Fungal Bir Miselyal Atığın Kitosan Kaynağı, Vermikompost Hammaddesi ve Besiyeri Bileşeni Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması

Burcu Atlı

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2022

Investigation of the Potential of a Fungal Mycelial Waste as a Source of Chitosan, Raw Material of Vermicompost and Component of Media

Burcu Atlı

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

June 2022

Fungal Bir Miselyal Atığın Kitosan Kaynağı, Vermikompost Hammaddesi ve Besiyeri Bileşeni Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması

Burcu Atlı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Haziran 2022

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa Yamaç danışmanlığında hazırlamış olduğum "Fungal Bir Miselyal Atığın Kitosan Kaynağı, Vermikompost Hammaddesi ve Besiyeri Bileşeni Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması" başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 02/06/2022

Burcu Atlı

ÖZET

Bu çalışma, günümüzde gelişen yeni teknolojilerin getirdiği miselyal atıkların, çeşitli katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında endüstriyel bir atık olan *Rhizomucor miehei* mikroorganizmasının atık miselyal biyokütlesinden çok fonksiyonlu fungal kitosan eldesi, vermikompost üretiminde kullanım potansiyeli ve mikrobiyolojik besiyeri bileşeni olan pepton alternatifi olarak kullanım olanakları araştırılmıştır.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda 70,6 mg/g kitosanın eldesi sağlanmıştır. Elde edilen kitosanın, deasetilasyon derecesi (%78), moleküler ağırlığı (14kDa), FT-IR, TGA analizleri gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Biyolojik aktiviteleri için antimikrobiyal ve yara iyileştirici aktivitesi ortaya konmuştur. Antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip biyofilm olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Vermikompost çalışmasında, elde edilen K3 ve K4 vermikompostlarının %20 torfu ile uygulanmasında marul bitkisinin kalitesi ve veriminin üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Son olarak atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı mekanik hücre lizis yönteminin istatistiksel optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimize koşullarda elde edilen proteince zengin fungal ekstraktların (U, B, D) karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların besiyeri bileşeni olarak test edilen konsantrasyonlarda hem katı hem de sıvı besiyerlerinde bakteriler, mayalar ve küflerin üremesinde etkili oldukları belirlenmiştir. Ticari kullanılan ürünlerle benzer etkilere sahip oldukları ortaya konulmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmalar ile literatürde ilk kez atık *R. miehei* miselyal atığının katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda bu tarz atıkların katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi ile biyoekonomiye kazanımlarının mümkün olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Rhizomucor miehei*, fungal kitosan, vermikompost, küf ekstraktı

SUMMARY

The objective of this study was carried out applications of converting the mycelial wastes brought by the new technologies developing today into various products with high value-added products. In the scope of this study, the possibilities of obtaining multifunctional fungal chitosan from the waste mycelial biomass of the *Rhizomucor miehei*, which is an industrial waste, its potential for use in vermicompost production, and its use as an alternative to peptone, which is microbiological media ingredient, were investigated.

Fungal chitosan (70.6 mg/g) was obtained from waste *R. miehei* biomass under optimized conditions. The obtained chitosan was characterized by deacetylation degree (78%), molecular weight (14kDa), FT-IR, TGA analysis. Antimicrobial and wound healing activity have been demonstrated for their biological activities. Its potential for use as a biofilm with antioxidant and antimicrobial activity has been determined. In the vermicompost study, it was determined that the application of the obtained K3 and K4 vermicomposts with 20% peat had positive effects on the quality and yield of the lettuce plant. Finally, statistical optimization of three different mechanical cell lysis methods was performed from waste *R. miehei* biomass. Studies have been carried out on the characterization of protein-rich fungal extracts (U, B, D) obtained under optimized conditions. It was determined that the obtained extracts were effective in the growth of bacteria, yeasts and molds in both solid and liquid media at the tested concentrations as a media component. It has been demonstrated that they have similar effects with commercially used products.

With the studies carried out, for the first time in the literature, studies have been carried out to transform waste *R. miehei* mycelial waste into products with high added value. As a result of these studies, it has been shown that it is possible to gain bioeconomy by transforming such wastes into products with high added value.

Keywords: *Rhizomucor miehei*, fungal chitosan, vermicompost, mold extract

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xxiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 4
2.1. Biyoekonomi 4
2.2. Endüstriyel Atıklar 6
2.3. Kitosan 8
2.4. Vermikompost 11
2.5. Mikrobiyolojik Besiyeri Bileşeni 14
3. MATERYAL VE YÖNTEM 16
3.1. Materyal 16
3.1.1. Atık *R. miehei* Biyokütlesi 16
3.1.2. Ticari Kitosan 16
3.1.3. Ahır Gübresi 16
3.1.4. *E. fetida* Solucanı 16
3.1.5. Test Bitkisi (Marul) 17
3.1.6. Test Mikroorganizmaları 17
3.2. Yöntem 17
3.2.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi 17
3.2.1.1. *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonu 17
3.2.1.2. Fungal kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu 19
3.2.2. Optimize koşullarda elde edilen kitosanın karakterizasyonu 21
3.2.2.1. Çözünebilirlik testi 21
3.2.2.2. FT-IR analizi 21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2.3. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi.....22
3.2.2.4. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....22
3.2.2.5. XRD (Tek kristal) ışını analizi.....23
3.2.2.6. SEM Analizi.....23
3.2.2.7. Elemental Analiz.....23
3.2.2.8. Termogravimetrik (TGA) Analizi.....24
3.2.3. Kitosanın biyolojik aktivitesinin belirlenmesi 24
3.2.3.1. Antimikrobiyal aktivite.....24
3.2.3.2. Yara iyileştirici aktivite.....25
3.2.4. Fungal kitosan içeren filmlerin eldesi, fiziksel ve biyolojik özellikleri....27
3.2.4.1. Fiziksel özellikler.....28
3.2.4.2. Kitosan filmin biyolojik aktiviteleri.....29
3.2.5. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi ve in vivo denemesi.....33
3.2.5.1. Vermikompost üretimi.....34
3.2.5.2. Vermikompost karışımlarının fiziksel ve kimyasal analizleri.....36
3.2.6. Vermikompostun Sera koşullarında *in vivo* denemesi.....37
3.2.6.1. Ortam hazırlığı ve dikim.....37
3.2.6.2. Fidelerde yapılan ölçümler.....38
3.2.7. Atık *R. miehei* biyokütlesinden mikrobiyolojik besiyeri bileşeni üretimi.39
3.2.7.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden protein ekstraksiyonu.....39
3.2.7.2. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin karakterizasyonu.....48
3.2.7.3. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi.....50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....53
4.1. *R. miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi.....53
4.1.1. *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonu.....55
4.1.2. Fungal kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu.....55
4.1.3. Optimize koşullarda elde edilen kitosan karakterizasyonu.....64

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.3.1. Çözünebilirlik testi....64
4.1.3.2. FT-IR analizi....65
4.1.3.3. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi....65
4.1.3.4. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi....67
4.1.3.5. XRD (Tek kristal) ışını analizi....67
4.1.3.6. SEM Analizi....68
4.1.3.7. Elemental Analiz....69
4.1.3.8. Termogravimetrik (TGA) Analizi....70
4.1.4. Kitosanın biyolojik aktiviteleri....72
4.1.4.1. Antimikrobiyal aktivitesi....73
4.1.4.2. Yara iyileştirici aktivitesi....77
4.1.5. Fungal kitosan içeren filmlerin eldesi, fiziksel ve biyolojik özellikleri…83
4.1.6. Fiziksel özellikleri....85
4.1.6.1. Suda çözünürlük testi (Sw)....85
4.1.6.2. Su iticilik testi....87
4.1.6.3. Elastiklik testi....87
4.1.7. Kitosan filmin biyolojik aktiviteleri....88
4.1.7.1. Filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri....89
4.1.7.2. Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri....93
4.2. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi ve in vivo denemesi....97
4.2.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi....97
4.2.2. Vermikompost karışımlarının fiziksel ve kimyasal analizleri....101
4.2.3. Vermikompostun sera koşullarında *in vivo* denemesi....108
4.3. Atık *R. miehei* biyokütlesinden mikrobiyolojik besiyeri bileşeni üretimi....118
4.3.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden protein ekstraksiyonu....118
4.3.1.1. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu....119
4.3.1.2. Dondurma-çözdürme ile ekstraksiyonun optimizasyonu....126
4.3.1.3. Boncuk ile ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu....131
4.3.2. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin karakterizasyonu....140

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.2.1. Toplam kül ve kuru madde miktarının belirlenmesi.....140
4.3.2.2. Toplam şeker miktarının belirlenmesi.....140
4.3.2.3. Toplam azot ve aminoasit içeriğinin belirlenmesi.....143
4.3.2.4. Yağ asidi içeriğinin belirlenmesi.....146
4.3.2.5. Moleküler ağırlık dağılımının analizi.....151
4.3.3. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi.....152
4.3.3.1. Sıvı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması.....153
4.3.3.2. Katı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması.....165
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....172
KAYNAKLAR DİZİNİ.....175
EK AÇIKLAMALAR.....197
Ek Açıklamalar-A: Ticari kitosan spesifikasyonu.....197

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

1.1. Fermentasyon sonrası proses....2

2.1. Doğrusal ve döngüsel ekonomi....5

2.2. Atık yönetimi piramidi....5

2.3. *Rhizomucor miehei* mikroskobik görüntüsü....8

2.4. Kitin ve kitosan kimyasal yapıları....9

2.5. *Eisenia fetida* türüne ait solucan ve kokonu....12

3.1. Atık fungal biyokütleden kitosan ekstraksiyonu....18

3.2. Atık *R. miehei* kuru biyokütlesinden kitosan eldesi....19

3.3. Yara oluşturmak için kullanılan tıpalar....26

3.4. Kitosan içeren filmlerin eldesi....27

3.5. Islatmaya bağlı su iticilik testi....29

3.6. ISO 22196 standart yöntemi....30

3.7. Yıkanmış atık fungal biyokütle....34

3.8. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost eldesi....35

3.9. Besiyeri içeriğinde azot kaynağı olarak kullanılmak üzere atık *R. miehei*'den protein kaynağı eldesi....39

3.10. BSA ile oluşturulan standart eğri....40

3.11. Boncuk çeşitleri....46

3.12. Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen fungal ekstrakt tozları....48

4.1. Test edilen değişkenlerin standardize edilmiş etkilerinin Pareto grafiği ile ifadesi....59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.2. Elde edilen fungal kitosanın gözlenen ve beklenen değerleri.....60

4.3. Test edilen değişkenlerin ikili etkileşim grafikleri.....62

4.4. Kitosan FTIR spektrumu.....65

4.5. Ticari kitosanın XRD spektrumu.....68

4.6. Fungal kitosanın XRD spektrumu.....68

4.7. Fungal kitosanın SEM görüntüleri.....69

4.8. Fungal kitosanın TGA görüntüsü.....71

4.9. Ticari kitosanın TGA görüntüsü.....71

4.10. Fungal kitosan ile ticari kitosanın karşılaştırması.....72

4.11. Kitosanın antibakteriyal etki mekanizmaları.....74

4.12. Fungal kitosan (K-1) ile ticari kitosanın (K-2) bakteri ve maya test mikroorganizmalarına karşı MİK görüntüsü.....74

4.13. Ticari ve fungal kitosanın antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması.....76

4.14. Fungal kitosan ile ticari kitosanın *A. brasiliensis* küfüne karşı MİK görüntüsü.....76

4.15. Ticari (a) ve fungal kitosanın (b) HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....78

4.16. Ticari ve fungal kitosanın yara kapatma yüzdelerinin karşılaştırılması.....79

4.17. Fungal kitosanın HaCaT keratinosit hücre kültüründe oluşturulan yara üzerinde zamana bağlı etkisi.....80

4. 18. Ticari kitosanın HaCaT keratinosit hücre kültüründe oluşturulan yara üzerinde zamana bağlı etkisi.....81

4.19. Hoechst floresan boyası ile boyama sonrası aynı konsantrasyonlardaki fungal ve ticari kitosanların karşılaştırılması.....82

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.20. Jelatin (a) ve nişasta (b) ile oluşturulan negatif kontrol film numuneleri.....84

4.21. Kitosan içeren film numuneleri.....85

4.22. Kitosan içeren filmlerin suda çözünürlük testi.....86

4.23. Suda çözünürlük sonuçları.....86

4.24. Bazı film numunelerinin su iticilik testi görüntüleri.....87

4.25. Kitosan içeren filmlerin agar plak üzerinde antimikrobiyal etkisi.....90

4.26. Film numunelerinin antiküf aktivitesi.....91

4.27. Filmlerin $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesi.....95

4.28. Filmlerin metal şelatlama aktivitesi.....96

4.29. Atık *R. miehei* biyokütlesinin farklı oranlarda ahır gübresi ile karıştırılmasıyla elde edilen vermikompostlar.....97

4.30. K1 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi.....98

4.31. K2 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi.....98

4.32. K3 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi.....99

4.33. K4 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi.....99

4.34. Test edilen karışımlardaki solucan sayısı ve ağırlıkları.....100

4.35. Vermikompost karışımlarının zamana bağlı pH değişimi.....102

4.36. Elde edilen vermikompostlardaki EC değeri değişimleri.....103

4.37. Yetiştirme ortamlarında büyüyen marul fideleri.....108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.38. Ultrasonikasyonla homojenizasyon yönteminin PB Pareto grafiği.....121

4.39. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde beklenen ve gözlenen değerler.....123

4.40. Ultrasonikasyonla homojenizasyon yönteminin BB Pareto grafiği.....124

4.41. Ultrasonikasyonla homojenizasyon yöntemindeki önemli üç değişkenin yanıt yüzey grafikleri.....125

4.42. Dondurma-çözdürme yönteminin PB Pareto grafiği.....127

4.43. Dondurma-çözdürme yönteminde beklenen ve gözlenen değerler.....129

4.44. Dondurma-çözdürme yönteminin BB Pareto grafiği.....130

4.45. Dondurma çözdürme yöntemindeki önemli üç değişkenin yanıt yüzey grafikleri...131

4.46. Boncuk tipinin elde edilen protein miktarına eldesi.....132

4.47. Boncukla ekstraksiyon yönteminin PB Pareto grafiği.....134

4.48. Boncukla ekstraksiyon yönteminin BB Pareto grafiği.....136

4.49. Boncukla ekstraksiyon yönteminde beklenen ve gözlenen değerler.....137

4.50. Boncukla ekstraksiyon yöntemindeki önemli üç değişkenin yanıt yüzey grafikleri.138

4.51. Glikoz ile oluşturulan standart eğri.....141

4.52. Toplam şeker miktarları.....142

4.53. FSA yönteminde meydana gelen renk değişimleri.....142

4.54. Toplam şeker miktarlarının karşılaştırması.....143

4.55. Toplam azot miktarı sonuçları.....144

4.56. Atık *R. miehei* biyokütlesinin GC kromatogramı.....147

4.57. B-fungal ekstrakt GC kromatogramı..... 148

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.58. D-fungal ekstrakt GC kromatogramı..... 149

4.59. U-fungal ekstrakt GC/ kromatogramı.....150

4.60. Proteinlerin moleküler ağırlık dağılımları.....151

4.61. Otoklav sonrası besiyerlerinin (%1 konsantrasyonlarında) görünümü.....153

4.62. Standart kullanılan besiyerlerinin test mikroorganizmalarına etkisi.....154

4.63. Küflerin inkübasyon sonrası besiyerlerinin ortalama pH değerleri.....163

4.64. *A. brasiliensis* küfünün koloni büyüme çapı.....166

4.65. *A. brasiliensis* küfünün miselyal büyüme hızı.....167

4.66. *A. brasiliensis* küfünün 2. ve 7. gün morfolojik görünümleri.....167

4.67. *A. flavus* küfünün koloni büyüme çapı.....168

4.68. *A. flavus* küfünün miselyal büyüme hızı.....169

4.69. *A. flavus* küfünün 2. ve 7. gün morfolojik görünümleri.....169

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3.1. Kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu için kullanılan değişkenler ve seviyeleri....20

3.2. Kitosan ekstraksiyonunun optimizasyon tasarımı....20

3.3. Farklı formülasyonlar ile oluşturulmuş film denemeleri....27

3.4. Ahır gübresi ile fungal biyokütle karışımları....35

3.5. Bradford yönteminin uygulanması....40

3.6. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri....42

3.7. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB tasarımı....42

3.8. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri....42

3.9. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı....43

3.10. Dondurma çözdürme yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri....43

3.11. Dondurma çözdürme yönteminde kullanılan PB tasarımı....44

3.12. Dondurma çözdürme yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri....44

3.13. Dondurma çözdürme yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı....45

3.14. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri....46

3.15. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB tasarımı....46

3.16. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri....47

3.17. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı....47

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.1. Fungal ve deniz canlıları kaynaklarının karşılaştırılması.....53

4.2. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen kitosan miktarları.....54

4.3. İstatistiksel tasarım ile oluşturulan farklı ekstraksiyon yöntemleri ve sonuçları.....56

4.4. Fungal kitosan ekstraksiyonundaki değişkenlerin etkileri.....58

4.5. Fungal kitosan ekstraksiyonunda kullanılan tasarımın istatiksel analiz sonucu.....58

4.6. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen kitosanların deasetilasyon dereceleri.....66

4.7. Elementel analiz sonuçları.....70

4.8. Minimum inhibisyon konsantrasyonları.....75

4.9. Elde edilen filmlerin elastiklik özellikleri.....88

4.10. Film numunelerinin yüzeylerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları.....92

4.11. DPPH radikali süpürme aktivitesi sonuçları.....94

4.12. Atık *R. miehei* biyokütlesinin ve AG-Rivasol® ahır gübresinin özellikleri.....101

4.13. Elde edilen vermikompostlardaki mineral madde değişimleri.....104

4.14. Elde edilen vermikompostların zamana bağlı C/N oranları.....105

4.15. Elde edilen vermikompostlardaki mineral madde değişimleri.....106

4.16. Elde edilen vermikompostlardaki mineral madde değişimleri.....107

4.17. Yetiştirme ortamlarının pH değerleri.....109

4.18. Yetiştirme ortamlarının EC değerleri.....109

4.19. Tohum çıkış oranı ölçüm sonuçları.....110

4.20. Marul fide boyu ölçüm sonuçları.....111

4.21. Marul yaprak sayısı ölçüm sonuçları.....112

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.22. Klorofil indeks miktarı (CCI) ölçüm sonuçları....113

4.23. Toprak üstü yaş ağırlık ölçüm sonuçları....113

4.24. Toprak üstü kuru ağırlık ölçüm sonuçları....114

4.25. Kök yaş ağırlık ölçüm sonuçları....115

4.26. Kök kuru ağırlık ölçüm sonuçları....115

4.27. Renk L* değeri ölçüm sonuçları....116

4.28. Renk a* değeri....117

4.29. Renk b* değeri ölçüm sonuçları....117

4.30. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve ekstrakte edilen protein miktarları....120

4.31. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin PB varyans analizi....121

4.32. Ultrasonikasyonla ektsraksiyon yönteminin BB analiz sonuçları....122

4.33. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve gözlenen değerleri....122

4.34. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve ekstrakte edilen protein miktarları....126

4.35. Dondurma-çözdürme yönteminin PB varyans analizi....128

4.36. Dondurma-çözme yönteminin BB analiz sonuçları....128

4.37. Dondurma-çözdürme yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve gözlenen değerleri....129

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.38. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve sonuçlar....133

4.39. Boncukla ekstraksiyon yönteminin PB varyans analizi....133

4.40. Boncukla ekstraksiyon yönteminin BB analiz sonuçları....135

4.41. Boncukla ekstraksiyon yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve gözlenen değerleri....135

4.42. Ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması....139

4.43. Toplam kül ve kuru madde miktarları....140

4.44. Aminoasit kompozisyonları....145

4.45. Bazı ticari peptonların aminoasit kompozisyonları....146

4.46. Atık *R. miehei* biyokütlesinin yağ asidi kompozisyonları....147

4.47. B-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları....148

4.48. D-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları....149

4.49. U-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları....150

4.50. Farklı besiyeri bileşenleri ile hazırlanan besiyeri pH değerleri....153

4.51. *E. coli*'nin üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....155

4.52. *S. aureus*'un üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....157

4.53. *P. aeruginosa*'nın üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....158

4.54. *B. subtilis*'in üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....160

4.55. *C. albicans*'ın üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....161

4.56. *S. cerevisiae*'nin üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri....162

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.57. *A. brasiliensis*'nin üç farklı konsantrasyonda biyokütle (g) değişimleri……..….164

4.58. *A. flavus*'un üç farklı konsantrasyonda biyokütle (g) değişimleri……...……..164

4.59. Test bakteri ve mayaları geliştirme potansiyellerinin karşılaştırılması……....…165

4.60. *A. brasiliensis*'in zamana bağlı sporulasyon sonuçları……...…..170

4.61. *A. flavus*'un zamana bağlı sporulasyon sonuçları.....170

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
DD	Deasetilasyon Derecesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
XRD	X Işını Kırınımı
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
TSA	Triptik Soy Agar
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
PDA	Potato Dekstroz Agar
MHB	Muller Hinton Broth
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)
ANOVA	Varyans Analizi
TGA	Termogravimetrik Analiz
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
FB	Fungal Biyokütle
AG	Ahır Gübresi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

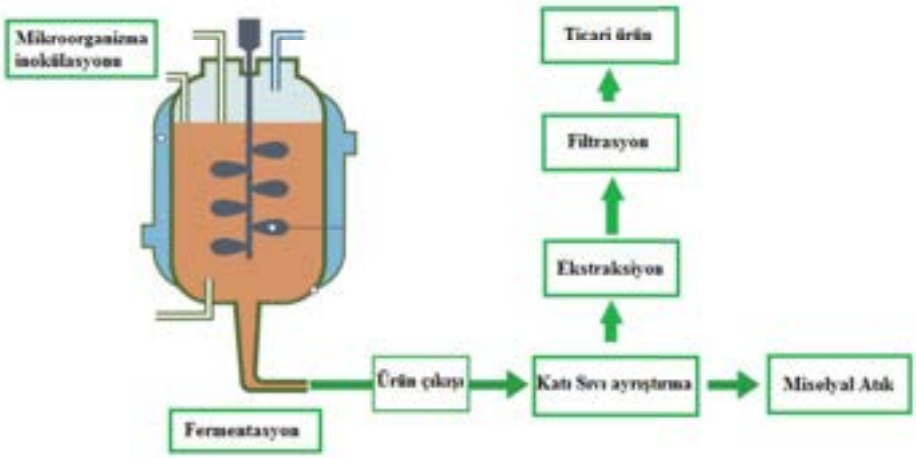
Günümüzde biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte endüstriyel enzim üretimi hayvansal ve bitkisel kaynaklardan mikrobiyal kaynaklara doğru geçiş yapmıştır. Hayvansal ve bitkisel kaynaklardan enzim eldesi olanakları hala mevcut olmasına rağmen, teknolojik ve ekonomik yönden mikrobiyal kaynaklardan endüstriyel enzim üretimi daha avantajlıdır. Hayvansal kökenli enzimler et endüstrisinin yan ürünü olarak elde edilmekte, ancak birçok kontrolden geçirilmeleri gerekmektedir. Toprak alanı, mevsimsel değişikler gibi koşullar ise bitkisel kaynaklardan elde edilecek enzimin verimi ve kalitesini etkilemektedir. Ayrıca hem hayvansal hem de bitkisel kaynakların dokuları ve elde edilecek enzim çeşitliliği sınırlıdır. Buna karşılık mikrobiyal kaynaklar; enzim çeşitliliği, mikroorganizmaların çoğalmasına bağlı üretim sürelerinin kısa olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik olmaları, stabiliteye sahip olmaları, yüksek oranlarda ve saflıkta kontrollü üretim potansiyelleri nedeniyle endüstriyel alanda özellikle gıda sektöründe önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle hayvansal kaynaklardan elde edilen enzim açıklarının kapatılması, dini ve beslenme tercihlerine bağlı olan pazar taleplerine cevap verebilmesi açısından da mikrobiyal kaynaklar gıda enzimleri üretiminde tercih edilmektedirler (Kıran vd., 2006).

Endüstriyel ölçekte gıda enzimlerinin mikrobiyal üretiminin yaygınlaşması ile birlikte Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration-FDA) tarafından doğal ve rekombinant mikroorganizmalardan oluşan gıda enzimlerini de içeren katkı maddeleri listesi Genellikle Güvenli Kabul Edilen Katkılar (GRAS-Generally Recognized as Safe) yayınlanmıştır. AMFEP (Enzim Ürünleri İmalatçıları ve Formülatörleri Birliği -Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products) tarafından yayınlanan listede mikrobiyal kaynaklı 160 adet enzimin gıda üretiminde kullanıldığı belirtilmektedir (Er ve Sarımehmetoğlu, 2009).

Fungal hücreler sahip oldukları yapıları nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda önemli potansiyele sahiptir. Özellikle fungal hücre duvarı yapısında, polisakkaritler

(yaklaşık %80) daha fazla olmak üzere protein (%5-15) ve lipidler (%3-10) bulunmaktadır. Bunların miktarları fungusun türüne, besiyeri bileşenine ve çevresel koşulların durumuna göre değişiklik göstermektedir. Polisakkaritler arasında glukan, kitin, kitosan, galaktoz, mannan ve selüloz en fazla bulunanlardır. Bu komponentler bazen birlikte bulunabilmektedirler. Basidiomycetes ve Chtridiomycetesler de kitin ve glukan, Zygomyceteslerde kitin ve kitosan, Ascomycetesler de kitin ve glukan olarak yer alırlar. Fungal hücre duvarlarında bulunan bu bileşenler sahip oldukları özellikler sayesinde gıda, tekstil, ilaç, boya gibi birçok sektörde kullanımlarını mümkün kılmaktadır.

Fermentasyon sonrası enzim içeren sıvı ile üretici mikroorganizma hücreleri ayrıştırılır. Enzim içeren sıvı saflaştırma işlemlerine tabi tutulurken üretici mikroorganizmanın hücreleri miselyal atık olarak kalır (Şekil 1.1). Miselyal atık, üretici mikroorganizma tarafından gıda işlem yardımcısı enzimlerin derin kültür fermentasyonu ile üretilmesi sonucunda arta kalan fungal hücrelerdir (Ren ve Zhao, 2013). Mikroorganizmaların endüstriyel ölçekte kullanılmasıyla birlikte üretim sonrası açığa çıkan miselyal atıklar, çevre kirliliğinin nedenlerinden biridir. Ülkemizde biyoteknolojik fermentasyon üretimleri yeni yeni yaygınlaştığından dolayı çok miktarda miselyal atık bulunmamaktadır. Yenilebilir mantar üretimlerinden arta kalan atık mantar kompostu ise en yaygın mikrobiyal atık olarak bilinmekle beraber geri dönüşümü için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Yamaç ve Pekşen, 2016).



Şekil 1.1. Fermentasyon sonrası proses

Rhizomucor miehei, süt pıhtılaştırıcı enzim (rennet) olarak bilinen asit proteaz enziminin ticari fungal kaynaklarından biridir. Endüstride süt pıhtılaştırma aktivitesinin proteolitik etkinliğe oranı, kazein içerisindeki bazı peptid bağlarına özgünlüğü, iyi peynir kalitesi ve verim oranı nedeniyle rennet üretimi de endüstri tarafından tercih edilmektedir. Büyük ölçekte üretimler yapan peynir mayası üreticileri, *R. miehei*'nin derin kültür fermentasyonu sonucunda tüketicinin taleplerini karşılayan başta lipaz ve proteaz olmak üzere çeşitli enzimler üretmektedirler. Bu proses sonrası da *R. miehei*'ye ait miselyal atık açığa çıkmaktadır. Birçok atığın değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılmakla birlikte, *Rhizomucor miehei* miselyal atıkları ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İlerleyen teknolojiyle birlikte fungal fermentasyonla çeşitli gıda işlem yardımcısı enzimlerin de ülkemizde endüstriyel ölçekte üretimi öngörülmektedir. Bu çalışmada *Rhizomucor miehei* miselyal atıklarının geri dönüşümünü sağlamak amacıyla çeşitli sektörlerde kullanım potansiyelleri üzerine yoğunlaşılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

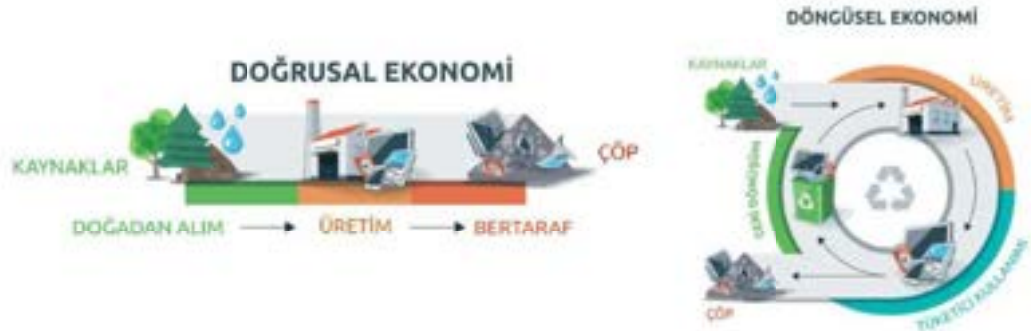
2.1. Biyoekonomi

Dünyada hızla artan nüfus, doğal kaynakların tükenmesi tehlikesiyle karşı karşıya kalınmasına neden olmuştur. Bununla birlikte iklim değişikliği gibi nedenler, dünyanın tüketim düzeyinin artık sürdürülebilir olmadığını göstermektedir. Bu durum büyüme yaklaşımı olarak biyoekonomi kavramını ortaya çıkarmıştır (Albrecht vd., 2010). Biyoekonomi; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan biyolojik süreçlerle üretilen çeşitli ürünlerin ticari dağılım ve tüketimini ele alan ekonomik bir süreçtir (Ünal, 2021). Biyolojik kaynaklar; artan dünya nüfusunun küresel sorunlarının giderilmesinde, çevre koruma ve iklim değişikliklerine karşı yönetim stratejilerinin oluşturulmasında, sürdürülebilir üretimde bilgi-temelinin sağlanmasında, yeni, düşük maliyetli ve yüksek katma değere sahip ürünlerin elde edilmesinde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. McCormick ve Kautto (2012), biyoekonomiyi, ekonomik faaliyetler ve kamu yararı için biyolojik bilimlere dayalı araştırma ve inovasyon olarak tanımlamışlardır. Bu kapsamda biyoekonomiyi oluşturan sektörler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (EC, 2012).

1. Tarım ve ormancılık
2. Balıkçılık ve su ürünleri yetiştiriciliği (Mavi Ekonomi)
    a. Sürdürülebilir balıkçılık
    b. Sürdürülebilir su ürünleri yetiştiriciliği
    c. Mavi biyoteknoloji
3. Biyo-temelli endüstriler/endüstriyel biyoteknoloji
4. Gıda sanayisi

Bu sektörler, inovasyon ve araştırmalara açık, pazar ve rekabetin geliştirilmesinde katkı sağlayacak önemli fırsatlar sunmaktadır. Bu sektörlerde yapılacak olan araştırmalar, ulusal ekonominin küresel dünyada öne çıkmasına ve sürdürülebilir bir gelecek inşa edilmesinde oldukça önemlidir.

Dünya ekonomisi, doğrusal ekonomi modeli ile günümüze kadar gelmiştir. Ancak bu model küresel kaynakların daha verimli kullanılması ve çevrenin korunması amacıyla sürdürülebilir kalkınma hedeflerinin ortaya konulması sonucu döngüsel ekonomi modeline evrilmeye başlamıştır. Doğrusal ekonomik modelde, üretim için gerekli kaynaklar doğadan alınır ve ortaya çıkan atıklar ise doğaya geri bırakılır. Döngüsel ekonomik modelde ise kaynak doğadan değil, tüketim sonrası ortaya çıkan atıklardan sağlanır. Bu atıklar geri dönüştürülerek başka üretim süreçlerinin hammaddesi olarak kullanılır. Biyoekonomi, sürdürülebilirlik yönü ile döngüsel ekonominin biyolojik itici gücü haline gelmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Doğrusal ve döngüsel ekonomi (Anonim, 2022a)

Atık yönetimi, bir ürünün üretimini, üretilirken oluşan atıklarını, atıkların geri dönüşümü veya bertarafını içeren süreçlerin yönetim biçimidir. Dünya genelinde kabul gören, atık yönetimi yöntemlerinin hiyerarşik sıralamasında "Atık yönetimi piramidi" kullanılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Atık yönetimi piramidi (Anonim, 2022b)

Atık yönetiminde, daha ürünün tasarım aşamasında atığın oluşmasını önlemek esastır. Atık yönetimi piramidine göre öncelik atığın oluşmasının önlenmesidir. Eğer atık oluşumu önlenemiyorsa azaltılmalıdır. Oluşan atığa bağlı olarak tekrar kullanımı ve geri dönüşümü yöntemleri uygulanmalıdır. Bu basamakların hiçbirisine girmeyen atıklar için ise son basamak enerjinin geri kazanımı ve atığın bertarafıdır. Atık üretiminin önlenmesi, azaltılması, yeniden kullanımı ve geri dönüşüm çevre dostu olan yöntemlerdir. Bununla birlikte atıktan enerji üretimi, düzenli/vahşi depolama ve bertaraf yöntemleri çevreye olumsuz etkileri olan yöntemlerdir.

Döngüsel ekonomi; atık kavramını ortadan kaldırarak, atıkların kaynak olarak kullanımlarının sonunda ürün döngüsüne geri kazandırılmasını sağlamaktadır. Böylelikle atığın ekonomi içerisinde mümkün olduğunca uzun süre kalması ve katma değerin oluşması sağlanmaktadır. Döngüsel değer geri kazanımı; biyokütle atıklarının gıda, yem, besin maddesi, gübre, biyoaktif malzeme veya kimyasal hammadde olarak geri kazanılması ve değerlendirilmesine odaklanır.

2.2. Endüstriyel Atıklar

Endüstriyel atık, sanayi ve üretim işlemleri sırasında oluşan tehlikeli ve zararlı madde içermeyen katı atıklardır (Pehlivan vd., 2014). Üretim atığı maddeler, kullanım süresi dolmuş malzemeler ve makinalar bu sınıfa girmektedirler. Nüfusun hızlı artması, kentleşme ve teknolojideki gelişmelerle birlikte katı atık miktarları da artmaktadır. Bu atıklar doğru değerlendirilip dönüştürülemediğinde doğa ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadırlar.

Özellikle ilaç, gıda ve biyoteknoloji sektörlerinin gelişmesiyle fermentasyon teknolojisi ortaya çıkmıştır. Bu sürecin ilerlemesiyle birlikte tarımsal atıklar değerlendirilerek çeşitli enzim, vitamin, gıda koruyucu/düzenleyici, ilaç etken maddesi gibi birçok katma değeri yüksek ürün üretilmektedir. Ancak bir atık mikrobiyal fermentasyonla başka bir ürüne dönüşürken yeni bir atıkta meydana gelmektedir. Miselyal atıklar (biyokütle) olarak bilinen bu atıklar ise sahip oldukları özellikler nedeniyle katma değeri olan ürünlere dönüşüm potansiyeli taşımaktadırlar (Ren ve Zhao, 2013). Ancak her sektörün atığı kendi içinde değişkenlik göstermektedir. Örneğin ilaç sektörü fermentasyon endüstrisinin önemli atıklarından biri, belirli miktarda antibiyotik içeren atık miselyumdur

(Belakhov ve Garabadzhiu, 2014). Bu atık doğru şekilde bertaraf edilmediği takdirde çevre kirliliğine ve antibiyotiklerin kötüye kullanılmasına neden olabilir. Antibiyotik üretiminden çıkan misel atıklarının büyük bir kısmı çamur göletlerinde toplanarak kanalizasyon arıtma sistemine atılmakta veya yakılarak bertaraf edilmektedir. Karpukhin vd. (1985) tarafından yapılan çalışmada ise bu atıkların lipitler, karbonhidratlar, proteinler gibi önemli miktarda değerli organik maddelerin yanı sıra kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, silisyum ve fosfor gibi inorganik bileşikleri de içerdiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, araştırıcılar, bu atıkların yapı malzemesi yapımında organik mineral katkı malzemesi olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Antibiyotik kalıntıların biyokütleden ayrıştırılmasının oldukça zor olması; bu sektördeki atıkların biyoyakıt veya çimento, kil ve inşaat malzemelerinde kullanılıp kullanılamayacağına yönelik araştırmaların yapılmasına neden olmuştur (Liang vd., 2015).

Gıda sektörü fermentasyon endüstrisinin atıkları ise çok daha işlenebilir bir potansiyele sahiptirler. Örneğin sitrik asit, düzenleyici, tatlandırıcı-kıvamlaştırıcı olarak şekerlemelerde ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk kez *Aspergillus niger* endüstriyel proseslerde kullanılıncaya kadar limon suyu ticari kaynak olarak kullanılmıştır. Üretim verimliliği açısından, eski bir teknik olmasına rağmen, derin kültür fermentasyonu ile *Aspergillus niger* küfünden sitrik asit üretimi hala devam etmektedir. Özellikle günümüzde tarımsal atıkların hammadde olarak kullanılmasıyla sitrik asit üretimi ekonomik olarak sürdürülebilmektedir (Öztürk ve Erbaş, 2021). Bu süreçte bir yandan tarımsal atıklar katma değeri yüksek bir ürüne dönüştürülürken, bir yandan başka bir sektörde hammadde olarak kullanılabilecek atıklar ortaya çıkmaktadır (Shahlaei ve Pourhossein, 2013). Bu durum endüstriyel ekolojinin önemini arttırmaktadır. Özellikle döngüsel ekonominin geliştirilmesinde endüstriyel simbiyoz sisteminin kurulması, stratejik bir araç olarak kabul edilmektedir (Demircioğlu ve Ever, 2020). Endüstriyel simbiyoz, Chertow (2000) tarafından birbirine yakın bulunan/kurulan işletmeler arasında atık su, enerji, yan ürünler ve üretim atıklarının değişimi olarak tanımlanmıştır. Farklı sektörlerden işletmeler bir araya getirilerek bu şekilde kaynak alışverişinde bulunulması amaçlanmıştır. Çevre kirliliğini ve kaynak yetersizliğini yöneterek iş birliği içinde sürdürülebilirliği arttırmaya çalışan işletmelerin bir arada bulunduğu eko endüstriyel parklar kurulmaktadır. Ancak buradaki ana problemlerden biri mevcut atıkların hangi sektörler için bir hammadde potansiyeli taşıdığının bilinmemesidir.

Fungi aleminin, Zygomycota divizyonu, Mucorales takımı, Mucoraceae familyası üyelerinden olan termotolerant *Rhizomucor miehei* (Cooney et Emerson) Schipper) (*Mucor miehei*) (Şekil 2.3), beyaz renkte hifsi yapıda koloni oluşturur. Sporların oluşumu ile birlikte yaşlanan kolonilerin görünümü griden kahverengiye dönüşür. Uygun koşullarda miselleri hızlı büyür. 24-55 °C sıcaklık aralığında gelişebilir.

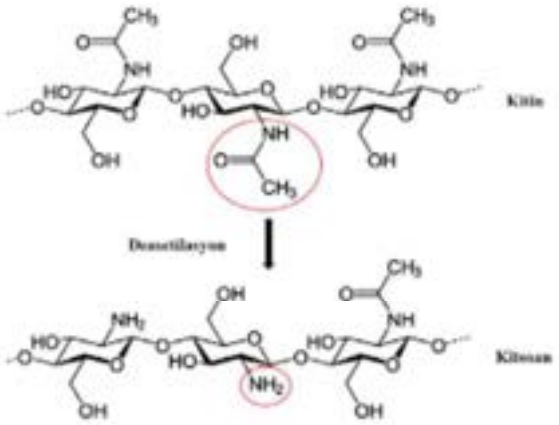


Şekil 2.3. *Rhizomucor miehei* mikroskobik görüntüsü (orjinal resim)

Enzim üretebilme yetenekleri sayesinde biyoteknolojik öneme sahiptirler. Özellikle yağların esterifikasyonu için kullanılan lipaz enzimi ile sütteki proteinin puhtılaşması için kullanılan proteaz enziminin önemli üreticisidir. Bu nedenle fermentasyon süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yegin ve Dekker, 2013; Mamo ve Assefa, 2018). *Mucor miehei* ve *Mucor pusillus,* sütü pıhtılaştırma aktiviteleri ve proteolitik aktiviteleri ile endüstriyel öneme sahip olmuşlardır (Şeker vd., 1998). *Rhizomucor miehei*'den elde edilen rennetin %6 karbohidrat içeriğine sahip olması termal stabilitesinin yüksek olmasını sağlamaktadır (Yada ve Nakai, 1986). Peynir yapımında kullanılan enzimlerin sıcaklığa direnci en yüksek olan enzim *Rhizomucor miehei*'den elde edilen rennettir (Dönmez ve Çelik, 1986). Bu nedenle süt ve süt ürünleri sektöründe en çok tercih edilen yan katkı ürünlerinden biridir. Spor ve miselyum formları arasında değişkenlik göstermekle birlikte, hücre duvarında kitin ve kitosan bulunmaktadır. Bu oran %12-40 aralığındadır. Bununla birlikte hücre duvarında, glukan, glikoprotein, mucoran, polisakkaritler ve lipitler bulunmaktadır (Lecointe vd., 2019).

