmuştur. Elde edilen bulgular sonuç bölümünde yer almaktadır [Figueroa-Pizano, 2020].

10.8.3. PEG/ Kitosan'ın Farklı Derişimleriyle Hidrojel Oluşturulması

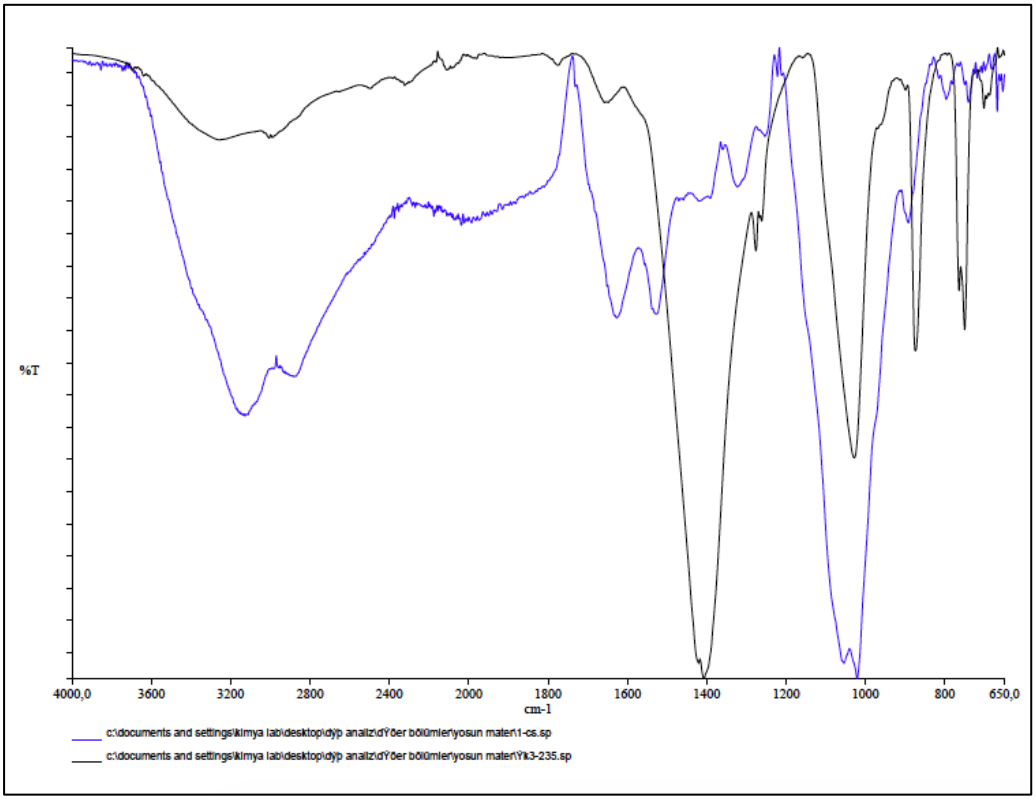
Zhang ve arkadaşlarının 2002'de yapmış olduğu çalışmada bahsedilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır.

4 adet 1.5 ml'lik eppendorf hazırlandı. Chitosan ve PEG 20000 2:1 ve 4:1 oranında karıştırılmıştır. %2'lik asetik asitte çözülmüş %2'lik kitosanla %2'lik asetik asitte çözülmüş %2'lik PEG 20000 karıştırılmıştır. 2/1 oranı için: 500 ul PEG 20000 + 1 ml kitosan, 4/1 oranı için: 250 µl PEG 20000 + 1 ml kitosan karışımı hazırlanmıştır. Ticari kitosan ve 235'ten elde edilen kitosan için ayrı ayrı yapıldı. Elde edile karışımlar 30 dk 80 °C'de su banyosunda tutulmuştur. Ardından Petri disklere dökülmüş ve vakum altında degaze edilmiştir. Son olarak 50°C'de gece boyu kurutulmuştur [Zhang et al., 2002].

11. SONUÇLAR

11.1. Kitosanın Kantitatif Tayini: FT-IR analizi

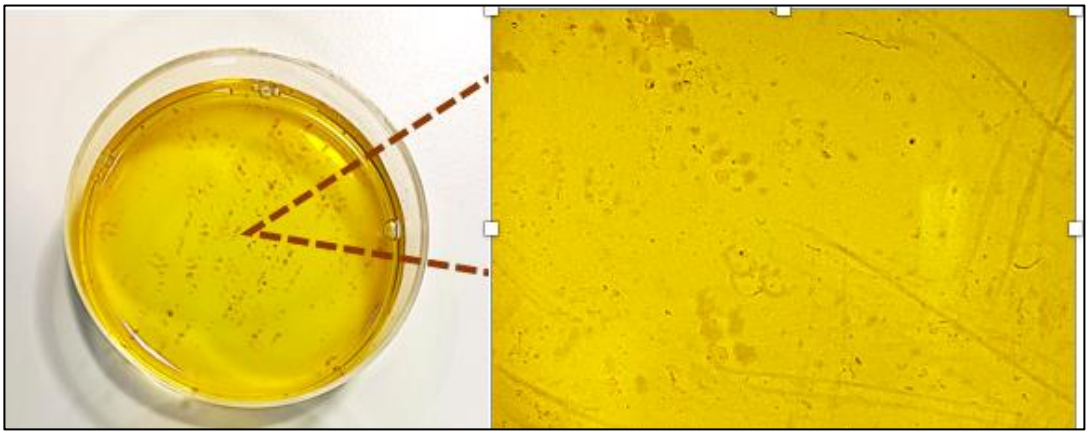
Seçilen 16 bakteri türüne (İK1-11, İK1-34, İK1-43, İK1-51, İK1-91, İK2-168, İK2-181, İK3-189, İK3-235, İK3-237, İK3-301 (26), İK3-301 (27), İK3-332, İK4-421, M1-A124, 2) Gebze Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde FT-IR analizi yapılmıştır. Kimya bölümünde yapılan yorumlara göre grafikler karşılaştırılmış ve kontrol olarak ticari kitosan baz alınmıştır. Sonuçlar kıyaslandığında grafik görüntüleri benzerlik göstermektedir.



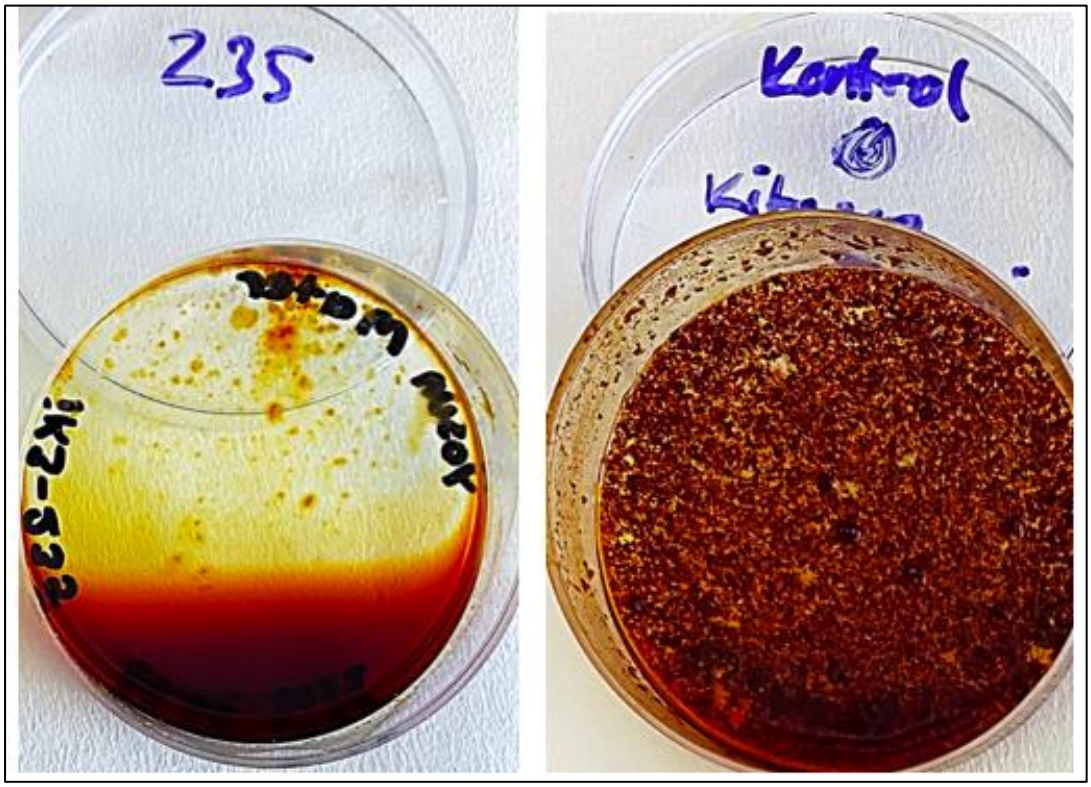
Şekil 11.1: Şekilde 650-4000 arası spektrumda seçilen bakteri örneği olan İK3-235'in ve ticari kitosanın FT-IR grafikleri gösterilmektedir. Dalgalanmalar oldukça benzerdir.