2.3. Kitosan

Kitosan, yapısal olarak β-1,4-D-glukozaminin N asetil-D-glukozamine bağlanmasıyla oluşan lineer bir polimerdir ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Şekil 2.4). Selülozdan sonra dünyada en çok bulunan ikinci doğal polimerdir.



Şekil 2.4. Kitin ve kitosan kimyasal yapıları (Odabaş, 2020)

Kitosan C2 pozisyonundaki amino grup ve C3-C6 pozisyonlarındaki birincil ve ikincil hidroksil grupları olmak üzere 3 tip reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. Kitosan polimerindeki iki monosakkaritin oranları, molekülün deasetilasyon derecesine, moleküler ağırlığına, viskozitesine ve pKa değerlerine göre değişkenlik göstermektedir (Jiang, 2011). Kitosanın söz konusu özellikleri fizikokimyasal yapısını ve uygulama alanlarını doğrudan etkilemektedir. Kitinin çözünememesine karşın, serbest amino gruplarının varlığı ve grupların protonasyon özelliğinden dolayı, kitosan zinciri asetik asit, laktik asit ve formik asit gibi dilüe asitler içerisinde çözünebilmektedir (Jiang, 2011). Kitosan deasetilasyon derecesi ile karakterize edilmektedir.

Ticari kitosan sadece karides ve diğer deniz kabuklu hayvanların kabuklarından sağlanmaktadır. Fungusların hücre duvarında yer alması sebebiyle kitosan eldesinde funguslar, potansiyel alternatif kaynak olarak düşünülmektedirler. Mantar miselyumundan kitosan izolasyonu, ilk kez White vd. (1979) tarafından gerçekleştirilmiş, daha sonrasında verimi arttırma ve iyileştirme için birçok araştırma yapılmıştır (Arcidiacono ve Kaplan 1992; Rane ve Hoover, 1993a, b; Crestini vd., 1996). Bu çalışmalar doğrultusunda Hu vd. (1999) tarafından fungal kitosan ekstraksiyon protokolü geliştirilmiştir. Araki ve Ito (1974) ilk defa *Mucor rouxii* isimli mantarın hücre duvarındaki kitosan sentez mekanizmasını açıklamıştır. Bu çalışma diğer farklı mantar türlerinin hücre duvarında kitosan varlığının araştırılmasına yönelik yapılan çalışmaların başlangıcı olmuştur (Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003). Zygomycetes sınıfı mantarların hücre duvarında %50'ye varan oranlarda kitosan bulunmaktadır (Gow ve Gadd, 1995). Çoğu mantarın hücre duvarında yapısal

polisakkarit kitin bulunurken, Zygomycetes grubu mantarlarda büyük oranda kitosan mevcuttur (George vd., 2011). Tajdini vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Rhizomucor miehei* türünden %13.67 oranında kitosan ekstrakte edilmiştir. Kitosan eldesi için *Mucor rouxii* ve *Aspergillus niger* organizmaları çalışılmış olmasına karşın (Araki ve Ito, 1974; White vd., 1979; Arcidiacono ve Kaplan, 1992) endüstriyel üretim süreçlerinden çıkan atık *Rhizomucor miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında endüstriyel önemi olan *Rhizomucor miehei* (*Mucor miehei*) türünün mikrobiyal rennet (peynir mayası) üretimi sonrası açığa çıkan biyokütlesinden kitosan eldesi üzerine çalışmalar ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Doğada fazlaca bulunmasının yanı sıra kitin ve kitosan, yenilenebilir ve çevre dostu bir biyopolimerdir. Bu özellikleri ile son yıllarda birçok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur. Kitosanın kullanım alanının geniş olması nedeniyle pazar payı her geçen yıl artmaktadır. Kitosan, özellikle Çin, Kuzey Amerika, Japonya ve Avrupa'da yaygın bir şekilde üretilmekte ve kullanılmaktadır (Hamed vd., 2016). Yapılan yatırımlarla 2024 yılında kitosan ve türevlerine ait pazarın 53 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Özel ve Elibol, 2021). Kitosan, kitine kıyasla ticari olarak daha kolay elde edilebilmesi ve çeşitli formlarda kullanılabilmesi nedeniyle daha fazla ilgi çekmektedir. Kitosan, biyouyumluluk özelliği sayesinde memeli ve mikroorganizma hücrelerine bağlanabilmektedir. Ayrıca hemostatik, antimikrobiyal, anti-kanserojen, anti-kolesterol aktivite olmak üzere birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Bu aktiviteleri nedeniyle kozmetik, medikal, gıda, tekstil ve biyoteknoloji gibi birçok uygulama alanında önemli bir hammadde olarak kullanılmaktadır. Özellikle son zamanlarda yaraların iyileştirilmesinde yardımcı materyal olarak kullanımı üzerine çalışmalar artmıştır (Feng vd., 2021). Deasetilasyon derecesi düşük olan kitosanların, yaradaki fibroblastların çoğalmasını arttırarak hücrelerin yara alanını kapatmada daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Chatelet vd., 2001).

Yeşil kimya uygulamasında atıkların tekrar değerlendirilmesi açısından kitosan oldukça önemli maddelerden biridir. Kitosanın toksik olmaması, biyouyumlu, yenilenebilir ve degrade olması yanı sıra antimikrobiyal etkileri ile film oluşturma kapasitesi nedeniyle gıda ve biyomedikal alanlarında üzerinde oldukça çalışılmaktadır (Shajahan vd., 2014).

2.4. Vermikompost

Tüm dünyada tarımsal üretimde sürdürülebilirlik kavramına vurgu yapan ve organik üretim yöntemlerini teşvik eden yaklaşımların yaygınlaşması sürecinde yer solucanlarının organik atık ve artıkları kısa zamanda yüksek kalitede değerli bir ürüne dönüştürebilme kapasitelerinin anlaşılmasıyla vermikültür adı verilen yeni bir tarımsal üretim sektörü ortaya çıkmıştır. Vermikompost işlemi; şehirleşme ve endüstrileşmeyle beraber büyüyen bir çevre sorunu olan endüstriyel artık/atık sorununa sürdürülebilir bir yöntem olarak çözüm sunmaktadır. Vermikompost son ürünü olan solucan dışkısı (vermikest) içindeki bitki besin elementleri, bitkiye faydası açısından ticari saksı karışımlarından ve geleneksel metotlarla üretilen kompost ürünlerinden daha üstün özelliklere sahiptir.

Çeşitli organik atıkların bazı toprak solucanları tarafından sindirilmeleri yoluyla kompostlaştırılarak elde edilen vermikompost, organik madde, azot ve çeşitli mikroelementlerce zengin bir karışım olup, toprak düzenleyici ve bitki beslemede kullanılan solucan gübresidir (Mısırlıoğlu, 2016). Hayvansal ve bitkisel kaynaklı organik atıkların solucan gübresine dönüştürülmesinde en yaygın olarak kullanılan 6 solucan türü sırasıyla; sıcak bölgelerde yaşayan ve epigeic olarak adlandırılan *Eisenia fetida* (ticari olarak en yaygın kullanılan), *Dendrobaena veneta* ve *Lumbricus rubellus* ile tropik bölgelerde yaşayan *Eudrilus eugeniae*, *Perinoyx excavatus* ve *Perionyx hawayana*'dır. Organik atıkların biyolojik olarak parçalanması ile elde edilen vermikompost yüksek ekonomik değere sahip bir üründür. Bitkilerin gelişiminde kullanılan vermikompostlar, özellikle çiçekçilikte, meyve ve sebze yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılmakta, bitkilerin sağlıklı, kaliteli ve yüksek verimli büyümelerini sağlamaktadır(Erşahin, 2010). Ayrıca içerdiği besin elementleri sayesinde verimsiz toprakların iyileştirilmesinde de kullanılırlar.

Eisenia fetida (Şekil 2.5) farklı toprak tiplerine, sıcaklık, nem, pH gibi çevresel faktörlere geniş tolerans gösterebildiği için ülkemizdeki vermikompost ve vermikültür yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan bir türdür (Mısırlıoğlu, 2016).



Şekil 2.5. *Eisenia fetida* türüne ait solucan ve kokonu (orjinal resim)

Her bir *E. fetida* solucanı, 3 ile 5 gün arasında 2-10 kokon meydana getirir. *E. fetida* solucanının, sıcaklık toleransı 0-35 °C aralığında iken optimum sıcaklığı 25 °C'dir. Optimum nem koşulları %50-90 aralığındadır. Bu koşullar hayatta kalmalarını sağlamalarına rağmen %80-90 nem içeren organik atıkların varlığında daha hızlı büyürler. pH açısından nötr toprakları tercih etseler de pH 5-9 aralığını tolere edebilirler. Yüksek miktarda amonyak içeren hayvan gübrelerinde hayatta kalamazlar. Bu nedenle bu atıklar kullanılmadan önce yıkanarak amonyak uzaklaştırılmalıdır. Fermente edilmemiş hayvan gübrelerinde, hayatta kalmaları oldukça zordur (Şen vd., 2017; Mısırlıoğlu, 2017).

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte tarımsal üretimde geleneksel yöntemlerin kullanılması yetersiz kalmıştır. Özellikle verimi ve üretimi arttırmak amacıyla kullanılan kimyasallar artan çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bu nedenle dünyada ve ülkemizde organik ürünlere doğru bir yönelim meydana gelmiştir. Kimyasal gübreler yerine organik gübreler tercih edilmeye başlanmıştır. Özellikle atık mantar kompostu, evsel atıklar gibi tarımsal atıklardan elde edilen kompostlar gübre ve toprak düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Bellitürk, 2016; Yamaç ve Pekşen, 2016). Vermikompostta sahip olduğu özellikleri nedeniyle tarımda kullanılan önemli seçeneklerden biridir. Özellikle vermikompostun yapısının gözenekli, su tutma kapasitesinin yüksek olması ve yüksek mikrobiyal aktiviteye sahip olması bitkilerin gereksinim duyduğu besin maddelerini alımını kolaylaştırmaktadır.

Yapılan çalışmalar, toprağa vermikompost katkısının, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirdiğini göstermektedir (Edwards, 2011; Abacıoğlu vd., 2020). Buna paralel olarak kalitesi artan toprağın verimliliğinin de arttığı bildirilmiştir (Mısırlıoğlu, 2011). Verimsiz toprakları verimli hale getirebilmek için vermikompost uygulandığında,

toprağın organik madde miktarının arttığı, bu sayede bitkiler için gerekli olan makro ve mikro besinleri içeren verimli topraklar elde edilebildiği vurgulanmıştır. Bitkilerin ihtiyacı olan N, P ve K besin elementlerinin neredeyse %97'sinin vermikomposttan doğrudan alınabilir formda olması oldukça önemlidir (Barley, 1961). Aynı zamanda vermikompost sadece bitkileri beslemekle kalmayıp, hastalık ve zararlılar ile mücadeleye de destek olmaktadır (Solmaz vd., 2018).

Familyası Compositae (Asteraceae) olan marul bitkisi (*Lactuca sativa* L.), yapraklarını tükettiğimiz ticari önemi yüksek sebze türlerinden biridir (Vural vd., 2000). Marul; yetiştirme periyodunun kısa olması, tüm yıl piyasada aranılan ve yetiştiriciliği yapılabilen bir tür olması nedenleri ile insan diyetinde de önemli bir yere sahiptir (Şalk vd., 2008). Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2021 yılında, Türkiye genelinde 83 bin 576 dekar alanda, 212 bin 091 ton marul üretimi olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2021).

Marul bitkisi, nemli hava koşullarına ihtiyaç duyan, soğuğa kısmen dayanaklı serin iklim sebzesidir. Vegetasyon evresinin kısa olması, ülkemizin bütün bölgelerinde yetiştirme imkanı sunmaktadır. Marul tohumlarının çimlenebilmesi için optimum sıcaklık 24-25 °C'dir. Bu aralığın üstündeki sıcaklıklarda çimlenme olmazken altındaki sıcaklıklarda ise 5-10 gün dayanıklık gösterebilmektedir (Beşirli vd., 2021). Sebze üretiminde verimi etkileyen faktörlerin başında tohum kalitesi ve fide kalitesi gelmektedir. Marul yetiştiriciliğinde yüksek verim ve kaliteli ürün için fide kalitesi büyük önem taşımaktadır. Kaliteli bir fide; pişkin ve kuru maddece zengin, çeşide özgü renge sahip, kök yapısı iyi gelişmiş ve hastalık ve zararlılardan ari olmalıdır. Verim ve kaliteli ürün için fide gelişiminin iyi sağlanması gerekir. Marul bitkisi her türlü toprakta yetiştirilebilmektedir. Ancak toprağın kalitesi ürünün kalitesini de etkilemektedir. Fide gelişimi üzerine en etkili faktör ise fide yetiştirme ortamıdır. Yetiştirme ortamı olarak torf, torf-perlit veya torf-perlit-vermikulit karışımları yaygın olarak kullanılmaktadır (Yılmaz vd., 2018). Kaliteli fide yetiştiriciliğinde torf uygun bir ortam olmakla birlikte, bulunabilirliği ile ilgili sıkıntılar ve pahalı olması nedeniyle torfun yerine kullanılabilecek farklı materyal arayışı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, sıfır atık kapsamında organik gübreler, tarımsal atıklardan elde edilen kompostlar, atık mantar kompostu gibi atıkların da marulda kalite ve verim üzerine etkileri konusunda yapılan çalışmalar rapor edilmektedir (Polat vd., 2004; Peksen ve Uzun, 2008; Yılmaz vd., 2018; Okuyucu vd., 2018). Son yıllarda

vermikompostun fide yetiştirme ve yetiştiricilikte kullanımı ile ilgili yapılan çalışmaların yaygınlaştığı görülmektedir (Özen ve Sönmez, 2019; Teke vd., 2019; Altunlu, 2021; Şahin ve Ataklı, 2021; Şenyiğit vd., 2021).

2.5. Mikrobiyolojik besiyeri bileşeni

Mikroorganizmalar, yaşamsal döngülerini tamamlayabilmek ve çoğalabilmek için besinlere ihtiyaç duyarlar. Özellikle laboratuvar koşullarında mikroorganizmaların geliştirilebilmesi için ihtiyaç duydukları besinleri içeren ortamlarda yetiştirilmeleri gerekir. Bu ortamlar, besiyeri veya kültür ortamı olarak tanımlanır (Halkman, 2005).

Mikroorganizmalar için besiyeri oluşturma çalışmaları ilk olarak 1860 yılında Pasteur'ün et ekstratı kullanarak bakterileri çoğaltması ile başlamıştır. Süt, pişmiş patates, yumurta akı, et suyu gibi çeşitli besin maddeleri besiyeri hazırlamak amacı ile kullanılmıştır ve günümüzde birçok besiyerinde hala kullanılmaktadır. Besiyerlerinin ticari olarak satılmaya başlanması, 1909 yılında Frost'un dehidre tekniğini bulmasına dayanmaktadır. Bugün ise birçok firma (Merck, Sigma, Difco, LabM, Conda, Hmedia vb.) besiyerlerini hem üretip hem de pazarlamaktadırlar.

Günümüzde mikrobiyolojik çalışmaların artmasıyla, çalışmalarda kullanılan besiyerleri ihtiyacı da artmaktadır. Mikroorganizmalarla yapılacak olan analizlerde mutlaka besiyeri olması gerekmektedir. Besiyeri olmadan mikrobiyolojik analizler yapılamamaktadır. Bu nedenle de besiyerlerinin ticari değeri oldukça yüksektir. Başta hastaneler olmak üzere, çeşitli araştırma kuruluşları, üniversiteler, mikrobiyal fermentasyon ile üretim yapan şirketler ve dış analiz laboratuvarları düşünüldüğünde, ülke ekonomimize ciddi bir yük oluşturduğu anlaşılmaktadır. Ülkemizde ticari besiyeri üretimi olmaması sebebiyle mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besiyerleri dış kaynaklı firmalardan ithalat yoluyla temin edilmektedir. Dolayısıyla bu durum önemli miktarda döviz kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle yerli kaynaklardan ekonomik yollarla besiyeri hazırlama çalışmalarının arttırılmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla ülkemizde yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Unat, 1980; Taşkın ve Kurbanoğlu, 2011; Akbaş, 2013).

Mikroorganizmaların besin gereksinimleri türlerine göre değişebilmekle birlikte, çoğalabilmek için benzer temel ana maddelere ihtiyaç duymaktadırlar. Bunlar 4 ana grupta toplanmıştır (Brock, 2010).

1. Mikroorganizmaların ana yapısını oluşturan karbon, azot, oksijen, hidrojen gibi elementleri sağlayan besinler
2. Fosfor, potasyum, kükürt, magnezyum gibi ikinci derece önemli olan elementleri sağlayan besinler
3. B12, biotin, tiamin gibi vitaminleri içeren besinler
4. İz elementler

Mikroorganizmalar besiyerindeki organik madde ihtiyacını karbonhidrat ve protein kaynaklarından sağlamaktadırlar. Bu kaynaklar, bitkisel veya hayvansal olabilirler. Bitkisel kaynaklar arasında şeker kamışı, patates, soya unu, mısır unu, gluten ve benzeri ürünler bulunurken, muz kabuğu, portakal kabuğu, fındık kabuğu gibi tarımsal atıklarda bulunmaktadır. Et ve et ürünleri, süt, yumurta, balık ve balık unu, kazein, jelatin gibi ürünler hayvansal kaynakları içermektedir. Bununla birlikte keçi boynuzu, tavuk tüyü gibi hayvansal atıklarda günümüzde değerlendirilmektedir (Kurbanoğlu, 1999; Taşkın ve Kurbanoğlu, 2011; Taşkın, 2011). Bununla birlikte günümüzde mikrobiyal fermentasyon teknolojilerinin gelişmesiyle mikrobiyal atıklarda ortaya çıkmaktadır. Bu nedenlerle tarımsal, mikrobiyal ve hayvansal atıkların doğaya atılması yerine, katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi hem çevrenin korunması hem de ekonomik kazanç bakımından önem taşımaktadır. Genel olarak fungal hücre duvarları kitin, kitosan, nötral polisakkaritler ve glikoproteinler ile çok az miktarlarda poliüronidaz, galaktozamin polimerleri, lipidler ve melaninden oluşmaktadır (Nwe vd., 2011; Abo Elsoud vd., 2019). *Rhizomucor miehei*'nin de içinde yer aldığı Zygomycetesler aynı zamanda değerli biyokütle bileşenlerine sahip olması nedeniyle protein kaynağı olarak kullanılma potansiyalleri de bulunmaktadır. GRAS statüsündeki mikroorganizmalar özellikle zengin protein ve diğer içeriklerinden kaynaklı balık ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Ferreira vd., 2013). *R. miehei* GRAS statüsünde olması ile birlikte bu anlamda kullanılma potansiyelinin belirlenmesi üzerinde literatürde pek fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinin azot kaynağı olarak kullanılmak üzere protein kaynağı bileşenlerinin karakterizasyonu ilk kez gerçekleştirilerek hem literatüre katkı sağlanması hem de yerli mikrobiyolojik besiyeri bileşeninin eldesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Atık *Rhizomucor miehei* biyokütlesi

Rhizomucor miehei biyokütlesi, derin kültür fermentasyonu ile mikrobiyal rennet üretimi yapan ve atık olarak *R. miehei* biyokütlesi açığa çıkaran Mayasan A.Ş. (İstanbul, Türkiye) gıda biyoteknoloji şirketinden temin edilmiştir. Yaş *R. miehei* biyokütle örnekleri saf su ile yıkandıktan sonra etüvde 60 ˚C'de bir gün boyunca kurutulmuştur. Çalışmalarda bu kuru fungal biyokütle kullanılmıştır.

3.1.2. Ticari kitosan

Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere ticari kitosan, ADAGA Gıda ve Dan. San. A.Ş. (Antalya, Türkiye) şirketinden temin edilmiştir. Analiz sertifikası EK-A'da sunulmuştur.

3.1.3. Ahır gübresi

Çalışmada kullanılan kuru fermente ahır gübresi, solucan gübresi üretimi ve satışını yapan Rivasol şirketinden (AG-Rivasol®) temin edilmiştir.

3.1.4. *E. fetida* solucanı

Eisenia fetida (Lumbricidae) türüne ait bireyler, yüksek üreme potansiyelleri ve adaptasyon kabiliyetleri nedeniyle vermikompost çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tavuç, 2016). Aynı nedenlerden dolayı bu çalışmada da *E. fetida* solucanı kullanılmıştır. Solucanlar, Soloverm (Konya) şirketinden temin edilmiştir.

3.1.5. Test bitkisi (Marul)

Çalışmada test bitkisi olarak kullanılan Papyon kıvırcık marul (*Lactuca sativa* L.) çeşidine ait tohumlar piyasadan temin edilmiştir.

3.1.6. Test mikroorganizmaları

Bu çalışmada test mikroorganizması olarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde uygun koşullarda korunan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* NRRL-B-558, *Candida albicans* ATCC 60193, *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y12632, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 1094 ve *Aspergillus flavus* NRRL1957 suşları kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi

Fungusların hücre duvarında yer alması sebebiyle kitosan eldesinde funguslar, potansiyel kaynak olarak düşünülmektedir. Bu kapsamda endüstriyel önemi olan *Rhizomucor miehei* türünün fermentasyon atığı olarak açığa çıkan biyokütlesinden kitosan eldesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonu

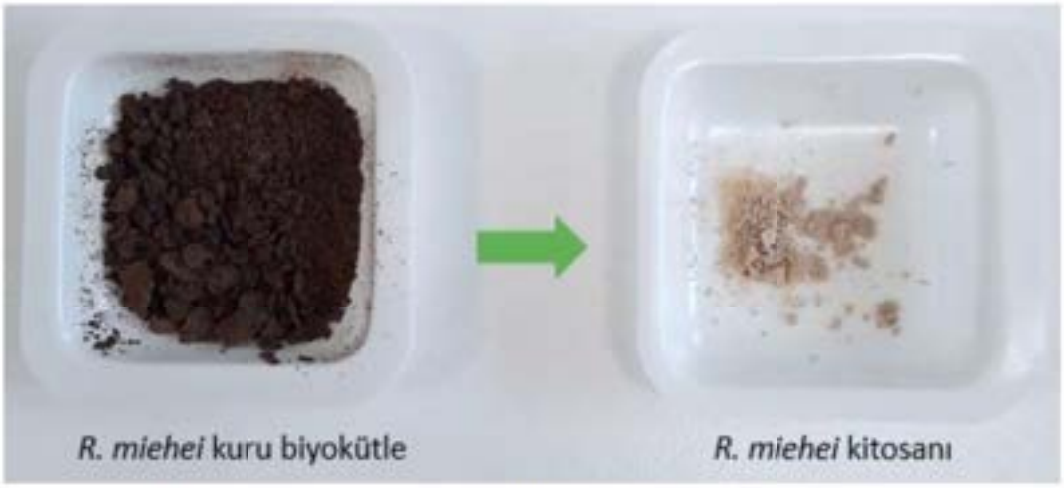
Literatürde yer alan protokolden (Ramos Berger vd., 2018) uyarlanan kitosan eldesi akış şeması Şekil 3.1'de sunulmuştur. İlk olarak *R. miehei* miselyumları yıkanıp kurutulduktan sonra, 1 gram kuru biyokütledeki protein giderimi için 2N NaOH çözeltisi (1:30 w/v) ile otoklavda 121 °C'de 20 dk muamele edilmiştir. Alkali çözünmeyen kısım 9000 rpm ve 4 °C'de 10 dk, santrifüj edilerek ayrılmıştır. Elde edilen çökelti, bazikliği gidermek amacıyla saf su ile yıkanarak pH'nın 7 olması sağlanmıştır. Elde edilen kısım bir gün boyunca 60 °C'de kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan çökelti tartılıp 1:30 w/v oranında %2'lik asetik asit çözeltisinde çözdürülmüş ve 95 °C'de 6 saat bekletildikten sonra

soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan karışım 9000 rpm ve 4 °C'de 10 dk, santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantın pH'sı 2N NaOH ile 9'a ayarlanmıştır.



Şekil 3.1. Atık fungal biyokütleden kitosan ekstraksiyonu (Ramos Berger vd., 2018'den modifiye edilmiştir)

pH değişimiyle şeffaf olan süpernatantın içerisinde belirgin hale gelen kitosan tekrar 9000 rpm, 10 dk 4°C'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çöken fungal kitosan önce saf su ile sonra etanol ile yıkanmış, daha sonra 65 °C'de kurutularak tartılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Atık *R. miehei* kuru biyokütlesi ve elde edilen kitosan

3.2.1.2. Fungal kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu

Bu bölümdeki istatistiksel analizler, Prof. Dr. Zeki Yıldız (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, İstatistik Bölümü, Eskişehir) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kitosan ekstraksiyonunun deproteinizasyon ve deasetilasyon olmak üzere iki aşaması bulunmaktadır. Bu aşamalardaki uygulamalar, elde edilecek olan kitosanın miktarını ve deasetilasyon derecesini etkilediğinden dolayı ekstraksiyonun optimal koşullarda yapılması daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

Kitosanın molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi ve miktarı; kaynağına, ekstraksiyon yöntemine, sodyum hidroksit ile işlem görme süresine, konsantrasyonuna ve işlem sırasındaki sıcaklığa bağlıdır. Kitosan alkali pH'da çözünmez, fakat hidroklorik asit, asetik asit gibi asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür. Bu çalışmada ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin ve seviyelerinin belirlenmesinde cevap yüzey metodu (Response Surface Methodolgy-RSM) kullanılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonunda NaOH konsantrasyonu, deproteinizasyon sıcaklığı ve süresi, asetik asit konsantrasyonu, deasetilasyon sıcaklığı ve süresi olmak üzere 6 farklı değişken test edilmiş (Çizelge 3.1) ve bu değişkenlerin tamamını içeren bir tasarım ile deneyler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Kitosan üretimi optimizasyonu için kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Ekstraksiyon aşamaları		-1	0	+1
Deproteinizasyon	NaOH konsantrasyonu (N)	1	2	3
	Deproteinizasyon sıcaklığı (°C)	95	108	121
	Deproteinizasyon süresi (dk)	10	20	30
Deasetilasyon	Asetik asit konsantrasyonu (%)	2	3	4
	Deasetilasyon sıcaklığı (°C)	75	85	95
	Deasetilasyon süresi (saat)	4	6	8

Çizelge 3.2. Kitosan ekstraksiyonunun optimizasyon tasarımı

Aşamalar	Deproteinizasyon			Deasetilasyon		
	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre
Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	0	0	-1	1	0	-1
2	-1	0	1	0	0	1
3	-1	1	0	1	0	0
4	0	0	1	1	0	1
5	0	0	-1	-1	0	-1
6	0	0	-1	1	0	1
7	0	1	1	0	1	0
8	-1	0	0	1	-1	0
9	0	1	-1	0	-1	0
10	0	1	1	0	-1	0
11	-1	0	1	0	0	-1
12	1	-1	0	-1	0	0
13	1	0	1	0	0	1
14	0	-1	0	0	1	-1
15	1	1	0	1	0	0
16	1	1	0	-1	0	0
17	0	-1	1	0	-1	0
18	0	1	0	0	1	1
19	1	-1	0	1	0	0
20	1	0	1	0	0	-1
21	0	0	0	0	0	0
22	1	0	-1	0	0	1
23	-1	0	-1	0	0	1
24	0	0	0	0	0	0
25	0	1	0	0	-1	1
26	0	0	1	-1	0	1
27	0	1	-1	0	1	0
28	0	-1	-1	0	1	0
29	-1	0	0	1	1	0
30	0	-1	0	0	-1	-1
31	0	-1	1	0	1	0
32	1	0	0	-1	1	0
33	1	0	0	1	1	0
34	0	0	1	1	0	-1
35	0	0	0	0	0	0
36	-1	-1	0	-1	0	0
37	0	1	0	0	1	-1
38	-1	0	0	-1	-1	0
39	1	0	0	-1	-1	0
40	1	0	-1	0	0	-1
41	-1	0	0	-1	1	0

Çizelge 3.2. Kitosan ekstraksiyonunun optimizasyon tasarımı (devam)

Aşamalar	Deproteinizasyon			Deasetilasyon		
	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre
Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0
44	-1	0	-1	0	0	-1
45	1	0	0	1	-1	0
46	0	-1	-1	0	-1	0
47	0	-1	0	0	1	1
48	-1	1	0	-1	0	0
49	0	0	1	-1	0	-1
50	0	1	0	0	-1	-1
51	0	-1	0	0	-1	1
52	-1	-1	0	1	0	0
53	0	0	-1	-1	0	1
54	0	0	0	0	0	0

Çalışmalar her deneme için üç tekrar halinde yapılmıştır. Üçlü deneylerden elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri Statistica 8 paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir

3.2.2. Optimize koşullarda elde edilen kitosan karakterizasyonu

3.2.2.1. Çözünebilirlik testi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın çözünebilirliğini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (%0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2 ve 3) asetik asit çözeltisi hazırlanarak, 1 gram kitosan 100 mL çözeltide vorteks yardımıyla çözdürülmüştür (Roy vd., 2017). Pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmıştır.

3.2.2.2. FTIR analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen numunenin yapısal gruplarının tanımlanması için, potasyum bromid (KBr) ile Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresinde ölçümleri hizmet alımı yoluyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,

Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) tarafından gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmıştır.

3.2.2.3. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesini (DD) belirlemek için Infrared Spektrometresi (FTIR) yöntemi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmış ve kitosanların deasetilasyon dereceleri aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir (Ebrahimzadeh vd., 2013).

$$DD = 100 - (A_{1657} / A_{3468}) \times 100 / 1.33 \qquad (3.1)$$

3.2.2.4. Molekül ağırlığının belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda elde edilen kitosanın viskozite-ortalama molekül ağırlığı, Ubbelohde Seyreltme Viskometresi ile belirlenmiştir. Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan kitosan solüsyonu, 25 °C'de bir çözücü sistemi (0.1M Asetik asit ve 0.2M Sodyum klorür, 1:1 hacim/hacim) kullanılarak molekül ağırlığın belirlenmesi için kullanılmıştır. Analiz üç tekrar ile yapılmış, pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmıştır. Kitosan numunelerinin molekül ağırlığını belirlemek için Mark-Houwink-Sakurada denklemi kullanılmıştır (Jung ve Zhao, 2012).

$$[\eta] = k\,(Mv)\,\alpha\,(2) \qquad (3.2)$$

$[\eta]$ = esas viskozite

Mv = viskozite ortalama molekül ağırlığı

$k = 1.81 \times 10^{-3}$ sabiti

$\alpha = 0.93$ sabiti

3.2.2.5. XRD (Tek kristal) ışını analizi

X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile maddenin yapısı (amorf, yarı-kristalin, kristalin), atom ya da atom düzlemleri arasındaki mesafeler (dhkl, Å) ve maddenin kristallik derecesi belirlenebilir. XRD yöntemi kristal yapısı bilinmeyen bir maddenin atom düzlemleri (dhkl) arasındaki mesafenin ölçümünü esas almakta olup, pikler Bragg yasası olarak bilinen 2θ açılarına karşılık gelen (dhkl) değerleriyle ifade edilir ($d = \lambda / 2 \sin\theta$, λ = 1.54056 Å). XRD analizi, hizmet alımı yoluyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) Panalytical Empyrean marka XRD cihazıyla CuKα ışınımlı (λ = 1.54056 Å) X-ışınları difraktometresinde yapılmış ve çekim koşulları 40 mA, 40 kV, tarama hızı 0.005° olarak uygulanmıştır. Fungal ekstrakttaki ve ticari kitosandaki kristalin indeks değerleri (CrI) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Liu vd., 2012).

$$CrI_{110} = [(I_{110}-I_{am})/I_{110}] \times 100 \qquad (3.3)$$

I_{110}=2θ ≅20° deki maksimum gerilim

I_{am} = 2θ ≅16° deki amorf difraksiyon gerilimi

3.2.2.6. SEM Analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın SEM analizi; hizmet alımı yoluyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ARUM) JEOL JSM 5600 SEM cihazı ile vakum altında palladyum-altınla kaplanması suretiyle yapılmıştır.

3.2.2.7. Elemental Analiz

Atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın elemental analizi; hizmet alımı yoluyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı

Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ARUM) Perkin Elmer 2400 Series II marka cihazla yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmıştır.

3.2.2.8. Termogravimetrik (TGA) Analizi

Termogravimetrik analiz, malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin sabit ısıtma oranı ile artan sıcaklık ile değişimlerini ölçen bir yöntemdir. Genel olarak bağlı polimer malzeme çalışmaları için ayrışma, oksidasyon ya da (örneğin, nem gibi) uçucu kaybı, kütle kaybı veya kazancı sergileyen malzemelerin seçilen özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın TGA analizi; Eskişehir Teknik Üniversitesi, Malzeme Araştırma Laboratuvarında Perkin Elmer marka Diamond TG/DTA model cihazla yüksek lisans öğrencisi Ufuk Kop (Eskişehir Teknik Üniversitesi) yardımıyla yapılmıştır. Analiz, her 1 dakikada 10 °C ısıtma hızı ile 25 - 550 °C sıcaklık aralığından gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ticari kitosan kullanılmıştır.

3.2.3. Kitosanın biyolojik aktivitesinin belirlenmesi

3.2.3.1. Antimikrobiyal aktivite

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) analizi ile belirlenmiştir. Analiz CLSI M07 A10 (Bakteri), CLSI M27 A2 (Maya) ve CLSI M38 A2 (Küf) yöntemlerine göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmada test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) kullanılmıştır.

Bu çalışmada her bir bakteri, maya ve küf mikroorganizması ön aktifleştirme yapıldıktan sonra kullanılmıştır. Bu amaçla bakteriler Triptik soy agar (TSA), mayalar Sabouraud dekstroz agar (SDA) ve küfler Potato dekstroz agar (PDA) besiyerine

ekilmiştir. Bakteriler ve mayalar, 32.5 °C'de 24 saat, küfler 22.5 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri ve mayalar steril öze yardımı ile 10 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisine aktarılmıştır. Hücre süspansiyonları McFarland 0.5 (10^8 hücre/ml) bulanıklığı gözle ayarlanmıştır. Bu işlemden sonra mikroorganizma içeren FTS tüpünden 1 ml alınarak çift kuvvetli Muller Hinton Broth içerisine aktarılarak 10^6 hücre/ml son konsantrasyon elde edilmiştir. Sonrasında test edilecek numuneler %1'lik asetik asit çözeltisinde çözdürülmüştür. Başlangıç konsantrasyonu 1000 µg/ml olarak ayarlanmış ve bir seri dilüsyon işlemi yapılmıştır. Mikroplakaya aktarılması için, 100 µl alınarak her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Kuyucuklara 10^6 hücre/ml mikroorganizma içeren çift kuvvetli MHB'den de 100 µl aktarılarak toplam 200 µl'lik hem kitosan hem de test mikroorganizmasını içeren süspansiyon oluşturulmuştur. Çalışmada pozitif kontrol için 100 µl çift kuvvetli MHB ve 100 µl mikroorganizma süspansiyonu, negatif kontrolde ise 200 µl çift kuvvetli MHB kullanılmıştır. Tüm bu basamaklar küf mikroorganizmaları için de çift kuvvetli Potato dextrose broth ile tekrar edilmiştir. Küf sayısı, thoma lamında mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. Test küfleri için de pozitif kontrol mikroorganizma ve besiyeri içeren kuyucuklar, negatif kontrol ise sadece besiyeri içeren kuyucuklar ve kitosan numunelerini içeren kuyucuklar hazırlanmıştır. Bakteri ve maya içeren plakalar 32.5 °C'de 24 saat, küf sporu içeren plakalar 22.5 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteriler ve mayaları içeren plakalar %0.1'lik TTC ile muamele edilerek renk değişiminin oluşumu sağlanmıştır. Küf sporu içeren plakalarda ise filament gelişimine göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.3.2. Yara iyileştirici aktivite (Stratch testi)

Bu analiz, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Zerrin Cantürk aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. *In vitro* yara iyileşmesi aktivitelerin tayininde "Stracht testi" standart olarak uygulanan bir tekniktir (Liang vd., 2007). HaCaT keratinosit hücreleri 96 kuyucuklu mikroplakanın her kuyucuğuna $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Yaklaşık 24 saat sonunda tıpalar çıkarılmış ve hücrelerin üzerine 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml final konsantrasyonlarda atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosan ve ticari kitosan içeren

tam besiyeri konularak 37 °C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Test numunesi konulmamış kuyucuklar negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. Yara oluşturmak için kullanılan tıpalar

0, 1, 3 ve 5. günlerde Leica DM 300 inverted mikroskop ile tıpanın altında kalan yuvarlak boşluk alanın her grup için farklı bölgelerden 3 adet olmak üzere fotoğrafları çekilmiştir. Hücre migrasyonunu belirlemek için oluşturulan yara alanları ölçülmüştür (Yüksel vd., 2021). Aynı plakanın paraleli de Hoechst boyasıyla boyanmak için çalışılmıştır. Yine 0, 1, 3 ve 5. günlerde kopan hücrelerden arındırılması için PBS ile her kuyucuk yıkanmıştır. Sonrasında 100 µL PBS içinde 5 µL Hoechst boyası ile boyanmış, 15 dk karanlıkta oda ısısında steril kabinde bekletilmiştir. Boya artıklarının temizlenebilmesi amacıyla her kuyucuk 100 µL PBS ile yıkanmıştır. Boyanan hücrelerin görüntüleri Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri) 472 nm'de alınmıştır. Hücrelerin oluşan boşluğu kapatma oranı ise aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Erarslan, 2019).

$$\text{Yara kapatma oranı} = [(\text{Alan}_0 - \text{Alan}_{\text{ölçümgünü}}) / \text{Alan}_0] \times 100 \qquad (3.3)$$

Alan_0 başlangıçta çekilen fotoğrafın ölçülmüş alanı, $\text{Alan}_{\text{ölçümgünü}}$ 1, 3 ve 5. günde alınan fotoğrafın alanıdır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Graphpad Prism 9 programında tek yönlü ANOVA ile yapılmış ve gruplandırmada Tukey testi kullanılmıştır.

3.2.4. Fungal kitosan içeren filmlerin eldesi, fiziksel ve biyolojik özellikleri

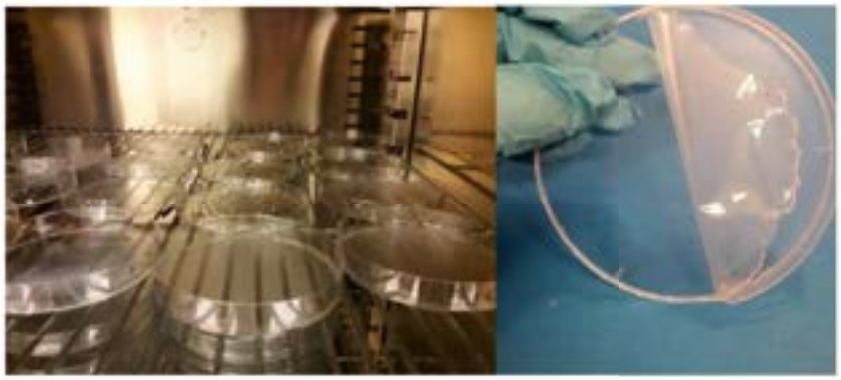
Bu çalışmada, kitosan içeren filmlerin oluşturulması için iki farklı polimerleştirici (jelatin ve nişasta) ve plastikleştirici (gliserol) ile kitosan numunelerinin karışımı kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Farklı formülasyonlar ile oluşturulmuş film denemeleri

Denemeler	Jelatin (%)	Nişasta (%)	Gliserol (%)	Fungal kitosan (%)	Ticari kitosan (%)
J	2	-	2	-	-
J+F	2	-	2	1	-
J+T	2	-	2	-	1
N	-	2	2	-	-
N+F	-	2	2	1	-
N+T	-	2	2	-	1

(N: nişasta, J: jelatin, F: fungal kitosan, T: ticari kitosan)

Her karışım, mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar 90 mm'lik steril petrilere dökülerek 2 gün kurutulmaya bırakılmıştır (Şekil 3.4). Her numune aynı yöntemle Çizelge 3.3'de gösterilen miktarlara göre hazırlanmıştır.



Şekil 3.4. Kitosan içeren filmlerin eldesi

Aynı çapa sahip petri kaplarında film oluşturulması için iki farklı hacimin (10 ve 20 ml) uygunluğu karşılaştırılmıştır. Kuruma sonrası 10 ml'lik filmlerin petriden ayrılma sırasında yırtılması nedeniyle sonraki çalışmalarda 20 ml hacim ile hazırlanan film numuneleri kullanılmıştır.

3.2.4.1. Fiziksel özellikler

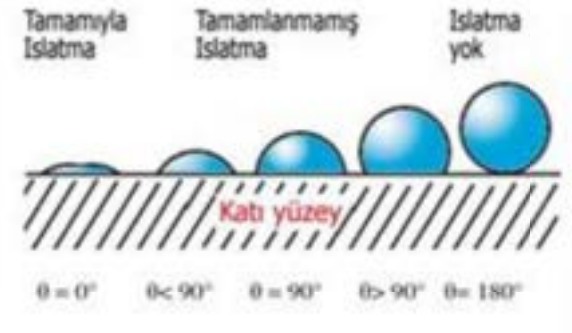
A. Suda çözünürlük testi (Sw)

Elde edilen kitosan film numunelerinin suda çözünürlük özelliği kurutma yöntemi ile belirlenmiştir. Öncelikle, film örnekleri kare biçiminde kesilmiş (1 x 1 cm) ve kurutma öncesinde tartılarak ağırlıkları (m0) kaydedilmiştir. Daha sonra etüvde 105 °C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra tartımları alınarak (m1), kilo kaybı oranı (m0-m1) olan nem kütlesi fraksiyonu (ω) belirlenmiştir. Kurutulan film örnekleri daha sonra 5 mL saf su içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat ve 24 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda, film örnekleri filtre kağıtları ile süzülmüş ve kabin fırınında 105 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Kurutma sorasında örnekler tekrar tartılarak ağırlıkları (m2) kaydedilmiştir. Çalışma üç paralelli olarak gerçekleştirilmiş ve aritmetik ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Kitosan filmlerin sudaki çözünme oranları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Feyzioğlu, 2016).

$$S(\%) = [\, m0\,(0-\omega) - m2 \,/\, m0\,(0-\omega)\,] \qquad (3.4)$$

B. Su iticilik testi (hidrofobik/hidrofilik testi)

Kitosan filmlerin suyu iticiliği konusundaki değerlendirme elde edilen film numunelerinin yüzeylerinin suyla yaptıkları değme açısına göre yapılmıştır. Su damlası yüzeyde yayılma eğilimi gösteriyorsa bu hidrofilik yüzey; damla yayılmak yerine küresel bir şekilde durma eğilimi gösteriyorsa hidrofobik yüzey olarak tanımlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Islatmaya bağlı su iticilik testi (Anonim, 2022c)

C. Elastiklik testi

Bir filmin biyomateryal olarak kullanılabilmesi için fiziksel ve mekanik bütünlüğünü etkin olarak koruyabilmesi gereklidir. Elde edilen filmlerin biyomateryal olarak kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla elastiklik testi gerçekleştirilmiştir. Test, oda sıcaklığında 1 mm/sn çekme hızında, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Malzeme Araştırma Laboratuvarında ISO 527 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Her film, üç paralel çalışılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.4.2. Kitosan filmin biyolojik aktiviteleri

A. Filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri

A1. Çözünürlüğe dayalı antimikrobiyal aktivite

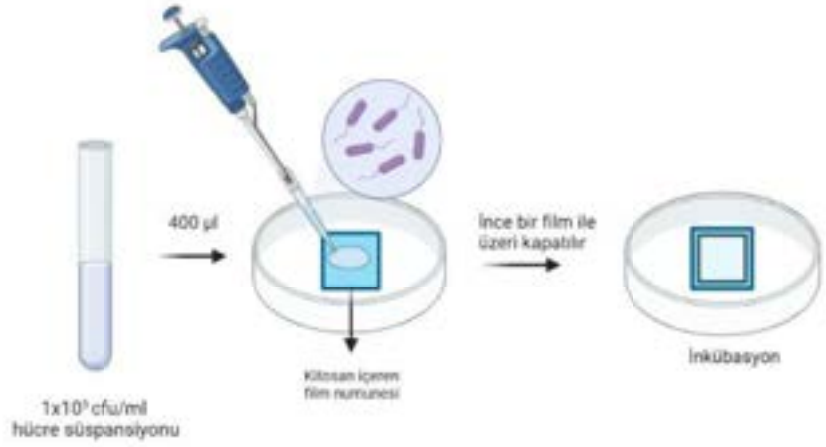
Çalışmada elde edilen film numunelerinin, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi, inkübasyon sonrası katı besiyerinde oluşan inhibisyon zon çaplarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bakteri ve maya için MacFarland 0.5'e, küf için 10^6 spor/ml'ye ayarlanmış süspansiyonlardan 100 µl alınarak ayrı ayrı katı besiyerlerine inoküle edilmiş ve steril drigalski spatülü yardımıyla agar yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra 10 dakika UV muamelesi ile steril edilmiş olan film parçaları mikroorganizma içeren agar yüzeyinin ortasına steril pens ile yerleştirilmiştir.

Bakteri ve maya içeren plakalar 32.5 °C'de 24 saat, küf sporu içeren plakalar 22.5 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir.

A2. Yüzeye bağlı antimikrobiyal aktivite

Elde edilen filmlerin yüzey antimikrobiyal aktiviteleri, ISO 22196 (plastiklerin ve gözeneksiz diğer materyallerin yüzeyindeki antibakteriyal aktivitenin ölçümü) standardına göre tayin edilmiştir. ISO 22196 standardı, plastik vb. yüzeylerin 24 saatlik temas süresi sonunda mikroorganizmaların üremesinin engellenmesi veya mikroorganizmaların öldürülmesini sağlama iddiasının test edildiği bir standarttır (Şekil 3.6).

ISO 22196 antimikrobiyal etkinlik testi *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri ile yapılmaktadır. Yöntem modifiye edilerek *C. albicans* ile antimaya, *A. brasiliensis* ile antiküf aktiviteleri de gerçekleştirilmiştir. Numuneler 3 x 3 cm ölçülerinde kesilerek UV ile 10 dakika steril edilerek kullanılmıştır. Analizler 3 paralelli gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. ISO 22196 standart yöntemi

Bakteri ve maya için aşılama hücre süspansiyonu MacFarland 0.5 standardına göre ayarlanarak bir seri dilüsyon ile 10^{-5}'ten, küf için 10^{6} spor/ml'ye ayarlanmış süspansiyondan 400 µl alınarak steril film yüzeylerine inoküle edilmiştir. Üzerine steril cover film kapatılarak mikroorganizmaların yüzeye dağılımı sağlanmıştır. Bakteri ve maya

inoküle edilen numuneler %90 nem 32.5 °C'de 24 saat, küf sporu içeren numuneler %90 nem 22.5 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Temas süresi sonunda örnekler nötralize edici solüsyona (SCDLP Broth: Soybean Casein Lecithin Polysorbate 80 Medium) alınarak antibakteriyel maddenin etkinliği durdurulmuştur. Beş dakika nötralizasyon uygulaması ile numunelerin yüzeyindeki mikroorganizmaların nötralize edici sıvıya geçmesi sağlanmıştır. Nötralize edici solüsyon steril fosfat tamponu içerisinde 1:10 oranında seri sulandırılmış, tüm sulandırma tüplerinden 1 ml alınarak bakteriler için Plate Count Agar, maya için Sabouraud Dekstroz Agar ve küf için Potato Dekstroz Agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Petri kaplarında oluşan koloniler sayılıp, ISO 22196 standardında belirtilen (R) ifadesine göre hesaplama yapılmıştır.

$$R = (U_t - A_t) \qquad (3.5)$$

R: Antibakteriyel aktivite değeri

U_t: 24 saatlik temas süresi sonunda kontrol örneklerindeki canlı hücrelerin (kob/cm^2) sayısının logaritması

A_t: 24 saatlik temas süresi sonunda test parçalarındaki canlı hücrelerin (kob/cm^2) sayısının logaritması

ISO 22196'ya göre bir yüzeyin antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilmesi için $R \geq 2$ olmalıdır.

B. Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri

Literatürde çeşitli materyallerin antioksidan aktivitelerinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden yalnızca birinin uygulanması ile olası antioksidan aktivitesi belirlenmesi yeterli görülmemektedir. Çünkü sadece bir yöntem antioksidan aktivite gösteren bir maddenin tüm olası etki mekanizmalarını belirlemek için yeterli değildir. Bu doğrultuda atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanı içeren film numuneleri ile ticari kitosan içeren film numunelerinin antioksidan aktiviteleri DPPH radikali süpürme aktivitesi, $ABTS^{+}$ radikali süpürme aktivitesi ve metal şelatlama aktivitesi yöntemleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Film numuneleri 10 mg (yaklaşık 1

cm^2'lik) olacak şekilde kesilmiştir. Kesilen numunelerin sterilizasyonu 10 dk UV ile yapılmıştır.

B1. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

DPPH çözeltisi (20 µg/mL) metanolde çözülerek taze olarak hazırlanmıştır. Film numuneleri 3 mL'lik DPPH çözeltisi ile 30 dakika ve 3 saat olmak üzere iki farklı sürede bekletildikten sonra absorbans değeri spektrofotometrede 517 nm'de ölçülmüştür. Çalışma 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Standart antioksidan madde olarak BHT ve askorbik asit çözeltileri (250-1000 µg/mL) kullanılmıştır. DPPH radikal giderme aktivitesi aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır (Kalyoncu vd., 2010).

$$\text{DPPH Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_0-A_1) / A_0] \times 100 \qquad (3.6)$$

A_0: Kontrolün absorbans değeri

A_1: Örnek veya standardın absorbans değeri

B2. $ABTS^+$ Radikali Süpürme Aktivitesi

$ABTS^+$ radikali süpürme aktivitesini belirlemek amacıyla 1 mL distile suda 7.4 mM ABTS çözülmüştür. Üzerine 2.6 mM $K_2S_2O_8$'den 1 mL ilave edilerek karıştırılmış ve 12-16 saat karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımın üzerine 60 mL metanol ilave edilmiştir. Bu çözeltinin 734 nm de spektrofotometrede absorbansı metanole karşı okunmuştur. $ABTS^+$ radikal katyonunun 734 nm'deki absorbansı 1.400±0.02'dir. Film numuneleri 3 ml ABTS çözeltisi ile muamele edilmiştir. Beş dakika karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede 734 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Pozitif kontrol çalışmaları için hazırlanan metanollü ABTS çözeltisinden 2,900 mL alınmıştır. Üzerine 100 µL BHT ve askorbik asit numunesinden (250-1000 µg/mL) konulmuştur. Negatif kontrol olarak numune yerine metanol içeren reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

$ABTS^+$ radikal giderme aktivitesi (%) aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır (Pellegrini vd., 1999).

$$ABTS^+ \text{ radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \qquad (3.7)$$

A_0: Kontrolün absorbans değeri

A_1: Örnek ve standardın absorbans değeri

B3. Metal Şelatlama Aktivitesi

Çalışmada kullanılacak film numunelerine 2ml saf su ilave edilmiş, üzerine 0.05 mL $FeCl_2$ (2 mM) çözeltisi eklenerek karışım 30 dk bekletilmiştir. Sonrasında karışıma 0.2 mL 5 mM ferrozin eklenip iyice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı köre karşı 562 nm'de ölçülmüştür. Absorbans değerindeki azalma; numunelerdeki metal şelat aktivitesinin yüksekliğini gösterir. Üç tekrarlı çalışma sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki formülde kullanılmıştır (Sarıkürkçü vd., 2008).

$$\text{Metal Şelatlayıcı Aktivite (\%)}: [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \qquad (3.8)$$

A_0: Standardın absorbansı

A_1: Numunenin absorbansı

3.2.5. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi ve *in vivo* denemesi

Bu çalışmada fermente ahır gübresi (AG-Rivasol®) ile atık *R. miehei* biyokütlesinden (fungal biyokütle; FB) oluşturulan karışımlar toprak solucanlarına mama olarak verilmesi neticesinde elde edilen vermikompostların kalitesi belirlenmiştir.

Çalışmanın bu iş paketi, Prof. Dr. İbrahim Mete Mısırlıoğlu (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir), Uzman Biyolog Osman Şen (Soloverm, Konya) ve Prof. Dr. Aysun Pekşen (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun)'in katkılarıyla tasarlanmıştır.

3.2.5.1. Vermikompost üretimi

Vermikompost üretiminde kullanılan yaş atık fungal biyokütle öncelikle saf su ile yıkanarak süzülmüş, bu yolla üzerindeki kontaminantlar uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.7). Daha sonra çalışmada kullanılmak üzere 65 °C'de 24 saat kurutulmuştur.



Şekil 3.7. Yıkanmış atık fungal biyokütle

Atık *R. miehei* biyokütlesinin, vermikompostlama işlemini gerçekleştirecek olan solucanlar için toksik olup olmadığı bir ön çalışma ile belirlenmiştir. 10 adet *E. fetida* solucanı doğrudan atık fungal biyokütlenin içerisine konularak, atık içerisine girip girmediği gözlenmiştir. 3 gün boyunca solucanların ortamdan kaçma davranışı sergileyip sergilemedikleri takip edilmiştir. Çalışma, solucanların herhangi bir kaçma eğilimi olmadığı belirlendikten ve bırakıldıkları kovada canlı olup olmadıkları kontrol edildikten sonra başlatılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesi (fungal biyokütle, FB) ile ahır gübresinin karıştırılma oranları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ahır gübresi ile atık fungal biyokütle karışımları

Vermikompostlar	Atık *R. miehei* biyokütlesi (FB) (%)	Ahır gübresi (AG) (%)
0FB+100AG (K1)	0	100
25FB+75AG (K2)	25	75
50FB+50AG (K3)	50	50
75 FB+25AG (K4)]	75	25

E. fetida için ideal olan yaşam ve besin ortamı koşullarının; sıcaklığı 15-24 °C, nem düzeyi %60-90, tuz miktarı 0.5 mg kg^{-1}'dan az, pH'sı 5-9 arasında ve oksijence zengin olması gerektiği literatürde açıklanmıştır (Mısırlıoğlu, 2011). Bu çalışma gerçekleştirilirken bahsedilen koşullar göz önünde bulundurulmuştur. Solucanların hareket alanı olması açısından 24 x 24.5 cm (5.5 L) ölçülerinde beyaz plastik kovalar kullanılmıştır (Şekil 3.8). Öncelikle bir miktar kompost plastik kovalar içerisine 5 cm yüksekliğinde ve zemini örtecek biçimde yayılmıştır. Üzerine önceden tartımı yapılan 50 adet *E. fetida* türüne ait solucan bireyleri bırakılarak kompost içerisine girip girmeyeceği gözlemlenmiştir. Daha sonra kalan karışım eklenerek kovaların üzeri havalanmayı engellemeyecek ve yabancı partikül ve canlıların girmesini engelleyecek şekilde tül ile kapatılmıştır. Her bir ortamın toplamı 6 kg olmakla birlikte %70 oranında saf su ile düzenli olarak nemlendirilmiştir. İnkübasyon aşırı sıcaklık nedeniyle meydana gelebilecek olan madde kayıplarını önlemek amacı ile doğrudan güneş ışığına maruz kalmayacakları bir alanda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost eldesi

E. fetida solucanlarının bir günde ağırlıklılarının %75'i kadar vermikompost üretebilmeleri nedeniyle çalışma 90 gün ile sınırlandırılmış ve periyodik olarak incelenmiştir (Ndegwa vd., 1999). Her bir karışım 4 paralel olarak çalışılmıştır. İnkübasyon denemesi toplam 48 kovadan (3 inkübasyon süresi x 4 paralel x 4 karışım) oluşturulmuş ve toplam 800 adet solucan kullanılmıştır. İnkübasyonun başlangıcı, 45 ve 90. günlerinde vermikompost kovalarındaki solucanlar el ile toplanarak sayımı yapılmış ve ağırlıkları tartılmıştır. Vermikompost numunelerinden 100 g alınarak fiziksel ve kimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Atık *R. miehei* biyokütlesi, ahır gübresi ve elde edilen vermikompostların fiziksel ve kimyasal analizleri

Atık *R. miehei* biyokütlesi ve AG-Rivasol® ahır gübresi ile atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin %0, 25, 50 ve 75 oranındaki karışımlarından elde edilen vermikompostların 0., 45. ve 90. günde pH, EC, organik madde, N ve mineral madde içerikleri tespit edilmiştir. Bu örneklerdeki pH ve EC değerleri taze örneklerde belirlenmiştir.

- **pH:** 10 g yaş vermikompost örneği 100 ml saf su (1:10) ile yarım saat karıştırıldıktan sonra pH metre cihazı ile belirlenmiştir (Rowel, 1996).

-Elektriksel iletkenlik (EC, dS m^{-1}): Elektriksel iletkenlik (EC), 1:10 oranında vermikompost örneği-saf su karışımı yarım saat karıştırılmış, sonra EC metre cihazı ile belirlenmiştir (Rowel, 1996).

İnkübasyon boyunca alınan vermikompost numuneleri 65 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Kurutulmuş numuneler nem çekmeyecek kaplarda, karanlık ve soğukta saklanmıştır. Doksan günün sonunda örneklerin tamamı aynı koşullarda analiz edilmiştir. Çalışmanın 0, 45 ve 90. günlerinde olmak üzere 3 farklı zamanda alınan vermikompost numunelerinde organik madde, N, P, K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Cd, Hg, Pb analizleri ve K_2O, P_2O_5, CaO ve MgO hesaplamaları Prof. Dr. Aysun Pekşen (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

-Organik madde (%): Tartılan örneklerin porselen kroze içerisinde 550 °C'de kül fırınında yakılması ile belirlenen kül miktarının 100'den çıkarılması ile organik madde içerikleri belirlenmiştir.

-**Azot miktarı (N, %):** Kjeldahl metoduna göre belirlenmiştir (Kacar ve İnal, 2008).

-**Mineral madde miktarının belirlenmesi:** 65 °C'de kurutulup öğütülen örneklerden 0.5 g yaş yakma tüpünün içerisine konulmuştur. Tüpe 1 ml hidrojen peroksit ve 5 ml nitrik asit ilave edilerek tüplerin ağzı kapatılmış ve 180 °C'de mikrodalgada yakılmıştır. Daha sonra soğuyan tüplerin içi ultra saf su ile yıkanmış, 50'lik steril falkon tüpü içerisinde ultra saf su ile seyreltme yapılmıştır. Hazırlanan numuneler ve standart çözeltiler ICP-MS cihazında cps değerleri ölçülmüş ve kalibrasyon grafiğinden faydalanarak mineral madde analiz (K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Cd, Hg ve Pb) sonuçları %, mg kg^{-1} ve µg kg^{-1} olarak belirlenmiştir (Julshamn vd, 2007). Örneklerin fosfor miktarı, Vanomolibdofosforik sarı renk yöntemine göre 430 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak belirlenmiştir (Kaçar ve İnal, 2008).

3.2.6. Vermikompostun sera koşullarında *in vivo* denemesi

Bu aşamada atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların marul fidesi üretiminde yetiştirme ortamı olarak kullanım durumu araştırılmıştır. Bu amaçla üretilen 4 farklı vermikompostun %0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 oranlarında torf ile hazırlanan karışımların marulda fide gelişimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşaması, Prof. Dr. Aysun Pekşen (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun) ve lisans öğrencisi Zehra Şa'nın desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Ortam hazırlığı ve dikim

Araştırma, Nisan-Mayıs 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi sera ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada Papyon kıvırcık marul (*Lactuca sativa* L.) çeşidi kullanılmıştır. Elde edilen vermikompostların fide gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada; 4 farklı vermikompostun [0FB+100AG (K1), 25FB+75AG (K2), 50FB+50AG (K3) ve 75 FB+25AG (K4)] %10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 oranlarında torf ile karışımlarından hazırlanan 32 ortam ve kontrol olarak torf ortamı (%0 vermikompost) kullanılmıştır.

Hazırlanan her bir ortamdan alınan örnekler 3 tekrarlamalı olacak şekilde 1:10 ortam/saf su şeklinde hazırlanmış, 7-8 saat bekletildikten sonra manyetik karıştırıcıda

çalkalanmıştır. Hazırlanan örneklerde pH metre ve EC metre ile pH ve elektriksel iletkenlik (EC, dS m^{-1}) değerleri tespit edilmiştir.

Tohum ekimi; dış ebatı 530 x 315 mm, üst ağız çapı 32 x 32 mm, derinliği 55 mm ve hacmi 33 cc olan 104 gözlü viyollere 03.04.2022 tarihinde yapılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlamalı ve her tekrarlamada 30 göze tohum ekimi olacak şekilde kurulmuştur. Tohum çıkış oranı aşağıda verilen formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Çıkış oranı} = (\text{Çimlenen tohum sayısı} / \text{Toplam tohum sayısı}) \times 100 \qquad (3.9)$$

Yetiştirme periyodu boyunca nem durumu kontrol edilerek gerekli görüldüğünde sulama yapılmıştır. Fidelere kimyasal gübre veya ilaç uygulanması yapılmamıştır.

3.2.6.2. Fidelerde yapılan ölçümler

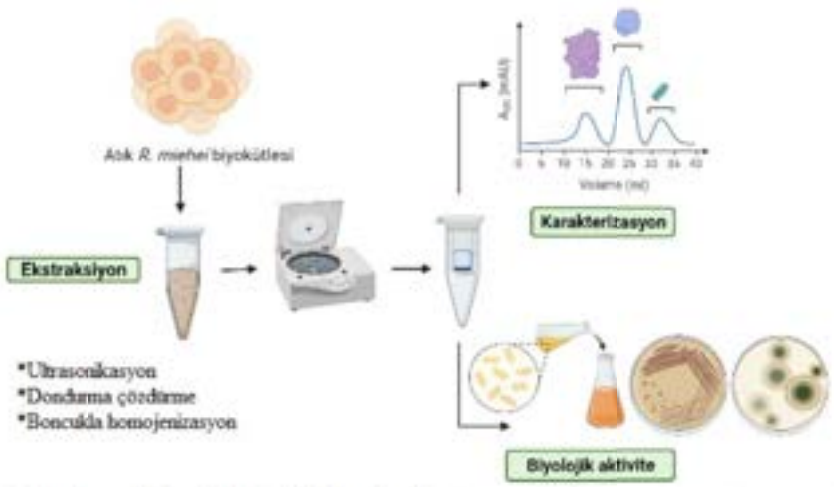
Çalışmada her uygulama için 10 fidede; fide boyu (cm), yaprak sayısı (adet), klorofil değeri (CCI), toprak üstü yaş ve kuru ağırlığı (g), kök yaş ve kuru ağırlığı (g) ve renk (L*, a* ve b*) özellikleri belirlenmiştir. Fideler söküldükten sonra kökleri gövdeye bağlandığı kısımdan kesilmiştir. Fide boyu; yetiştirme ortamı yüzeyinden kesilen kısım ile en uzun yaprağın ucuna kadar olan mesafenin cetvel yardımıyla ölçülmesi ile belirlenmiştir. Fidelerin yaprak sayıları adet/fide olarak saptanmıştır. Fidenin toprak üstü ve kök ağırlıklarının saptanmasında 0,0001 g hassasiyette hassas terazi kullanılmıştır. Kök yaş ağırlığı (g) belirlenirken önce marul fidelerinin kökleri dikkatli bir şekilde yıkanmış, kökler zarar görmeyecek şekilde kağıt havlu ile kurulanmış, daha sonra hassas terazide ölçülerek tespit edilmiştir. Yaş ağırlıklar belirlendikten sonra etüvde 105 °C'de sabit ağırlığa ulaşana kadar örnekler kurutulmuş, hassas terazide tartılarak kuru ağırlıklar belirlenmiştir. Marul fidelerinde tam gelişmiş ilk gerçek yaprakta klorofil ölçer (CCM-200, Opti-Sciences, Hudson, USA) ile klorofil miktarı ve minolta renk ölçer (Croma Meter, CR-300, Japon) ile L*, a* ve b* değerleri belirlenmiştir. L rengin parlaklığını (0: Siyah, 100: Beyaz), a Kırmızılık Yeşillik (-60: Yeşil, +60: Kırmızı), b ise Sarılık Mavilik (-60: Mavi, +60: Sarı) ifade etmektedir (Konica Minolta, 2007; Keskin vd., 2017).

İstatistiksel Analiz

Verilerin varyans analizinde IBM SPSS Statistics 20 versiyon kullanılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) sonucunda istatistiksel olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Tohum çıkış oranı % değerler olduğundan bu değerlere arcsin transformasyonu uygulanmıştır.

3.2.7. Atık *R. miehei* biyokütlesinden mikrobiyolojik besiyeri bileşeni üretimi

Çalışmanın bu aşamasında atık *R. miehei* biyokütlesinin, mikrobiyolojik besiyerlerinde alternatif azot kaynağı olarak kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen iş akış şeması Şekil 3.9'da özetlenmiştir.



Şekil 3.9. Besiyeri içeriğinde kullanılmak üzere atık *R. miehei*' den azot kaynağı üretim şeması

3.2.7.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden protein ekstraksiyonu

Hücre içerisindeki proteinin ekstrakte edilebilmesi için lizis yöntemleri olarak ultrasonikasyon, dondurma-çözdürme ve boncukla ekstraksiyon yöntemleri test edilmiştir. Böylelikle atık biyokütlede bulunan protein içeriğinin ekstrakt haline getirilerek besiyeri katkı maddesi olarak kullanım olanağının arttırılması amaçlanmıştır. Bunun için üç farklı yöntem, değişken parametreler ve bu değişkenlerin tamamını içeren bir tasarım ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Her örnek için üç tekrar analizi yapılmıştır.

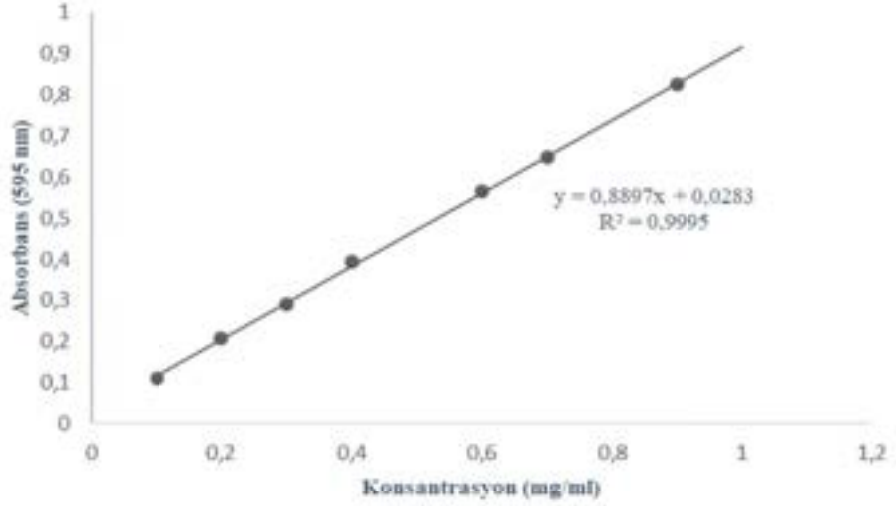
Ekstrakte edilen protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Özel vd., 2014). Bu yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Coomassie Brillant Blue G-250 boyası kuvvetli bir asitte çözündüğü zaman, protonlanmadan dolayı kırmızı-kahverengi arası bir renge dönüşür. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise renk maviye dönüşür. Bu boya, (+) yüklü bir proteine bağlandığında ise 595 nm de mavi bir renk oluşur. Renk oluşumu 5 dakikada tamamlanır. Ancak 10-15 dakika içinde çökmeler olabilir.

Bu çalışmada protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Bradford reaktifi için 0.1 g coomassie brilliant blue G-250 tartılıp 50 ml etanol içerisinde çözdürülmüştür. Üzerine 100 ml fosforik asit ilave edilmiştir. Çözelti, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak, 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda ışık görmeden karıştırılmıştır. Whatman No. 1 filtreden geçirilmiştir. Bradford reaktifi oda sıcaklığında saklanmıştır. Elde edilen reaktif Çizelge 3.5'de bulunan oranlarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Bradford yönteminin uygulanması

	Kör (ml)	**Örnek (ml)**
Distile su	0.1	-
Örnek	-	0.1
Bradford reaktifi	5	5
Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir ve 595 nm' de absorbans ölçülür.		

Ölçümler Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Her analiz için ayrı standart eğri hazırlanmıştır. Hesaplamalar BSA ile oluşturulan standart eğrilere göre yapılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. BSA ile oluşturulan standart eğri

Günümüzde sanayi devriminden sonra kimyasal kullanımının yaygınlaşması, dünyadaki doğal kaynakların tüketilmesi, yüksek miktarlarda atıkların çıkması ve maliyetlerin artması ile ciddi bir sorunla karşı karşıya kalmaktayız (Gür ve Karagölge, 2016). Bu nedenle yeşil mutabakat kapsamında kötüye giden durumu iyileştirmek, kaynakları doğru ve verimli kullanabilmek için sürdürebilirlik hareketi başlatılmıştır. Yeşil kimya, çevre kirliliğinin önlenmesi için, endüstiyel uygulamalarda kullanılan kimyasalların azaltılması, mümkünse hiç kullanılmaması ya da çıkan atıkların geri kazanımının sağlanmasını teşvik etmektedir. Özellikle birçok atığın hidroliz aşamasında kimyasal kullanımı, mekanik yöntemlere göre daha etkin olmasına rağmen birçok dezavantaja sahiptir. Dünyamızda gelinen nokta düşünüldüğünde daha fazla kimyasal atık oluşumuna neden olmadan temiz yöntemlerin kullanım olanakları denenmelidir. Bu anlamda yeşil kimya ekonomik, güvenli ve doğaya karşı sorumlu bir bilinçle araştırma ve üretim olanağı sağlamaktadır. Bu çalışmada, yeşil kimya hareketi göz önünde bulundurularak çeşitli kimyasallar kullanılarak yapılan hücrenin kimyasal lizisine karşın mekanik yöntemler ve kimyasal yerine su kullanılması tercih edilmiştir. Mekanik yöntemlerden ultrasonikasyon, dondurma-çözdürme ve boncukla ekstraksiyon yöntemleri ile proteince zengin fungal ekstraktların eldesi amaçlanmıştır.

A. Ultrasonikasyon ile ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Ultrasonikasyon (US), ultrasonik dalgaların kuvvetlerini kullanarak oluşan basınç dalgalarının kavitasyon veya mikrobaloncuklar üretmesidir. Bu şekilde hücrelerin parçalanması, dalga yoğunluğu yaklaşık 20 Kilohertz/s olan yüksek frekanslı ses üretebilen ultrasonik titreşkenler tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre süspansiyonuna titanyum prob daldırılır. Dönüştürücünün ultrasonik dalgaları mekanik titreşime dönüştürmesiyle hücrelerin mekaniksel lizisi başlatılmış olunur. Ancak bu teknik, ısıya hassas proteinleri denatüre edebilecek ısıyı da üretmektedir. Bu nedenle denemeler sürecinde numuneler soğuk su banyosunda tutulmuştur. Elde edilen protein maksimum oranda eldesi için etkili parametrelerin belirlenmesi için istatiksel yöntemlerden Plackett-Burman (PB) deney tasarımı kullanılmıştır. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde 6 değişken belirlenmiştir. Kullanılan değişkenlerin yüksek miktarı (+1), düşük miktarı ise (-1) olarak ifade edilmiştir. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Bu aşamada 8 farklı deneme gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.6. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı ve birimi	Düşük değer -1	Yüksek değer +1
X_1	Biyokütle partikül çapı (mm)	0,5	1
X_2	Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	1/5	1/10
X_3	Ultrasonikasyon genliği (%)	20	30
X_4	Ultrasonikasyon süresi (dk)	1	5
X_5	Ultrasonikasyon titreşimi	kesikli (20sn aralıklarla)	sürekli
X_6	Ultrasonikasyon döngü sayısı	1	5

Çizelge 3.7. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB tasarımı

Deneme	Biyokütle partikül çapı (mm)	Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	US genliği (%)	US süresi (dk)	US titreşimi	US döngü sayısı
1	1	1/10	30	5	sürekli	5
2	1	1/10	20	1	kesikli	1
3	1	1/5	30	5	kesikli	1
4	1	1/5	20	1	sürekli	5
5	0,5	1/10	30	1	sürekli	1
6	0,5	1/10	20	5	kesikli	5
7	0,5	1/5	30	1	kesikli	5
8	0,5	1/5	20	5	sürekli	1

Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemini etkileyen değişkenlerin seviyelerinin belirlenmesinde cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre önemli bulunan 3 değişkenin seviyelerini belirlemede Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Bu değişkenler için +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 düzey test edilmiştir (Çizelge 3.8). Bu şekilde 17 farklı kombinasyonda 51 adet ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 3.9). Diğer parametreler, biyokütle partikül çapı 0.5 mm, biyokütle/sıvı oranı 1:5 (a/h) ve ultrasonikasyon titreşimi kesikli (20 sn aralıklarla) olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.8. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı	-1	0	+1
X_3	Ultrasonikasyon genliği (%)	20	25	30
X_4	Ultrasonikasyon süresi (dk)	3	5	7
X_6	Ultrasonikasyon döngü sayısı	3	5	7

Çizelge 3.9. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı

Deneme	X_3 Ultrasonikasyon genliği	X_4 Ultrasonikasyon süresi	X_6 Ultrasonikasyon döngü sayısı
1	25	7	7
2	25	5	5
3	20	5	3
4	25	5	5
5	20	3	5
6	25	3	3
7	25	5	5
8	25	7	3
9	30	7	5
10	20	7	5
11	25	5	5
12	30	5	7
13	30	5	3
14	20	5	7
15	25	3	7
16	30	3	5
17	25	5	5

B. Dondurma-çözdürme ile ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Dondurma-çözdürme yöntemi, hücrelerin parçalanması için uygulanan geleneksel yöntemlerden biridir. Dondurulan hücrenin çözünmesine bağlı olarak iki mekanizma gerçekleşir. Soğutma sıcaklığı ile donma sıcaklığı arasındaki fark fazla olursa buz kristalleri oluşur ve hücreler mekanik hasardan ölür. Bunun tam tersi durumda ise hücre içinde oluşan serbest su hücrenin lizisine neden olur (Ban vd., 2018). Bu çalışmada saf su kullanılarak atık fungal biyokütleden dondurma-çözdürme yöntemiyle protein ekstraktının eldesi gerçekleştirilmiştir. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.10'da verilmiştir. Elde edilen protein maksimum oranda eldesi için istatiksel yöntemlerden Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.10. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı	Düşük değer -1	Yüksek değer +1
X_1	Biyokütle partikül çapı (mm)	0,5	1,0
X_2	Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	1/5	1/10
X_3	Dondurma sıcaklığı (°C)	-20	-86
X_4	Dondurma süresi (saat)	4	24
X_5	Çözdürme sıcaklığı (°C)	25	37
X_6	Dondurma-çözdürme döngü sayısı	1	5

Çizelge 3.11. Dondurma çözdürme yönteminde kullanılan PB tasarımı

Deneme	Biyokütle partikül çapı (mm)	Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	Dondurma sıcaklığı (°C)	Dondurma süresi (saat)	Çözdürme sıcaklığı (°C)	Dondurma-çözdürme döngü sayısı
1	1	1/10	-86	24	37	5
2	1	1/10	-20	4	25	1
3	1	1/5	-86	24	25	1
4	1	1/5	-20	4	37	5
5	0,5	1/10	-86	4	37	1
6	0,5	1/10	-20	24	25	5
7	0,5	1/5	-86	4	25	5
8	0,5	1/5	-20	24	37	1

Dondurma-çözdürme yöntemini etkileyen değişkenlerin seviyelerinin belirlenmesinde cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre önemli bulunan 3 değişkenin seviyelerini belirlemesinde Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Bu değişkenler için +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 düzey test edilmiştir (Çizelge 3.12). Bu şekilde 17 farklı kombinasyonda 51 adet ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.13). Diğer parametreler, biyokütle partikül çapı 0.5 mm, biyokütle/sıvı oranı 1:5 (a/h) ve dondurma sıcaklığı -86 °C olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.12. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı	-1	0	+1
X_4	Dondurma süresi (s)	2	3	4
X_5	Çözdürme sıcaklığı (°C)	13	25	37
X_6	Dondurma-çözdürme döngü sayısı	3	5	7

Çizelge 3.13. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı

Deneme	X_4 Dondurma süresi	X_5 Çözdürme sıcaklığı	X_6 Dondurma-çözdürme döngü sayısı
1	3	37	7
2	3	25	5
3	2	25	3
4	3	25	5
5	2	13	5
6	3	13	3
7	3	25	5
8	3	37	3
9	4	37	5
10	2	37	5
11	3	25	5
12	4	25	7
13	4	25	3
14	2	25	7
15	3	13	7
16	4	13	5
17	3	25	5

C. Boncuk ile ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Boncukla öğütme yöntemi, partikülleri öğütmek için genel olarak seramik, cam veya metalden yapılmış küçük boncuklar ile çarpıştırma işlemidir. Hücreleri işlerken, bu öğütme mekanizması onları parçalamak için kullanılmaktadır. Hücre kırılması, kayma kuvveti, boncuk arası öğütme ve boncuklarla çarpışmadan kaynaklanmaktadır. Hücre kırılmasının etkinliği, karıştırma hızı, boncuk boyutu, boncuk yoğunluğu ve çapı, sıvı yoğunluğu gibi bazı değişkenlere bağlıdır.