11.2. Kitosan Kalitatif Tayini

Geri kazanımdan sonra elde edilen beyaz çökelti, 15 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlendi. Distile su (pH 7) ile iki kez yıkandı. Daha sonra çökelti 0,5 µL distile suda yeniden süspanse edildi ve bu süspansiyon Petri kabına alındı. 55°C'de 2-4 saat kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş çökelti üzerine 2-3 damla iyot/potasyum iyodür çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı ve karışım 2-3 damla %1 H_2SO_4 ile asitleştirildi. İyot/potasyum iyodür çözeltisi ilave edildikten sonra çökelti rengi koyu kahverengiye dönüşür ve çözelti renksizleşir ve sülfürik asit ilave edildiğinde koyu kahverengi renk koyu mora döner. Bu kitosan varlığını gösterir. Ticari kitosanla karşılaştırıldığında yoğunluk olarak daha az olsa da renk değişimi görülmektedir.



Şekil 11.2: Petri kabında kurutulmuş çökelti üzerine 2-3 damla iyot/potasyum iyodür çözeltisi ilave edildikten ve karışım 2-3 damla %1 H_2SO_4'le asitleştirildikten sonra renk değişimi görülmektedir.



Şekil 11.3: Kontrol olarak belirlenen ticari kitosanın parçacık boyutu, miktarı ve saflığı daha fazla olduğu için daha yoğun olarak gözükmektedir. Taneciklerin renk değişimi aynı olduğu için kitosan varlığının kalitatif tayininin yapılmıştır.

11.3. Kitosan İzolasyonu Sonrası Tartım Sonuçları

FTIR analizi ve p-nitroasetinalid uygulamasından sonra kitosan ürettiği düşünülen bakteriler karides kabuğu içeren besiyerinde büyütülmüş ve ardından kitosan izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda elde edilen kitosan miktarları tartılmıştır. Tartım sonuçları Tablo 11.1 ‘de verilmiştir. En çok üretim yapan bakteri türleri arasında İK1-34, İK1-55, İK1-91, İK2-168, İK3-235, İK3-237, İK3-332 bulunmaktadır. Bu türler arasında FTIR analizine göre karşılaştırma yapıldığında kitosan ürettiği kesin olarak düşünülen İK3-235 numaralı bakteri seçilmiş ve büyük ölçekli üretim yapılmıştır. Büyük ölçekli üretimin ardından hidrojel oluşturma metotlarına geçilmiştir.

Tablo 11.1. Kitosan izolasyonu sonrası tartım sonuçları.

İzolat Kodu	Boş Petri	Dolu Petri	Fark
İK3-235	9,7418 gr	9,7879 gr	0,0461 gr

11.4. Büyük Ölçekli Üretim Sonuçları

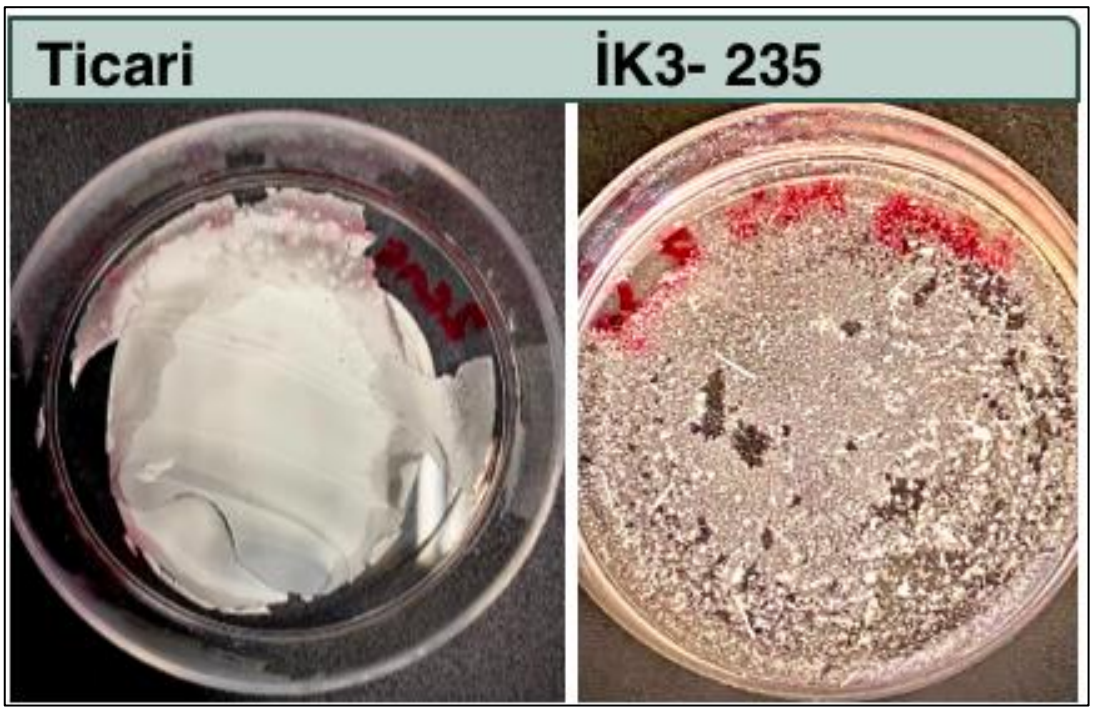
Seçilen İK3-235 numaralı bakteri 250 ml'lik Erlen'de karides kabuğu içeren NB besiyerinde büyütülmüştür. Ardından kitosan izolasyonu yapılmış ve tartım sonucunda 0.18 gr kitosan elde edilmiştir. Elde edilen bu kitosan hidrojel olarak kullanılmak üzere %2'lik asetik asitte oda sıcaklığında gece boyu çözüldükten sonra hidrojel oluşturma metotlarında kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır. Aynı işlemler ticari kitosan için de gerçekleştirilmiştir. Şekil 11.4'te çözülmüş kitosanlar görülmektedir. İK3- 235'ten elde edilen kitosanın ticari kitosana göre daha iyi çözündüğü görülmektedir. Ticari kitosanın bulunduğu tüpün dibinde kitosan çökeltileri az da olsa bulunmaktadır.

Şekil 11.4: Üstteki fotoğraflada A-1 ve B-1'de çözünmeden önceki kitosanlar, alttaki fotoğrafta A-2 ve B-2'de çözüldükten sonra kitosanlar görülmektedir.