Bu yöntemin optimizasyonu ile maksimum protein eldesi amaçlanmıştır. Özellikle boncuk çeşidi oldukça önemlidir (Klimek-Ochab vd., 2011). Bu nedenle boncukla öğütme yönteminde kullanılacak olan boncuk çeşidinin belirlenmesi için paslanmaz çelik, zirkonyum ve cam olmak üzere 3 farklı boncuk çeşidi üzerine bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11). Diğer parametreler sabit tutularak üç farklı boncuk çeşidi test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek protein miktarını veren boncuk çeşidi olan paslanmaz çelik boncukla bir sonraki aşama gerçekleştirilmiştir. Plackett-Burman deney tasarımı ve kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri ile çalışmanın tasarımı sırasıyla Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Boncuk çeşitleri

Çizelge 3.14. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı	Düşük değer -1	Yüksek değer +1
X_1	Biyokütle partikül çapı (mm)	0,5	1,0
X_2	Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	1/5	1/10
X_3	Boncuk çapı (mm)	0,5	1,0
X_4	Boncuk ağırlığı (g)	0,8	1,0
X_5	Vorteks hızı (rpm)	600	2400
X_6	Vorteks süresi (dk)	1	5
X_7	Vorteks döngü sayısı	1	5

Çizelge 3.15. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan PB tasarımı

Deneme	Biyokütle partikül çapı (mm)	Biyokütle/sıvı oranı (a/h)	Boncuk çapı (mm)	Boncuk ağırlığı (g)	Vorteks hızı (rpm)	Vorteks süresi (dk)	Vorteks döngü sayısı
1	1	1/10	1	1	2400	5	5
2	1	1/10	0,5	0,8	600	1	5
3	1	1/5	1	1	600	1	1
4	1	1/5	0,5	0,8	2400	5	1
5	0,5	1/10	1	0,8	2400	1	1
6	0,5	1/10	0,5	1	600	5	1
7	0,5	1/5	1	0,8	600	5	5
8	0,5	1/5	0,5	1	2400	1	5

Boncukla ekstraksiyon yöntemini etkileyen değişkenlerin seviyelerinin belirlenmesinde cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre önemli bulunan 3 değişkenin seviyelerini belirlemede Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Bu değişkenler için +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 düzey test edilmiştir (Çizelge 3.16). Bu şekilde 17 farklı kombinasyonda 51 adet ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.17). Diğer parametreler, biyokütle partikül çapı 0,5 mm, biyokütle/sıvı oranı 1:5 (a/h), boncuk ağırlığı 0.8 g ve vorteks hızı 2400 rpm olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.16. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken değişkenleri ve seviyeleri

Değişen kodu	Değişken adı	-1	0	+1
X_3	Boncuk çapı (mm)	1,0	1,5	2,0
X_6	Vorteks süresi (dk)	3	5	7
X_7	Vorteks döngü sayısı	3	5	7

Çizelge 3.17. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Box-Behnken tasarımı

Deneme	X_3 Boncuk çapı	X_6 Vorteks süresi	X_7 Vorteks döngü sayısı
1	1,5	7	7
2	1,5	5	5
3	1	5	3
4	1,5	5	5
5	1	3	5
6	1,5	3	3
7	1,5	5	5
8	1,5	7	3
9	2	7	5
10	1	7	5
11	1,5	5	5
12	2	5	7
13	2	5	3
14	1	5	7
15	1,5	3	7
16	2	3	5
17	1,5	5	5

Elde edilen sıvı ekstraktlar falkonlara eşit olacak şekilde dağıtılarak 8500 rpm'de 15 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant başka bir şişeye aktarılmıştır ve pellet atılmıştır. Her üç yöntem için optimize edilen koşullarda elde edilen protein ekstraktları liyofilizasyon ile toz haline getirilmiştir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) süspansiyon halde veya çözelti halinde bulunan ürünlerin dondurulması ve sonrasında süblimasyon yoluyla gaz fazının uzaklaştırılması yöntemine dayalı bir işlemdir. Bu aşamada ürünler katı halden sıvı faza geçmeden düşük basınca maruz kalarak kurutulmaktadır (Karagül ve Altuntaş, 2018). Farklı yöntemlerle elde edilen ve -80 °C'de bekletilen protein ekstraktları liyofilizatör kullanılarak toz hale getirilmiştir. Örnekte su miktarının yüksek olması ve cihaz kapasitesinin düşük olması dolayısıyla yaklaşık 4 gün süren liyofilizasyon işlemi neticesinde kuru toz ürün elde edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Atık R. miehei biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen fungal ekstrakt tozları (1: Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen U-fungal ekstrakt, 2: Dondurma-çözdürme yöntemi ile elde edilen D-fungal ekstrakt, 3: Boncukla ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen B-fungal ekstrakt)

3.2.7.2. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin karakterizasyonu

A. Toplam kül ve kuru madde miktarının belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşeninin (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt), kül tayinleri 550°C sıcaklıkta yakma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Nem miktarları, nem cihazı (Radwag, MA 50.R.WH) ile tayin edilmiş ve ağırlık kaybı cinsinden yüzde olarak belirlenmiştir. Kuru madde miktarları nem üzerinden aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Dikel ve Yanar, 2018).

$$\%\ \text{Toplam Kuru Madde Miktarı (g/100 g)} = 100 - \%\ \text{Nem miktarı} \qquad (3.10)$$

B. Toplam şeker miktarının belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı ekstraktın toplam şeker (karbohidrat) içeriğini belirlemek için fenol-sülfürik asit (FSA) metodu uygulanmıştır (Dubois vd., 1956). Standart olarak glikoz kullanılmıştır. 0,1 g toz numune 10 ml distile suda çözdürülmüştür. Bir ml numune ve ardından 1 ml %5'lik fenol çözeltisi cam tüpe eklenmiştir. Vortekslenerek karıştırılan tüplere dikkatlice 5 ml %95'lik sülfürik asit konmuştur. 20 dakika beklenip süre sonunda tüplerin kapakları kapalı şekilde dikkatlice vortekslenerek karıştırılmıştır. Oluşan sarı turuncu renklerin koyulukları spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV/VIS) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerlerinin standart eğriye (glikoz) ait denklemde yerine konmasıyla toplam şeker miktarı hesaplanmıştır.

C. Toplam azot ve aminoasit içeriğinin belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşeninin (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) ham azot/protein içeriği, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümünde Prof. Dr. Gülçin Işık yardımıyla Kjeldahl cihazı (Foss, Kjeltech 2300) kullanılarak ölçülmüştür.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşeninin (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) aminoasit kompozisyon tayini JASEM (İstanbul, Türkiye) firmasından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

D. Yağ asidi içeriğinin belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşeninin (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) yağ asidi profili gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) tarafından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

E. Moleküler ağırlık dağılımının analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşeninde (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) bulunan proteinlerin moleküler ağırlıklarının dağılımının analizi, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir. SDS PAGE protein elektroforezi analizi, OMÜ-KİTAM (Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi) tarafından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminde molekül ağırlıkları bilinmeyen proteinler, molekül ağırlıkları bilinen standart protein markerleri kullanılarak örneklerdeki proteinler bunlarla kıyaslanarak molekül ağırlıkları tayin edilmiştir. Bunun için marker ve molekül

ağırlığı bilinmeyen proteinler aynı jelde ve aynı şartlar altında elektroforezde yürütülmüştür.

3.2.7.3. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen *R. miehei* biyokütlesinin ekstraktlarının azot kaynağı olarak kullanım potansiyeli, prokaryotik ve ökaryotik model organizmaların üremesini desteklemesi açısından araştırılmıştır. Bu amaçla fungal ekstraktlar 4 bakteri, 2 maya ve 2 filamentöz mikrofungus türünün üreme ortamın azot kaynağı olarak ilave edilmiştir. Gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus subtilis* NRRL-B-558, maya *Candida albicans* ATCC 60193 ve *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y12632, küf *Aspergillus brasiliensis* ATCC 1094 ve *Aspergillus flavus* NRRL1957 olmak üzere geniş bir mikroorganizma grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma öncesi test mikroorganizmalarından bakteriler ve mayalar 35 °C'de 24 saat, küfler 27 °C'de 7 gün aktifleştirilmiştir.

A. Sıvı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı fungal ekstraktın (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) mikroorganizmaların üremesinde kullanılan besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılabilirlikleri üç farklı konsantrasyonda (%1, 2 ve 3) araştırılmıştır. Test besiyerleri, toz ekstraktlar belirlenen konsantrasyonlara göre tartıldıktan sonra 0.5 g sodyum klorür, 0.25 g glikoz ile karıştırılarak son hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır. Bakteriler için hazırlanan besiyerlerinin pH'sı 7.1'e ayarlandıktan sonra 121°C 15 dakika steril edilmiştir. Otoklav öncesi ve sonrası pH değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak bakteriler için Triptik Soy Broth (Merck), mayalar için Sabouraud Dekstroz Broth (Merck), küfler için Potato Dekstroz Broth (Merck) kullanılmıştır. Bu besiyerleri üreticileri tarafından önerilen yönteme göre hazırlanmıştır. Bazı ticari azot kaynakları da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu amaçla yedi farklı azot kaynağı, Bacteriological Pepton (Hmedia), Malt extract (Merck), Yeast extract (Merck), Beef extract powder (Acumedia), mycological pepton (LabM), Peptone from soymeal (Merck), Peptone from meat (Merck), üç farklı

konsantrasyonda (%1, 2 ve 3) kullanılarak yukarıda belirtilen biçimde besiyerleri hazırlanmıştır.

Çalışma, bakteri ve maya türleri için steril 96 kuyucuklu mikroplakalarda gerçekleştirilmiştir. Bakteri ve mayalar için McFarland 0.5 standardına göre ayarlanmış aktif hücre süspansiyonlarından ekim yapılmıştır. Mikroplakalar mikroorganizma ekiminden sonra 35°C'de 36 saat inkübe edilmiştir. Bakteri ve mayaların üremesi, 4 saat aralıklarla 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm (Biotek Powerwave XS) ile belirlenmiştir.

Küf test mikroorganizmaları (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 1094 ve *Aspergillus flavus* NRRL1957) için, atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen ekstraktlar (U-, B- ve D-fungal ekstrakt), alternatif azot kaynaklarını üç farklı konsantrasyonda (%1, 2 ve 3) içeren sıvı besiyerleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan Potato Dekstroz Broth besiyeri 50 ml hazırlanarak otoklavda steril edilmiştir. Küf test mikroorganizmalarının inokülantları thoma lamında spor sayımı yapılarak 10^8 spor/ml olacak biçimde hazırlanmıştır. İnokülasyon sonrası 28±2°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası biyokütle toplanıp kurutularak tartım yöntemiyle ağırlıkları belirlenmiştir. Sterilizasyon sonrası ve inkübasyon sonrası besiyerlerin pH değerleri ölçülerek kaydedilmiştir.

B. Katı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması

Atık *R. miehei* biyokütlesinden üç farklı yöntemle elde edilen üç farklı besiyeri bileşenleri (U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt) ve diğer bileşenleri sıvı besiyeri denemesi sonucu elde edilen en iyi konsantrasyon üzerinden katı besiyeri çalışmalarında tek konsantrasyonda (%3) çalışılmıştır. Besiyeri bileşenleri %3 konsantrasyonuna göre tartıldıktan sonra 0.5 g sodyum klorür, 0.25 g glikoz ve 1.5 g agar ile karıştırılarak son hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır. Bakteriler için hazırlanan besiyerlerinin pH' sı 7.1'e, mayalar ve küfler için pH'sı 5.6' ya ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri petrilere (90 x 17 mm) döküldükten sonra besiyerinin donması beklenmiştir. Daha sonra bakteri ve mayalar için McFarland 0.5'e göre ayarlanmış hücre süspansiyonlarından 0.1 ml ekim yapılmış ve steril drigalski spatülü ile aseptik koşullarda hücreler yayılmıştır. Bakteri ve mayalar, 35 °C'de sırasıyla 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni sayısı ve makro morfolojisi

incelenmiştir. Küflerin ise steril iğne öze yardımıyla petri kutusunun merkezine tek nokta ekimi yapılmıştır. Petriler, 28±2°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Günlük misel büyüme çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Spor oluşturma yetenekleri skor verilerek (-: yok, +:az, ++:orta, +++:çok) kaydedilmiştir.

Verilerin varyans analizinde SPSS 25 programı kullanılmıştır. Sıvı besiyeri çalışmalarının istatiksel analizleri iki yönlü, katı besiyeri çalışmalarının istatistiksel analizleri tek yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Varyans analizi (ANOVA) sonucunda istatistiksel olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi

Son zamanlarda yeni nesil katkı maddeleri arasında yer alan kitosan, gıda, sağlık, tarım ve çevre biyoteknolojisi alanlarında araştırmalar yapılan önemli bir katkı maddesi haline gelmiştir. Ticari kitin ve kitosan, yalnızca deniz canlılarından elde edilmektedir. Özellikle gıda endüstrisinin bir atığı olan yengeç ve karides gibi deniz kabuklularının atıkları önemli bir kaynaktır. Deniz canlıları atıkları, kuru ağırlıklarının %14-35'i kadar kitosan içermektedir (Gökçe, 2008). Bununla birlikte bu hayvansal kaynaklı kitin ve kitosanlar, mevsimsel sınırlamalar ve toksisite gibi riskler içermesi nedeni ile yeni kitosan kaynaklarına yönelim artmıştır. Çizelge 4.1'de deniz canlıları ve fungal kaynaklardan elde edilen kitosanların karşılıklı avantaj ve dezavantajları sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Fungal ve deniz canlıları kaynaklı kitosanların karşılaştırılması (Gül, 2020)

Özellik	Deniz canlıları	Fungal kaynak
Kaynak	Hayvansaldır.	Vejeteryan olarak kabul edilir.
Toksisite	Toksisite problemi vardır.	Toksisite problemi yoktur.
Sınırlaması	Mevsimsel ve çoğrafik sınırlamaları mevcuttur.	Sınırlamaları yoktur. Bulunabilirliği kolaydır.
İnorganik materyal	Düşük seviyededir	Yüksek seviyededir.
Atık yönetimi	Atık miktarı fazladır ve atık bertaraf maliyeti yüksektir.	Atık miktarı azdır ve atık bertaraf maliyeti düşüktür.
Demineralizasyon işlemi	Gereklidir.	İhtiyaç duyulmaz.
Fiziko-kimyasal özellikler	Tutarlıdır.	Çeşitlilik gösterir.

Genel olarak mantarların hücre duvarlarında polisakkaritler, kitin, kitosan, glukan, glikoproteinler ve lipidler bulunmaktadır. Fungal kaynakların kitin ve kitosan miktarı, kuru ağırlığının %2- 42 aralığındadır (Wu, 2004). Fungal kaynaklarından fermentasyon teknolojisi ile kitin ve kitosan üretimi, mevsimsel sınırlamanın olmadığı, toksik olmayan, helal ve vegan gibi çeşitli tüketici isteklerini karşılayan önemli avantajlara sahiptir (Kurita,

2006). Bazı fungal kaynaklardan çeşitli araştırmacılar tarafından kitosan elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen kitosan miktarları

Mikroorganizma	Kitosan miktarı (mg/g)	Referans
Absidia glauca	52-59	Miyoshi vd., 1992
Rhizopus oligosporus	32	Tan vd., 1996
Mucor rouxii	33-204	Synowiecki ve Al-Khateeb, 1997
Absidia orchidis	18-69	Jaworska ve Konieczna, 2001
Aspergillus niger	107	Pochanavanich ve Suntornsuk, 2002
Rhizopus oryzae	138	
Pleurotus sajor-caju	12	
Candida albicans	44	
Lentinus edodes	33	
Gongronella butleri	58–216	Nwe vd., 2002
Penicillium chrysogenum	29-57	Tianwei vd., 2002
Mucor racemosus	12-117	Wu, 2005
Rhizomucor pusillus	80	Zamani vd., 2007
Rhizomucor miehei	14-137	Tajdini vd., 2010
Rhizopus oryzae	44-138	Vaingankar vd., 2014
Cunninghamella elegans	35-78	
Rhizopus arrhizus	21-58	Berger vd., 2014
Benjaminiella poitrasii	51–78	Mane vd., 2017

Fungal kaynaklardan iki şekilde kitosan elde edilebilmektedir. Birincisi doğrudan kitosan üretimi için fungal fermentasyonla biyokütle üretimi yapılması, ikincisi ise mevcut fermentasyonlardan çıkan fungal atıklardan kitosan ekstrakte edilmesidir. İlki saf ürün elde etmede avantajlar sağlarken, oldukça yüksek maliyete sahiptir. Çoğu araştırmacı çalışmalarını bu ilk yönteme göre gerçekleştirmektedir (Crognale, 2022). Diğer yöntemin avantajı ise dünyamızın geleceğini ilgilendiren bir soruna ekonomik şekilde çözüm sunması ve ülkemizde de son dönemde uygulanmaya başlayan sıfır atık yaklaşımına uygun olmasıdır. Bu nedenlerle bu çalışmada atık fungal biyokütleden kitosan eldesi amaçlanmıştır.

Rhizomucor miehei, lipaz ve proteaz enzimlerinin ana üreticisi olarak kullanılan endüstriyel bir fungustur. Özellikle derin kültür fermentasyonları sonrası oldukça yüksek

miktarlarda biyokütle atığı oluşmaktadır. Ancak bu biyokütle fungal hücrelerden oluşan miseller olduğundan zengin protein, polisakkarit, lipit içeriğine ve vitamin, glukan, kitosan gibi diğer bileşenlere sahiptir. *R. miehei'* ninde dahil olduğu zigomisetlerin hücre duvarlarında %20-50 oranında kitin ve kitosan yer aldığı bilinmektedir (Gow ve Gadd, 1995). Buna rağmen *R. miehei*'den kitosan eldesi ile ilgili sadece bir çalışma (Tajdini vd., 2010) bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı bu çalışmada kitosan kaynağı olarak *R. miehei* atık biyokütlesinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

4.1.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonu

Fungal organizmanın üreme ortamı, inkübasyon süresi gibi parametreler fungal biyokütledeki kitosan miktarına doğrudan etki etmektedir (Safaei vd., 2016). Bununla birlikte elde edilecek olan kitosan miktarını kitosan ekstraksiyon koşulları da önemli ölçüde etkilemektedir (Abdel-Gawad vd., 2017; Azlan vd., 2020; John Kasongo vd., 2020; Huq vd., 2022). Atık biyokütleden kitosan eldesinde, atık ürünlerin ortaya çıkmadan önceki ticari üretim koşulları kontrol edilemediğinden, ekstraksiyon aşaması oldukça kritiktir. Bu çalışmada herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmaksızın atık *R. miehei* biyokütlesinden, Ramos Berger vd. (2018) tarafından rapor edilen kitosan ekstraksiyonu prosedürü ile 13,8 mg/g kitosan elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, atık *R. miehei* hücre duvarından kitosan elde edilebileceğini göstermiştir. Ancak bu miktar ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ile arttırılabilir.

4.1.2. Fungal kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu

Fungal kaynaklardan kitosan eldesi, deproteinizasyon ve deasetilasyon işlemi olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir (Crognale vd., 2022; Huq vd., 2022). Buna ilaveten bazı durumlarda dekolorizasyon aşaması da yapılabilmektedir. Bununla birlikte deniz canlılarında bulunan demineralizasyon işlemi ise yer almamaktadır. Deproteinizasyon aşamasında, hücre yapısındaki proteinlerin uzaklaştırılması için genellikle yüksek sıcaklık (100–150°C) ve düşük konsantrasyonlarda sodyum hidroksit (NaOH) gibi alkali çözeltiler kullanılmaktadır. Deasetilasyon aşamasında, kitinin kitosana dönüştürülmesi için de sıcaklık ve derişik asetik asit çözeltisi kullanılmaktadır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonunun optimizasyon çalışması, istatistiksel deney tasarımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonunda NaOH konsantrasyonu, deproteinizasyon sıcaklığı ve süresi, asetik asit konsantrasyonu, deasetilasyon sıcaklığı ve süresi olmak üzere 6 farklı değişken test edilmiş (Çizelge 3.1) ve deneyler bu değişkenlerin tamamını içeren bir tasarım ile gerçekleştirilmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden fungal kitosan eldesi amacıyla cevap yüzey metodu ile uygulanan deneysel tasarıma göre gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İstatistiksel tasarım ile oluşturulan farklı ekstraksiyon yöntemleri ve sonuçları

Aşamalar	Deproteinizasyon			Deasetilasyon			Fungal kitosan (mg/g)
	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	
Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	2	108	10	4	85	4	43,1
2	1	108	30	3	85	8	28
3	1	121	20	4	85	6	42,8
4	2	108	30	4	85	8	35,6
5	2	108	10	2	85	4	16,7
6	2	108	10	4	85	8	59,5
7	2	121	30	3	95	6	45,9
8	1	108	20	4	75	6	10,9
9	2	121	10	3	75	6	40,5
10	2	121	30	3	75	6	30,4
11	1	108	30	3	85	4	40,3
12	3	95	20	2	85	6	40,9
13	3	108	30	3	85	8	26,7
14	2	95	20	3	95	4	18,7
15	3	121	20	4	85	6	32
16	3	121	20	2	85	6	12,7
17	2	95	30	3	75	6	19,1
18	2	121	20	3	95	8	22,9
19	3	95	20	4	85	6	70,6
20	3	108	30	3	85	4	30
21	2	108	20	3	85	6	41,5
22	3	108	10	3	85	8	41,5
23	1	108	10	3	85	8	44,7
24	2	108	20	3	85	6	32,3
25	2	121	20	3	75	8	35,5
26	2	108	30	2	85	8	14
27	2	121	10	3	95	6	27,7
28	2	95	10	3	95	6	16,6
29	1	108	20	4	95	6	20,7
30	2	95	20	3	75	4	24,1
31	2	95	30	3	95	6	48,3
32	3	108	20	2	95	6	41,4
33	3	108	20	4	95	6	43,3
34	2	108	30	4	85	4	45,2
35	2	108	20	3	85	6	48,2
36	1	95	20	2	85	6	18,1
37	2	121	20	3	95	4	14,9
38	1	108	20	2	75	6	28,9

Çizelge 4.3. İstatistiksel tasarım ile oluşturulan farklı ekstraksiyon yöntemleri ve sonuçları (devam)

Aşamalar	Deproteinizasyon			Deasetilasyon			Fungal kitosan
	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	Konsantrasyon	Sıcaklık	Süre	
Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	(mg/g)
39	3	108	20	2	75	6	19,6
40	3	108	10	3	85	4	46,4
41	1	108	20	2	95	6	19,6
42	2	108	20	3	85	6	47,8
43	2	108	20	3	85	6	51,7
44	1	108	10	3	85	4	20.8
45	3	108	20	4	75	6	51,1
46	2	95	10	3	75	6	38,4
47	2	95	20	3	95	8	38,5
48	1	121	20	2	85	6	37
49	2	108	30	2	85	4	29,5
50	2	121	20	3	75	4	37,8
51	2	95	20	3	75	8	21,8
52	1	95	20	4	85	6	23,4
53	2	108	10	2	85	8	20,6
54	2	108	20	3	85	6	48,3

Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu için cevap yüzey metodu ile uygulanan tasarımın istatistiksel analiz sonucu Çizelge 4.4' te verilmiştir. Katsayıların işareti (Regression coefficient) ilgili değişkenin hangi düzeyinin fungal kitosan ekstraksiyonunun üzerinde etkili olduğu konusunda bilgi vermektedir. Pozitif etkiler (+) değişkenin üst düzeyinin, negatif etkiler (-) ise değişkenin alt düzeyinin etkili olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 4.4 incelendiğinde X_3 değişkeni dışındaki tüm değişkenlerin etkilerinin alt düzeyinin etkili olduğu görülmektedir ($p<0.05$).

Çoklu belirleme katsayısı olan R^2, bağımsız değişkenlerce bağımlı değişkendeki değişikliğin yüzde ne kadarının açıklandığını gösteren bir değerdir. Test edilen değişkenlerin beraberce fungal kitosan eldesindeki değişimin %76.32'sini açıkladığını göstermektedir (Çizelge 4.5). Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde F değerinin yüksek olması ve ''Prob>F'' olarak ifade edilen olasılık değerinin 0.05'ten küçük olması gerekir. Olasılık değerinin 0.1'den büyük olduğu durumlarda model cevap değişkenleri için anlamsız olmaktadır. Bu çalışmada F-değeri 16'dan yüksek ve probabilite değeri düşük olduğundan (<0.0001) model anlamlıdır.

Çizelge 4.4. Fungal kitosan ekstraksiyonundaki değişkenlerin etkileri

Source	DF	Coefficient	Sum of squares	*p* Value
X_1	1	5,044	1832,14	<,0001
X_1^2	1	-2,759	234,93	0,0302
X_2	1	0,066	0,32	0,9356
X_2^2	1	-2,978	273,79	0,0194
X_3	1	-0,979	69,03	0,2371
X_3^2	1	-0,41	5,20	0,7449
X_4	1	7,472	4020,06	<,0001
X_4^2	1	-4,55	639,08	<,0004
X_5	1	0,019	0,03	0,9812
X_5^2	1	-8,212	2080,93	<,0001
X_6	1	0,906	59,22	0,2733
X_6^2	1	-6,985	1505,81	<,0001
$X_1 X_2$	1	-13,125	4134,37	<,0001
$X_1 X_3$	1	-4,258	435,20	0,0034
$X_1 X_4$	1	5,525	1465,23	<,0001
$X_1 X_5$	1	1,683	68,01	0,0240
$X_1 X_6$	1	-2,466	146,03	0,0864
$X_2 X_3$	1	-0,537	6,93	0,7072
$X_2 X_4$	1	-1,233	36,51	0,3894
$X_2 X_5$	1	-3,22	497,94	0,0015
$X_2 X_6$	1	-1,479	52,51	0,3022
$X_3 X_4$	1	-3,491	292,60	0,0017
$X_3 X_5$	1	9,912	2358,18	<,0001
$X_3 X_6$	1	-4,987	1194,01	<,0001
$X_4 X_5$	1	-1,308	41,08	0,3613
$X_4 X_6$	1	2,30	126,96	0,1096
$X_5 X_6$	1	4,045	392,85	0,0053

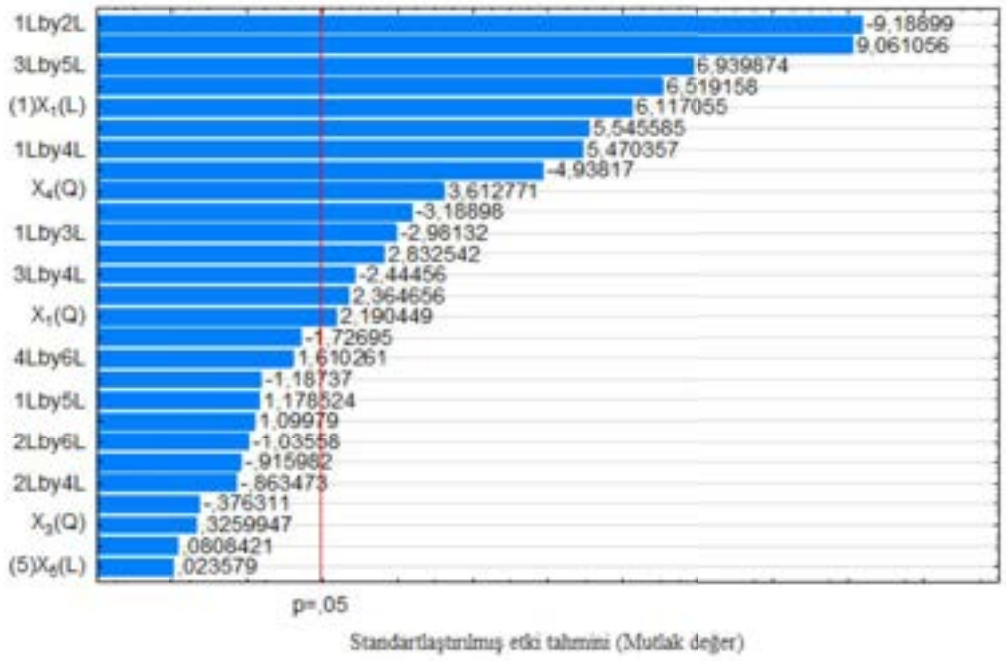
Çizelge 4.5. Fungal kitosan ekstraksiyonunda kullanılan tasarımın istatiksel analiz sonucu

Kaynak	Kareler toplamı (SS)	Serbestlik Derecesi (DF)	Kareler Ortalaması	F değeri	Olasılık (p)
Model	21151,39	27	783,38	16,0004	p<0,01
Kalan	6561,14	134	48,96		
Toplam	27712,53	161			

*Anlamlılık katsayısı (R^2) = 0,76.

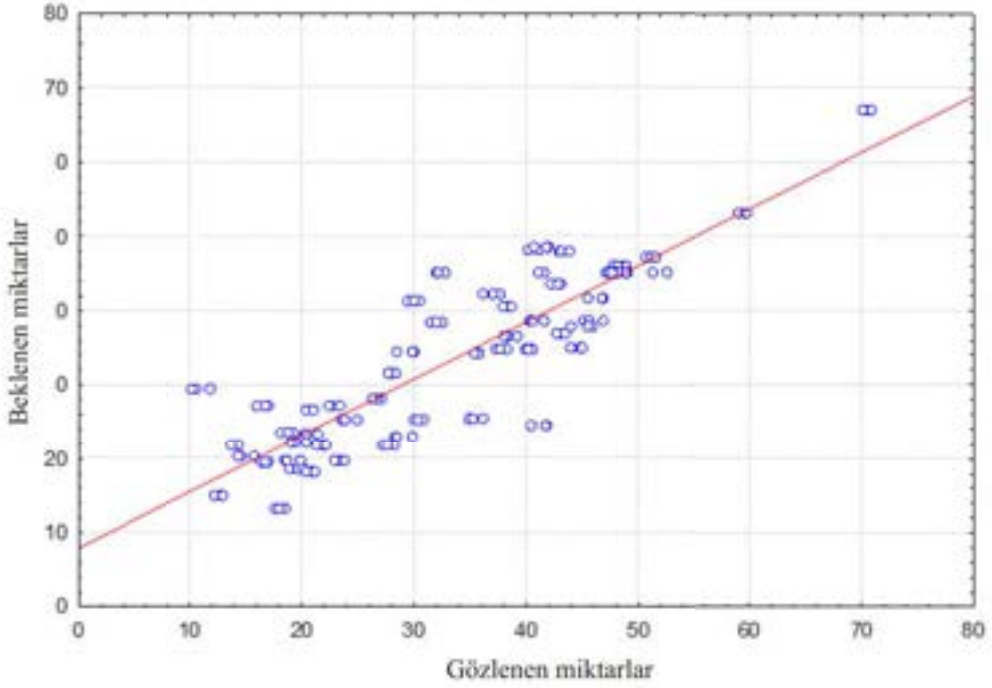
Ekstraksiyon yönteminde test edilen değişkenlerin etkisini karşılaştırabilmek için oluşturulan Pareto grafiği Şekil 4.1'de sunulmuştur. Bu grafikte sunulan kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ifade etmektedir. Grafikte kitosan ekstraksiyon işleminde asetik asit çözeltisinin konsantrasyonunun etkin bir role sahip olduğu görülmektedir. Özellikle deproteinizasyon aşamasından sonra asetik asit çözeltisi, elde edilen kitosanın çözünürlüğünü ve deasetilasyon derecesini etkilediği için bu değişkenin etkisinin önemli

olması istatiksel tasarım ile de doğrulanmıştır. Aynı şekilde asetik asit çözeltisinde bekletilme sıcaklığının ikinci en önemli değişken olduğu görülmüştür. En önemli üçüncü değişken olarak ise deproteinizasyon aşamasında kullanılan NaOH çözeltisinin konsantrasyonun fungal kitosan ekstraksiyonunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Fungal kitosan ekstraksiyonunda en az etkili değişkenin ise deproteinizasyon aşamasında NaOH çözeltisinde bekletilme sıcaklığının olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Test edilen değişkenlerin standardize edilmiş etkilerinin Pareto grafiği ile ifadesi (1Lby2L: NaOH konsantrasyonu ile deproteinizasyon sıcaklığının doğrusal etkileşimi, 3Lby5L: deproteinizasyon süresi ile deasetilasyon sıcaklığının doğrusal etkileşimi, X_1 (L): NaOH konsantrasyonun doğrusal etkisi, 1Lby4L: NaOH konsantrasyonu ile asetik asit konsantrasyonunun doğrusal etkileşimi, X_4 (Q): asetik asit konsantrasyonunun karesel etkisi, 1Lby3L: NaOH konsantrasyonu ile deproteinizasyon süresinin doğrusal etkileşimi, 3Lby4L: deproteinizasyon süresi ile asetik asit konsantrasyonunun doğrusal etkileşimi, X1 (Q): NaOH konsantrasyonunun karesel etkisi, 4Lby6L: asetik asit konsantrasyonu ile deasetilasyon süresinin doğrusal etkileşimi, 1Lby5L: NaOH konsantrasyonu ile deasetilasyon sıcaklığının doğrusal etkileşimi, 2Lby6L: deproteinizasyon sıcaklığı ile deasetilasyon süresinin doğrusal etkileşimi, 2Lby4L: deproteinizasyon sıcaklığı ile asetik asit konsantrasyonunun doğrusal etkileşimi, X3(Q): deproteinizasyon süresinin karesel etkisi, X5(L): deasetilasyon sıcaklığının doğrusal etkisi)

Şekil 4.2'de deneysel çalışma sırasında gözlenen ve istatistiksel tasarım ile hesaplanan fungal kitosanın ilişkisi ve uyumu verilmiştir. Bu şekilde mavi noktaların kırmızı çizgiye yakın olduğu, sonuçların çoğunluğunun birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Sonuçların daha iyi anlaşılması ve yorumlanabilmesi amacıyla, fungal kitosan ekstraksiyonunun optimize koşullarının üç boyutlu tahmini modelleri Şekil 4.3'de sunulmuştur.



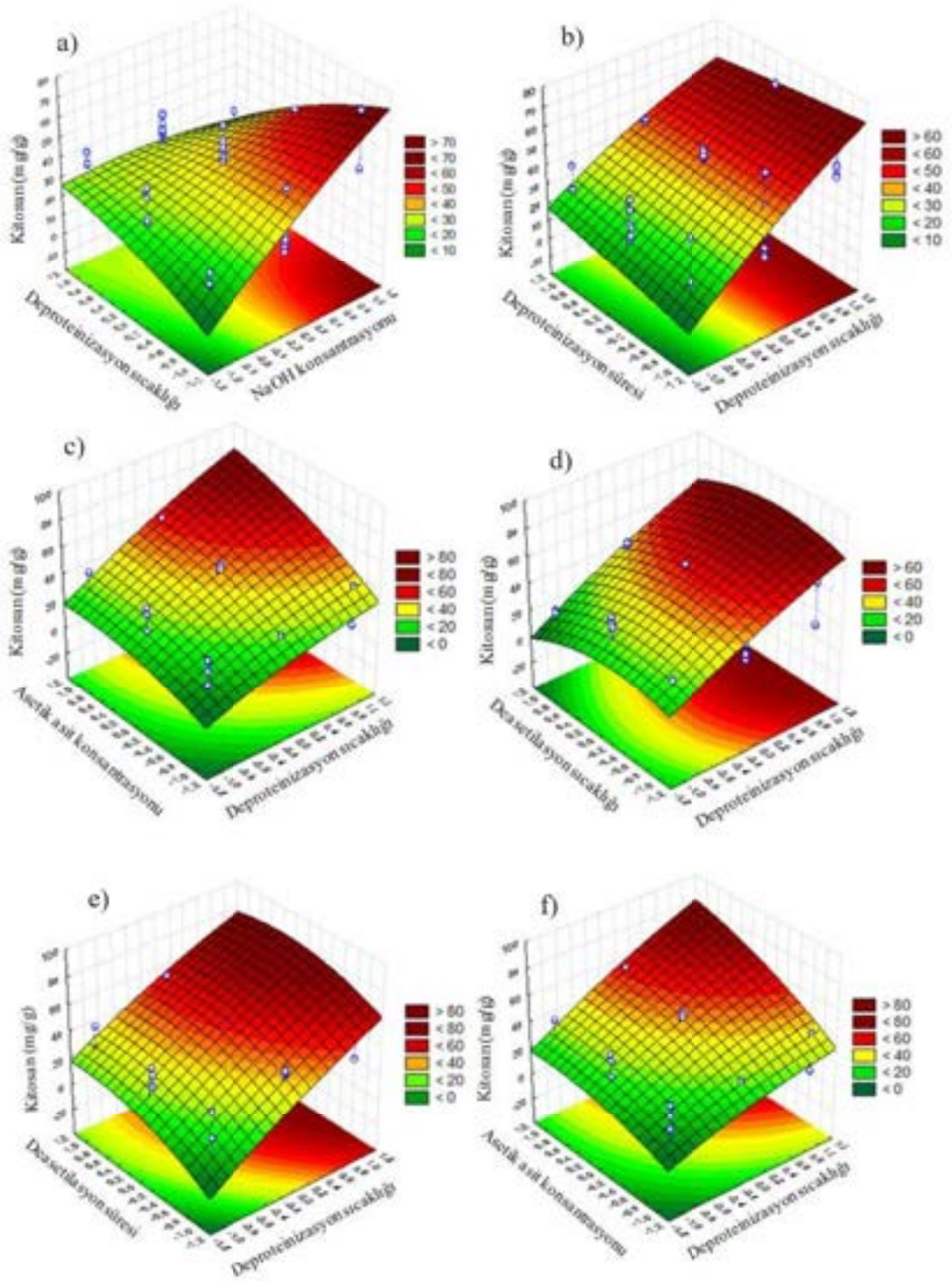
Şekil 4.2. Elde edilen fungal kitosanın gözlenen ve hesaplanan değerleri

Şekil 4.3 incelendiğinde her bir cevap değişkeni için optimum faktör seviyelerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu grafiklere bakıldığında, fungal biyokütleden yüksek miktarda kitosan eldesi, 3N NaOH çözeltisinde 95 °C'de 20 dk deproteinizasyon, %4 asetik asit çözeltisinde 85 °C'de 6 saat deasetilasyon yapılmasıyla elde edileceği belirlenmiştir.

Deasetilasyon işleminde belirli bir sürede yapıda önemli bir bozunma olmadan asetik asit içerisinde çözünme işlemi gerçekleştirilmelidir. Bu nedenle sıcaklığın ve sürenin doğru şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Deasetilasyon işlemi otoklav yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Özellikle bu aşama elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesini önemli derece etkilemektedir. Bu çalışmada fungal biyokütlenin, yüksek konsantrasyon olan 70.6 mg/g değerine 3N NaOH çözeltisinde 95 °C ve 20 dk da deproteinizasyonu ve %4'lük asetik asit çözeltisinde 85 °C'de 6 saat deasetilasyonunun gerçekleştirilmesiyle

ulaşılmıştır. 2N NaOH çözeltisinde 108 °C'de ve 10 dk da deproteinizasyon, %4' lük asetik asit çözeltisinde 85 °C'de 8 saat deasetilasyon uygulamasında ise 59.5 mg/g kitosan elde edilmiştir. En düşük miktarda kitosan eldesi (10.9 mg/g) ise 1 N NaOH çözeltisinde 108 °C'de, 20 dk da deproteinizasyon, %4'lük asetik asit çözeltisinde 75 °C'de 6 saat deasetilasyon uygulandığında gerçekleşmiştir.

Geleneksel olarak kitosan üretimi, hücre duvarından iki aşamalı bir ekstraksiyon işlemi (deproteinizasyon ve deasetilasyon) ile gerçekleştirilir. Fermentasyondan sonra miselyal biyokütlenin alkali koşullar altında (%2-4 NaOH) yüksek sıcaklıkta işlenmesiyle (90-121 °C sıcaklıkta, 15-120 dakika), kitosan, proteinler ve bozulmuş hücre duvarı parçaları alkali çözünmeyen bir materyal olarak elde edilir. Bu adımdan sonra, kitin-glukan kompleksi, bir deasetilasyon ile kitosan' a dönüştürülerek kitini serbest bırakır. Daha sonra %2–%10 konsantrasyonlarında hidroklorik asit (HCl), laktik veya asetik asit gibi bir asitle, 25-95 °C sıcaklıkta, 1-24 saat boyunca bekletilir. Bu işlemin amacı çözünmeyen maddeleri ve fosfatları hücre duvarından uzaklaştırmak ve olabildiğince daha fazla kitosan elde edebilmektir. Asitte çözünür halde bulunan kitosanlar, NaOH yardımıyla pH yükseltildiğinde görünür hale gelir ve çökelti oluştururlar. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır ve pellet (kitosan) aseton, etanol gibi çözücülerle yıkanırlar (Taşar vd., 2016; Huq vd., 2022). John Kasongo vd. (2020), dev termit olarak bilinen *Termitomyces titanicus* mantarından kitosan ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. 3M NaOH çözeltisinde 100 °C sıcaklıkta 120 dakika deproteinizasyon, 6 N HCl çözeltisinde 80 °C sıcaklıkta 16 saat deasetilasyon işlemi sonucunda %38,04 kitosan elde etmişlerdir.



Şekil 4.3. Test edilen değişkenlerin ikili etkileşim grafikleri (a: Deproteinizasyon sıcaklığı ile NaOH konsantrasyonu etkileşimi, b: Deproteinizasyon süresi ile sıcaklığı arasındaki etkileşimi, c: Asetik asit konsantrasyonu ile deproteinizasyon sıcaklığı ile etkileşimi, d: Deasetilasyon sıcaklığı ile deproteinizasyon sıcaklığı etkileşimi, e: Deasetilasyon süresi ile deproteinizasyon sıcaklığı etkileşimi, f: Asetik asit konsantrasyonu ile deproteinizasyon sıcaklığı etkileşimi)

Sonuç olarak bu çalışmada kitosan ekstraksiyonunda uygulanan 6 değişkenin, atık *R. miehei* biyokütlesinden fungal kitosan ekstraksiyonu üzerine etkisi sorgulanmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden, Ramos Berger vd. (2018) uyguladığı kitosan ekstraksiyonu prosedürü ile 13.8 mg/g kitosan elde edilmiştir. Bu çalışmada kitosan ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucu elde edilen en yüksek kitosan miktarı 70.6 mg g^{-1}'dır. Şekil 4.3'de görüldüğü üzere ekstraksiyon aşamalarındaki değişkenler oldukça önem arz etmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki veya fungal biyokütledeki kitosanın kullanım alanlarının belirlenmesinde de ekstraksiyon yöntemi önemlidir. Bu nedenle etkili bir ekstraksiyon gereklidir. Azlan vd. (2020) tarafından yapılan *Mucor rouxii*' den kitosan ekstraksiyonun optimizasyon çalışmasında deproteinizasyon aşaması iyileştirilmiştir. Bir grama 40 ml 1M NaOH çözeltisi (1:40, v/v) ile 121 °C'de 25 dakika deproteinizasyon, %0,5 asetik asit ile 14 saat deasetilasyon aşaması ile 158 mg/g kitosan elde etmişlerdir. Tao (2004) *Aspergillus niger*' den kitosan ekstraksiyonunda 1M NaOH (w:v/1:40) çözeltisinde, 95 °C sıcaklıkta, 30 dakika deproteinizasyon, %2 asetik asitle 6 saat 95 °C sıcaklıkta deasetilasyon aşaması sonucunda %24,01 kitosan elde ettiklerini raporlamıştır.

Deasetilasyon aşamasında kullanılan asidin tipi son ürün kitosanın özelliklerini etkileyebilmektedir. Bu amaçla çeşitli araştırıcılar formik asit, laktik asit, sülfürik asit gibi asitlerin kitosan eldesi üzerine araştırmalar gerçekleştirmiştir. Deasetilasyon aşamasında uygulanan sıcaklık etkisinin sülfürik asit yerine laktik asit ile gerçekleştirildiğinde elde edilen kitosanın veriminde artış olduğunu rapor etmiştir. Asidin tipi sadece verimi değil elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesini, çözünürlüğü gibi karakteristik özelliklerini de etkilemektedir. Güçlü asitlerin kitosan yapısındaki monomerleri parçaladığı ve verimin bu nedenle düştüğü düşünülmektedir (Kannan ve Rajarathinam, 2010). Atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosanın ekstraksiyonunda optimal koşullar sağlandığında elde edilen kitosan miktarı önemli ölçüde değişkenlik göstermiştir. Yapılan bu çalışma ile 80 mg/g' a varan sonuçların elde edilebileceği istatistiksel olarak belirlenmiştir. Böylece istatistiksel tasarım kullanılarak gerçekleştirilen kitosan ekstraksiyon optimizasyonu sonucunda elde edilen kitosan miktarı 5 kat arttırılmıştır.

4.1.3. Optimize koşullarda elde edilen kitosan karakterizasyonu

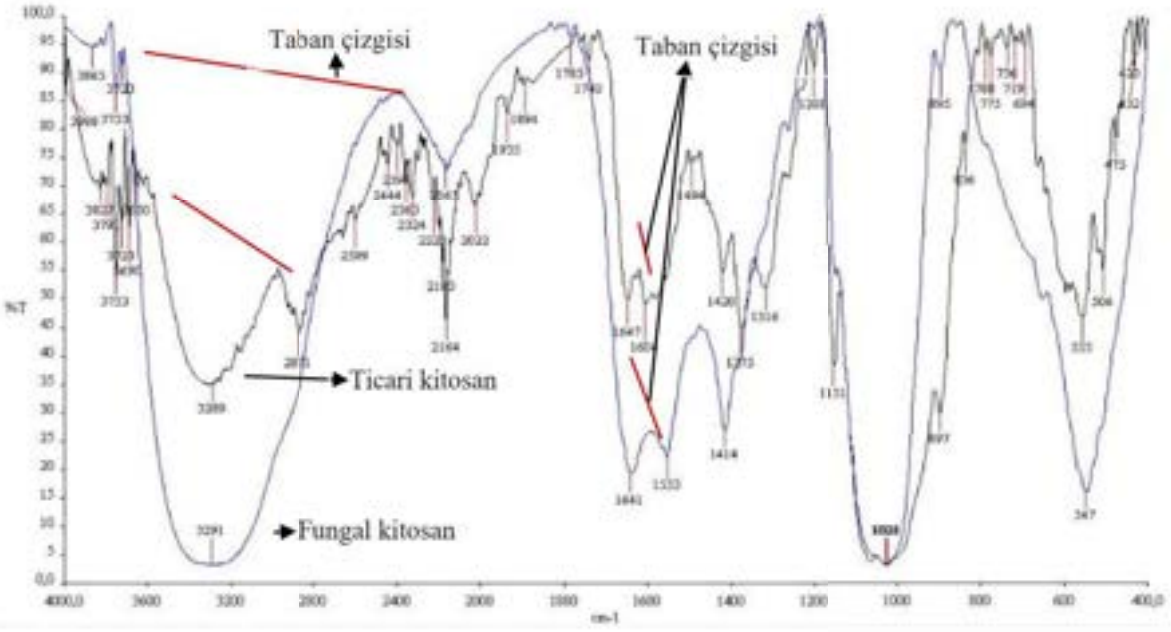
Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın miktarsal olarak arttırılması her ne kadar önemli ise elde edilen kitosanın fiziksel ve biyolojik özellikleri de o kadar önem arz etmektedir. Birçok alanda kullanım olanağı bulunan kitosanın hangi uygulama için uygun olduğu bu aşama ile belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1.3.1. Çözünebilirlik testi

Kitosanın çözünürlüğü önemli parametrelerden biri olup molekül ağırlığına, üretim kaynağına, ortamda metal iyonlarının bulunup bulunmamasına, çözücü olarak kullanılan asidin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Çözünürlüğünün düşük olması kullanım alanını da kısıtlamaktadır. Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın %0.1-0.8 asetik asit çözeltisinde çözünmediği, %1-3 arasında iyi çözündüğü belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ticari kitosanın spesifikasyonunda da (Ek-A) belirtildiği gibi ticari kitosan da %1 asetik asit çözeltisinde iyi çözünmüştür. Elde edilen kitosan ile ticari kitosan karşılaştırıldığında çözünürlüklerinin benzer olduğu görülmüştür. Düşük pH' larda kitosan polikatyonik özellik göstermektedir. Bazı çalışmalarda kitosanın çözünürlüğünün, deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Huq vd. 2022). Düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, sadece pH 9 ve üzerinde çözünebilir olduğu, buna karşın yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, pH 6.5 ve altında çözünür olduğu, nötral ve alkali pH değerlerinde çözünmediği, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanların glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi organik ve inorganik asitlerle tuz oluşturarak çözündüğü gösterilmiştir (Yıldırım vd., 2016). Bu durumda *R. miehei* atık biyokütlesi ile üretilen kitosanın çözünürlüğünün çeşitli uygulama alanlarında kullanılabilir özellikte olduğu düşünülmektedir.

4.1.3.2. FT-IR analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın yapısının doğrulanması için FT-IR analizi gerçekleştirilmiş olup, elde edilen spektrum Şekil 4.4' de verilmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosan pikleri ile ticari kitosanın absorpsiyon pikleriyle benzerlik göstermiştir. Genel olarak, kitosan bantları 3000-3500 cm^{-1} (NH bağı)' den 1400-1650 cm^{-1} (C=O bağı) arasında görülmektedir (Chatterjee vd., 2005). Kitosanın karakteristik amid piklerinin, fungal kitosanda görülmesi, ekstrakte edilen ürünün kitosan olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 4.4. Kitosan FTIR spektrumu, Amid-I bandı absorbans ile hidroksil grubu absorbans hesaplanması için taban çizgileri

4.1.3.3. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi

Kitosanın özelliklerini ve uygulama alanlarını tanımlayan en önemli özelliklerinden biri deasetilasyon derecesidir. Deasetilasyon derecesi, amino gruplarının sayısının, asetilamino gruplarının sayısına oranıdır. Bu oran ticari olarak %40 ile %95 aralığında olabilmektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın deasetilasyon derecesini belirlemek için FT-IR analizi sonucu elde edilen

spektrum kullanılmıştır. Analiz sonucu, 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edilen absorbans değerleri ile hesaplama yapılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanın ve ticari kitosanın deasetilasyon derecesi, karakteristik kitosan piki (3000-3500 cm^{-1}) ile referans pikinin (1400-1650 cm^{-1}) karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Hesaplamalara göre fungal kitosanın deasetilasyon derecesi %78, ticari kitosanının deasetilasyon derecesi %85 olarak bulunmuştur. Yapılan hesaplama sonucu elde edilen veri ticari kitosanın spesifikasyonunda (Ek-A) belirtilen spesifikasyon değerleri ile uyumluluk göstermektedir. Bu durum uygulanan yöntemin ve kullanılan formülün doğruluğu, elde edilen verilerin güvenilirliğinin ifade etmektedir. Literatürde fungal kökenli kitosanların deasetilasyon derecesi ile ilgili veriler incelendiğinde geniş bir dağılıma sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Deasetilasyon derecesi %60 ile %95 aralığında olmalıdır. Daha altındaki değerlerde safsızlık oranı arttığı için bu durum glukan-kitosan kompleksinin tam olarak ayrılmadığını veya kitinin kitosana etkili şekilde dönüştürülmediği anlamına gelmektedir (Moore ve Roberts, 1980). Bu durum *R. miehei* atık biyokütlesinden elde edilen kitosanın % 78 deasetilasyon derecesi ile literatürle uyumlu olduğunu ve ticari olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6. Bazı mikroorganizmalardan elde edilen kitosanların deasetilasyon dereceleri

Mikroorganizma	Deasetilasyon Derecesi (%)	Referans
Absidia glauca	75-80	Miyoshi vd., 1992
Mucor rouxii	80-90	Synowiecki ve Al-Khateeb, 1997
Absidia orchidis	68-85	Jaworska ve Konieczna, 2001
Aspergillus niger	81-90	Pochanavanich ve Suntornsuk, 2002
Pleurotus sajor-caju	83	
Candida albicans	83	
Lentinus edodes	86	
Gongronella butleri	89-92	Nwe vd., 2002
Penicillium chrysogenum	84	Tianwei vd., 2002
Mucor racemosus	70-84	Wu, 2005
Rhizomucor miehei	81	Tajdini vd., 2010
Rhizopus oryzae	85-89	Vaingankar vd., 2014
Cunninghamella elegans	72-90	
Rhizopus arrhiizus	82	Berger vd., 2014
Benjaminiella poitrasii	94	Mane vd., 2017

4.1.3.4. Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

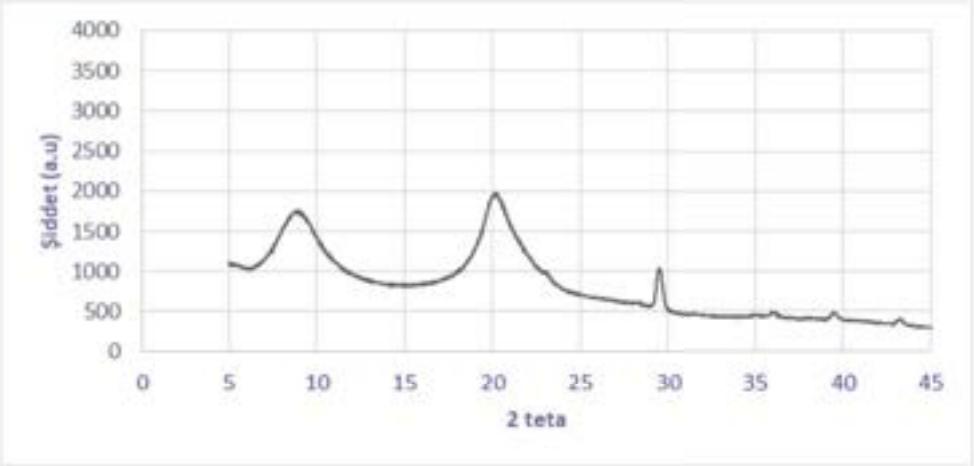
Kitosan moleküler ağırlığı, yapısındaki monomerik birimlerinin sayısı ile doğrudan ilişkili olduğundan kitosanın çözünürlük, viskozite vb. gibi özelliklerini ve uygulama alanlarını etkilemektedir. Bu açıdan kitosanlar, molekül ağırlığı bakımından üç gruba ayrılmaktadır; (1) düşük molekül ağırlıklı kitosan (50 kDa" dan daha düşük), (2) orta molekül ağırlıklı kitosan (50-150 kDa), (3) yüksek molekül ağırlıklı kitosan (150 kDa" dan daha yüksek) (Yıldırım vd., 2016). Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosanın viskozite-ortalama molekül ağırlığı, Ubbelohde Seyreltme Viskometresi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada fungal kitosanın molekül ağırlığı 14 kDa, ticari kitosanın moleküler ağırlığı 87 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuç atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanın düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermiştir.

Literatürde fungal kökenli kitosanların molekül ağırlığına ilişkin veriler incelendiğinde, kabuklu deniz canlılarının atıklarından elde edilen kitosan, yüksek moleküler kütleye sahipken (yaklaşık 1.5 10^6 Da), fungal kaynaklarından elde edilen kitosanın moleküler ağırlıkları (6.4 10^3-1,4 10^6 Da) geniş ölçüde değişmektedir (Wang vd. 2008). Bu durum *R. miehei* atık biyokütlesinden elde edilen kitosanın düşük moleküler ağırlığına sahip olması literatürle uyumluluk göstermektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip kitosanlar, insan vücuduna zararsızdır ve yüksek antibakteriyal etki göstermektedir (Dragostin vd., 2016). Aranaz vd. (2009), düşük molekül ağırlıklı kitosanlar, gen taşıma, gıda kaplama ve yara iyileşmesi gibi uygulama alanları için tercih edilmeye uygun olduğunu rapor etmiştir. Gıda ambalajı kullanımında ise Dotto ve Filho (2017) tarafından yapılan araştırmada düşük molekül ağırlığına sahip kitosan katkılı ambalaj ile papaya meyvesinin ve balıklarının depolanması ve saklanmasında yüksek moleküler ağırlığa sahip kitosan katkılı ambalajlara göre daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

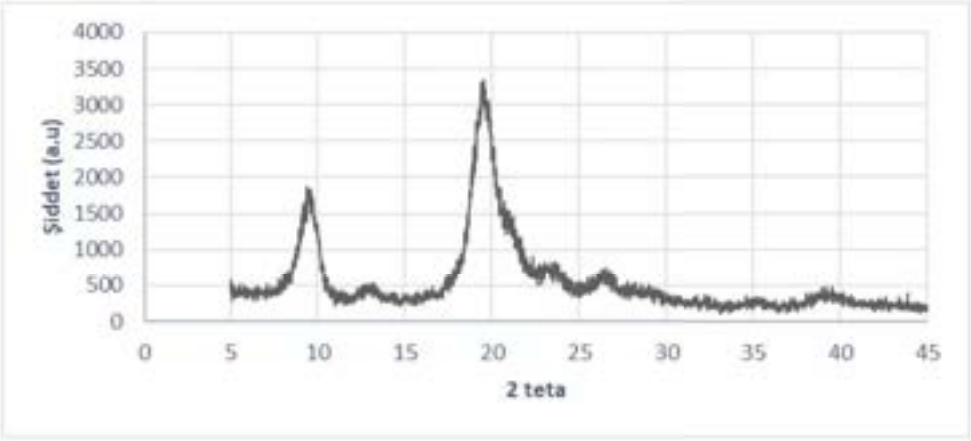
4.1.3.5. XRD (Tek kristal) ışını analizi

Literatürde kitosanın karakteristik piklerinin 10 ve 20° 'lerinde gözlendiği belirtilmiştir (Erdoğan vd., 2017). X-ışınları toz kırınım deseni incelediğinde, 9 ve 19°

'lerinde iki belirgin pikin olduğu görülmektedir (Şekil 4.5; Şekil 4.6). Bu pikler atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanın ve ticari kitosanın amorf yapıda olduğunu göstermektedir. Diğer piklerin varlığı glukan kalıntısı olduğuna ve kitosanın içinde safsızlıklar olduğunu göstermektedir. Fungal ekstraktaki kitosan kristalin indeks değerleri (CrI) %49,85 iken, ticari kitosanın (Adaga) CrI değeri %59,91 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir (Ahmad vd., 2020).



Şekil 4.5. Ticari kitosanın XRD spektrumu

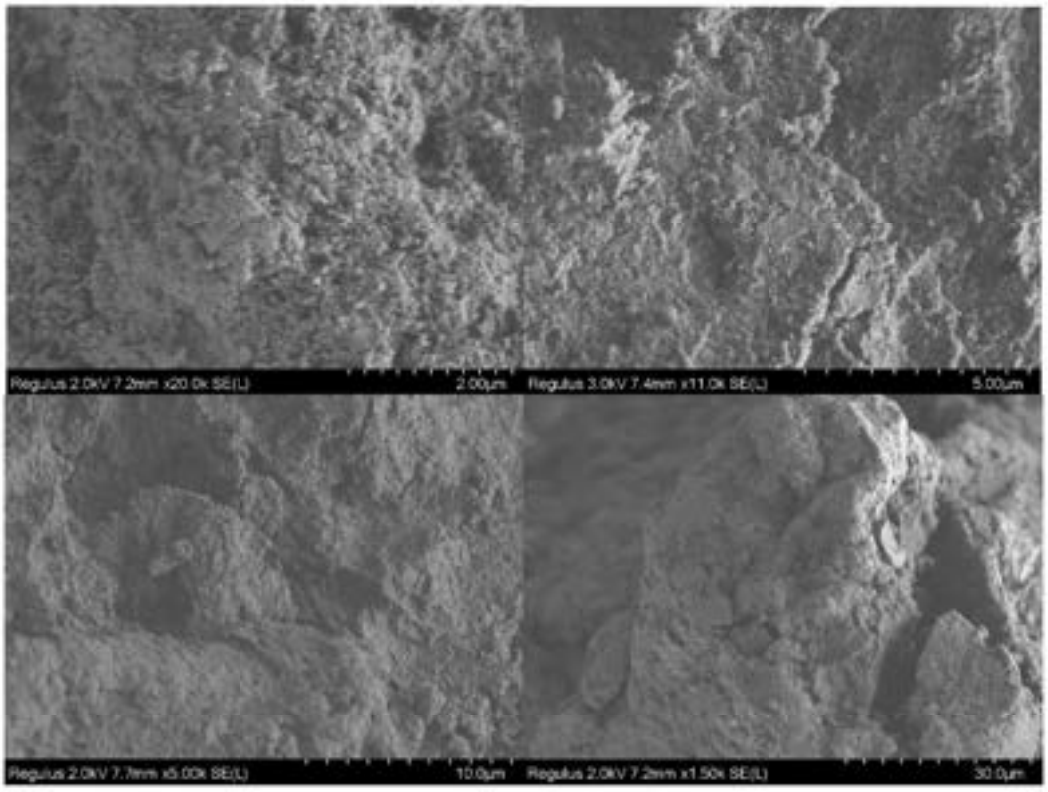


Şekil 4.6. Fungal kitosanın XRD spektrumu

4.1.3.6. SEM analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın yüzey morfolojisi görünümü hakkında bilgi edinmek amacıyla SEM analizi yapılmıştır.

Numune paladyum-altınla kaplanarak SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.7' de kitosanın pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmüş ve kitosan yüzey morfolojisinin diğer önemli özelliği olarak amorf yapısı gözlemlenmiştir. Optimize koşullarda elde edilen fungal kitosanın pürüzsüz bir yüzeye sahip olması, ekstraksiyonunda kullanılan alkali çözeltinin uygun konsantrasyonda olduğunu göstermiştir. Lifli bir yapı görünmektedir. Çoğunlukla deniz canlılarından elde edilen kitosanlarda lifli yapılar görülmektedir. Mineral ($CaCO_3$) kalıntısı taşımaları durumunda SEM ile Ca^{+2} beyaz noktalar halinde tespit edilmektedirler. Ancak fungal ekstraksiyonda bu aşama olmadığı için beyaz nokta görünümü olmamıştır (Cui vd., 2018).



Şekil 4.7. Fungal kitosanın SEM görüntüleri

4.1.3.7. Elementel Analiz

Genel olarak kitosanın element bileşimi, yaklaşık % 44,11 karbon (C), % 6,84 hidrojen (H) ve azot (N) % 7,97 oranındadır (Paulino vd., 2006). Çeşitli uygulamalarda kitosanın sahip olduğu karbon ve azot içeriği, buna bağlı C/N oranı önemli bir özellik olarak aranmaktadır. Kitosan türevlerinin eldesi için kitosana bağlanmak istenilen bileşiğin

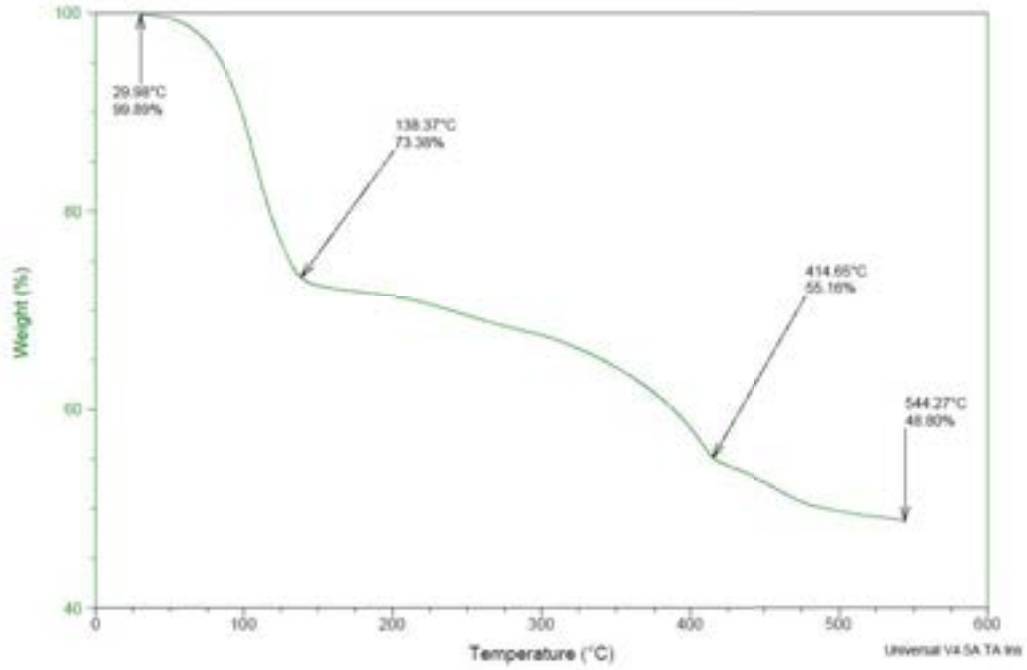
bağlanabilme oranı ve özelliklerini bu şekilde belirlemek mümkün olabilmektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosanın yapısı elementel analiz ile aydınlatılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7' de verilmiştir. Sunulan verilere göre fungal kitosanın ticari kitosana oldukça benzer yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte fungal kitosanda karbon yüzdesinin ticari kitosana oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Azot yüzdesinin ise ticari kitosanın daha yüksek olduğu görülmüştür. Literatürdeki kitosanların elemental ile ilgili veriler incelendiğinde geniş bir dağılıma sahip olduğu görülmekte ise de birbirine yakın değerler elde edilmiştir (Paulino vd., 2006). Bu durum atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosanın çeşitli türevlerinin oluşturulmasında ve yeni materyallerin yapımında kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. Elementel analiz sonuçları

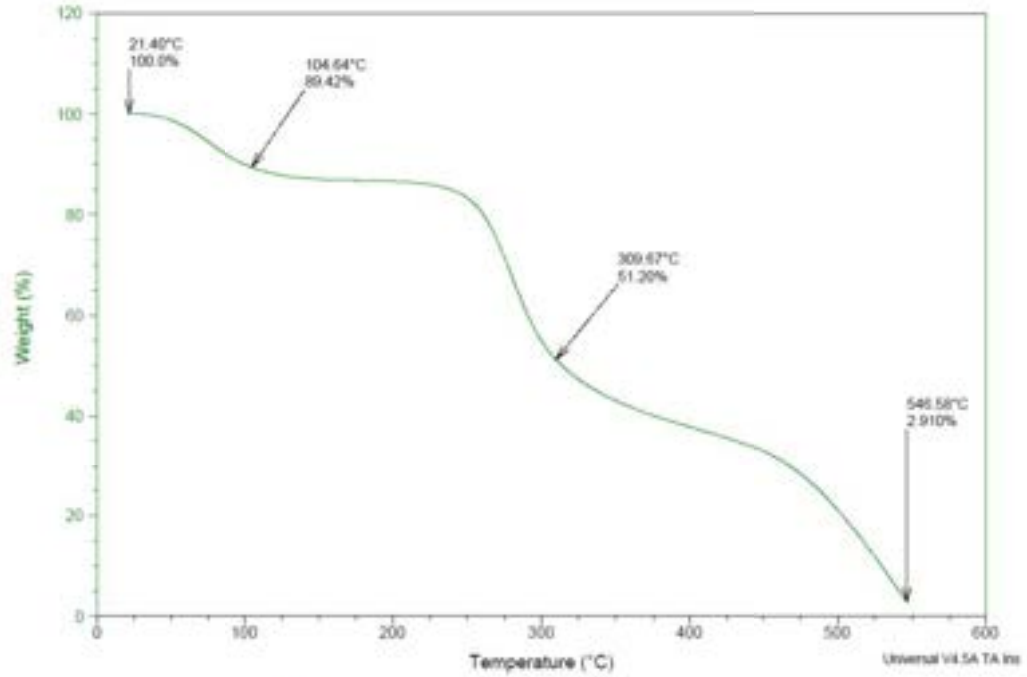
Elementler	Fungal kitosan (%)	Ticari kitosan (%)
Karbon	38,81	46,09
Hidrojen	6,93	7,10
Nitrojen	6,40	8,05
Sülfür	0,20	-
C/N	6,06	5,72

4.1.3.8. Termogravimetrik (TGA) Analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın ve ticari kitosanın ısıl kararlılık durumunu, bozunma davranışını belirlemek amacıyla TGA analizi yapılmıştır. Termal gravimetrik analiz sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. TGA analizinden elde edilen sıcaklığa bağlı % kütle değişim grafiğinde iki aşamada bozunma görülmektedir. İlk aşamada 50 °C sıcaklıkta yapıdan kütle kaybının nem kaybından kaynaklandığı, su molekülünün ortamdan ayrılması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın 138 °C de gerçekleşen %73' lük kütle kaybının fungal kitosan yapısının zincirlerinde meydana gelen bozunmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.



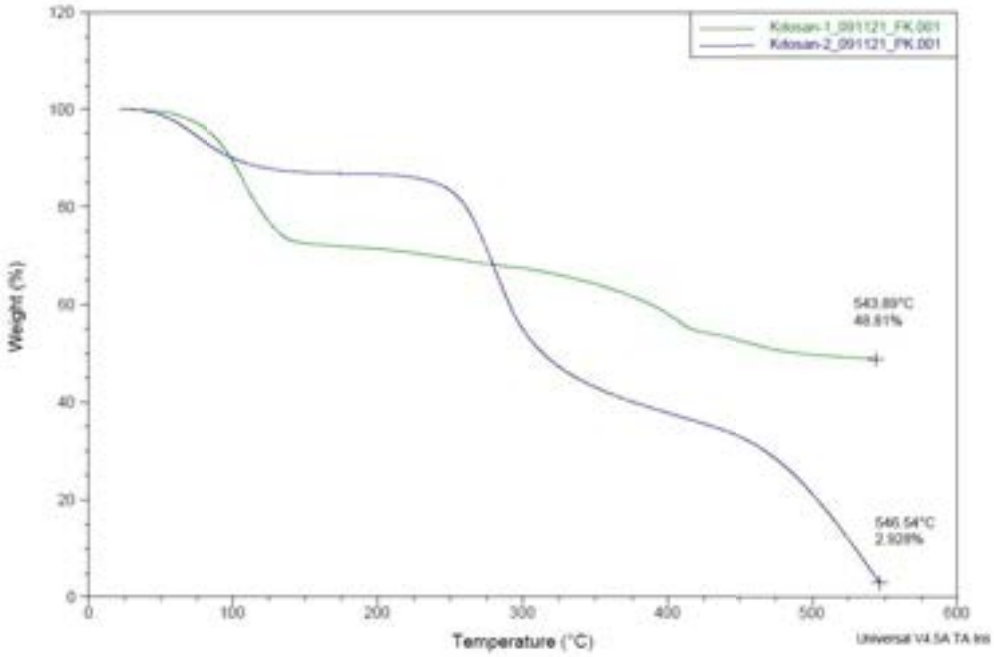
Şekil 4.8. Fungal kitosanın TGA görüntüsü



Şekil 4.9. Ticari kitosanın TGA görüntüsü

Kitosandaki asetil grubunun ayrılması ile bozunmanın başlaması 250-350°C aralığındadır. Ticari kitosanın 309 °C' de bozunmaya başladığı görülmektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın 414 °C' de bozunmaya başladığı görülmektedir. Deniz kabuklularından elde edilen ticari kitosan, fungal kitosana göre

bozunmaya daha erken başlamıştır (Şekil 4.10). Bu durum atık *R. miehei* biyokütlesinden ekstrakte edilen fungal kitosanın termal stabilitesinin ticari kitosana göre yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Fungal kitosan ile ticari kitosanın karşılaştırması

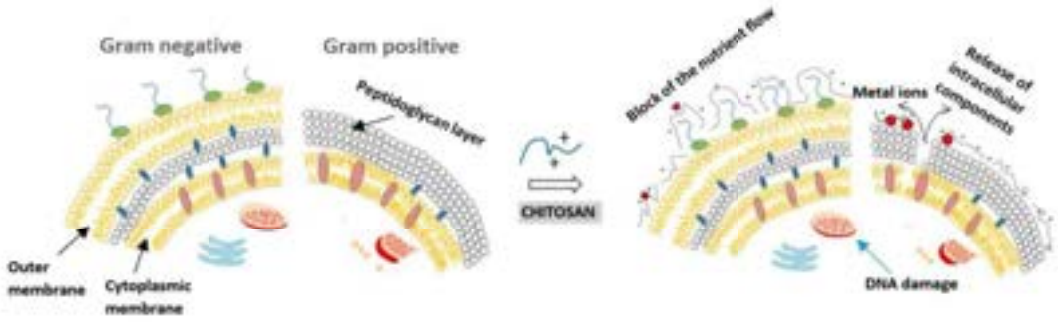
4.1.4. Kitosanın biyolojik aktivitesinin belirlenmesi

Yapılan araştırmalarda deniz canlılarından elde edilen ticari kitosanın, hemostatik, antimikrobiyal, anti-kanserojen, anti-kolesterol, yara iyileştirici aktivite gibi birçok biyolojik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Yıldırım vd., 2016). Kitosan ve türevleri, antimikrobiyal ve yara iyileştirici aktivite bakımından önemli bir yere sahiptirler (Üner, 2021). Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen kitosanın yara iyileştirme potansiyelini ortaya koymak için *in vitro* çizik (stracht) testi uygulanmıştır.

4.1.4.1. Antimikrobiyal aktivite

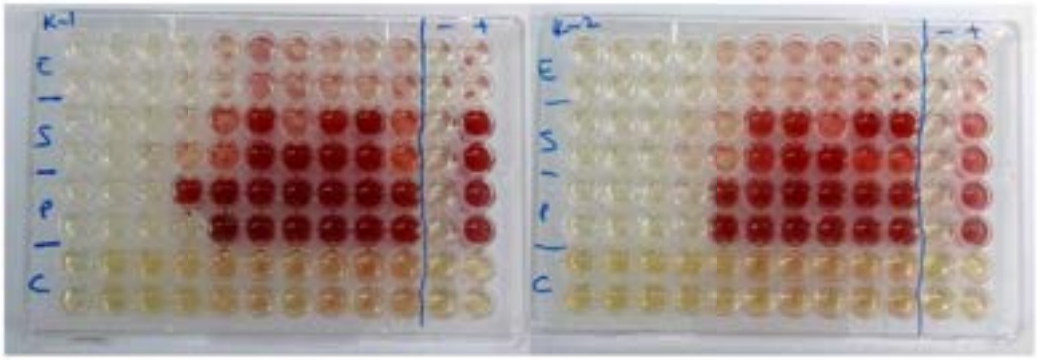
Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, pH, deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Özellikle düşük pH' larda gösterdiği polikatyonik özellik kitosanın antimikrobiyal aktivite göstermesinde önemli bir etkendir. pH 6' dan küçük değerlerde glukozamin bileşeninin ikinci karbonundaki amino grubu ($-NH_2$) proton bağlayıp pozitif yüklü ($-NH_3^+$) forma dönüştüğünden kitosanın antimikrobiyal aktivitesi kitine göre daha yüksektir (Yıldırım vd., 2016). Kitosan serbest amino grupları içermesiyle kitinden ayrılır. Bu yapılar, mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan lipopolisakkarit ve hücre yüzey proteinleri gibi anyonik bileşenler ile elektrostatik etkileşime girerler. Bu etkileşim sonucunda hücre membranındaki yüklerin dağılımı değişerek membran bütünlüğü bozulmaktadır. Hücrenin membran geçirgenliğinin bozulması sonucu hücre ölür. Bunun yanı sıra kitosanlar, sahip oldukları moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi gibi özelliklerine göre farklı antimikrobiyal etki mekanizmaları gösterebilirler (Li ve Zhuang, 2020). Örneğin suda çözünebilir düşük moleküler ağırlıklı kitosanlar hücre içerisine kolaylıkla girebilir ve hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonların bozulmasına neden olurlar. Yüksek moleküler ağırlıklı olan kitosanlar ise hücre içine giremedikleri için yüzey etkileşimleri sayesinde hücrenin membran bütünlüğünü, iyon dengesini bozarak hücrelerin ölümüne neden olurlar.

Genel olarak literatürde kitosan ve türevlerinin ilk etki ettiği yerin hücre duvarı olduğu ve mikroorganizma ölümünün ise membran yapısının bozulmasından ileri geldiği kabul edilmektedir (Goy, 2009). Bununla birlikte kitosan, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı etkilidir. Farklı kompozisyondaki hücre duvarları nedeniyle gram negatif ve gram pozitif bakteriler kitosandan farklı şekillerde etkilenmektedirler. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında lipopolisakkaritler bulunmaktadır ve peptidoglikan tabakası daha incedir. Ayrıca gram negatif bakterilerin hücre yüzeyindeki negatif yükler kitosanın kolaylıkla etkileşime girmesini sağlar. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanlar gram negatif bakterilere karşı etkiliyken, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanlar gram pozitiflere karşı daha etkilidirler. Bununla birlikte sadece moleküler ağırlığı değil kitosan konsantrasyonu, deasetilasyon derecesi, pH, elde edildiği kaynak, sıcaklık, mikroorganizmanın türü, metal katkılamanın olup olmadığı gibi birçok etken antimikrobiyal aktiviteye etkilemektedir.



Şekil 4.11. Kitosanın antibakteriyal etki mekanizmaları (Kravanja vd., 2019)

Şekil 4.11' de de görüldüğü üzere, kitosan ve lipopolisakkaritler (veya teikoik asit) arasındaki elektrostatik etkileşimler, hücre zarını bozarak kitosanın hücre zarına daha fazla nüfuz etmesini sağlar. Polikatyonik özelliği nedeniyle iyon dengesini bozarak hücre dışındaki besin elementlerinin hücre içine alınmasını engeller. DNA, protein gibi moleküllere bağlanarak hücrenin çoğalmasını durdurabilirler. Bu çalışmada optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosanın, 2 Gram negatif (*Escherichia coli* (E) ve *Pseudomonas aeruginosa* (P)) ve 1 Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* (S)) bakteri olmak üzere test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosan ve ticari kitosan numunelerinin MİK değeri inkübasyon sonrası gelişme varlığı/yokluğuna göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Test uygulaması inkübasyon sonrasında üreme olmayan dozların belirlenmesi ile tamamlanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.8' de sunulmuştur.



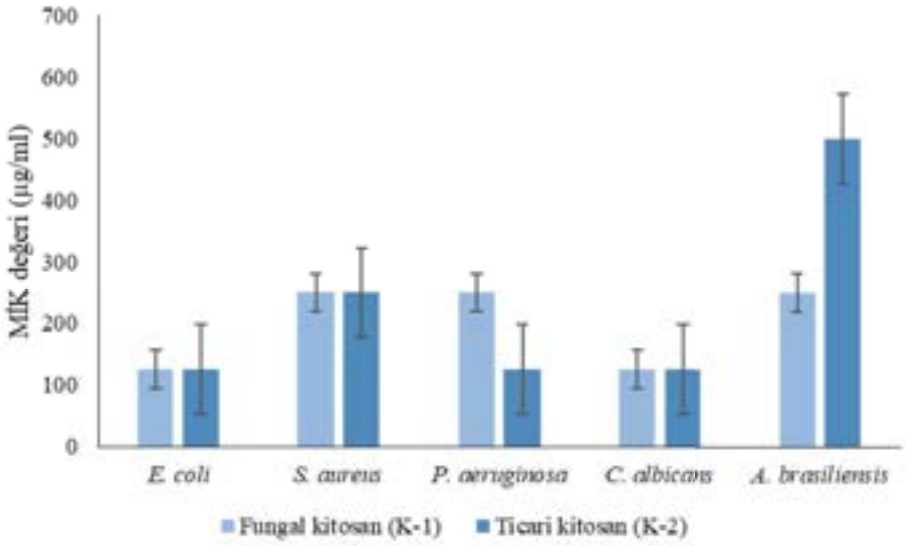
Şekil 4.12. Fungal kitosan (K-1; soldaki mikroplaka) ile ticari kitosanın (K-2; sağdaki mikroplaka) bakteri ve maya test mikroorganizmalarına karşı MİK görüntüsü

Çizelge 4.8. Minimum inhibisyon konsantrasyonları (µg/ml)

Numune Kodu	*E. coli* (ATCC 8739)	*S. aureus* (ATCC 6538)	*P. aeruginosa* (ATCC 9027)	*C. albicans* (ATCC 10231)	*A. brasiliensis* (ATCC 16404)
Fungal kitosan (K-1)	125	250	250	125	250
Ticari kitosan (K-2)	125	250	125	125	500

Çizelge 4.4'de görüldüğü üzere, atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın gram negatif *E. coli*'ye karşı daha etkili olduğu gram pozitif *S. aureus*'a karşı daha az etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermesi ile birlikte fungal kitosanın moleküler ağırlığının düşük olması nedeniyle hücre içine girerek hücre içi biyokimyasal reaksiyonları bozduğu söylenebilir. Ancak ticari kitosan orta molekül ağırlığında olmasına rağmen, fungal kitosanla aynı MİK değerlerini vermiştir. Bu nedenle moleküler ağırlıklarından ziyade bir diğer mekanizma olan polikatyonik etkiler nedeniyle antibakteriyal etkiye neden oldukları görülmektedir.

Fungal kitosan ile ticari kitosanın biyofilm oluşturma özelliği olan *P. aeruginosa*' ya karşı antibakteriyal etki mekanizması farklılaşmaktadır. Ticari kitosanın, fungal kitosana göre *P. aeruginosa*' ya karşı daha yüksek antibakteriyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanların *P. aeruginosa*'ya karşı daha etkili olduğu, deasetilasyon derecesinin antibakteriyal etki mekanizmalarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Tsai vd., 2002). Yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanların antifungal aktivitelerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada da yüksek deasetilasyon derecesine sahip ticari kitosanın, düşük deasetilasyon derecesine sahip fungal kitosana göre antiküf aktivitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Ticari kitosan ile fungal kitosanın *C. albicans*'a (C) karşı antimaya aktivitelerinin aynı olması nedeniyle antimaya aktivitesinde polikatyonik mekanizmanın devrede olduğu söylenebilir. Genel antimikrobiyal aktivite durumları Şekil 4. 13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Ticari ve fungal kitosanın antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması

Kitosanın antifungal aktivitesinin mekanizması henüz tam olarak ortaya çıkarılamamış olmasına karşın bununla ilgili de iki mekanizma öne sürülmektedir. İlk mekanizmaya göre kitosanın polikatyonik özelliğinin küf ve mayaların hücre yüzeylerindeki negatif yükler ile etkileşime girerek, iyin dengesinin bozulmasına yol açar. İkinci mekanizmaya göre ise fungal hücrenin içine girerek protein, DNA gibi moleküllere bağlanır. Bunun sonucunda üremeyi durdurmuş olur. Bu çalışmada optimize koşullarda ekstrakte edilen fungal kitosanın, mayalara karşı etkisi için *Candida albicans*, küflere karşı etkisini belirleyebilmek için *Aspergillus brasiliensis* test mikroorganizması kullanılmıştır (Şekil 4.14).