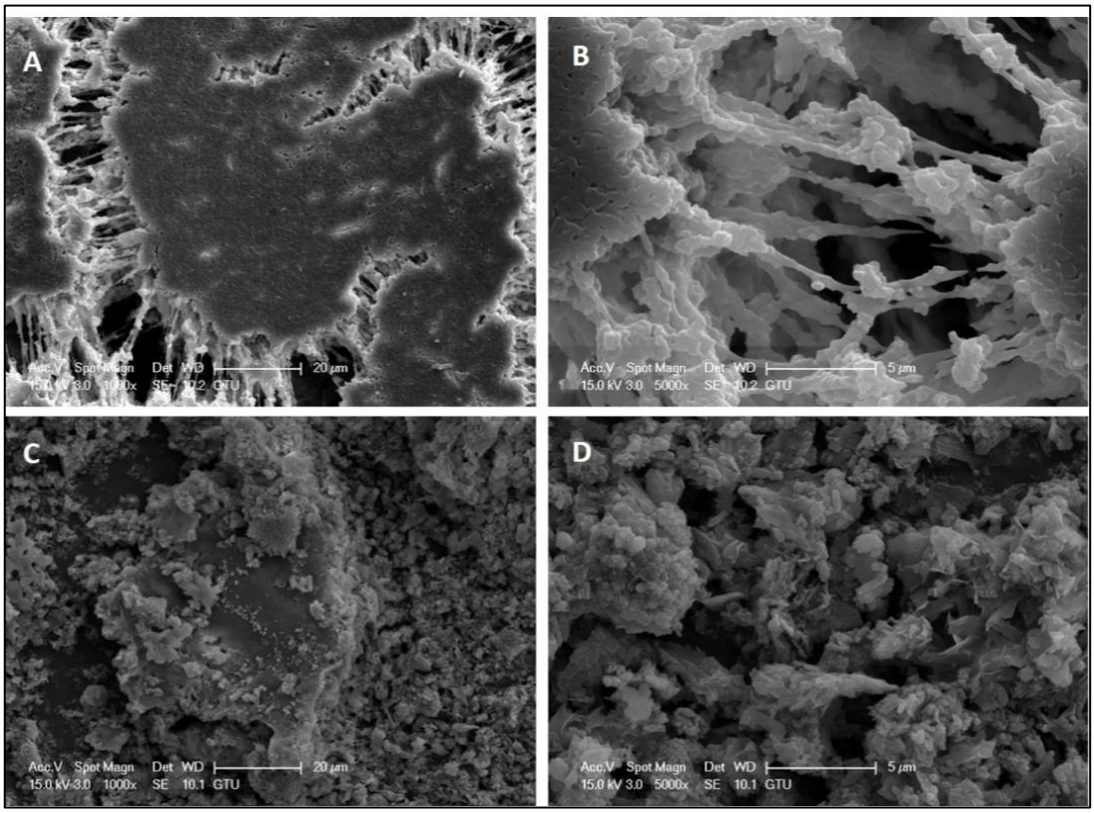
11.5. Hidrojel Sonuçları

11.5.1. PEG/Kitosan Çözeltisi ile Oluşturulan Hidrojel

Bölüm 10.8.1'de bahsi geçen Zeng ve arkadaşlarının 2003'te yapmış olduğu çalışmada kullanmış olduğu metodun modifiye haliyle elde edilmiş kitosan hidrojel örnekleri Şekil 11.5'te görülmektedir. Sonuçlara göre ticari kitosandan elde edilen hidrojel yapısal olarak daha bütün halde durmaktadır. İK3-235'ten elde edilen kitosanla hazırlanmış hidrojelde ise yer yer boşluklar görülmektedir. Bunun başlıca sebebi elde ettiğimiz kitosanın ticari kitosan kadar saf olmaması olabilir. Kitosan izolasyonu yapıldıktan sonra metoda saflaştırma basamağı eklenerek ve diğer adımlarda optimizasyon yapılarak ticari kitosanla aynı kalitede hidrojel oluşturmak mümkündür.



Şekil 11.5: PEG/Kitosan çözeltisiyle hazırlanmış hidrojellerin ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosanın karşılaştırılması.

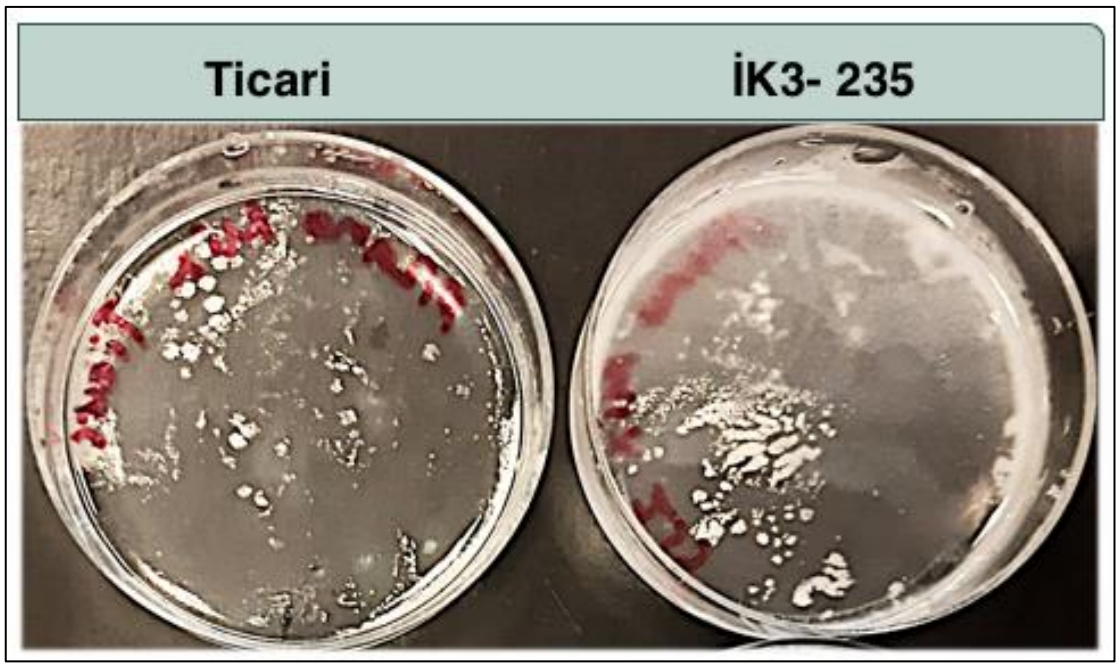


Şekil 11.6: PEG 20000 ve kitosanla hazırlanan hidrojel SEM fotoğrafları. A- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, B- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma, C- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, D- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma.

Bölüm 10.8.1'de bahsedilen yöntemle elde edilen hidrojelin SEM görüntüleri Şekil 11.6'da görülmektedir. Şekilde görülen sonuçlara göre, ticari kitosanla oluşturulan hidrojelde 1000X'te görülen düz yapı, yer yer İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojelde de görülmektedir. Yumru görülen yapılar ve gözenekler her iki yapıda da gözükse de İK3-235'ten elde edilen hidrojelde sert ve keskin görünen tuz kristalleri bulunmaktadır. Bu da yıkama aşamasında tuzların tamamen uzaklaştırılamamasından kaynaklanmaktadır. İzolatımızdan elde ettiğimiz kitosanın birkaç saflaştırma basamağı eklenmesinden sonra daha benzer sonuçlar vereceği düşünülebilir. Yine de iki örnekten de görülebileceği üzere hidrojel oluşturma metotumuz başarılı sonuçlar vermiştir.