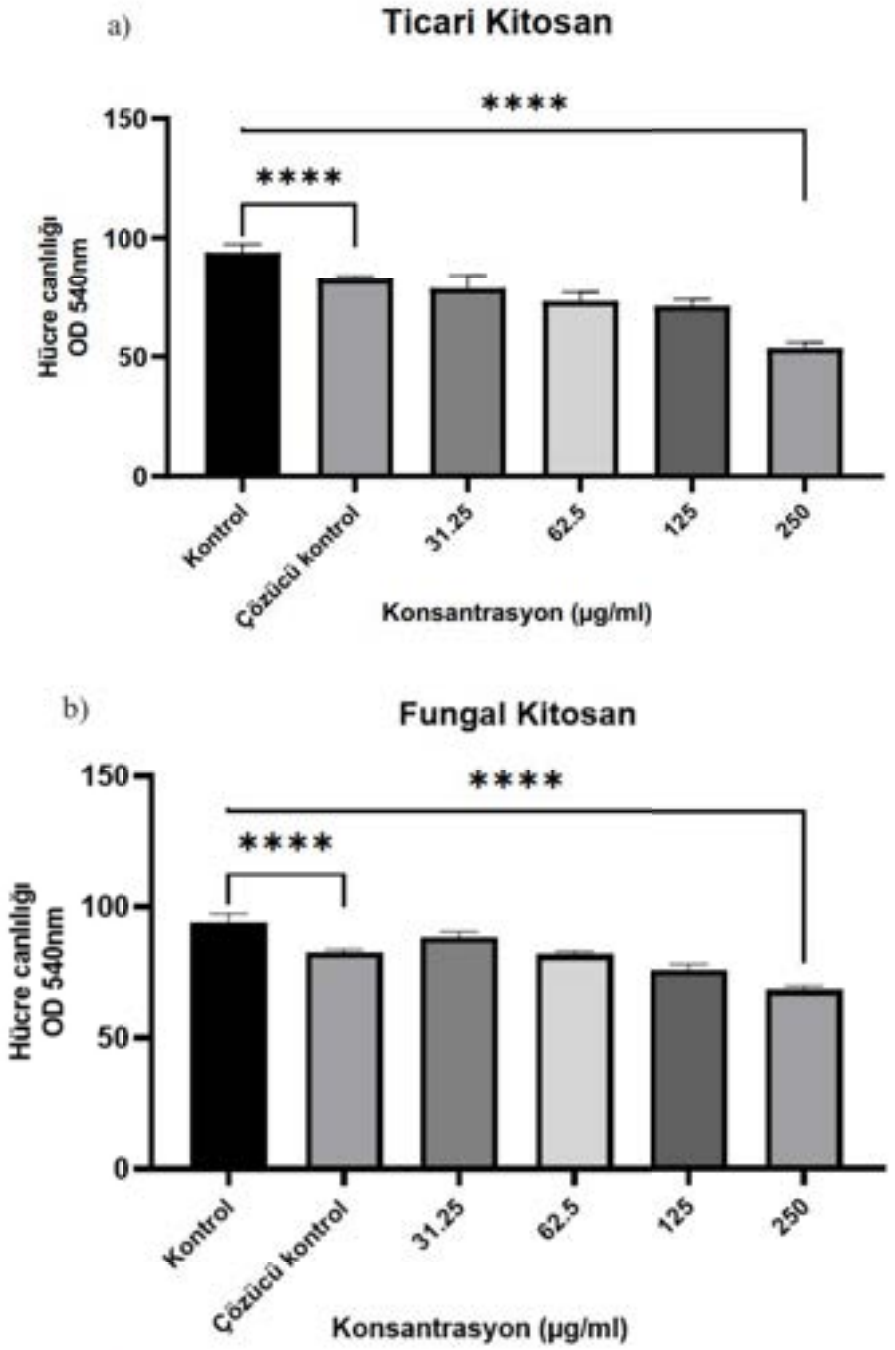


Şekil 4.14. Fungal kitosan (K-1; üstteki satırlar) ile ticari kitosanın (K-2; alttaki satırlar) *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) küfüne karşı MİK görüntüsü

Kitosanın funguslar üzerindeki etkisinde kitosan konsantrasyonunun kilit faktör olduğu ve *Fusarium oxysporum*, *Colletrotichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* ve *Penicillium digitatum* küflerinin gelişmelerinin tamamen önlenebilmesi için yüksek kitosan konsantrasyonun gerekli olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, *Rhizopus stolonifer*' e karşı 2 mg/mL düzeyinde kitosan uygulandığında maksimum antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı moleküler ağırlıklara sahip kitosanların *Aspergillus niger* 'a karşı antifungal aktivitesi, Li vd. (2008) tarafından çalışılmıştır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip kitosanların, *A. niger* 'a karşı antifungal aktivitesinin olmadığını ve düşük moleküler ağırlığa sahip kitosanların 72 saatte *A. niger*' in büyümesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın ticari kitosana göre, MİK değerleri yakın olmakla birlikte mikroorganizmadan mikroorganizmaya göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç fungal kitosanın antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

4.1.4.2. Yara iyileştirici aktivite (Stratch testi)

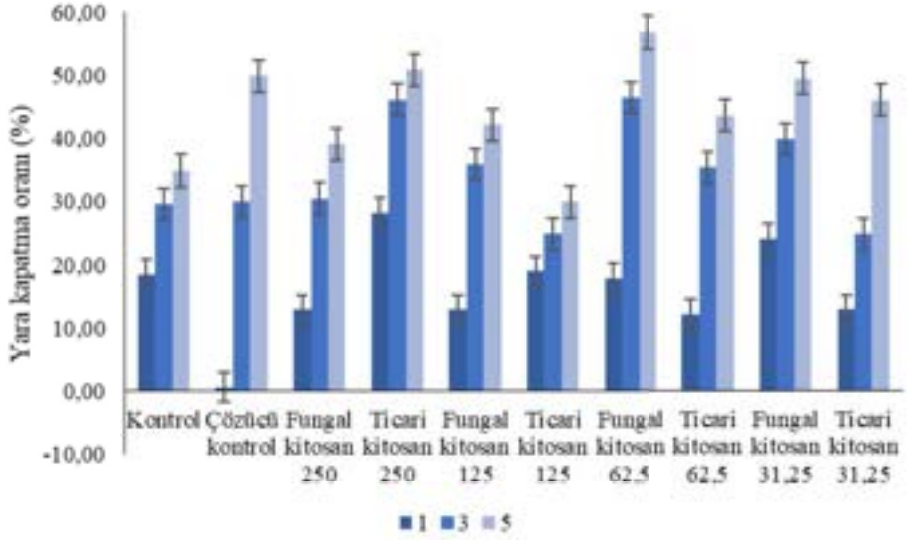
Yara iyileşmesi, hücre migrasyonu, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis aşamalarını içeren oldukça kompleks bir süreçtir. Yara iyileşmesinde kullanılan, vücut ile temas eden her şeyin biyouyumlu olması gerekir aksi takdirde immün sistem tarafından dışarı atılır. Kitosan, hemostatik aktivitesi nedeniyle yaraların iyileştirilmesinde kullanılan doğal ve biyouyumlu bir polimerdir. Yaranın erken evrelerinde hücre migrasyonu ve poliferasyonunu hızlandırıcı etkisi bulunmaktadır (Bano vd., 2017; Üner, 2021). Bu çalışmada yara iyileştirici aktivitesi belirlenmeden önce, atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın ve ticari kitosanın farklı konsantrasyonlardaki HaCat hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bunun nedeni yaranın iyileşmesi için hücrelerin migrasyon yapabilir canlılıkta olması gerektiğidir. Elde edilen verilerin istatiksel analizi, GraphPad Prism 9 programı ile yapılmıştır. Standart sapma ve anlamlılık değerleri bulunmuştur. $p>0,05$ ise anlamsız, $p<0,05$ ise anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ticari ve fungal kitosanların konsantrasyonları arttıkça HaCat hücrelerinin büyümesi üzerinde olumsuz etki göstermiştir (Şekil 4.15). İstatiksel analiz sonucu $P<0,0001$ olduğundan hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tek yönlü Anova, Tukey analizi).



Şekil 4.15. Ticari (a) ve fungal kitosanın (b) HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

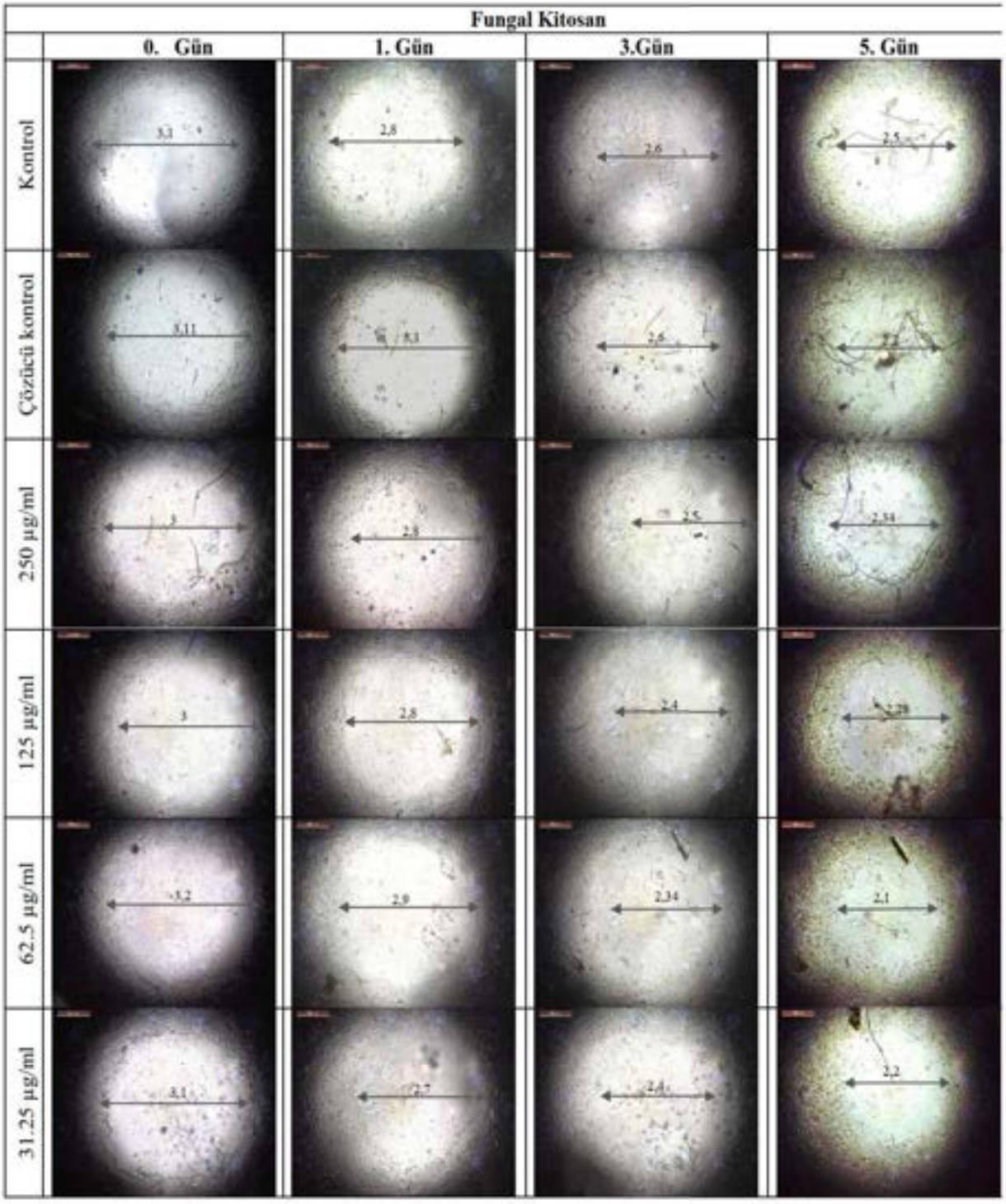
Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosanın HaCat hücrelerinin, oluşturulan yaralı alana göçü üzerindeki etkisini araştırmak için standart bir in vitro yöntem olan yara iyileşme testi (stracht testi) yapılmıştır. Çalışmada 31,25-62,5-125 ve 250 µg/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir muamele yapılmamış, yara oluşturulduktan sonra hücreler besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Kontrol grubu ve test gruplarının başlangıç saatinde oluşturulan yara

belirgin bir şekilde görülmüştür. Her bir test grubunun başlangıç (0. saat) görüntüleri alınmıştır. Kontrol grubunda hücre migrasyonunun 24. saatte (1. gün) başladığı ve 5 gün boyunca migrasyonun devam ettiği gözlemlenmiştir. Test edilen 1, 3 ve 5. günlerdeki yara alanları başlangıç saatindeki (0. saat) alana oranlanarak her bir test grubu için yara kapanma yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 4.16).

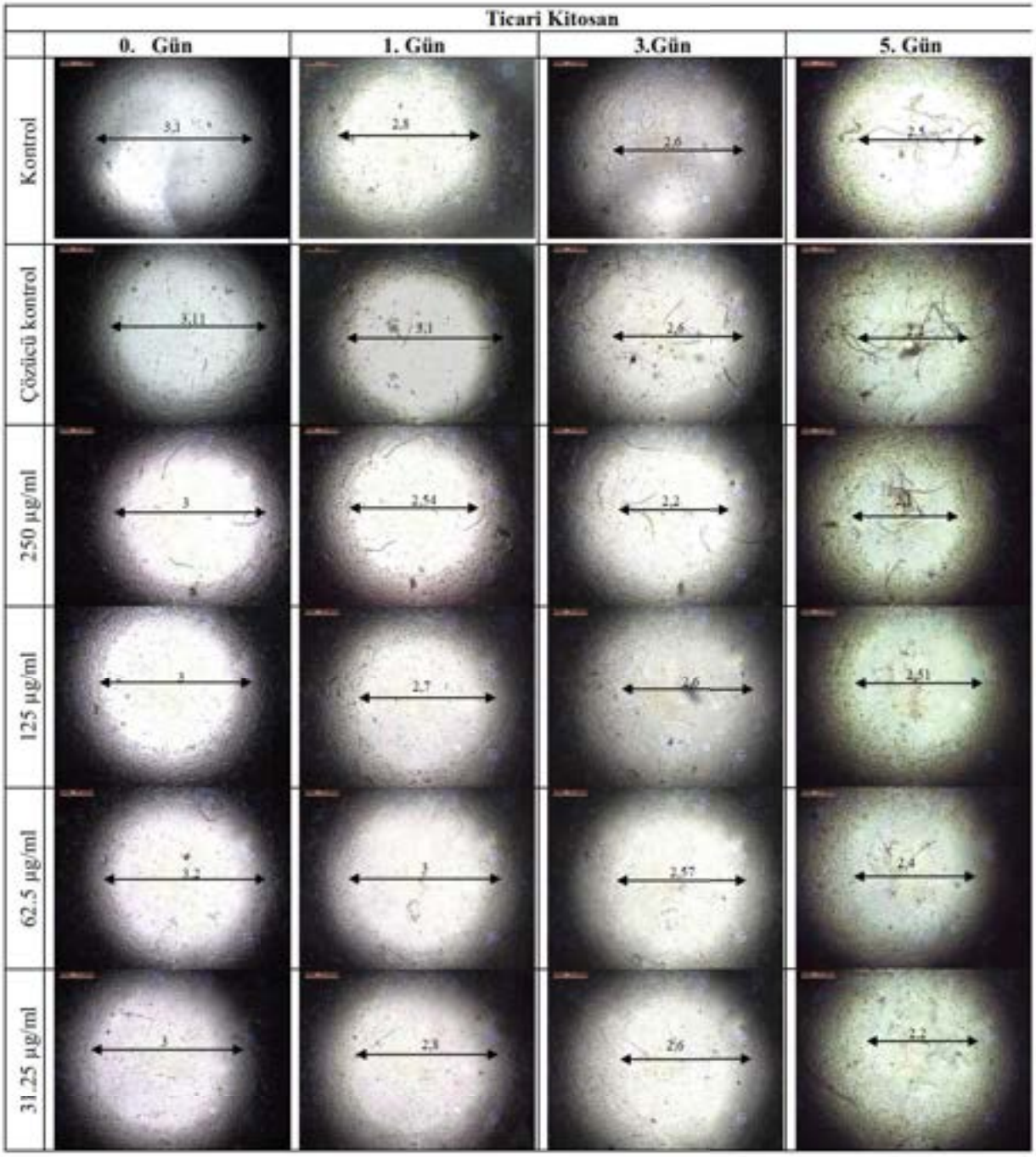


Şekil 4.16. Ticari ve fungal kitosanın yara kapatma yüzdelerinin karşılaştırılması

Sonuçlara göre, atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın 62,5 µg/ml' lik dozunda, fibroblast hücrelerinin yaralı bölgeye göçünü önemli ölçüde arttırabilmiştir. 5. günde yara bölgesinin %57'sine yakın kısmı kapatmıştır. Kontrol grubuna göre atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan %22 daha fazla yara iyileştirme aktivitesi göstermiştir. Ticari kitosan ise 250 µg/ml'lik dozunda, fibroblast hücrelerinin yaralı bölgeye göçünü önemli ölçüde arttırabilmiştir. Kontrol grubuna göre ticari kitosan %16 daha fazla yara iyileştirme aktivitesi göstermiştir. Sadece çözücü kontrolün uygulandığı yaranın ilk 24 saatinde belirgin bir hareketlilik görülmemiştir. 3. günde ise hızlı bir yara kapanma yüzdesine ulaşmıştır. Çözücü kontrol, kontrol grubuyla kıyaslandığında ise 5. gün sonunda yarada %15 daha fazla kapanma etkisi göstermiştir. Asetik asidin yara iyileşmesinde olumlu etki yaptığı görülmüştür. Agrawal vd. (2017) tarafından %1'lik asetik asidin yara alanındaki pH' yı düşürerek yara iyileşmesine katkı sağladığı rapor edilmiştir. Bu sonuç, elde edilen verilerle uyumluluk göstermektedir. Fungal ve ticari kitosanın migrasyon testi sonuçları Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Beşinci gün yara durumu değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile 31,25-250 µg/ml aralığındaki kitosan konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$).



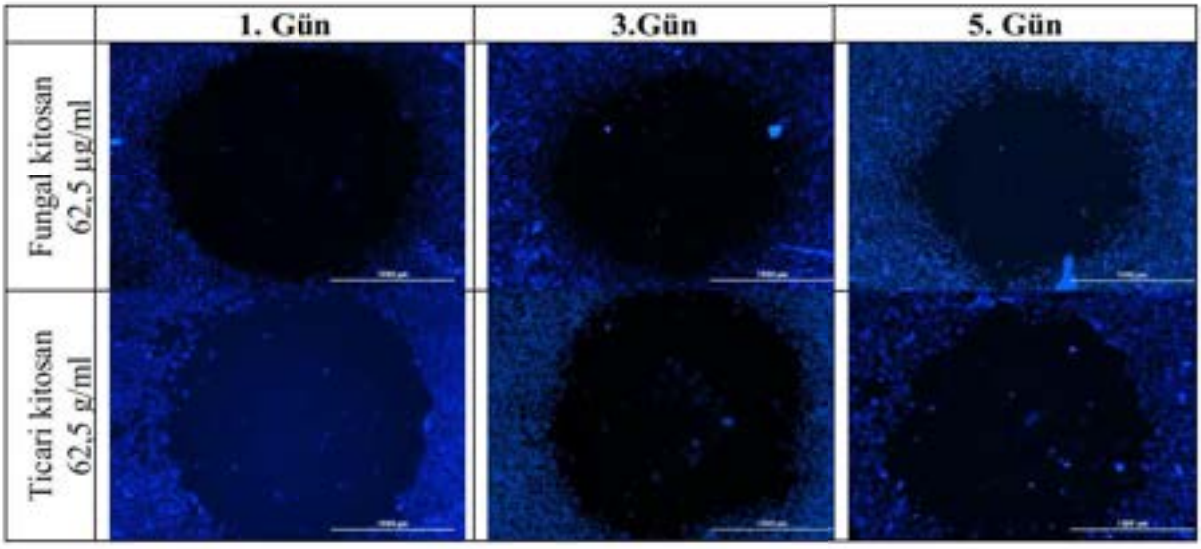
Şekil 4.17. Fungal kitosanın HaCaT keratinosit hücre kültüründe oluşturulan yara üzerinde zamana bağlı etkisi (Mikroskop büyütmesi:100X, Fotoğraf skalası: 500 µm)



Şekil 4.18. Ticari kitosanın HaCaT keratinosit hücre kültüründe oluşturulan yara üzerinde zamana bağlı etkisi (Mikroskop büyütmesi:100X, Fotoğraf skalası: 500 µm)

Ticari ve atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın 62,5 µg/ml konsantrasyonlarındaki HaCaT hücrelerinin, oluşturulan yaralı alana göçü üzerindeki zamana bağlı etkileri Şekil 4.19'da verilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın yara iyileştirme aktivitesinin ticari kitosana göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca hücrelerin göçünün belirlenebilmesi için

flüoresan mikroskobunda da Hoechst boyasıyla da boyanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Hoechst floresan boyası ile boyama sonrası aynı konsantrasyonlardaki fungal ve ticari kitosanların karşılaştırılması

Kitosanın sahip olduğu antibakteriyal özellikler yara iyileşmesinde sinerjistik etki oluşturmaktadır. Yaraların, patojen bakteriler tarafından enfeksiyon oluşturma riski yüksek olmaktadır. Yara enfeksiyonu riskini azaltmak için, yara örtüsüne antimikrobiyal ajanlar ekleyerek antimikrobiyal etkiye sahip yara örtüleri geliştirilmektedir. Silva vd. (2013), Aloe veranın terapötik özelliklerinin açık yara örtü malzemesi olarak etkili olduğunu göstermiştir. Kitosanın yanık yaralarına iyi geldiği, yara bölgesindeki bakteriyal (*P. aeruginosa* ve *P. mirabilis*) enfeksiyonun ilerlemesini önleyerek farelerin yaşam sürelerinin uzatıldığı Dai vd. (2009) tarafından rapor edilmiştir.

Çeşitli bitkisel ekstraktlar, yağlar, bileşenler kullanılarak kitosan içeren yara örtücü film çalışmaları yapılmaktadır. Bu maddeler, yara örtüsü filmlerin mekaniksel, fiziksel ve biyolojik özelliklerini geliştirmekle birlikte yara iyileşmesine sinerjistik etki yapmaktadır. Hem yaranın hızlıca kapanmasını hem de enfeksiyon kapma riskinin azaltılmasını sağlarlar (Qiao vd., 2017). Küçük ve Yıldırım (2019) yara örtüsü olarak kitosan ile protein esaslı jelatin biyopolimeri ile sarı kantaron bitkisel ekstraktını çeşitli oranlarda içeren filmler hazırlamışlardır. Bu filmlerin yarayı enfeksiyonlardan koruyacak, yaranın hava almasını sağlayarak iyileşmesini hızlandıracak özellikte olduklarını göstermişlerdir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda elde edilen fungal kitosanın antibakteriyal özelliğinin

olması biyomedikal uygulamalarda ekstra önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Bu durum başta yara örtüsü olmak üzere, çeşitli biyomedikal uygulamalarda atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda elde edilen fungal kitosanın antibakteriyal yara iyileştirici etken madde olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

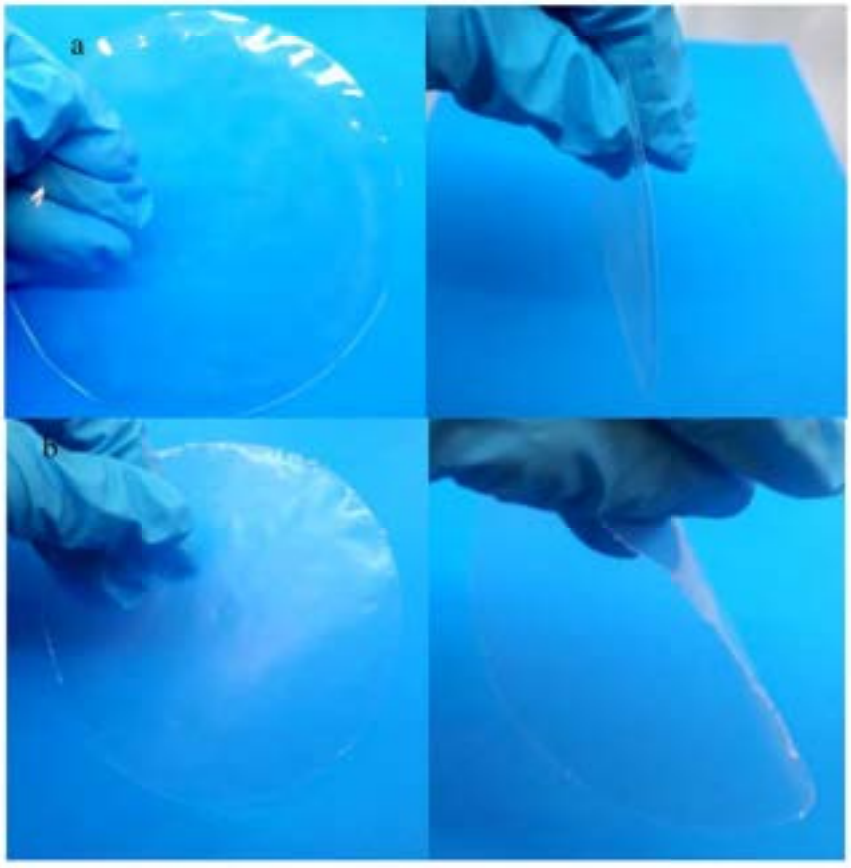
4.1.5. Fungal kitosan içeren filmlerin eldesi, fiziksel ve biyolojik özellikleri

Kitosanlar sahip oldukları özellikleri bakımından, gıda sanayisinde ambalaj olarak, biyomedikal uygulamalarda yara örtüsü olarak kullanılabilmektedir. Antibakteriyal olması özellikle gıdaların uzun süre sağlıklı bir şekilde depolanmasını sağlamakta, hem de oksijen, karbondioksit gibi gazlar için seçici bir bariyer görevi görmektedir. Yenilebilir olması, geri dönüşüm sürecinde de kolaylıklar sağlamaktadır (Tokatlı ve Demirdöven, 2015). Önceki çalışmalarımızda atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosanın fiziksel ve biyolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Bu aşamada ise fungal kitosandan elde edilen filmin biyolojik özelliklerini koruyup korumadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kitosan ve türevlerinden, kitosan/polimer, kitosan/sentetik polimer gibi karışımlardan filmler elde edilebilmektedir (Wang vd., 2018). Bu konuyla ilgili literatürde birçok çalışmaya rastlamak mümkündür (Uçan ve Mercimek, 2013; Tan vd., 2015; Wang vd., 2018; Cazon ve Vazquez, 2020; Tian ve Liu, 2020). Ancak atık bir fungal biyokütleden elde edilen kitosanın kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Saf kitosan kullanılarak yapılan filmler, uzun raf ömrüne sahip olup antioksidant özellikleri ve besinsel içerikleri korurlar. Ayrıca mikrobiyal kirliliği de önlerler. Bununla birlikte az miktarda gliserol, sorbitol gibi plastikleştiricilerin eklenmesiyle esneklik kazanırlar. Fimlerin mekaniksel özelliklerini iyileştirmek için Tween 80 gibi emülsiyonlar da kullanılabilmektedir.

Jelatin, hayvanlardan elde edilen kolajenden saflaştırılmış bir proteindir. Şeffaf filmlerin eldesinde tercih edilmektedir. Su buharı ve özellikle güneş ışığı/UV ışıklarına karşı bir bariyer oluşturarak mikrobiyal üremeyi durdurur ve gıdanın raf ömrünü uzatır (Poverenov vd., 2014). Bu avantajları nedeni ile bu çalışmada jelatin/kitosan filmler oluşturulmuştur. Ayrıca polisakkaritlerin kullanılmasıyla fonksiyonel filmlerin elde edilebilmesi avantajı nedeni ile kitosan/polisakkarit film eldesi de gerçekleştirilmiştir. Bitkilerden elde edilen nişastanın, geniş kullanım alanına sahip olması, düşük maliyetli ve

biyolojik olarak parçalanabilirliği yüksek olması en önemli avantajlarıdır (Talon vd., 2017). Nişasta ve kitosanın film oluşturma kapasiteleri yüksektir. Nişasta/kitosan filmleri, bakteri üremesini azaltır, antioksidan aktivite sergiler ve su buharı için bir bariyer işlevi görürler (Kowalczyk vd., 2015).

Bu çalışmada negatif kontrol grubu olarak kitosan içermeyen nişasta ve jelatin içeren filmler kullanılmıştır (Şekil 4.20). Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosan katkılı jelatin içeren film numuneleri şeffaf, nişasta içeren film numuneleri beyaz opak görünümdedir (Şekil 4.21). Fungal ve ticari kitosan %1 asetik asit çözeltisinde çözdürülerek kullanılmıştır. Nişasta/kitosan filmler şeffaf ambalaj gibi olurken, jelatin/kitosan filmler streç film gibi bir görünümde ve formda oluşmuştur. Elde edilen bu filmlerin bazı fiziksel özellikleri, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri belirlenerek gıda ambalajı olarak kullanım potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.20. Jelatin (a) ve nişasta (b) ile oluşturulan negatif kontrol film numuneleri



Şekil 4.21. Kitosan içeren film numuneleri

4.1.6. Fiziksel özellikler

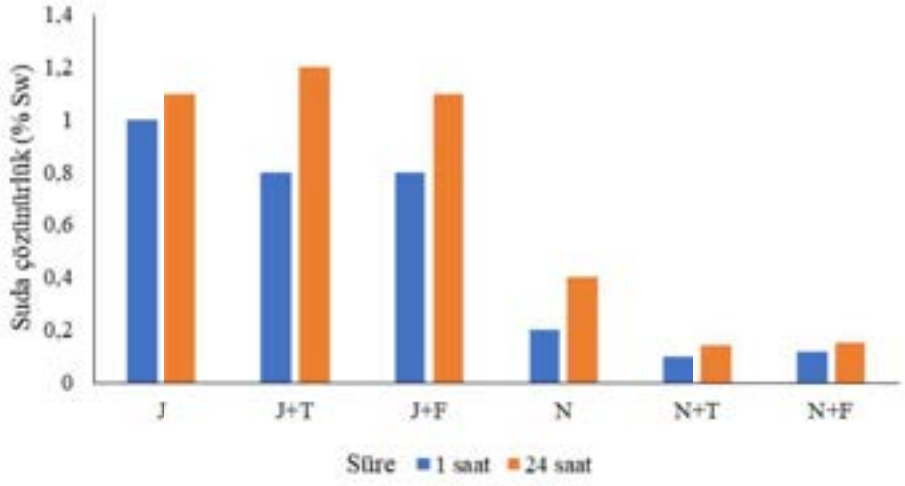
Nişasta, jelatin gibi protein ve karbonhidrat zincirleri arasındaki bağlar moleküllerin hareketlerini kısıtlayarak kırılganlıklarını arttırırlar. Bu durun filmlerin elastikiyetlerini önemli ölçüde azaltır. Bu nedenle bu çalışmada hazırlanan filmlere % 2 gliserol ilavesi yapılmıştır. Bu durum elde edilen kitosan katkılı filmlerin fiziksel özelliklerini de etkilemektedir. Nişasta/kitosan filmlerin, Jelatin/kitosan filmlere göre daha kırılgan yapıya sahip oldukları görülmüştür.

4.1.6.1. Suda çözünürlük testi (Sw)

Nişasta ile üretilmiş olan film numuneleri 1 saat ve 24 saat gözle görünür şekilde kalırken, jelatin ile üretilmiş olan film numuneleri 1 saat ve 24 saat sonunda tamamen görünmez hale gelmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Kitosan içeren filmlerin suda çözünürlük testi (1-3:Nişasta/kitosan filmler, 4-6: Jelatin/kitosan içeren filmler)

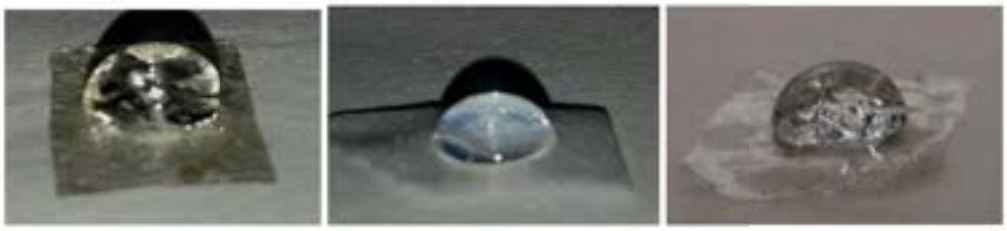


Şekil 4.23. Suda çözünürlük sonuçları (J: Jelatin, J+T: Jelatin/ticari kitosan, J+F: Jelatin/fungal kitosan, N: nişasta, N+T: Nişasta/ticari kitosan, N+F: Nişasta+ Fungal kitosan)

Elde edilen verilere göre, 1 saat süre sonunda en yüksek çözünürlüğün %1 oranında (w/v) Jelatin, en düşük çözünürlüğün ise %0,1 oranında (w/v) Nişasta+Ticari kitosan filmde olduğu görülmektedir. 24 saatin sonunda ise en düşük çözünürlüğün Nişasta+Ticari kitosan ile Nişasta+Fungal kitosanda olduğu belirlenmiştir. Bu özellik açısından değerlendirildiğinde; Nişasta/kitosan filmlerinin su buharına karşı daha etkin bariyer işlevi göstereceği düşünülmektedir. Jelatin/kitosan filmlerin ise daha çok yenilebilir film olarak kullanıma uygun olduğu söylenebilir. Özellikle gıdaların saklanmasında meyvelerin raf ömrünü arttırmakla birlikte, suda çözünmesinin yüksek olması nedeniyle yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Candan ve Bağdatlı, 2018).

4.1.6.2. Su iticilik testi (hidrofobik/hidrofilik testi)

Elde edilen verilere göre nişasta ile elde edilen filmlerin (ɵ =90 °) su iticilik yeteneği jelatin ile oluşturulan filmlere (ɵ<90°) göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.24). Özellikle jelatinli numuneler suda çözünürlüğü yüksek olduğu için film yapılarında bozulma meydana geldiği belirlenmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosanın su iticilik özelliği üzerinde belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.24. Bazı film numunelerinin su iticilik testi görüntüleri

Elde edilen bu sonuçlar, nişasta/kitosan filmlerin su buharına karşı etkin bir ambalaj olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu desteklemektedir. Aynı şekilde Jelatin/kitosan filmlerin yenilebilir ve kolayca uzaklaştırılabilinir bir film olarak gıda ambalajı olmasının yanı sıra yara iyileştirilmesinde kullanma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir (Küçük ve Yıldırım, 2019).

4.1.6.3. Elastiklik testi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal ve ticari kitosan katkılı nişasta ve jelatin ile elde edilen filmlerin elastiklik sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Nişasta ile elde edilen filmlerin elastiklik değerlerinin jelatin ile elde edilen filmlere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Katkılama yapılan kitosanın tipinin belirgin bir şekilde elastiklik özelliğini etkilemediği, kitosan ilavesinin filmin elastikiyetini bir miktar arttırdığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, plastikleştirici olarak gliserol kullanılarak, kitosan ve nişasta karışımından dökme yöntemi ile filmler elde edilmiştir. Filmlerdeki nişasta oranının artmasıyla su buharı geçirgenliğinin azaldığı, kopma dayanımı ve elastikiyetin

arttığı belirtilmiştir (Xu vd., 2005). Elastiklik, filmlerin gıda ambalajı olarak kullanım şeklini etkilemektedir. Elastik/esnek ambalajların kullanım alanları, sabit/elastik olmayan ambalajlara göre daha fazladır (Karakuş ve Ayhan, 2019; Karakuş vd., 2021).

Çizelge 4.9. Elde edilen filmlerin elastiklik özellikleri

Denemeler	Elastiklik (Young Modülü-Mpa)
J	887.5
J+F	899.1
J+T	903.3
N	850.9
N+F	862.0
N+T	874.8

4.1.7. Kitosan filmin biyolojik aktiviteleri

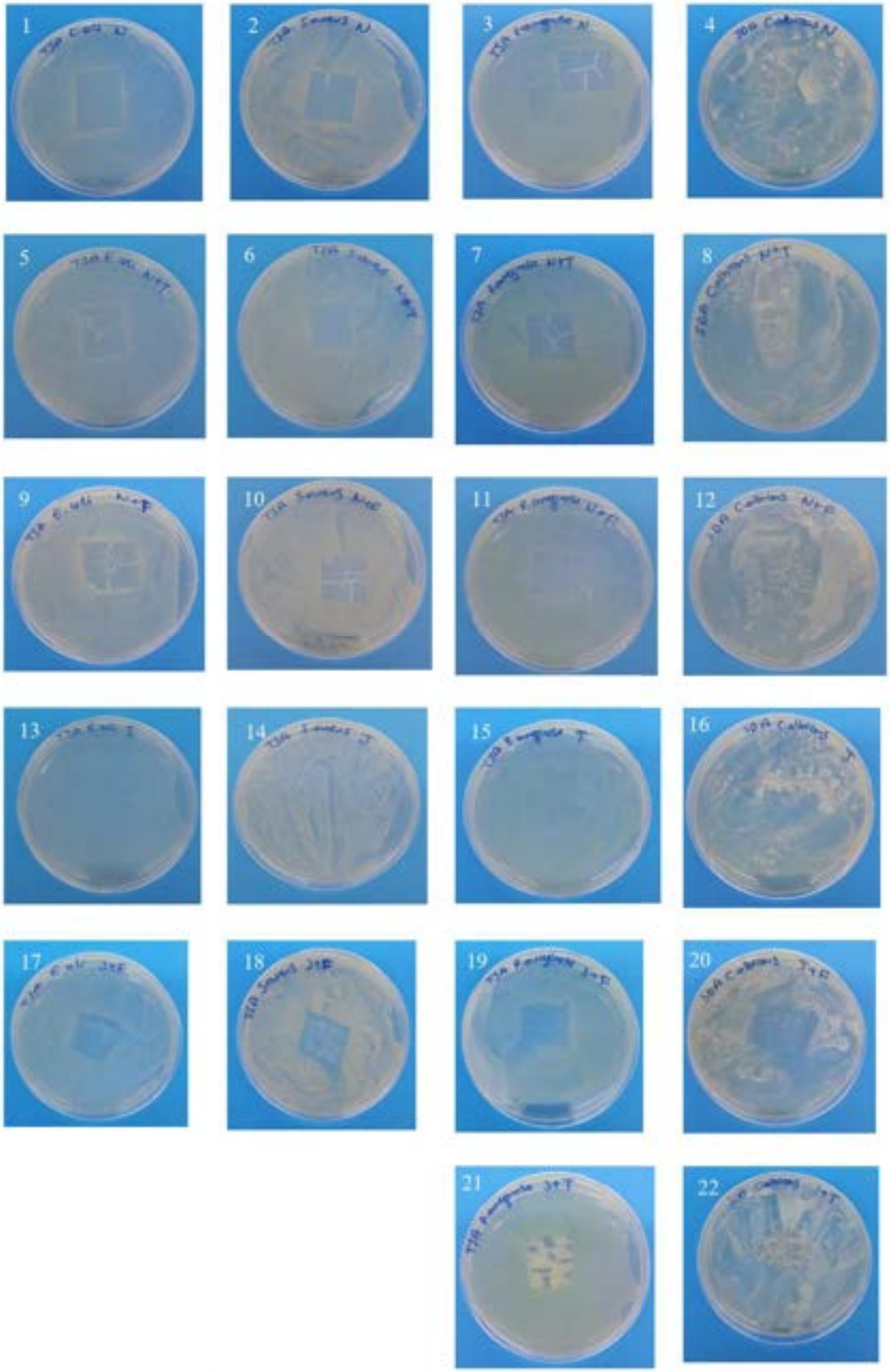
Fiziksel özellikleri bakımından atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan, ticari kitosana benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte elde edilen filmlerin fonksiyonel olup olmadıklarını belirlemek amacıyla filmlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Elde edilen filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri, hem çözünürlüğe dayalı hem de yüzeye bağlı olmak üzere iki farklı şekilde belirlenmiştir. Bunun nedeni elde edilen filmlerden etken kitosan maddesinin çözünüp çözünmediğini de ortaya koymaktır. Literatürde en çok rastlanılan antibakteriyal aktivite yöntemi, çözünürlüğe dayalı antibakteriyal aktivite (inhibisyon zon çapı) tayinidir (Goy ve Assis, 2014; Malinowska-Pańczyk; 2015). Ancak çözünürlük, birçok durum için istenmeyen bir özelliktir. Filmlerin ömrünü, çevredeki maddelerle etkileşimini etkilemektedir.

4.1.7.1. Filmlerin antimikrobiyal aktiviteleri

A. Çözünürlüğe dayalı antimikrobiyal aktivite

Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosan içeren film numuneleri, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. Elde edilen filmlerden etken maddenin çözünürlüğüne dayalı antibakteriyal etkisi araştırılmıştır. Jelatinli filmlerde *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) üzerinde çözünmeye bağlı antimikrobiyal etki oluştuğu belirlenmiştir. Film altı üreme gösteren numuneler ise, nişastalı numunelerin *C. albicans*, jelatinli filmlerin ise Jelatin ve Jelatin+Ticari kitosan numunelerinin *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* petrilerinde görülmüştür (Şekil 4.26). Elde edilen filmlerden Jelatin+Fungal kitosan film numunesi *Candida albicans* (ATCC 10231)'a karşı zon (2 mm) oluşturmuştur. Nişastalı filmlerde zon oluşumu görülmemiştir. Jelatinli filmlerde ise inkübasyon sonrası filmlerin eridiği ve oldukları bölgede mikroorganizma gelişiminin olmadığı görülmüştür.