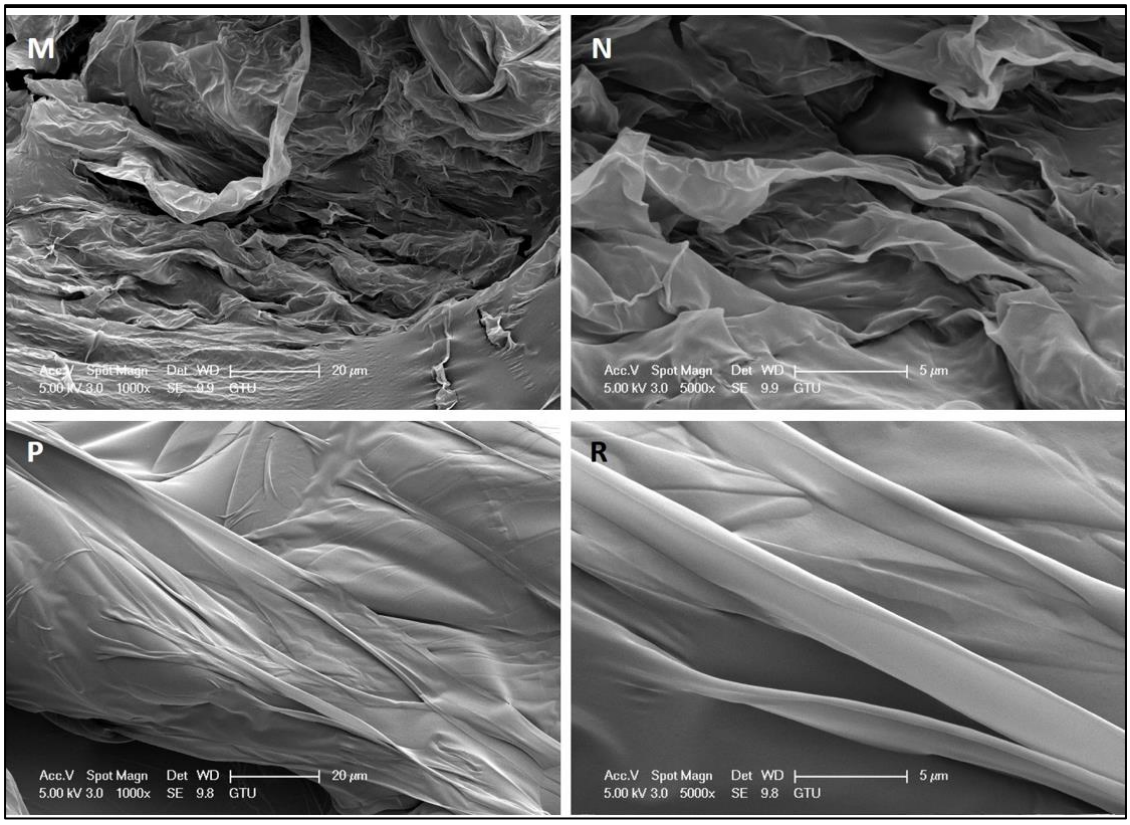
11.5.2. Soğutma Metotu ile Oluşturulan Hidrojel

Bölüm 10.8.2'de bahsi geçen Figueroa-Pizano ve arkadaşlarının 2020'deki çalışmasında uygulamış olduğu metot modifiyesiyle yapılan çalışmanın görüntüleri Şekil 11.6'da gösterilmiştir. Hem ticari kitosanda hem de İK3-235'ten elde edilen kitosanda ortaya biriken kısımlarda beyaz jelimsi yapı görünmektedir.



Şekil 11.7: Ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosanın -80 'de bekletildikten sonra.

Bölüm 10.8.2'de bahsedilen yöntemle soğutma yöntemiyle yapılan hidrojelin SEM görüntüleri Şekil 11.8'te verilmiştir. Ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosandan hidrojel karşılaştırıldığında ikisinde de jel oluşumu görülmektedir. Referans makaledeki yönteme göre daha kısa süren bir yöntem uygulansa da jel oluşumu oldukça iyi görülmektedir. Ticari kitosanla karşılaştırıldığında izolatımızın ürettiği daha ince ve daha pürüzsüz yüzeyli olarak görülmektedir. Saflaştırma basamağı uygulanmadan yapılmış olmasına rağmen oldukça iyi bir sonuç alınmıştır.



Şekil 11.8: PVA ve kitosanla hazırlanan hidrojel SEM fotoğrafları. M- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, N- Ticari kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma, P- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 1000X yakınlaştırma, R- İK3-235'ten elde edilen kitosanla oluşturulan hidrojel 5000X yakınlaştırma.

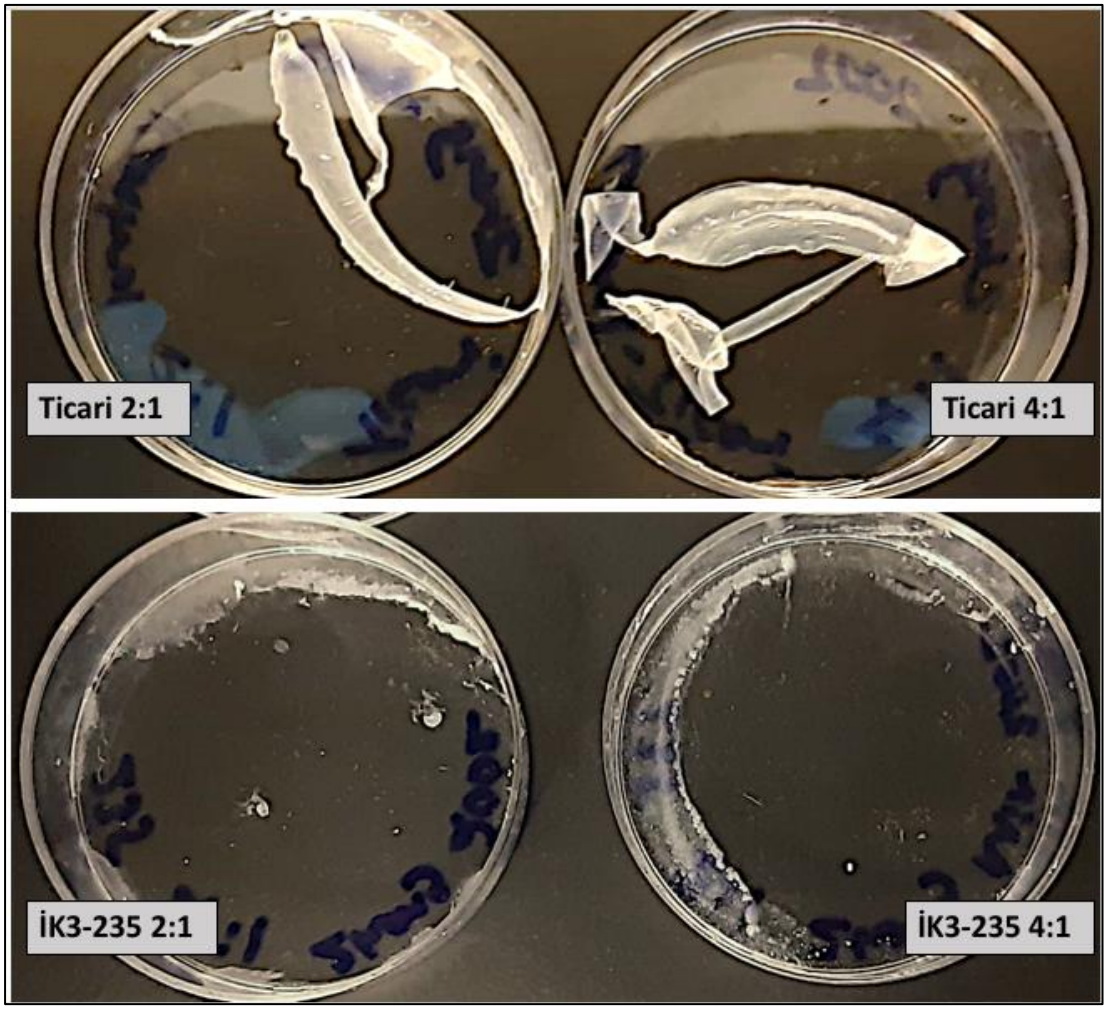
11.5.3. PEG/Kitosan'ın Farklı Derişimleriyle Hidrojel Oluşturulması

Bölüm 10.8.3'te açıklanan Zhang ve arkadaşlarının 2002'de yapmış olduğu çalışmanın modifiye edilmesiyle elde edilen hidrojel örnekleri Şekil 11.9'da görülmektedir. Bu sonuçlara göre Ticari kitosanın 2:1 ve 4:1 oranında PEG 20000 ile karıştırılmasıyla elde edilen hidrojeller oldukça beyaz bir tabaka oluşturmuş ve Petriden ayrılmıştır. İK3-235'ten üretilen kitosandan elde edilen hidrojel ise daha şeffaf görünümlü ve daha parçalı bir yapıya sahiptir.

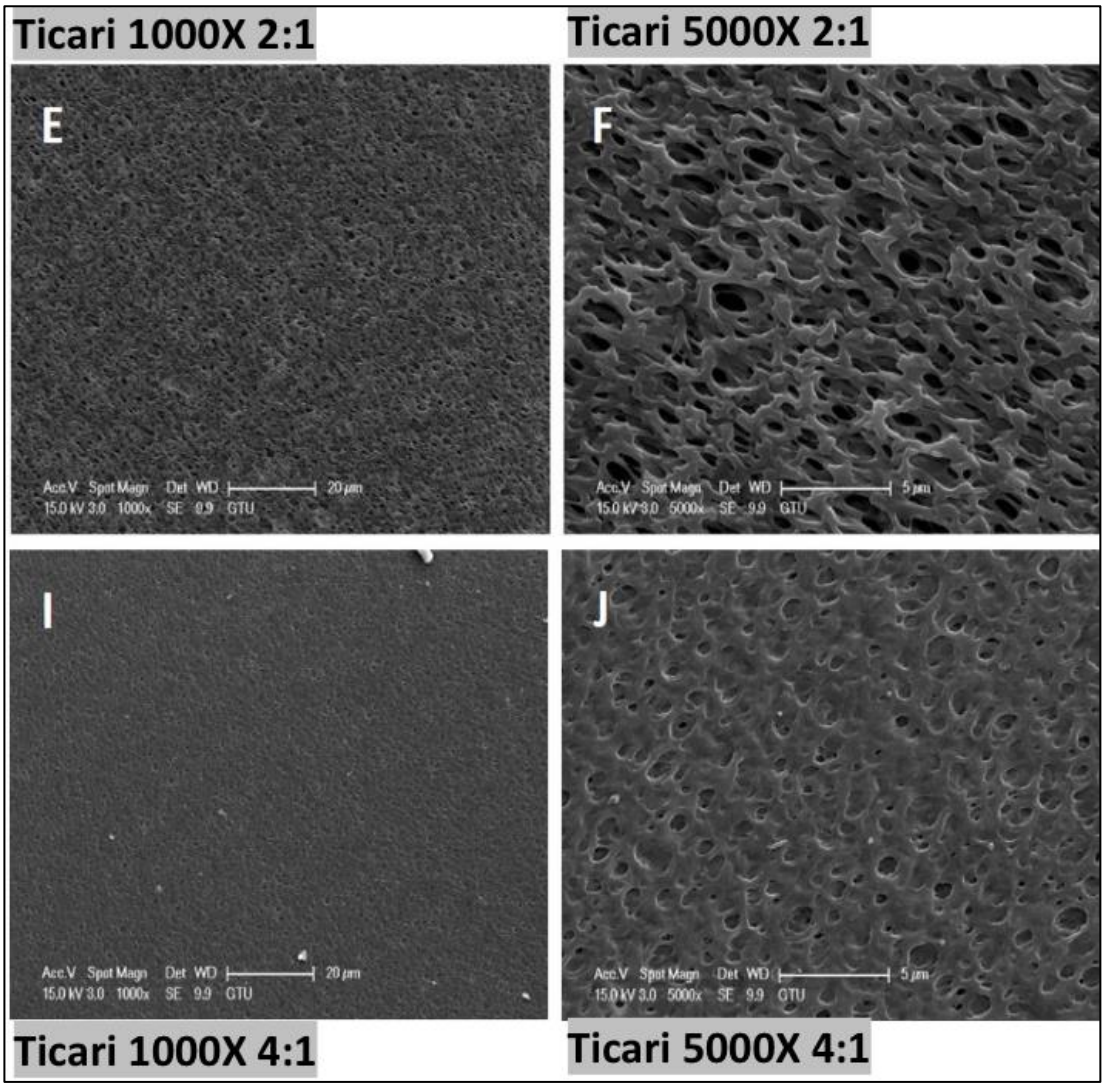
Şekil 11.10'da ise Ticari kitosanın 2:1 ve 4:1 oranında PEG 20000 ile karıştırılmasıyla oluşturulan hidrojellerin SEM fotoğrafları görülmektedir. SEM fotoğraflarında 1000X'te hemen hemen aynı görülse de 5000X yakınlaştırma yapıldığında gözenek boyutları arasındaki fark anlaşılabilir. 2:1 oranında karıştırılan

kitosan ve PEG daha büyük gözeneklere sahipken 4:1 oranındaki daha sıkı bir yapıya sahiptir.

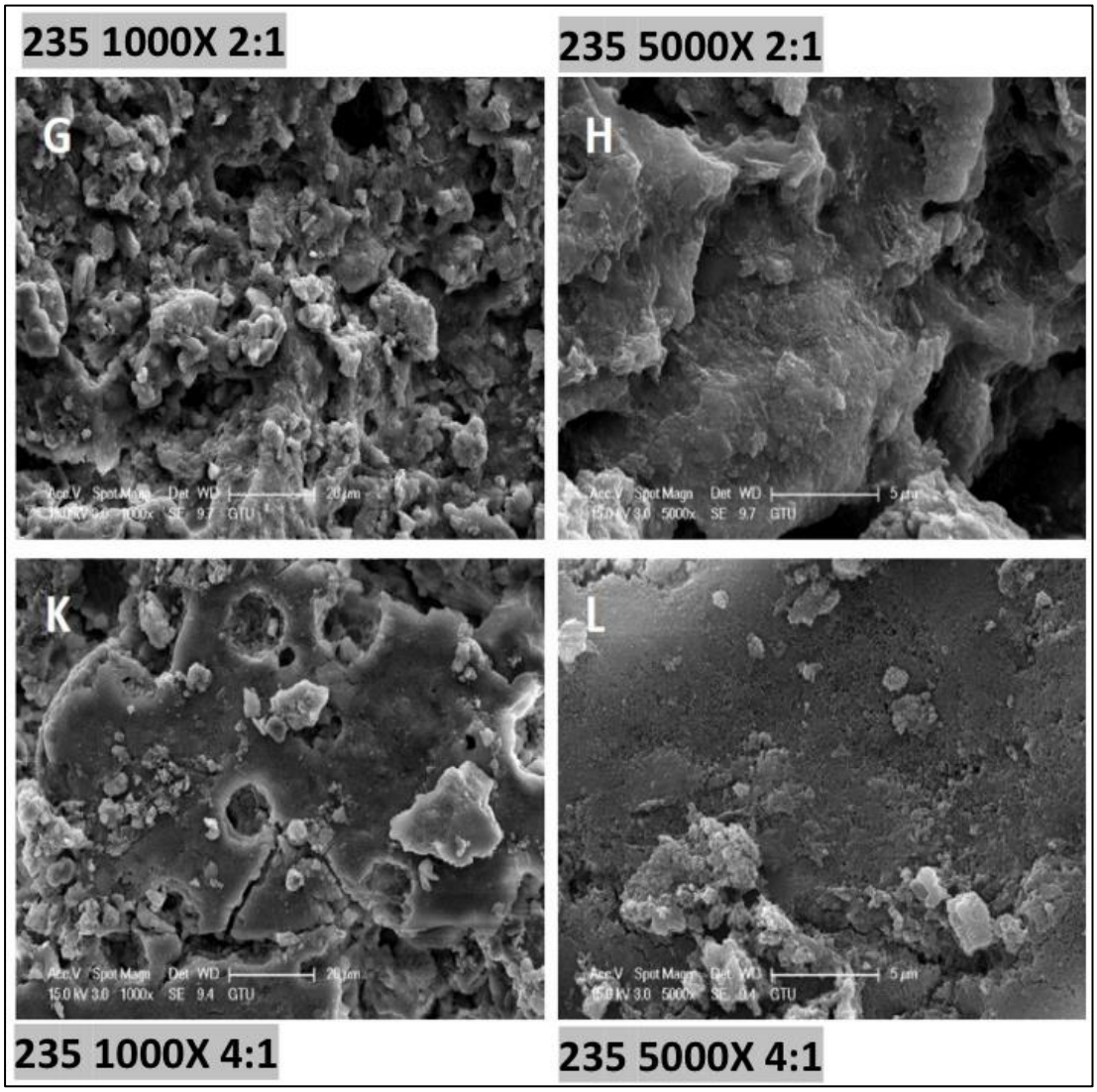
Şekil 11.11'de ise İK3-235'ten elde edilen kitosanın 2:1 ve 4:1 oranında PEG 20000 ile karıştırılmasıyla oluşturulan hidrojellerin SEM fotoğrafları görülmektedir. Ticari kitosana oranla her iki büyütmede de hem 2:1 hem de 4:1 oranında karıştırmada çok fazla tuz kalıntısı görülmektedir. 4:1 'deki görsellerde yüzey şekilleri ve gözenek boyutları ticari ile benzerlik göstermektedir. 2:1'de gözenek boyutları 4:1'e göre daha geniş olarak gözükmektedir. Bu da ticari kitosanla elde edilen hidrojelle benzerliğini desteklemektedir.