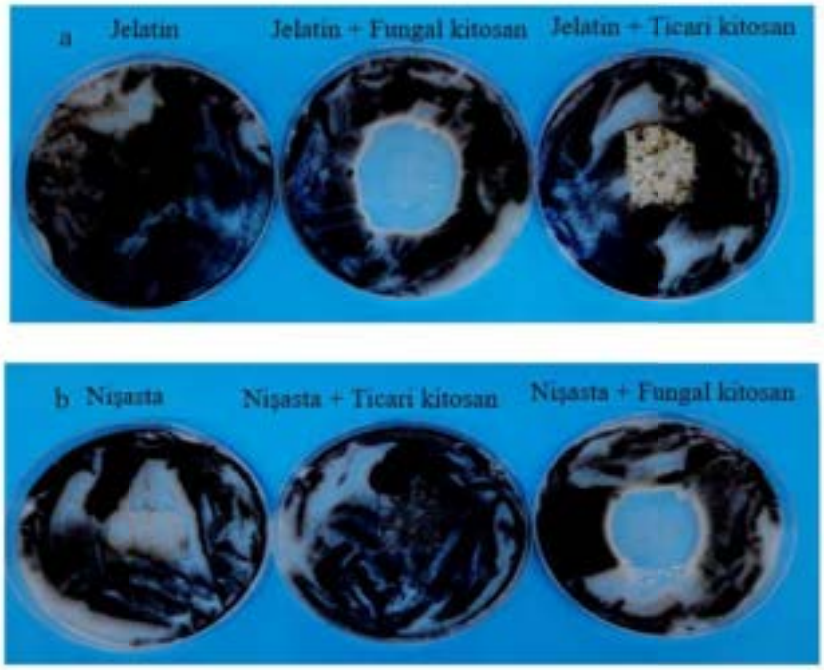
Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosanın saf toz hallerinde MİK değerleri ve temsilci test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Çizelge 4.8). Ancak bu nişasta/kitosan filmlerinin çözünürlüğe dayalı anti bakteriyal aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. Bu durum literatürde de rapor edilmiştir (Malinowska-Pańczyk, 2015). Bu durumun pH dan kaynaklı çözünürlüğün zayıflaması ve amino gruplarının yüklerinin baskılanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.25. Kitosan içeren filmlerin agar plak üzerinde antimikrobiyal etkisi (1-4: Nişasta, 5-8: Nişasta/Ticari kitosan, 9-12: Nişasta/Fungal kitosan,13-16: Jelatin, 17-20: Jelatin/Fungal kitosan, 21-22: Jelatin/Ticari kitosan)

Kitosan çözeltilerinin antibakteriyal aktivitesi olmasına karşın, film yapısında bu aktiviteyi elde edebilen çok az çalışma vardır. Hatta bazı araştırmacılar kitosan filmlerin antimikrobiyal aktivite göstermediklerini belirtmişlerdir (Foster ve Butt, 2011). Her ne kadar saf kitosanların antimikrobiyal aktivitesi olsa da filmlerinin gıda ambalajı olarak kullanılması için yeterli antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda literatürün belirttiği gibi bu yöntemle test edildiklerinde antimikrobiyal etkinliklerinin az veya hiç olmadığı yönündedir. Bu nedenle birçok çalışmada ekstra aktif etken madde katkıları yapılarak filmlerin antimikrobiyal etkilerin arttırılması amaçlanmaktadır. Dahası bu yöntem hala çok sık kullanılmasına rağmen filmlerin antimikrobiyal etkinliğini ölçmek için tek başına yeterli değildir. Oluşan sıkı bağlar sonucu etken madde besiyeri ortamında çözünemediği için de zon oluşumu gerçekleşmeyebilir ve bu nedenle yanıltıcı sonuçlar verebilir. Bu nedenle bu çalışmada yüzeye bağlı antimikrobiyal aktivite yöntemi de çalışılmıştır.

Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi mümkün olmamışken, çözünürlüğe bağlı antiküf aktivitesinde zon oluşumu görülmüştür. Film numunelerinin *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) üzerine antiküf etkileri Şekil 4.26'da sunulmuştur.



Şekil 4.26. Film numunelerinin antiküf aktivitesi, (a) Jelatin katkılı (b) Nişasta katkılı

Jelatin filmin üzerinde küf üremesi görülürken, Jelatin+Ticari kitosan filminde zon oluşmamasına rağmen üzerinde büyüme görülmemiştir. Jelatin+Fungal kitosan filminde ise belirgin bir zon oluşumu (4 mm) görülmüştür. Ayrıca *A. brasiliensis* küfünün sporulasyonunu da küçük bir oranda inhibe ettiği görülmektedir. Nişastalı filmlerde küfün Nişasta ve Nişasta+Ticari kitosan filmlerinin üzerinde de ürediği görülürken, Nişasta+Fungal kitosan filminde zon oluşumu (3,5 mm) olduğu ve sporulasyonun yine inhibe olduğu belirlenmiştir.

B. Yüzeye bağlı antimikrobiyal aktivite

Elde edilen filmlerin yüzey antimikrobiyal aktivitelerinin tayini ISO 22196 standardına göre analiz yöntemi kullanılmıştır (Bayatbalay vd., 2021). Ticari ve fungal kitosan içeren filmlerin 24 saatlik temas süresi sonunda antibakteriyal ve antimaya, 72 saatlik temas süresi sonunda antiküf aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Film numunelerinin yüzeylerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

Numune Kodu	*E. coli* (ATCC 8739)		*S. aureus* (ATCC 6538)		*C. albicans* (ATCC 10231)		*A. brasiliensis* (ATCC 16404)	
	R	%A	R	%A	R	%A	R	%A
N	0,42	1,02	0,49	1,08	0,34	53,85	0,29	0,58
N+T	2,55	99,76	1,38	95,83	1,55	97,16	0,36	0,91
N+F	2,04	99,01	1,44	95,97	2,49	99,67	2,58	99,83
J	0,34	0,90	0,50	1,10	0,41	0,99	0,11	0,18
J+T	2,29	99,28	2,02	99,01	2,11	99,23	1,55	97,17
J+F	2,47	99,66	2,28	99,26	2,09	99,78	2,91	99,86

Yapılan analizler sonucunda çözünürlüğe bağlı aktivite ile yüzeye bağlı antimikrobiyal aktiviteler arasında bir korelasyon olmadığı görülmüştür. Yüzeyle direk temasta kitosan içeren film numunelerinin belirli bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10). Nişasta ile elde edilen filmlerde *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivite R≥2 kriterini sağlayamamıştır. Kitosan katkılı filmlerin *E. coli*'ye karşı %99 oranında antibakteriyal etkinliği olduğu görülmüştür. Nişasta+Fungal kitosan, Jelatin+Ticari kitosan ve Jelatin+Fungal kitosan kodlu numunelerin *C. albicans*'a karşı antimaya aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Antiküf aktivite de ise fungal kitosan katkılı filmler, aktiviteleri ile

öne çıkmaktadır. Kitosan filmleri gram negatif bakterilere karşı, gram pozitif bakterilere göre daha fazla antibakteriyal aktivite göstermiştir. Bu sonuç daha önceki yapılan çalışma ile de uyumluluk göstermektedir. Ticari kitosan içeren filmlerin, fungal kitosan içeren filmlere göre antifungal aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar da bir önceki aşamada yapılan sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Antimikrobiyal aktivite için tüm test mikroorganizmalarına karşı R≥2 kriterini yerine getirmiş olan deney grubu ise Jelatin+Fungal kitosan filmidir. Gerçekleştirilen bu test ile elde edilen filmlerin antimikrobiyal aktivitesi ortaya konulmuştur. Yüzey ile mikroorganizmanın doğrudan temas ile etkileşimlerinin artması, filmdeki kitosanla hücre duvarları arasındaki polikatyonik etki mekanizmasının işlemesine kolaylık sağlamıştır. Böylelikle kitosan/polisakkarit (nişasta) filmlerin antimikrobiyal etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Uygulanan yöntem, bu tarz filmlerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemede başarılı bulunmuş olup kitosan katkılı filmler için de kullanılması önerilmektedir. Yapılan analizler ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen fungal kitosan ve ticari kitosanın antimikrobiyal aktiviteleri açıkça ortaya konulmuştur. Bu nedenle bu tarz filmlerin sadece gıdaları istenmeyen çevresel faktörlerden korumakla kalmayarak aynı zamanda mikrobiyal kontaminasyonu da azaltabilen bir gıda ambalaj malzemesi olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir.

4.1.7.2. Filmlerin Antioksidan Aktiviteleri

Antioksidan aktivite, antibakteriyal enfeksiyonların önlenmesinde ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir parametredir. Gıda ambalajlarında antioksidan aktivite, ambalajın degredasyonunu ve kötü koku oluşumunu engeller (Brody vd., 2001). Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanı içeren film numuneleri ile ticari kitosan içeren film numunelerinin antioksidan aktiviteleri, DPPH radikali süpürme aktivitesi, $ABTS^{+}$ radikali süpürme aktivitesi ve metal şelatlama aktivitesi yöntemleri olmak üzere üç farklı yöntem ile belirlenmiştir.

A. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesi

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Ortamda antioksidan aktiviteye sahip bir molekül bulunması halinde DPPH çözeltisinin renginde değişim meydana gelir. Ortamda antioksidan maddenin bulunması durumunda mor renkte bir azalma gerçekleşir ve renk sarıya döner. Bu nedenle absorbans değerinde bir azalma gerçekleşir. Bu durumda ortamda DPPH radikalinin konsantrasyonunun azaldığını gösterir. DPPH radikali giderme aktivitesi sonuçları incelendiğinde, film numunelerinin serbest radikal giderim aktivitesinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Nişasta+Ticari kitosan içeren film numunesi % 14,96 antioksidan aktiviteyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Zamana bağlı olarak antioksidan aktivitede artış meydana geldiği belirlenmiştir. Fungal kitosan katkılı nişasta film numunesinin, fungal kitosan katkılı jelatin film numunesine göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

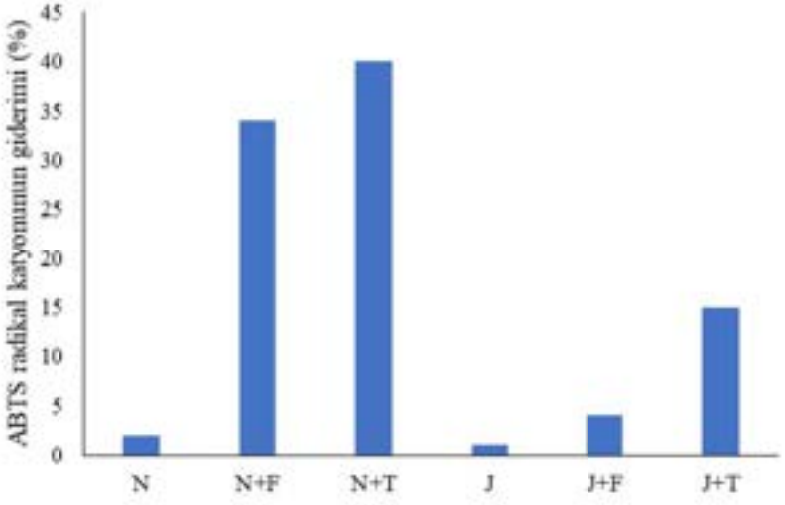
Çizelge 4.11. DPPH radikali süpürme aktivitesi sonuçları

Numune	Aktivite (%)	
	30 dakika	3 saat
N	1,01	4,43
N+F	2,45	7,37
N+T	3,65	14,96
J	2,99	8,05
J+F	1,31	5,73
J+T	3,06	9,29

Akyüz Yılmaz vd. (2021), yenilebilir olmayan bir makrofungus olan *Pisolithus arhizus*' un sporlarını ve kitosan içeren filmlerin eldesini geçekleştirdikleri bir çalışmada, bu filmlerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri %12,66 olarak belirlenmiştir. Farklı oranlarda *Pisolithus arhizus* sporu ilavesinin antioksidan aktiviteyi bir miktar arttırdığı (%14-15) rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise kitosan içeren filmlerin antioksidan aktivitenin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Literatüre göre DPPH yöntemine göre belirlenen antioksidan aktivitelerin genelde düşük çıkması nedeni ile katkılama yapılması gerekmektedir (Küçük ve Yıldırım, 2019).

B. $ABTS^{+}$ Radikali Süpürme Aktivitesi

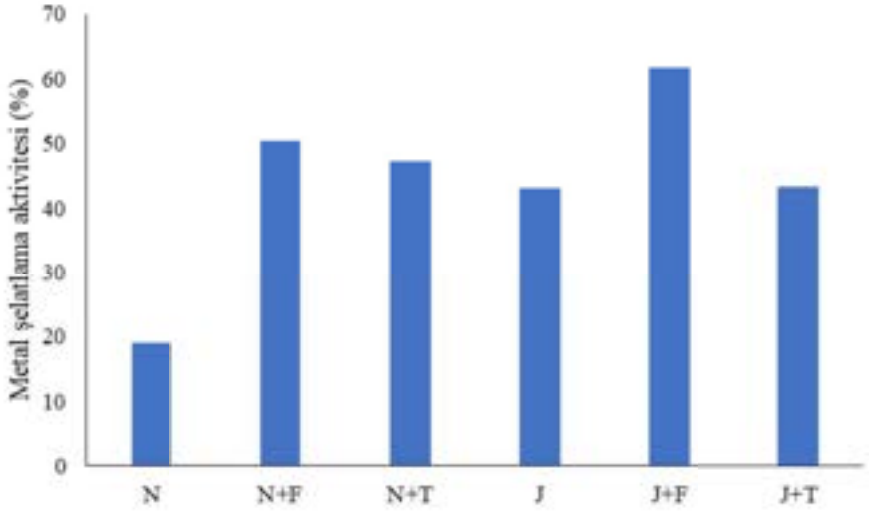
Çalışmada kullanılan kitosan katkılı film numunelerinin $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesini gösteren % inhibisyon-konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.27). Ticari kitosan katkılı film numunelerinin, fungal kitosan katkılı film numunelerine göre daha yüksek $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca nişastalı filmlerin jelatinli filmlere oranla daha yüksek $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.27. Filmlerin $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesi

C. Metal Şelatlama Aktivitesi

Fe^{+2} miktar bakımından ferrozin ile kompleks yapabilir, şelatlayıcı ajanların varlığında oluşan kompleksin yapısı kırılır, kompleksin kırmızı renginde azalma gözlenir. Bu çalışma, şelatla birlikte mevcut olan metal-şelat aktivitesinin değerlendirilmesinde renk azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Filmlerin metal şelatlama aktivitesi

Nişastalı filmde %19, jelatinli filmde %43 aktivite görülmüştür. Bunlara ticari ve fungal kitosan katkılı sonuçları ise sırasıyla, N+T %47,32, J+T %43,2, J+F %61,72, N+F %50,41 metal şelatlama aktivitesi olarak bulunmuştur. Fungal kitosan katkısının ticari kitosana göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kitosanın serbest radikal tutucu özelliğinin deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı ile ilişkili olduğu ve buna göre değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (Bilal ve Keser, 2009). Primer antioksidan etkisi, maddenin fenolik gruplara sahip olarak oksidasyondan önce reaksiyona girmeleri durumudur. Sekonder antioksidan etkisi ise maddenin oksidasyonu katalizleyen metal iyonlarıyla şelat oluşturmaları sonucunda gerçekleşmektedir. Kitosan ağırlıklı olarak sekonder antioksidan etkisi göstermektedir (Agullo vd., 2003). Bu çalışmada en düşük aktivite DPPH radikal süpürücü aktivite iken, en yüksek antioksidan aktivite metal şelatlama yönteminde elde edilmiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumluluk göstermekte olup atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize koşullarda elde edilen fungal kitosan içeren film numuneleri ile ticari kitosan içeren film numunelerinin sekonder antioksidan etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

4.2. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi ve *in vivo* denemesi

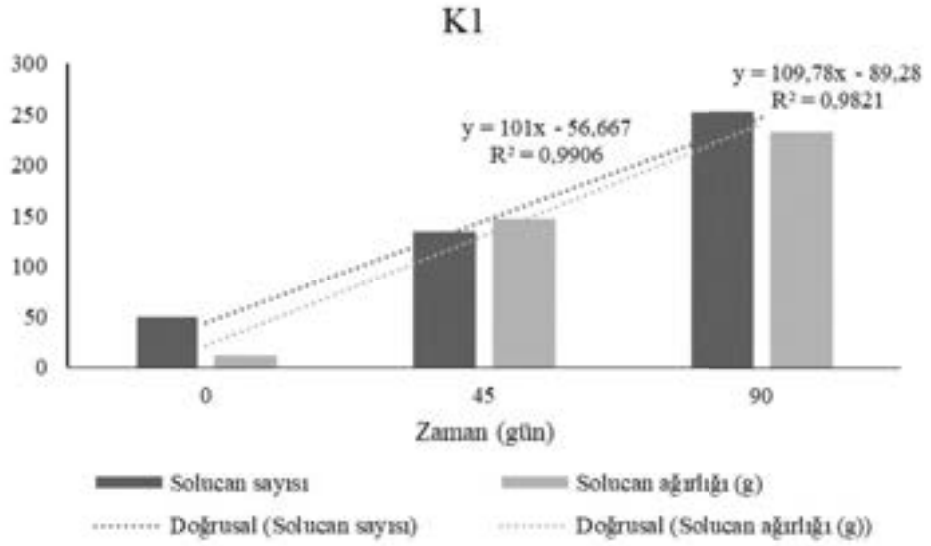
4.2.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden vermikompost üretimi

Vermikompost, tarımsal üretimde sürdürülebilirliği sağlayan ekonomik yöntemlerden biridir. Özellikle katı organik atıkların parçalanması ve geri dönüşümünde önemli çevre sorunlarına çözümler sunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinin vermikompost üretiminde kullanılma potansiyeli üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Eisenia fetida* solucan türü kullanılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile AG-Rivasol® ahır gübresinin farklı oranlarda karıştırılmasıyla 4 farklı solucan maması elde edilmiştir (Şekil 4.29). Tüm karışımların (**K1**: %0FB+%100AG, **K2**: %25FB+%75AG, **K3**: %50FB+%50AG, **K4**: %75FB+%25AG) nem ve sıcaklık gibi diğer tüm koşulları sabit tutulmuştur.

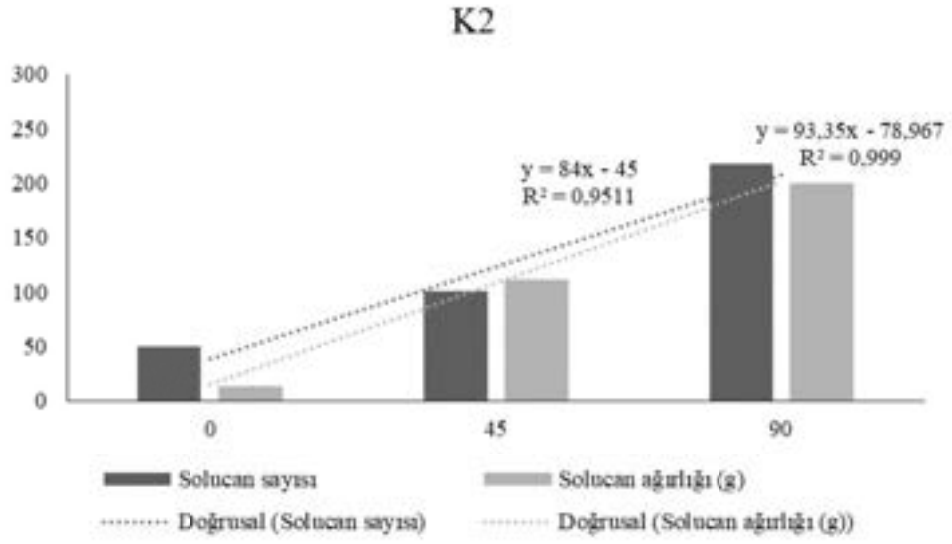


Şekil 4.29. Atık *R. miehei* biyokütlesinin solucan maması olarak kullanımı

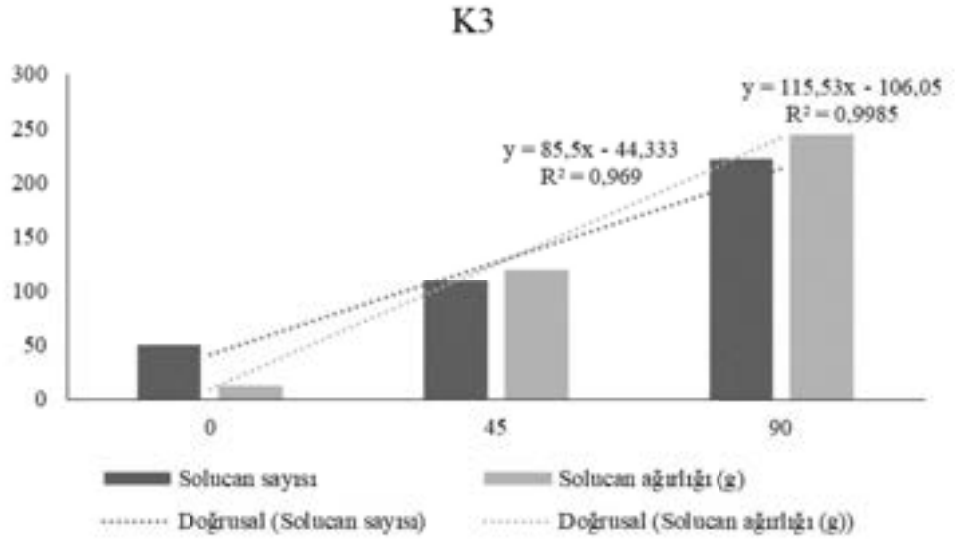
Çalışmanın 0, 45. ve 90. günlerinde olmak üzere 3 farklı zamanda numune alımı yapılarak analizleri yapılmıştır. Sonuçlar, 4 paralelin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Farklı zamanlarda (başlangıç, 45 ve 90. gün) solucan sayısı ve ağırlığında zamana bağlı meydana gelen değişimleri her bir karışım için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33).



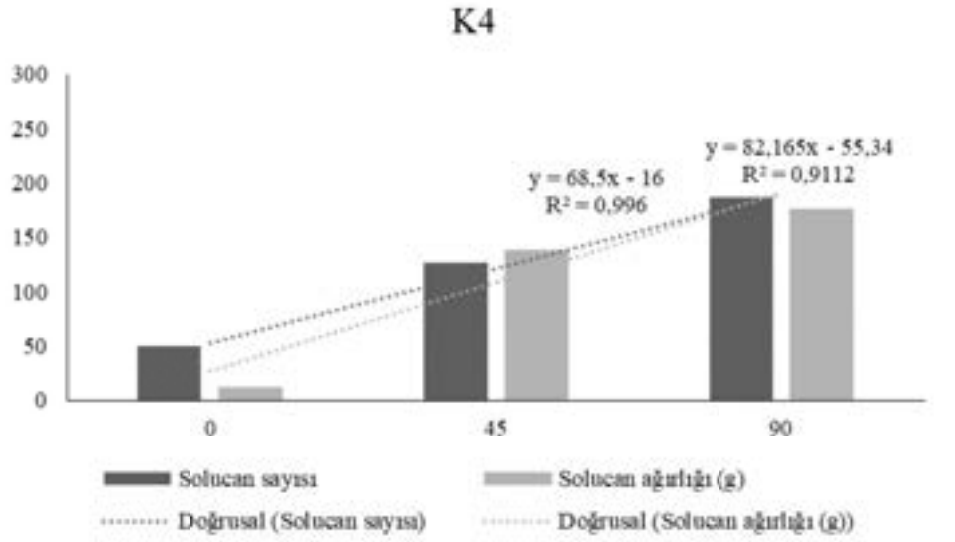
Şekil 4.30. K1 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi (y: solucan sayısı veya ağırlığı, x: gün sayısı)



Şekil 4.31. K2 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi (y: solucan sayısı veya ağırlığı, x: gün sayısı)



Şekil 4.32. K3 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi (y: solucan sayısı veya ağırlığı, x: gün sayısı)

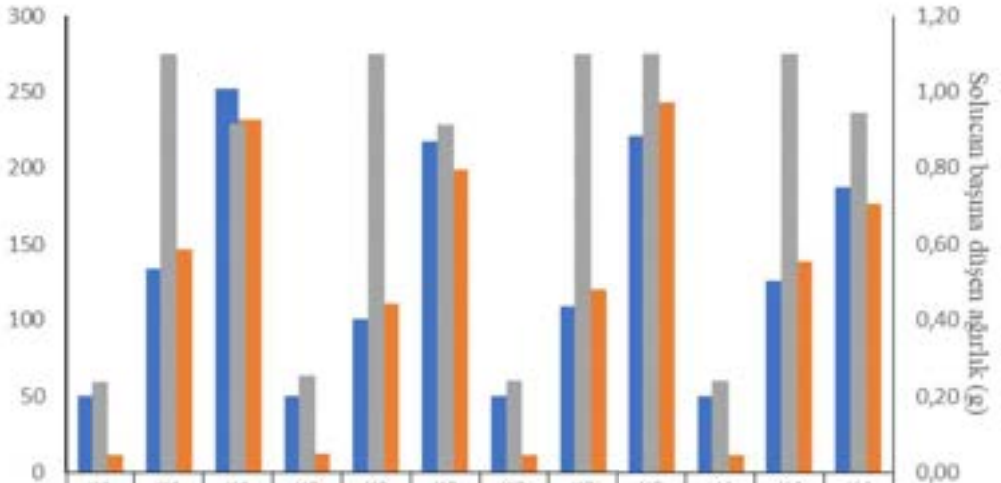


Şekil 4.33. K4 karışımındaki solucan sayısı ve ağırlıklarının zamana bağlı değişimi (y: solucan sayısı veya ağırlığı, x: gün sayısı)

K1 karışımında solucan sayısı (R^2 = 0,99) ve solucan ağırlığı (R^2=0,98) doğrusal artış göstermiştir. K2 ve K3 karışımlarından da solucan ağırlığının (R^2=0,999 ve R^2=0,998) zamana bağlı artan bir doğrusal arttığı belirlenmiştir. Zaman ile solucan sayısı ve ağırlıklarının arttığı görülmüştür. Zamana bağlı solucan ağırlıklarındaki en düşük

değişimin (R^2=0,911) K4 karışımında olduğu belirlenmiştir. K4 karışımında 45. günden sonra solucan sayısına oranla solucan ağırlığındaki artışta bir yavaşlama başladığı görülmüştür. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile AG-Rivasol® ahır gübresinin karışımlarıyla elde edilen karışımlarda solucan sayısı ve ağırlıklarında zamana bağlı herhangi bir azalma görülmemiştir.

Toplam inkübasyon sonrası (90. gün) en yüksek solucan sayısı ve ağırlığı %100 AG-Rivasol® ahır gübresinde (K1) elde edilmiştir. %50 atık *R. miehei* biyokütlesi ile %50 AG-Rivasol® ahır gübresinin karışımıyla (K3) elde edilen vermikompostta ise en yüksek solucan ağırlığına ulaşılmıştır (Şekil 4.32). %75 atık *R. miehei* biyokütlesi içeren vermikompostta (K4) ise 90. günde en düşük solucan sayısı ve ağırlığı tespit edilmiştir. Tüm karışımlarda 90 gün boyunca solucanların ortalama ağırlık artışının devam ettiği belirlenmiştir. Vermikompost denemelerindeki solucan sayılarının da zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.34 incelendiğinde K1, K2 ve K4 karışımlarında 45. günde solucan sayısının, solucan ağırlığına yakınlaştığı, 90. günde ise solucan sayısının, solucan ağırlığını geçtiği görülmektedir. Bu durum solucanların ilk 45 günde hızlı bir şekilde çoğalmaya başladıklarını göstermektedir.



	K1 0	K1 45	K1 90	K2 0	K2 45	K2 90	K3 0	K3 45	K3 90	K4 0	K4 45	K4 90
Solucan sayısı	50	134	252	50	101	218	50	109	221	50	126	187
Solucan ağırlığı (g)	11,94	147,4	231,5	12,7	111,1	199,4	12,04	119,9	243,1	12,02	138,6	176,35
1 adet solucan ağırlığı	0,24	1,10	0,92	0,25	1,10	0,91	0,24	1,10	1,10	0,24	1,10	0,94

Şekil 4.34. Test edilen karışımlardaki solucan sayısı ve ağırlıkları

Vermikompost üretimi için her atık uygun olmayabilir. Bu nedenle atıkların solucan maması olarak kullanım uygunlukları ve karışım oranlarının belirlenmiş olması vermikompost üretimi için oldukça önemlidir (Kayıkçıoğlu, 2016). Doksan günlük inkübasyon sonucunda yüksek solucan ağırlığı elde edilmesi nedeniyle K3 karışımı (%50 atık *R. miehei* biyokütlesi ile %50 AG-Rivasol® ahır gübresinin karışımı) öne çıkmaktadır.

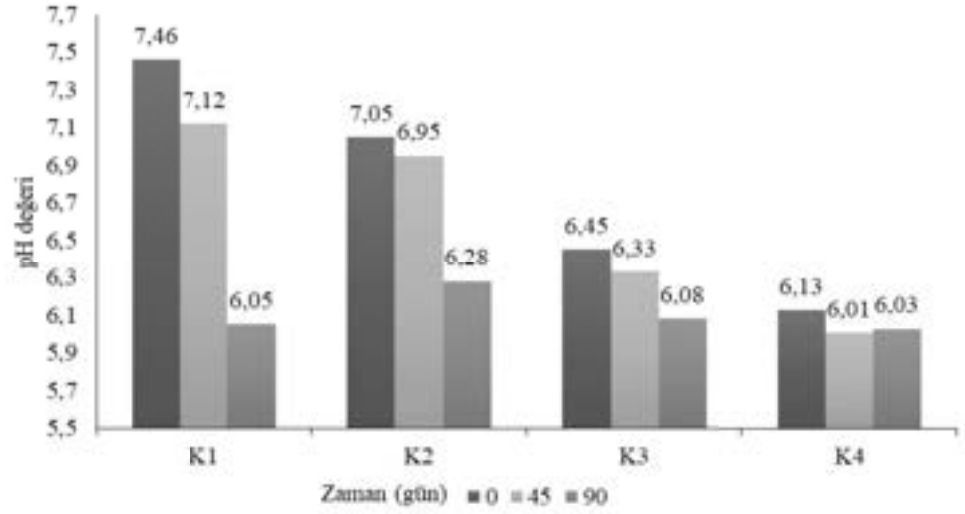
4.2.2. Vermikompost karışımlarının fiziksel ve kimyasal analizleri

Atık *R. miehei* biyokütlesinin ve AG-Rivasol® ahır gübresinin özellikleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Atık *R. miehei* biyokütlesinin ve AG-Rivasol® ahır gübresinin özellikleri

Parametreler	Atık fungal biyokütle	Ahır Gübresi
pH	5,46	7,46
EC (dS m^{-1})	1,49	1,35
Organik madde (%)	47,64	53,74
N (%)	5,30	2,91
K (mg kg^{-1})	1279,36	1410
Mg (mg kg^{-1})	1010,45	570
Ca (mg kg^{-1})	1148,46	4220
Na (mg kg^{-1})	25141,97	720
Mn (mg kg^{-1})	40,54	216,65
Fe (mg kg^{-1})	97,18	350
Cu (mg kg^{-1})	9,59	118,37
Zn (mg kg^{-1})	60,59	193,24

Atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin %0, 25, 50 ve 75 karışımlarından elde edilen vermikompostların 0., 45. ve 90. günde alınan örneklerinde de pH, EC, organik madde, N, P, K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Cd, Hg, Pb, K_2O, P_2O_5, CaO, MgO içerikleri belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak atık *R. miehei* biyokütlesinin ve AG-Rivasol® ahır gübresinin belirli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen vermikompostların bazı fiziksel özellikleri ve besin içeriklerindeki değişim incelenmiştir. Vermikompostların pH değeri, bitki gelişimini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Elde edilen vermikompostların zamana bağlı pH değişimleri Şekil 4.35'de verilmiştir.

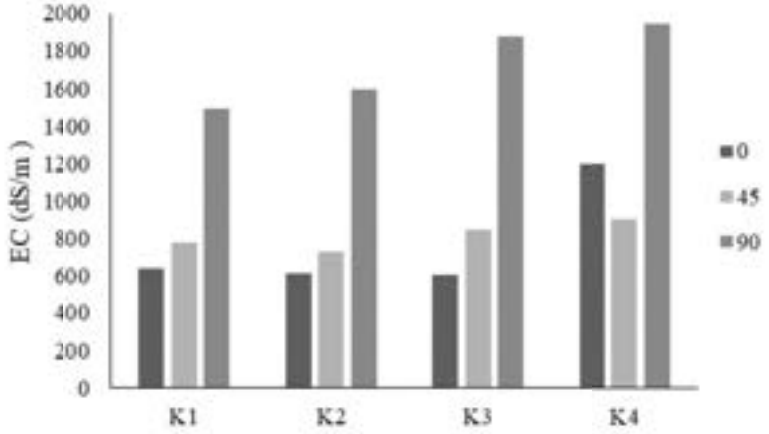


Şekil 4.35. Vermikompost karışımlarının zamana bağlı pH değişimi

En yüksek pH değerleri K1 karışımından (%100AG) elde edilen vermikompostta belirlenirken, en düşük pH değişimi K4 karışımından (%75FB+25AG) elde edilen vermikompostta tespit edilmiştir. AG-Rivasol® ahır gübresinin pH değeri 7,46 iken atık *R. miehei* biyokütlesinin pH değeri 5,46 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.12). Elde edilen vermikompostların karışımlarındaki atık *R. miehei* biyokütle miktarı arttıkça pH değeri azalmıştır (Şekil 4.35). Bu atık *R. miehei* biyokütlesinin pH değerinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı şekilde zamana bağlı olarak da pH değerleri düşmüştür. Atık *R. miehei* biyokütlesi içeren K2, K3 ve K4 denemelerinde ise 45. güne kadar belirgin bir pH değişimi olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.35). Vermikompostta istenilen optimal pH değeri aralığı 6-8 olarak bildirilmiştir (Erşahin, 2007). Belirlenen pH değerleri solucanların yaşayabileceği optimal aralıkta bulunmuştur.

EC değeri de pH gibi solucanların yaşamasını ve bitki gelişimini etkileyen önemli faktörlerden biridir. AG-Rivasol® ahır gübresinin EC değeri 1,35 dS m^{-1} iken, atık *R. miehei* biyokütlesinin EC değeri 1,49 dS m^{-1} olarak bulunmuştur. Elde edilen vermikompost karışımlarının EC değeri değişimleri Şekil 4.37'de verilmiştir. Başlangıçta AG-Rivasol® ahır gübresine %50 oranına kadar atık *R. miehei* biyokütlesi karıştırılması EC değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmazken, %75 oranında karıştırılması sonucu EC değerinde önemli bir artış meydana gelmiştir. 90. güne ait EC değerleri incelendiğinde; karışımdaki atık *R. miehei* biyokütlesi arttıkça EC değerlerinin de arttığı

tespit edilmiştir. En yüksek EC değeri, K4 karışımında 90. günde elde edilmiştir (Şekil 4.36). Vermikompost oluşumu süresince EC değerlerinin artması; organik maddenin azalması ve çözünür formda fosfor, potasyum, amonyum gibi minerallerin üretiminden kaynaklanabilmektedir. EC değerinin 0,60 ile 4 dS m^{-1} aralıklarında olması birçok bitki için ideal koşuldur (Deliboran ve Savran, 2015). Elde edilen sonuçlara göre test edilen tüm denemelerin EC değerleri, EC 0-2 dS m^{-1} aralığındadır. Bu durum karışımların EC değerleri açısından da vermikompost üretiminde kullanımlarının uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.36. Atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin farklı oranlarda karışımlarından elde edilen vermikompostların zamana göre EC değerlerine ait değişimler

Değişen miktarda atık fungal biyokütle ilave edilerek hazırlanan denemeler arasında istatistiksel fark bulunmaz iken, örnekleme zamanı ve örnekleme zamanı x deneme interaksiyonları bakımından istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (Çizelge 4.13). Atık *R. miehei* biyokütlesinin yüksek azot içeriğine (%5,30) sahip olduğu belirlenmiştir. AG-Rivasol® ahır gübresinin azot içeriği ise %2,91'dir. Karışımların azot miktarının ise %2,65-2,91 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte atık *R. miehei* biyokütlesinin karbon değeri %47,64, AG-Rivasol® ahır gübresinin ise %53,74 olarak birbirine yakın bulunmuştur. Atık *R. miehei* biyokütlesinin C/N oranı 8,89 iken AG-Rivasol® ahır gübresinin C/N oranı 18,46 olarak bulunmuştur. Vermikompostun C/N oranı 20'den az olması beklenmektedir (Borah vd., 2007).

Çizelge 4.13. Atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin farklı oranlarda karışımlarından elde edilen vermikompostların N, K, P, Mg, Na, Ca ve Fe içerikleri

	N (%)	K (%)	P (%)	Mg (%)	Na (%)	Ca (%)	Fe (%)
0. gün (0G)	2,89a	1,44	0,15a	0,59	0,79a	4,59	0,37a
45. gün (45G)	2,64b	1,46	0,15a	0,60	0,64b	4,31	0,33a
90. gün (90G)	2,74b	1,34	0,10b	0,62	0,47c	4,00	0,26b
0FB+100AG (K1)	2,91a	1,41	0,13	0,57	0,72a	4,22b	0,35a
25FB+75AG (K2)	2,75b	1,35	0,14	0,59	0,60b	3,93b	0,291b
50FB+50AG (K3)	2,70b	1,41	0,14	0,61	0,61b	4.15b	0,31ab
75 FB+25AG (K4)	2,65b	1,48	0,13	0,63	0,59b	4.90a	0,35a
0GxK1	3,00a	1,39	0,15ab	0,59abc	0,83a	4,24	0,36ab
0GxK2	2,94ab	1,43	0,14abc	0,58abc	0,79a	4,09	0,36ab
0GxK3	2,82bc	1,46	0,14abc	0,60abc	0,79a	4,46	0,36ab
0GxK4	2,77c	1,48	0,15ab	0,60abc	0,74ab	5,56	0,41a
45GxK1	2,95ab	1,58	0,15ab	0,62ab	0,74ab	4,58	0,37ab
45GxK2	2,59de	1,27	0,16ab	0,55bc	0,60cd	3,82	0,27c
45GxK3	2,56de	1,42	0,17a	0,61ab	0,55de	4,09	0,30bc
45GxK4	2,46e	1,55	0,14abc	0,62ab	0,66bc	4,75	0,40a
90GxK1	2,79bc	1,25	0,08e	0,51c	0,59cde	3,85	0,30bc
90GxK2	2,72cd	1,34	0,11cd	0,65a	0,40fg	3,87	0,24c
90GxK3	2,72cd	1,35	0,13bcd	0,62ab	0,49ef	3,89	0,26c
90GxK4	2,71cd	1,41	0,10de	0,68a	0,38g	4,38	0,24c
Gün (G)	**	öd	**	öd	**	öd	**
Karışımlar (K)	**	öd	öd	öd	**	*	*
G x K	*	öd	*	*	*	öd	*

FB: Fungal biyokütle. AG: Ahır gübresi. öd: önemli değil. *: $p<0.05$. **: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Zamana bağlı C/N oranı değişimleri Çizelge 4.14'de verilmiştir. K1 uygulaması, K2, K3 ve K4 uygulamalarından farklı bir C/N oranı değişimi göstermiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesi içeren uygulamalarda 45. güne kadar artan C/N oranı, 45. günden sonra azalma göstermiştir. K1 uygulamasında ise bu durumun tam tersinin gerçekleştiği görülmüştür. 90 gün inkübasyon sonrası en yüksek C/N oranı K1 denemesinde, en düşük C/N oranı K4 denemesinde elde edilmiştir. Tarımda Kullanılan Organik Mineral ve Mikrobiyal Kaynaklı Gübrelere Dair Yönetmeliği'ne (2018) göre, katı vermikompostlarda C/N oranı 8-22 arasında olmalıdır. Bu durum elde edilen vermikompostların C/N oranı açısından yayınlanan yönetmeliğe uygun olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.14. Elde edilen vermikompostların zamana bağlı C/N oranları

Gün	K1	K2	K3	K4
0	17,91	17,14	17,62	16,42
45	16,86	18,68	18,23	17,26
90	17,33	16,21	16,53	14,88

Vermikompostların içeriğinde potasyum, fosfor ve azot gibi makro elementlerin bulunması önemlidir. Çünkü bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi desteklerler. K2 ve K3 vermikompostlarının fosfor (P) içeriğinin 45. günde 0. güne göre yükseldiği tespit edilmiştir. Ancak tüm vermikompostlarda, 90. gün örneklerin P miktarı, 0 ve 45. gün örneklerinin P miktarına göre istatistiksel olarak çok önemli düzeyde azalmıştır. Örnekleme zamanı x deneme interaksiyonları bakımından incelendiğinde en yüksek P miktarı %0.17 ile 45GxK3 denemesinden, en düşük ise %0.08 ile 90GxK1 vermikompostundan elde edilmiştir (Çizelge 4.15). 90 gün inkübasyondan sonra en yüksek P miktarı (%0,13) ise K3 vermikompostundan elde edilmiştir. Potasyum (K) içeriği bakımından ise ahır gübresine atık fungal biyokütle ilavesinin K miktarında bir miktar artış meydana getirdiği görülmüştür. 90 gün inkübasyon sonrasında en yüksek K miktarı (% 1,41) K4 vermikompostunda, en düşük K miktarı (%1,25) ise K1 vermikompostunda elde edilmiştir. K3 vermikompostunda ise zamana bağlı K miktarında azalma meydana gelmiştir. Magnezyum içeriği bakımından test edilen vermikompostlar incelendiğinde ahır gübresine atık fungal biyokütle ilavesinin önemli bir değişiklik meydana getirmediği görülmüştür. Bununla birlikte genel olarak K1, K2, K3 ve K4 vermikompostunda zamana bağlı Mg miktarında artış meydana gelmiştir. 90 gün inkübasyon sonucunda en yüksek Mg miktarı %68 ile K4 vermikompostundan, en düşük Mg miktarı %0,51 ile K1 vermikompostundan elde edilmiştir.