Şekil 11.9: Ticari kitosan ve İK3-235'ten elde edilen kitosan ve PEG'den hazırlanan hidrojellerin kuruduktan sonra Petri kaplarındaki görüntüsü.



Şekil 11.10: Ticari kitosan ve PEG'in 2:1 ve 4:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen hidrojelin 1000X ve 5000X'te çekilen SEM görüntülerinin karşılaştırılması.



Şekil 11.11: İK3-235'ten elde edilen kitosan ve PEG'in 2:1 ve 4:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen hidrojelin 1000X ve 5000X'te çekilen SEM görüntülerinin karşılaştırılması.

12. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada atık karides kabuklarında bulunan kitinin deasetilasyonunun enzimatik yöntemle bakterilerden faydalanarak yapılması asit-baz muamelesinin azaltılmasını dolayısıyla toksik etkinin engellenmesini ve medikal alanlarda kullanıma uygun olmasını hedeflemiştir. Kitosan eldesinde yaygın yöntem olan kimyasal üretim, daha uzun süren, daha fazla iş gücü gerektiren ve çevreye zararlı kimyasal atık salınımına neden olan bir yöntemken enzimatik üretim bu dezavantajları ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca kimyasal yöntemdeki verim, enzimatik yönteme göre daha düşüktür. Bu amaçla yapılan çalışmaların biyolojik üretime yönelmesi yüksek verim sağlarken daha çevreci bir yaklaşımdır. Kitosan elde etmedeki zorluklar minimalize edildikçe kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan deniz bakterilerinin doğal yaşam alanlarında da kitini sindirebilmek için enzimatik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Bu durum kitin içeren atıkların değerlendirilmesinde bu canlıların kullanılmasını avantajlı hale getirmektedir. Bizim bu çalışmada elde ettiğimiz kitosan ile hidrojellere yönelmemizin sebebi medikal anlamda kullanımını denemek olmuştur. Hidrojellerin kullanım alanları oldukça çeşitlidir.

Elde ettiğimiz kitosanın FT-IR ve iyodür çözeltisi ile tayin edilmesinden sonra hidrojel oluşturmak için kullanılması, medikal anlamda kullanıma uygunluğunun test edilmesi için yapılmıştır. Bu sebeple ticari kitosanla karşılaştırma yapılmıştır. Farklı yöntemlerin modifiye edilmesiyle elde edilen hidrojeller hemen hemen benzer yapılar sergilemiştir ve sonuçlar literatürlerle de desteklenmiştir.

Oluşturulan hidrojellerin SEM görüntüleri bize göstermiştir ki, PEG kullanılarak hazırlanan her iki hidrojel oluşturma yönteminde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Burada İK3-235'ten elde edilen kitosan ile hazırlanan hidrojellerde doğrudan besiyerinden izole edilmesinden dolayı tuz kalıntıları görülmüştür. Diğer yandan SEM ile görüntülemede yakalanan temiz yüzeylerin ticari kitosan ile oluşturulan hidrojellerle aynı özellikler sergilediği gözlemlenmiştir. Bu durum bize 235'in saflaştırma aşamasından sonra birden fazla yıkama yapılarak tuzların

uzaklaştırılması gerektiğini göstermektedir. Aynı zamanda her iki kitosanda da kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek boyutlarının değiştiği ve kullanım amacına göre bu yapılardaki boyutların ayarlanabileceği gösterilmiştir.

Soğutma metodu ile elde edilen hidrojellerin karşılaştırılmasında ise oldukça iyi sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir. Burada diğer yöntemlerdeki gibi saflaştırmadan kaynaklı tuz kalıntıları gözlemlenmemiştir. Daha gergin, pürüzsüz ve ince membran yapısı gözlemlenmiştir. Bu yöntemde ise gözenek boyutları oldukça küçük olduğu için fotoğraflarda görülememiştir.

Hidrojel oluşturulmasında kullanılan üç yöntem için de farklı kullanım alanlarına hizmet edeceği söylenebilir. Bizim çalışmamız için farklı yöntemlerde hidrojel oluşturabilmek kitosan elde ettiğimizi ve çeşitli alanlarda kullanım için uygun hale getirilebileceğini göstermiştir. Gelecekte hidrojel kullanımı yaygınlaşarak doku rejenerasyonu, yara örtüsü gibi medikal alanlar haricinde atık su arıtımı gibi farklı alanlarda kullanılabilir hale gelecektir.

KAYNAKLAR

Águila-Almanza E., Salgado-Delgado R., Vargas-Galarza Z., García-Hernández E., Hernández-Cocoletzi H., (2019), “Enzymatic depolymerization of chitosan for the preparation of functional membranes.”, Journal of Chemistry, 2019, 1–8

Ahmed E. M., (2015), “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.”, Journal of advanced research, 6(2), 105-121.

Ali A., Ahmed S., (2018), “A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery.”, International journal of biological macromolecules, 109, 273-286.

Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh, A., Davaran S., (2017), “Biodegradable and Biocompatible Polymers for Tissue Engineering Application: A Review.”, Artif. Cells Blood Substit. Biotechnology, 45, 185–192.

Bakshi P. S., Selvakumar D., Kadirvelu K., Kumar N. S., (2020), “Chitosan as an environment friendly biomaterial–a review on recent modifications and applications.”, International journal of biological macromolecules, 150, 1072-1083.

Bano I., Arshad M., Yasin T., Ghauri M. A., Younus M., (2017), “Chitosan: A potential biopolymer for wound management.”, International journal of biological macromolecules, 102, 380-383.

Bastiaens L., Soetemans L., D'Hondt E., Elst K., (2019), “Sources of chitin and chitosan and their isolation.”, Chitin and Chitosan: Properties and Applications, 1-34.

Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny R. J. E. J. O. P., (2004), “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.”, European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 57(1), 19-34.

Bhat P., Pawaskar G. M., Raval R., Cord-Landwehr S., Moerschbacher B., Raval K., (2019), “Expression of Bacillus licheniformis chitin deacetylase in E. coli pLysS: Sustainable production, purification and characterisation.”, International journal of biological macromolecules, 131, 1008-1013.

Bhattarai N., Gunn J., Zhang M., (2010), “Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery.”, Advanced drug delivery reviews, 62(1), 83-99.

Bindal S., Gupta R., (2016), “Thermo-and salt-tolerant chitosan cross-linked γ-glutamyl transpeptidase from Bacillus licheniformis ER15.”, International journal of biological macromolecules, 91, 544-553.

Broussignac P., (1968), “Chitosan: a natural polymer not wellknown by the industry.”, Chim Ind Genie Chim, 99:1241-1247.

Chen R. R., Silva E. A., Yuen W. W., Brock A. A., Fischbach C., Lin A. S., Guldberg R. E., Mooney D. J., (2007), “Integrated approach to designing growth factor delivery systems.”, The FASEB Journal, 21(14), 3896-3903.

Choi C., Nam J. P., Nah J. W., (2016), “Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials.”, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 33, 1-10.

Chopra H., Ruhi G., (2016), “Eco friendly chitosan: An efficient material for water purification.”, The pharma innovation, 5(1, Part B), 92.

Christodoulidou A., Bouriotis V., Thireos G., (1996), “Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of Saccharomyces cerevisiae.”, Journal of Biological Chemistry, 271(49), 31420-31425.

Cohen-Kupiec R., Chet I., (1998), “The Molecular Biology of Chitin Digestion.”, Current Opinion in Biotechnology, 9, 270-277.

Dai H., Li X., Long Y., Wu J., Liang S., Zhang X., Zhao N., Xu J., (2009), “Multi-membrane hydrogel fabricated by facile dynamic self-assembly.”, Soft Matter, 5(10), 1987-1989.

Denuziere A., Ferrier D., Damour O., Domard A., (1998), “Chitosan–chondroitin sulfate and chitosan–hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties.”, Biomaterials, 19(14), 1275-1285.

Diaz A., Rincon N., Escorihuela A., Fernandez N., Chacin E., Forster C. F. (1999), “A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela.”, Process Biochemistry, 35(3-4), 391-395.

Domalik-Pyzik P., Chłopek J., Pielichowska K., (2019), “Chitosan-based hydrogels: preparation, properties, and applications.”, Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series, ed. IH Mondal (Cham: Springer), 1665-1693.

Du H., Liu M., Yang X., Zhai G., (2015), “The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery.”, Drug discovery today, 20(8), 1004-1011.

El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Asselin A., (1992), “Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits.”, Phytopathology, 82, 398–402.

Elisseeff J., (2008), “Hydrogels -Structure starts to gel.”, Nature Materials, 7(4), 271-273.

Ferreira A. R., Alves V. D., Coelhoso I. M., (2016), “Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications.”, Membranes, 6(2), 22.

Foster A. B., Webber J. M., (1961), “Chitin”, In Advances in carbohydrate chemistry, Vol. 15, pp. 371-393.

Ghormade V., Kulkarni S., Doiphode N., Rajamohanan P. R., Deshpande M. V., (2010), “Chitin deacetylase: a comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications.”, Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2.

Goy R. C., Britto D. D., Assis O. B., (2009), “A review of the antimicrobial activity of chitosan.”, Polímeros, 19(3), 241-247.

Gül Şeker M., (2009), “Marmara Denizi ve Karadeniz’den izole edilen bakterilerin saflaştırılması ve tanımlanması”, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Haghighi H., Licciardello F., Fava P., Siesler H. W., Pulvirenti A., (2020), “Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications.”, Food Packaging and Shelf Life, 26, 100551.

Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajj R., Rinaudo M., Nasri M., Jellouli K., (2014), “Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources.”, International journal of biological macromolecules, 65, 298-306.

Hejazi R., Amiji M., (2003), “Chitosan-based gastrointestinal delivery systems.”, Journal of controlled release, 89(2), 151-165.

Huang H. L., YE C. Y., Yao Y. Y., (1992), “Screening and properties of chitin deacetylase from Bacillus subtilis.”, Microbiology.

Islam M. M., Shahruzzaman M., Biswas S., Sakib M. N., Rashid T. U., (2020), “Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review.”, Bioactive materials, 5(1), 164-183.

Islam M. M., Shahruzzaman M., Biswas S., Sakib M. N., Rashid,T. U., (2020) “Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review.”, Bioactive Materials, 5(1), 164-183.

Kardas I., Struszczyk M. H., Kucharska M., van den Broek L. A., van Dam,J. E., Ciechańska D., (2012), “Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications.”, The European polysaccharide network of excellence (EPNOE), 329-373.

Kaur K., Dattajirao V., Shrivastava V., Bhardwaj, U., (2012), “Isolation and characterization of chitosan-producing bacteria from beaches of Chennai, India.”, Enzyme research, 2012.

Kaur S., Dhillon G.S., (2013), “The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications.”, Critical reviews in Microbiology, 40(2), 155-175.

Key J., Park K., (2017), “Multicomponent, Tumor-Homing Chitosan Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy.”, International journal of molecular sciences, 18(3), 594.

Keyhani N. O., Roseman S., (1999), “Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria.”, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1473(1), 108-122.

Khoushab F., Yamabhai M., (2010), “Chitin research revisited.”, Marine drugs, 8(7), 1988-2012.

Khwaldia K., Basta A. H., Aloui H., El-Saied H., (2014), “Chitosan-caseinate bilayer coatings for paper packaging materials.”, Carbohydrate Polymers, 99, 508–516. h

Kou S. G., Peters L. M., Mucalo M. R., (2021), “Chitosan: A review of sources and preparation methods.”, International Journal of Biological Macromolecules, 169, 85-94.

Köping-Höggård M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Vårum K. M., Artursson P., (2001), “Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo.”, Gene therapy, 8(14), 1108-1121.

Köping-Höggård M., Vårum K. M., Issa M., Danielsen S., Christensen B. E., Stokke B. T., Artursson P., (2004), “Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers.”, Gene therapy, 11(19), 1441-1452.

Kravanja G., Primožič M., Knez Ž., Leitgeb M., (2019.) “Chitosan-based (Nano) materials for novel biomedical applications.”, Molecules, 24(10), 1960.

Kumar A. S., Malik, K., (2020), “Isolation and screening of microorganisms for chitosan production.”, IJCS, 8(1), 1408-1410.

Kuzgun N. K., Inanlı A. G., (2013), “Kitosan üretimi ve özellikleri ile kitosanın kullanım alanları.”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2), 16-21.

Lalov I. G., Guerginov I. I., Krysteva M. A., Fartsov K., (2000), “Treatment of waste water from distilleries with chitosan.”, Water Research, 34(5), 1503-1506.

Latgé J. P., (2007), “The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell.”, Molecular microbiology, 66(2), 279-290.

Lavall R. L., Assis O. B., Campana-Filho S. P., (2007), “β-Chitin from the pens of Loligo sp.: Extraction and characterization.”, Bioresource Technology, 98(13), 2465-2472.

Lavertu, M, Methot S., Tran-Khanh N., Buschmann M. D., (2006), “High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of

molecular weight and degree of deacetylation.", Biomaterials, 27(27), 4815-4824.

Li M., Han M., Sun Y., Hua Y., Chen G., Zhang L., (2019), "Oligoarginine mediated collagen/chitosan gel composite for cutaneous wound healing.", International journal of biological macromolecules, 122, 1120-1127.

Liu L., Gao Q., Lu X., Zhou H., (2016), "In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration.", asian journal of pharmaceutical sciences, 11(6), 673-683.

Lu Y, Sun Q, She X, Xia Y, Liu Y, Li J, Yang D, (2013), "Fabrication and characterisation of α-chitin nanofibers and highly transparent chitin films by pulsed ultrasonication.", Carbohydrate polymers, 98(2), 1497-1504.

Madihally S.V., Matthew H.W., (1999) "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering.", Biomaterials 20, 1133–1142.

Marpu S.B., Benton E.N., (2018) "Shining Light on Chitosan: A Review on the Usage of Chitosan for Photonics and Nanomaterials Research.", International Journal of Molecular Sciences, 19(6), 1795.

Merzendorfer H., (2011)., "The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences.", European journal of cell biology, 90(9), 759-769.

Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K., (2017), "Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications.", International Journal of Biological Macromolecules, 105, 1358–1368.

Nadarajah K., Prinyawtwatkui W., No H.K., Sathivel S., Xu, Z., (2006) "Sorption behavior of crawfish chitosan films as affected by chitosan extraction processes and solvent types.", Journal of food science, 71(2), E33-E39.

Narayanan K., Parameswaran B., Pandey A., (2016), "Production of chitin deacetylase by Aspergillus flavus in submerged conditions.", Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(5), 501-508.

Nie J., Pei B., Wang Z., Hu, Q., (2019), "Construction of ordered structure in polysaccharide hydrogel: A review.", Carbohydrate polymers, 205, 225-235.

Nie J., Wang Z., Hu Q., (2016), "Chitosan hydrogel structure modulated by metal ions.", Scientific reports, 6(1), 1-8.

Niepel M. S., Ekambaram B. K., Schmelzer C. E., Groth T., (2019), "Polyelectrolyte multilayers of poly (l-lysine) and hyaluronic acid on nanostructured surfaces affect stem cell response.", Nanoscale, 11(6), 2878-2891.

Ofori-Kwakye K., Mfoafo K. A., Kipo S. L., Kuntworbe N., El Boakye-Gyasi M., (2016), "Development and evaluation of natural gum-based extended release

matrix tablets of two model drugs of different water solubilities by direct compression.", Saudi Pharmaceutical Journal, 24(1), 82-91.

Panchani D., Pandya N., (2020)," Isolation and characterization of chitosan producing bacteria from soil.", International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR), 7(2), 215-220.

Park P.J., Koppula S., Kim S.K., (2010), "Antioxidative activity of chitosan, chitooligosaccharides and their derivatives. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives.", CRC Press, 2010, 241–250.

Peers S., Montembault A., Ladavière C., (2020), "Chitosan hydrogels for sustained drug delivery.", Journal of Controlled Release, 326, 150-163.

Pellá M. C., Lima-Tenório M. K., Tenório-Neto E. T., Guilherme M. R., Muniz E. C., Rubira A. F., (2018), "Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications.", Carbohydrate Polymers, 196, 233-245.

Pelletier A., Sygusch J., (1990), "Purification and characterization of three chitosanase activities from Bacillus megaterium P1.", Applied and Environmental Microbiology, 56(4), 844-848.

Plassard C., Mousan D., Salsac L., (1983), "Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (Pinus pinaster).", Pisolithus tinctorius:valuation de la masse myc.lienne et de la mycorhization. Can. J. Bot., 61, 692–699 in French.

Prashanth K. H., Tharanathan R. N., (2007), "Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview.", Trends in food science & technology, 18(3), 117-131.

Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X., (2004), "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles.", Carbohydrate research, 339(16), 2693-2700.

Ravikumar M., Perinbam, K., (2016), "Production, optimization and characterization of chitin deacetylase from marine bacteria Bacillus cereus TK19.", J Acad Indus Res, 5, 72-76.

Renault F., Sancey B., Charles J., Morin-Crini N., Badot P.M., Winterton P., Crini G., (2009), "Chitosan flocculation of cardboard-mill secondary biological wastewater.", Chemical Engineering Journal, 155(3), 775-783.

Rinaudo M., (2006), "Chitin and chitosan: Properties and applications.", Progress in polymer science, 31(7), 603-632.

Rocha J., Garcia-Carreño F. L., Muhlia-Almazán A., Peregrino-Uriarte A. B., Yépiz-Plascencia G., Córdova-Murueta J. H., (2012), "Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei during the molting cycle.", Aquaculture, 330, 111-115.

Ruiz G.A.M, Corrales H.F.Z, (2017), “Chitosan, chitosan derivatives and their biomedical applications,”, Biological activities and application of Marine polysaccharides 87.

Schmitz C., González Auza L., Koberidze D., Rasche S., Fischer R., Bortesi L., (2019), “Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: current status and future prospects.”, Marine drugs, 17(8), 452.

Singh A., Narvi S. S., Dutta P. K., Pandey N. D., (2006) “External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde,”, Bull. Mater. Sci., vol. 29, no. 3, pp. 233–238.

Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. (2004).” Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs.”, International journal of pharmaceutics, 274(1-2), 1-33.

Sudarshan N. R., Hoover D. G., Knorr, D., (1992), “Antibacterial action of chitosan.”, Food Biotechnology, 6(3), 257-272.

Takeda M., Abe E., (1962), “Isolation of crustacean chitin: Decalcification by disodium ethylenediaminotetrracetate and enzymic hydrosis of incidental proteins.”, Norisho Suisan Koshusho Kenkyu Hokoku 11: 339–406.

Takeda M., Katsuura H., (1964), “Purification of king crab chitin.”, Suisan Daigaku Kenkyu Hokoku 13: 109–116.

Tao F., Cheng Y., Shi X., Zheng H., Du Y., Xiang W., Deng H., (2020) “Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering.”, Carbohydrate Polymers, 230, 115658.

Thomas S., Durand D., Chassenieux C., Jyotishkumar P., (2013), “Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks.”, John Wiley & Sons.

Thomas S., Pius A., Gopi, S. (Eds.), (2020), “Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties.”, Elsevier.

Tian L., Singh A., Singh A. V., (2020), “Synthesis and characterization of pectin-chitosan conjugate for biomedical application.”, International Journal of Biological Macromolecules.

Tronsmo A., Skaugrud O., Harman,G.E., “Use of chitin and chitosan in biological control of plant diseases.”, In: Chitin Enzymology. Eur. Chitin Soc., 1993, 265–270.

Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., (2000), “Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology.”, Trends in biotechnology, 18(7), 305-312.

Tsurkan M. V., Voronkina A., Khrunyk Y., Wysokowski M., Petrenko I., Ehrlich, H., (2021), “Progress in chitin analytics.”, Carbohydrate Polymers, 252, 117204.

Venkatesan J., Bhatnagar I., Kim S. K., (2014) “Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering.”, Marine drugs, 12(1), 300-316.

Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K., (2020), “Chitosan derivatives and their application in biomedicine.”, International journal of molecular sciences, 21(2), 487.

Wu Z. L., Gong J. P., (2011), “Hydrogels with self-assembling ordered structures and their functions.”, Npg Asia Materials, 3, 57-64.

Yu X., Guo L., Liu M., Cao X., Shang S., Liu,Z., Tian L., (2018), “Callicarpa nudiflora loaded on chitosan-collagen/organomontmorillonite composite membrane for antibacterial activity of wound dressing.”, International journal of biological macromolecules, 120, 2279-2284.

Zeng M., Fang Z., Xu C., (2004), “Novel method of preparing microporous membrane by selective dissolution of chitosan/polyethylene glycol blend membrane.”, Journal of applied polymer science, 91(5), 2840-2847.

Zhao Y., Park R. D., Muzzarelli R. A., (2010), “Chitin deacetylases: properties and applications.”, Marine drugs, 8(1), 24-46.

Zhou G., Zhang H., He Y., He L., (2010), “Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization.”, African Journal of Microbiology Research, 4(23), 2597-2603.

Figueroa-Pizano M. D., Vélaz I., Martínez-Barbosa M. E., (2020), “A freeze-thawing method to prepare chitosan-poly (Vinyl alcohol) hydrogels without crosslinking agents and diflunisal release studies.”, JoVE (Journal of Visualized Experiments), (155), e59636.

Zhang M., Li X. H., Gong Y. D., Zhao N. M., Zhang X. F., (2002), “Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG.”, Biomaterials, 23(13), 2641-2648.

ÖZGEÇMİŞ

Çisel Dikkulak Bayram, 2013 yılında başladığı Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2019 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Yüksek Lisans eğitimi ile birlikte, Temmuz 2021'den beri Klinik Araştırma Saha Koordinatörü olarak Ethic CRO'da, Syneos, Pfizer, Johnson & Johnson vd. firmaların sponsorluğunda onkoloji, aşı ve gastroenteroloji çalışmalarında görev almaktadır.

EKLER

EK A. Tez çalışmasında yapılan yayın ve sunumlar.

Dikkulak Bayram Ç., (2022), “Marmara Denizi ve İzmit Körfezinden Alınan İzolat Örnekleriyle Karides Kabuğu Atıklarından Bakteriyal Kitosan Eldesi ve Hidrojel Olarak Kullanımı”, 6. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli, Türkiye, 01-02 Haziran.

EK B. Bakterilerin büyütülmesi için hazırlanan besiyerinin içeriği.

Tablo EK B.1. Tryptic Soy Broth besiyeri içeriği.

Malzeme	Miktar
Tripton	10 gr
NaCl	10 gr
Yeast Extract	5 gr
dH_2O	1 L

EK C. Çalışmada kullanılan cihazlar

Şekil C1. 1. İnkübatör: Edmund-Bühler TH 15 inkübatör 5-50 °C, 0- 500 rpm aralığında çalışmaktadır.

Şekil C1. 2. Santrifüj: Beckman Coulter Allegra 25r santrifüj 0-15000 rpm ve 2-40 °C aralığında çalışır.

Şekil C1. 3. Santrifüj: Gyrozen 1248 R santrifüj, 0-4000 rpm 4-40 °C aralığında çalışır.

Şekil C1. 4. Etüv: Binder ED 115 Etüv Avantgarde Line With Natural Convection, 5-300 °C aralığında çalışır.

Şekil C1. 5. Manyetik Karıştırıcı: IKA RCT Classic, 50-360 °C , 50-1500 rpm aralığında çalışır.

Şekil C1. 6. -80 °C Dondurucu: Thermo Scientific™ Forma™ 88000 Series -86°C Upright Ultra-Low Temperature Freezers, -50- -86 °C aralığında çalışır.