Çizelge 4.15. Atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin farklı oranlarda karışımlarından elde edilen vermikompostların K_2O, P_2O_5, CaO ve MgO içerikleri

	K_2O (%)	P_2O_5 (%)	CaO (%)	MgO (%)
0. gün (0G)	1,73	0,34a	6,42a	0,04
45. gün (45G)	1,75	0,35a	6,03ab	0,04
90. gün (90G)	1,61	0,24b	5,59b	0,03
0FB+100AG (K1)	1,69	0,29	5,91b	0,04
25FB+75AG (K2)	1,62	0,32	5,50b	0,03
50FB+50AG (K3)	1,70	0,33	5,80b	0,03
75 FB+25AG (K4)	1,78	0,30	6,85a	0,04
0GxK1	1,67	0,34ab	5,94	0,04
0GxK2	1,72	0,33abc	5,73	0,03
0GxK3	1,76	0,33abc	6,25	0,04
0GxK4	1,78	0,36ab	7,78	0,04
45GxK1	1,90	0,35ab	6,41	0,04
45GxK2	1,53	0,36ab	5,35	0,03
45GxK3	1,72	0,38a	5,72	0,03
45GxK4	1,86	0,33abc	6,66	0,04
90GxK1	1,50	0,17e	5,39	0,04
90GxK2	1,61	0,26cd	5,42	0,03
90GxK3	1,63	0,29bcd	5,44	0,03
90GxK4	1,70	0,24de	6,13	0,03
Gün (G)	öd	**	*	öd
Karışımlar (K)	öd	öd	*	öd
G x K	öd	*	öd	öd

FB: Fungal biyokütle. AG: Ahır gübresi. öd: önemli değil. *: $p<0.05$. **: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Sodyum (Na) miktarı açısından, ahır gübresine atık fungal biyokütle ilavesinin Na miktarında bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Başlangıçta %0,83 ile en yüksek Na miktarına sahip olan K1vermikompostunun, 90. gün Na miktarı %0,59' a düşmüştür. Genel olarak tüm vermikompostlarda zamana bağlı Na miktarında azalma meydana gelmiştir. 90 gün inkübasyon sonunda en yüksek Na miktarı (%59) ile K1 vermikompostunda elde edilmiştir. Bunu %49 Na miktarı ile K3 vermikompostu takip etmiştir. En düşük Na miktarı ise K4 vermikompostundan elde edilmiştir. Test edilen vermikompostların kalsiyum (Ca) miktarları karşılaştırıldığında zamana bağlı bir azalma meydana gelmiştir. En yüksek Ca miktarı (%4,38) K4 vermikompostundan, en düşük Ca miktarı (%3,85) K1 vermikompostundan elde edilmiştir. Demir (Fe) miktarı açısından değerlendirildiğinde en yüksek Fe miktarı K1 vermikompostundan elde edilmiştir.

Çizelge 4.16. Atık *R. miehei* biyokütlesi ve ahır gübresinin farklı oranlarda karışımlarından elde edilen vermikompostların Mn, Cu, Zn, As, Cd, Hg ve Pb içerikleri

	Mn (mg kg^{-1})	**Cu** (mg kg^{-1})	**Zn** (mg kg^{-1})	**As** (µg kg^{-1})	**Cd** (µg kg^{-1})	**Hg** (µg kg^{-1})	**Pb** (µg kg^{-1})
0 gün (0G)	212,84a	124,48a	201,80a	1674,43	160,54	12,52	2665,60a
45. gün (45G)	205,48ab	111,03b	184,93a	1595,08	152,97	11,17	2640,08a
90. gün (90G)	172,93b	68,49c	152,05b	1712,29	150,92	11,19	2170,59b
0FB+100AG (K1)	216,65	118,37a	193,24a	1512,85	155,88	11,78	2757,38
25FB+75AG (K2)	178,34	89,37b	166,52b	1612,86	146,06	11,59	2291,19
50FB+50AG (K3)	191,55	96,64b	177,73ab	1640,42	151,66	11,73	2333,57
75FB+25AG (K4)	201,81	100,95b	180,88ab	1876,27	165,64	11,38	2586,21
0GxK1	210,43	123,99a	212,47	1580,95	165,01	13,71	2766,07
0GxK2	202,59	126,03a	197,81	1469,56	150,83	12,67	2530,15
0GxK3	220,26	126,65a	205,65	1572,76	159,62	12,44	2609,71
0GxK4	218,09	121,24a	191,26	2074,44	166,69	11,23	2756,46
45GxK1	230,55	133,62a	203,91	1572,92	163,37	11,51	3201,71
45GxK2	171,65	89,09bc	161,44	1497,27	139,12	10,13	2219,05
45GxK3	190,87	93,44b	170,44	1651,51	146,46	10,96	2296,41
45GxK4	228,87	127,96a	203,93	1658,61	162,93	12,06	2843,15
90GxK1	208,96	97,50b	163,34	1384,67	139,26	10,12	2304,36
90GxK2	160,79	52,99d	140,32	1871,75	148,23	11,98	2124,39
90GxK3	163,51	69,84cd	157,09	1696,98	148,89	11,80	2094,60
90GxK4	158,46	53,64d	147,44	1895,74	167,30	10,86	2159,02
Gün (G)	**	**	**	öd	öd	öd	**
Karışımlar (K)	öd	**	*	öd	öd	öd	öd
G x K	öd	**	öd	öd	öd	öd	öd

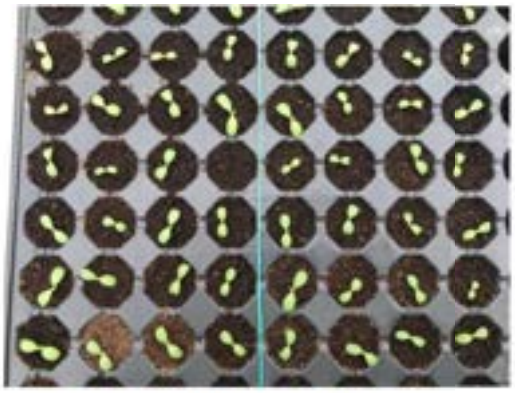
FB: Fungal biyokütle. AG: Ahır gübresi. öd: önemli değil. *: $p<0.05$. **: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Mg ve As dışındaki diğer mineral içeriklerinin günlere göre azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.16). 90 gün inkübasyon sonunda en yüksek Mn (208,96 mg kg^{-1}), Cu (97,5 mg kg^{-1}), Zn (163,34 mg kg^{-1}), Pb (2304,36 µg kg^{-1}) miktarı K1 vermikompostunda tespit edilmiştir. Tarımda Kullanılan Organik Mineral ve Mikrobiyal Kaynaklı Gübrelere Dair Yönetmeliği'ne (2018) göre, katı vermikompostlarda kadmiyum (Cd) 3 mg kg^{-1}, bakır (Cu) 450 mg kg^{-1}, kurşun (Pb) 150 mg kg^{-1}, çinko (Zn) 1100 mg kg^{-1}, civa (Hg) 5 mg kg^{-1} değerini geçmemelidir. Bu durum değerlendirildiğinde K1, K2, K3 ve K4 vermikompostlarının yönetmeliğe uygun olduğu görülmektedir. Solucan sayısı ve ağırlığı, pH, EC, makro ve mikro elementleri içeriği bakımından K1 ve K3 vermikompostları, diğer vermikompostlara göre başarılı bulunmuştur. Yapılan vermikompostların analizleri sonucu elde edilen verilere göre 90 gün inkübasyonu sonucu tüm vermikompostların (K1, K2, K3

ve K4) Tarımda Kullanılan Organik Mineral ve Mikrobiyal Kaynaklı Gübrelere Dair Yönetmeliği'ne (2018) uygun olduğu tespit edilmiştir.

4.2.3. Vermikompostun sera koşullarında *in vivo* denemesi

Bu aşamada farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresi karışımlarından elde edilen vermikompostların (K1, K2, K3 ve K4), bitki gelişimine nasıl etki edeceğini belirlemek amacıyla marul fidesi üretiminde yetiştirme ortamı olarak kullanım durumu incelenmiştir (Şekil 4.37). Bu amaçla elde edilen 4 farklı vermikompostun torfa %0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 oranlarında ilavesi ile marul fidesi yetiştirme ortamları hazırlanmıştır. Denemeler, 03.04.2022 tarihinde başlatılmış olup 35 gün sonra fideler sökülmüştür. Marul fidelerinde kalite ve verimi belirlemek için çeşitli ölçümler yapılmış ve bunların ortalamaları alınmıştır.



Şekil 4.37. Yetiştirme ortamlarında büyüyen marul fideleri

Hazırlanan yetiştirme ortamlarının pH ve EC değerleri sırasıyla Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'de verilmiştir. pH aralığı marul fidelerinin gelişimi üzerine olumsuz etki oluşturulacak bir aralıkta değildir. Ancak vermikompostların karışımdaki oranı arttıkça EC değerlerinin yükseldiği tespit edilmiştir. %100 ortamlarda ve karışımlarda %40, 50 ve 75 oranında torfa ilave edilerek hazırlanan ortamların EC değerleri çok yüksek bulunmuştur. EC değerlerinin 2 dS m^{-1} ve üzeri olduğu ortamlarda fide gelişiminin azaldığı belirlenmiştir. Yüksek EC (tuzluluk), fide gelişimi için istenmeyen bir koşuldur. Farklı oranlarda bira fabrikası atıklarının kullanıldığı bir çalışmada, bu atıkların toprağın EC değerini arttırdığı bildirilmiştir (Kütük vd., 2003). Aydınşakir vd. (2011) tarafından yapılan

bir başka çalışmada da kentsel katı atık kompostlarının uygulanmasının EC değerini arttırdığı belirtilmiştir.

Çizelge 4.17. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının pH değerleri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	6,46a-e**	6,46a-e	6,38c-g	6,53abc	6,46a**
10	6,32d-i	6,46a-e	6,40c-g	6,27e-i	6,36b
20	6,31d-i	6,43b-f	6,33d-i	6,31d-i	6,35b
30	6,32d-i	6,49a-d	6,43b-f	6,34c-h	6,39ab
40	6,22ghi	6,45b-e	6,36c-h	6,37c-g	6,35b
50	6,25f-i	6,48a-d	6,42b-f	6,41b-g	6,39ab
75	6,17hi	6,50a-d	6,48a-d	6,48a-d	6,41ab
100	6,13i	6,59ab	6,64a	6,47a-d	6,46a
Ortalama	6,27c**	6,48a	6,43b	6,40b	

**: p<0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.18. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının EC değerleri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	0,52k**	0,56k	0,53k	0,57jk	0,55f**
10	1,44f-k	1,20g-k	0,97h-k	1,20g-k	1,20e
20	1,64e-j	1,26f-k	0,80ijk	1,33f-k	1,26e
30	1,90d-h	2,03d-h	1,86d-i	2,11d-g	1,97d
40	2,57cde	2,12d-g	1,91d-h	2,70cde	2,33d
50	2,89cd	2,78cd	2,31c-f	3,34bc	2,83c
75	5,31a	5,65a	3,34bc	4,21b	4,63b
100	6,37a	6,33a	4,21b	5,58a	5,62a
Ortalama	2,83a**	2,74a	1,99b	2,63a	

**: p<0.01 düzeyinde önemli

Viyollere ekilen marul tohumlarından ilk tohum çimlenmesi 5 gün içinde görülmüştür. İlk tohum çıkışı, K1 vermikompostunun torfla %10 oranında karıştırılması ile elde edilen yetiştirme ortamında gerçekleşmiştir. Çizelge 4.19'de hazırlanan yetiştirme ortamlarına ekilen marul tohumlarının çıkış oranları verilmiştir. En yüksek tohum çıkış oranı, K1 vermikompostunun %20 oranında torf ile karıştırılması sonucu hazırlanan yetiştirme ortamından elde edilmiştir.

Çizelge 4.19. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının tohum çıkış oranı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	96,88a-d**	95,83a-e	95,83a-e	97,92abc	96,62ab**
10	98,96ab	96,88a-d	98,96ab	95,83a-e	97,66a
20	100,00a	96,88a-d	84,38c-g	87,50c-f	92,19abc
30	68,75f-i	98,96ab	90,63b-f	98,96ab	89,32bc
40	78,13e-h	96,88a-d	95,83a-e	72,92f-i	85,94c
50	43,75ijk	83,33d-g	90,63b-f	90,63b-f	77,08d
75	46,88ijk	59,38g-j	50,00h-k	59,38g-j	53,91e
100	19,79k	30,21jk	26,04jk	23,96jk	25,00f
Ortalama	69,14b**	82,29a	79,04a	78,39a	

**: $p<0.01$ düzeyinde önemli

K1 vermikompostunun torf ile karıştırılma oranı arttıkça tohum çıkış oranının azaldığı görülmüştür. K2 vermikompostunun %10, 20, 30 ve 40 oranlarında tohum çıkış oranı %96-98 aralığında iken, %40'ın üzerindeki oranlarda tohum çıkış oranı azalmıştır. K3 ve K4 vermikompostlarının %50 oranı içeren yetiştirme ortamlarında marul tohumu çıkış oranın ciddi derecede azaldığı tespit edilmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların %30 oranlarına kadar torf ile karıştırılması ile yüksek tohum çıkış oranlarına ulaşılmıştır. En düşük tohum çıkış oranları %75 ortamında elde edilmiştir.

Tohum çıkış oranı dışında, fide boyu, yaprak sayısı, klorofil miktarı, toprak üstü yaş ağırlığı, toprak üstü kuru ağırlığı, kök yaş ağırlık, kök kuru ağırlık ve renk değerleri belirlenmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marul fide boyu

ölçüm sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir. En yüksek fide boyuna (7,18 cm) %10 oranında K1 vermikompostunun kullanıldığı yetiştirme ortamında elde edilmiştir. K2 ve K3 denemelerinin %20 oranı üzerinde kullanıldığı yetiştirme ortamlarında fide boylarında önemli bir azalma meydana gelmiştir. En düşük fide boyları (3,08-3,62 cm), tüm vermikompostların %75 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamlarında görülmüştür.

Çizelge 4.20. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fide boyu üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	7,02a**	6,704ab	6,33abc	6,53abc	6,65ab**
10	7,18a	6,48abc	6,97a	7,03a	6,92a
20	5,43bcd	6,08abc	6,27abc	6,72ab	6,13b
30	4,23def	5,27cd	5,25cd	6,23abc	5,25c
40	3,80efg	3,32efg	3,73efg	4,68de	3,88d
50	2,75g	3,70efg	3,83e	4,07d-g	3,59d
75	3,62efg	3,48efg	3,08fg	3,48efg	3,42d
Ortalama	4,86b**	5,00b	5,07b	5,54a	

**: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Morfolojik özellikleri arasında, marulun yaprak özellikleri en önemli parametrelerden biridir. Özellikle marulun yaprak sayısının çok olması pazarlanabilirliğini kolaylaştırmaktadır. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marul yaprak sayısı ölçüm sonuçları Çizelge 4.21'de verilmiştir. Tüm vermikompostların %20 ve üzeri oranında kullanıldığı yetiştirme ortamlarında marul yaprak sayısında azalma meydana gelmiştir. K2 ve K3 vermikompostlarının % 10 oranı üzerinde kullanıldığı yetiştirme ortamlarında marulun yaprak sayılarında artma meydana gelmiştir. En yüksek yaprak sayısı K1 vermikompostunun %10 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamında görülmüştür. En düşük yaprak sayısı ise K1 vermikompostunun %50 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamında elde edilmiştir. Tüm vermikompostların %10 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamlarında marul sayısı, diğer kullanılan oranlara göre en yüksektir. Marul yaprak sayısı açısından vermikompost uygulamalarının etkisi istatistiki

açıdan anlamlı bulunmamıştır. Vermikompost karışımlarının marul yetiştirme ortamlarında kullanılma oranının, yaprak sayısında negatif etkisi olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.21. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin yaprak sayısı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	4,83a*	4,33a-d	4,50abc	4,67ab	4,58a**
10	4,83a	4,67ab	4,67ab	4,17a-e	4,58a
20	3,83a-g	4,17a-e	4,17a-e	4,50abc	4,17ab
30	3,33a-h	4,00a-f	4,00a-f	4,17a-e	3,88b
40	2,83fgh	2,67gh	3,00e-h	3,50b-h	3,00c
50	2,33h	2,83fgh	2,83fgh	3,00e-h	2,75c
75	3,00e-h	2,67gh	2,50h	3,17d-h	2,83c
Ortalama	3,57b*	3,62ab	3,67ab	3,88a	

*: $p<0.05$ düzeyinde önemli, **: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Marulda yaprakların sayısı kadar yaprakların rengi ve içerdikleri klorofil miktarı da kaliteyi etkileyen önemli unsurlardır. Atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marulların klorofil indeks ölçüm sonuçları Çizelge 4.22'de verilmiştir. Marulda farklı oranlarda kullanılan vermikompost karışımlarının kullanılma oranlarının klorofil indeks miktarlarına etkisi önemsiz bulunmuştur. En yüksek klorofil miktarı K3 vermikompostunun %20 ve 40 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamlarında elde edilmiştir. En düşük klorofil indeks miktarı (6,35) K3 vermikompostunun %10 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamında tespit edilmiştir. Uğur vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, kıvırcık marul çeşitlerinde azot katkısının artması ile yaprak özellikleri, klorofil indeks miktarı (10.81) ve verimde artış olduğu rapor edilmiştir. Marulda farklı dozlarda yapılan bor uygulamalarında doz miktarının arttıkça klorofil indeks miktarlarında (en düşük 5,60) azalma görülmüştür (Özdemir, 2019). Klorofil miktarı, marulun çeşidine ve ekim zamanına göre değişmektedir. Erken ve geç ekimlerde klorofil miktarının düştüğü Tsiakaras vd. (2014) tarafından bildirilmiştir. Çalışmanın yapıldığı bölgedeki güneşlenme süresinin azlığı bu çalışmada da düşük klorofil miktarının elde edilmesine neden olmuş

olabilir. Bu çalışmada yüksek klorofil değeri açısından K3 vermikompostunun %20 oranında kullanıldığı yetiştirme ortamı öne çıkmaktadır. Atık R. miehei biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marullarda incelenen diğer kalite parametrelerinden toprak üstü ve kök ağırlıklarıdır. Bu çalışmada marulların hem yaş ağırlıkları hem de kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Çizelge 4.22. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesi yapraklarındaki klorofil miktarı (CCI) üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	10,30öd	10,45	10,65	8,13	9,88a*
10	8,98	9,48	6,35	7,38	8,05b
20	8,87	9,07	10,35	9,00	9,32ab
30	7,77	9,15	7,85	8,23	8,25ab
40	8,18	8,10	10,30	9,53	9,03ab
50	7,52	8,45	9,28	9,33	8,65ab
75	8,42	7,83	8,42	9,07	8,44ab
Ortalama	8,58öd	8,93	9,03	8,67	

öd: önemli değil, *: p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.23. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin toprak üstü yaş ağırlığı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	1,51ab**	1,28abc	1,18a-d	1,27abc	1,31a**
10	1,61a	1,27abc	1,20a-d	1,21a-d	1,32a
20	0,67d-g	0,94b-e	1,09a-d	1,11a-d	0,95b
30	0,37efg	0,62d-g	0,71c-g	0,91c-f	0,65c
40	0,28g	0,26g	0,33fg	0,42efg	0,32d
50	0,17g	0,30g	0,28g	0,35efg	0,27d
75	0,32fg	0,29g	0,21g	0,31fg	0,28d
Ortalama	0,71öd	0,71	0,71	0,79	

öd: önemli değil, **: p<0.01 düzeyinde önemli

Toprak üstü yaş ağırlık ve kuru ağırlık ölçüm sonuçları sırasıyla Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'de verilmiştir. Vermikompostların kullanılma oranı arttıkça marulların toprak üstü yaş ağırlıkları ve toprak üstü kuru ağırlıkları azalmıştır. En yüksek toprak üstü yaş ağırlığı (1.61 g) ve toprak üstü kuru ağırlığı (0,07 g) ile K1 vermikompostunun %10 kullanım oranında ulaşılmıştır. En düşük toprak üstü yaş ağırlığı (0,17 g) ve toprak üstü kuru ağırlığı (0,01 g) ile K1 vermikompostunun %10 kullanım oranında elde edilmiştir.

Çizelge 4.24. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin toprak üstü kuru ağırlığı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	0,07öd	0,06	0,06	0,06	0,06±0,01a**
10	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07±0,01a
20	0,05	0,06	0,07	0,07	0,06±0,01a
30	0,08	0,04	0,05	0,05	006±0,06a
40	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03±0,00b
50	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02±0,00b
75	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02±0,00b
Ortalama	0,05öd	0,04	0,04	0,05	

öd: önemli değil, **: $p<0.01$ düzeyinde önemli

Atık R. miehei biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marulların kök yaş ağırlık ve kuru ağırlık ölçüm sonuçları sırasıyla Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.25. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin kök yaş ağırlığı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	0,45öd	0,40	0,38	0,39	0,41a**
10	0,41	0,28	0,40	0,30	0,35ab
20	0,24	0,23	0,36	0,27	0,27b
30	0,16	0,17	0,19	0,23	0,19c
40	0,12	0,13	0,14	0,15	0,14c
50	0,12	0,14	0,10	0,14	0,12c
75	0,18	0,15	0,14	0,16	0,15c
Ortalama	0,24öd	0,21	0,24	0,23	

öd: önemli değil, **: p<0.01 düzeyinde önemli

En yüksek kök yaş ağırlığı (0,41 g) ve toprak üstü kuru ağırlığı (0,070 g) ile K1 vermikompostunun %10 kullanım oranında ulaşılmıştır. En düşük kök yaş ağırlığı (0,10 g) ve kök kuru ağırlığı (0,052 g) ile sırasıyla K3 vermikompostunun %50 ve K1 vermikompostunun %50 kullanım oranında elde edilmiştir.

Çizelge 4.26. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin kök kuru ağırlığı üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	0,072öd	0,071	0,070	0,068	0,070a**
10	0,070	0,066	0,061	0,059	0,064ab
20	0,064	0,060	0,062	0,065	0,062ab
30	0,058	0,055	0,059	0,059	0,058b
40	0,056	0,059	0,056	0,056	0,057b
50	0,052	0,057	0,054	0,068	0,058b
75	0,057	0,072	0,058	0,057	0,061ab
Ortalama	0,061öd	0,063	0,060	0,062	

öd: önemli değil, **: p<0.01 düzeyinde önemli

Atık *R. miehei* biyokütlesi ile elde edilen vermikompostların farklı oranlarda torf ile karıştırılması sonucu elde edilen yetiştirme ortamlarında gelişen marulların yeşil rengi (a*) ve sarı rengi (b*) ve parlaklığı veren L* renk parametreleri incelenmiştir. Renk ölçüm sonuçları (L*, a*, b*) sırasıyla Çizelge 4.27, Çizelge 4.28 ve Çizelge 4.29'da verilmiştir. En yüksek L* değeri K1 vermikompostunun %30 kullanım oranında, en düşük L* değeri, K2 vermikompostunun %75 kullanım oranında elde edilmiştir.

Çizelge 4.27. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin yapraklarında renk L* üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	80,67öd	96,05	91,60	85,12	88,36öd
10	72,83	81,02	86,96	84,17	81,25
20	87,43	99,82	85,53	85,30	89,52
30	101,22	81,31	84,28	87,31	88,53
40	85,10	86,09	87,84	83,70	85,68
50	100,22	88,90	94,82	85,17	92,28
75	79,76	69,76	85,35	88,89	80,94
Ortalama	86,75öd	86,13	88,05	85,67	

öd: önemli değil

En yüksek a* değeri K3 denemesinin %50 kullanım oranında, en düşük a* değeri, K1 denemesinin %10 kullanım oranında elde edilmiştir. a* değerinin yüksek olması, yeşil rengin de o kadar yüksek olması anlamına gelmektedir. Marulların a* değeri ile vermikompost uygulamalarının kullanım oranları arasında bir korelasyon kurulamamıştır.

Çizelge 4.28. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin yapraklarında renk a* üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	24,21öd	33,07	30,06	27,23	28,64öd
10	20,55	26,72	26,74	24,76	24,69
20	26,85	32,71	28,26	29,17	29,25
30	33,16	23,87	27,76	28,04	28,21
40	28,18	30,24	28,77	25,66	28,21
50	33,46	30,16	34,42	29,67	31,93
75	25,29	20,28	27,76	30,78	26,03±
Ortalama	27,39öd	28,15	29,11	27,90	

öd: önemli değil

Çizelge 4.29. Farklı oranda atık *R. miehei* biyokütlesi ile ahır gübresinden elde edilen vermikompostların değişik oranda torfla karışımından hazırlanan yetiştirme ortamlarının marul fidesinin yapraklarında renk b* üzerine etkileri

Oranlar	Ortamlar				Ortalamalar
	0FB+100AG (K1)	25FB+75AG (K2)	50FB+50AG (K3)	75 FB+25AG (K4)	
0 (Kontrol)	21,66öd	37,72	31,04	28,33	29,69öd
10	16,86	27,71	27,54	27,08	24,80
20	27,23	37,39	30,58	31,96	31,79
30	38,70	24,22	28,72	30,36	30,50
40	29,59	34,43	30,32	27,50	30,46
50	38,08	31,66	39,82	30,99	35,14
75	23,19	19,46	27,88	36,24	26,69
Ortalama	27,90öd	30,37	30,84	30,35	

öd: önemli değil

En yüksek b* değeri K3 denemesinin %50 kullanım oranında, en düşük b* değeri, K1 denemesinin %10 kullanım oranında elde edilmiştir. b* değerinin yüksek olması, sarı rengin de o kadar yüksek olması anlamına gelmektedir. Marulların a* değeri ile vermikompost uygulamalarının kullanım oranları arasında bir korelasyon kurulamamıştır.

Marul bitkisinin renk değerlerine azotlu gübre uygulamalarının bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Mahlangu vd. 2016).

Çalışmada vermikompost kullanım oranı arttıkça, marul fidesinin kalitesinin azaldığı belirlenmiştir. Coşkan ve Şenyiğit (2018) tarafından yapılan çalışmada solucan gübresinin yüksek oranlarda kullanılmasının bitkilerde genelde olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir. Marul üretimi için 4,5 litrelik saksılarda 25 g solucan gübresinin kök bölgesine uygulanması önerilmiştir. Tavalı (2019), vermikompost uygulamasının marul fidelerinin tohum çıkış oranına olumsuz etkilerinden dolayı, marul fidesi yetiştiriciliğinde kullanılmamasını, serada marul yetiştiriciliğinde kullanılmasının daha uygun olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte her vermikompostun farklı olduğu ve bitki verimi üzerine farklı etkilere sahip olduğunu söylemek mümkündür (Çakmak, 2011; Çağlar, 2014). Farklı gübre uygulamalarının marul bitkisinin kalitesi ve veriminin üzerine çalışıldığı bir başka çalışmada, en yüksek verime vermikompost uygulaması ile ulaşılmıştır (Premuzic vd., 2002). Vermikompost uygulamasının kıvırcık marul kalitesi üzerine etkilerini inceleyen Hınıslı (2014) tarafından maruldaki kalsiyum, çinko, magnezyum, bakır ve azot içeriğinde olumlu etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada %25 atık *R. miehei* biyokütlesi ile AG karışımından üretilen vermikompostun %40'a varan oranlarda torfla karışımlarından hazırlanan yetiştirme ortamında tohum çıkış oranı %96-%98 aralığında bulunmuştur.

4.3. Atık *R. miehei* biyokütlesinden mikrobiyolojik besiyeri bileşeni üretimi

Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinin, mikrobiyolojik besiyerlerinde kullanılan pepton gibi pahalı olan hayvansal ürünler yerine alternatif azot kaynağı olarak kullanım pontasiyelinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla inceleme parametresi olarak atık *R. miehei* biyokütlesinin protein miktarı değerlendirilmiştir.

4.3.1. Atık *R. miehei* biyokütlesinden protein ekstraksiyonu

Herhangi bir ekstraksiyon işlemi olmayan koşulda atık *R. miehei* biyokütlesinin protein miktarı 0,153 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuç protein ekstraksiyonu için bir optimizasyon yapılması gerektiğini göstermiştir. Bu nedenle hücre içerisindeki proteinin

maksimum verimle ekstrakte edilebilmesi için farklı lizis yöntemleri test edilmiştir. Böylelikle atık biyokütlede bulunan protein içeriğinin ekstrakt haline getirilerek besiyeri katkı maddesi olarak kullanım olanağı sağlanmak istenmiştir. Bu amaçla kullanılan üç farklı yöntemin karşılaştırılması için, değişken parametreler ve bu değişkenlerin tamamını içeren bir tasarım uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda fiziksel olarak fungal hücre duvarının zayıflatılarak hücre içerisindeki protein ekstraktının eldesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon amacı ile kullanılan geleneksel yöntemin dezavantajları, kullanılan kimyasalların ekstraktan uzaklaştırılmasının maliyetli olması ve uzun süreçler gerektirmesidir. Son ürünün ticarileşmesi planlandığında, ekonomik ve daha az adımda daha çok verim eldesine yönelik yöntemler seçilmiş ve tasarlanmıştır. Her örnek için üç tekrar analizi yapılmıştır.

4.3.1.1. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

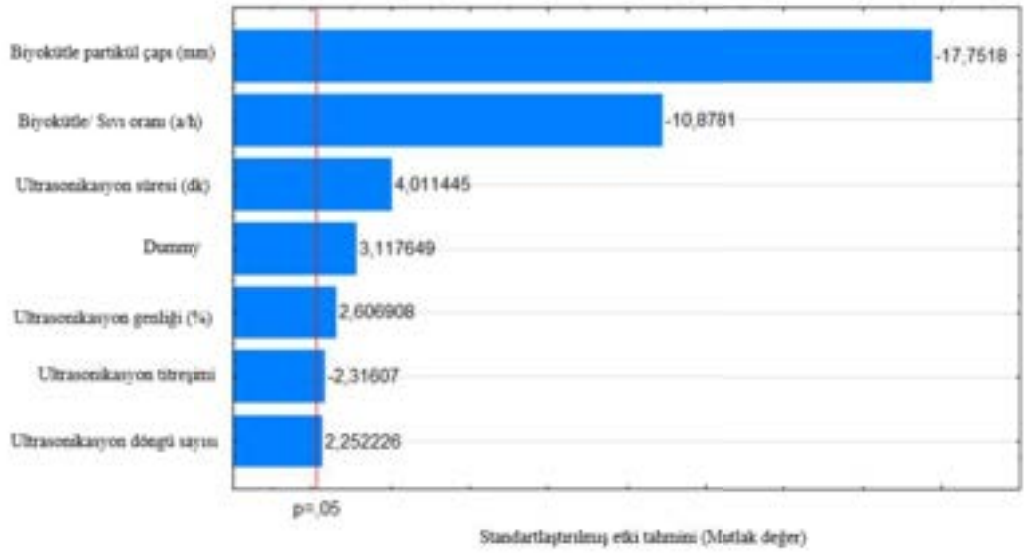
Ultrasonikasyonla ekstraksiyonda, ses dalgaları, frekansa göre değişen oranlarda yüksek veya nadiren düşük basınçlı döngülere neden olmaktadır. Düşük basınçlı döngülerde, ultrasonik dalgalar sıvı içerisinde kabarcıklar oluşturur. Belirli bir seviyede ise kavitasyon meydana gelir ve kavitasyon patlarken sıcaklık ve basınçta artma meydana gelir. Kavitasyon patlaması 280m/s hıza ulaşabilir. Oluşan bu kuvvetler hücre duvarında mekanik kırılmalara neden olur ve hücreler lizise uğrar. Ultrasonikasyonla ekstraksiyonda, uygulanan sonikasyon parametrelerine göre hücrelere yıkıcı etkileri değişebilmektedir (Moulton ve Wang, 1982). Endüstriyel uygulamasının kolay olması ve kimyasal madde kullanımı gerektirmediği için atık çamurlarında mikrobiyal yükün azaltılmasında ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır (Aydın ve Civelekoğlu, 2010). Bu çalışmada yeşil sürdürülebilirlik hareketi göz önüne alınarak bu yöntem uygulanmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden yüksek oranda protein eldesinde etkin faktörlerin seçilebilmesi için istatiksel yöntemlerden Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Yöntemin verimini etkileyebilecek atık *R. miehei* biyokütlesinin partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2), ultrasonikasyon genliği (X_3), ultrasonikasyon süresi (X_4), titreşim (X_5) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_6) olmak üzere 6 farklı değişkenin fungal ekstraktaki protein içeriğine etkileri Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Yapılan denemeler sonucunda en düşük protein miktarı (0,283mg/ml) 1:10 partikül/sıvı oranında, 1 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin, %20 genliğe sahip, 20 saniyede bir verilen titreşimlerin toplam süresi 5 dakika olmak üzere bir kez işlem uygulanması (Deneme 2) ile elde edilmiştir. En yüksek protein miktarına (1,856 mg/ml) ise, 1:5 partikül/sıvı oranında, 0,5 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin %30 genliğe sahip, 20 saniyede bir verilen titreşimlerin süresi 1 dakika olmak üzere 5'er kez aynı işlemin tekrarlanması (Deneme 7) ile ulaşılmıştır (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve ekstrakte edilen protein miktarları

Run	Partikül çapı (mm)	Partikül/sıvı oranı (a/h)	US genliği	US süresi	US Titreşim	Döngü sayısı	Dummy	Protein miktarı (mg/ml)
1	1	1/10	30	5	sürekli	5	+	0,591
2	1	1/10	20	1	kesikli	1	+	0,283
3	1	1/5	30	5	kesikli	1	–	0,958
4	1	1/5	20	1	sürekli	5	–	0,644
5	0,5	1/10	30	1	sürekli	1	–	0,984
6	0,5	1/10	20	5	kesikli	5	–	1,264
7	0,5	1/5	30	1	kesikli	5	+	1,856
8	0,5	1/5	20	5	sürekli	1	+	1,707

Şekil 4.38'de katsayıların işareti ilgili değiskenin hangi düzeyinin protein eldesi üzerinde etkili olduğu konusunda bilgi verilmektedir. Pozitif etkiler (+) değiskenin üst düzeyinin, negatif etkiler (-) ise değiskenin alt düzeyinin etkili olduğunu ifade etmektedir. Test edilen tüm değişkenlerinin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüstür ($p<0.05$). Şekil 4.38'e göre atık *R. miehei* biyokütlesinin protein ağırlıklı mikrobiyolojik besiyeri bileşeni olarak kullanılabilmesi için yapılan ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde ultrasonikasyon genliği (X_3), ultrasonikasyon süresi (X_4), aynı işlemin döngü sayısı (X_6) değişkenlerinin üst düzeylerinin, partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2) ve ultrasonikasyon titreşimi (X_5) değişkenlerinin de alt düzeylerinin olumlu etkiye sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.38. Ultrasonikasyonla homjenizasyon yönteminin PB Pareto grafiği

PB deney tasarımı ile gerçekleştirilen ultrasonikasyonla ekstraksiyon denemelerinde atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında sırasıyla ultrasonikasyon genliği (X_3), ultrasonikasyon süresi (X_4) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_6) değişkenlerinin pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Regresyon ve varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 4.31) modelin istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Modelin, gerçekleştirilen ultrasonikasyonla ekstraksiyon denemelerinde elde edilen sonuçları istatistiki olarak %96,75'ini ($R^2 = 0.96$) temsil ettiği görünmektedir.

Çizelge 4.31. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin PB varyans analizi

Factor	Effect Estimates; Var.:Ultrasonik; R-sqr=,96751; Adj.,9533 7 Factor Screening Design; MS Residual=,0132487 DV: Ultrasonikasyon Effect	Std.Err.	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,03608	0,02349	44,097	0,00000	0,98627	1,08589	1,03608	0,02349	0,98627	1,08589
Biyokütle partikül çapı (mm)	-0,83416	0,04699	-17,751	0,00000	-0,93378	-0,73455	-0,41708	0,02349	-0,46689	-0,36727
Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	-0,51116	0,04699	-10,878	0,00000	-0,61078	-0,41155	-0,25558	0,02349	-0,30539	-0,20577
Ultrasonikasyon genliği (%)	0,12250	0,04699	2,606	0,01907	0,02288	0,22211	0,06125	0,02349	0,01144	0,11105
Ultrasonikasyon süresi (dk)	0,18850	0,04699	4,011	0,00100	0,08888	0,28811	0,09425	0,02349	0,04444	0,14405
Ultrasonikasyon titreşimi	-0,10883	0,04699	-2,316	0,03414	-0,20844	-0,00921	-0,05441	0,02349	-0,10422	-0,00460
Ultrasonikasyon döngü sayısı	0,10583	0,04699	2,252	0,03870	0,00621	0,20544	0,05291	0,02349	0,00310	0,10272
Dummy	0,14850	0,04699	3,117	0,00663	0,04888	0,24811	0,07325	0,02349	0,02344	0,12305

Plackett-Burman tasarımı ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında önemli rol oynayan değişkenler belirlenmiştir. Önemli bulunan bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarına etkisi araştırılmıştır. Plackett-Burman

deneylerinin sonuçları dikkate alınarak Box-Behnken deney tasarımı oluşturulmuştur. Box-Behnken tasarımı ile seçilen üç değişkenin, +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere üç seviyesi test edilmiştir. Seçilen değişkenler ve seviye değerleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.32'de, tasarım ve protein miktarı sonuçları Çizelge 4.33'de verilmiştir.

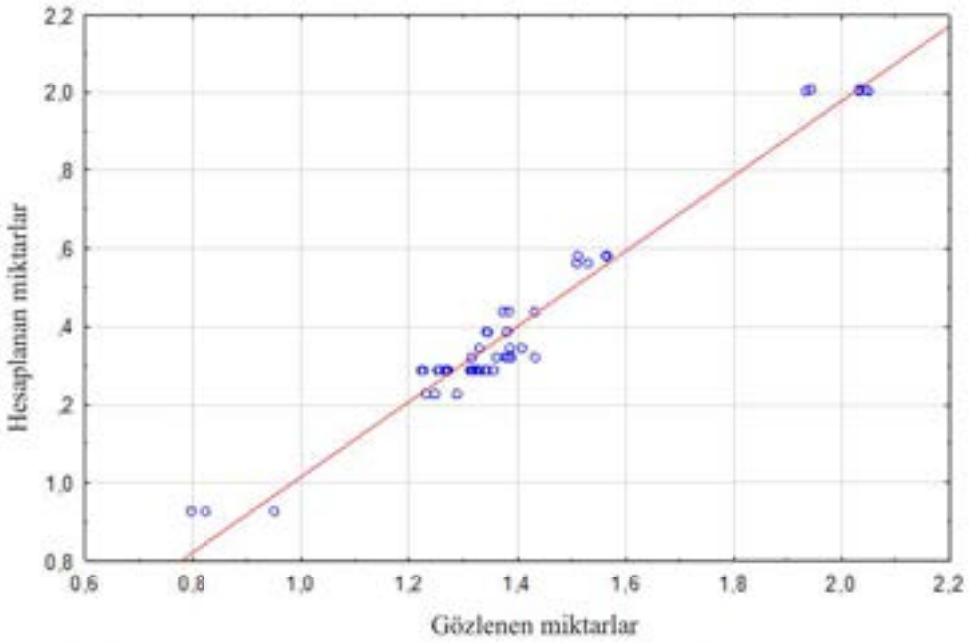
Çizelge 4.32. Ultrasonikasyonla ektsraksiyon yönteminin BB analiz sonuçları

	Effect Estimates; Var. **Protein miktarı mg/ml** R-sqr=,96341; Adj:,95538 3 3-level factors, 1 Blocks, 51 Runs; MS Residual=,0031737 DV: **Protein miktarı mg/ml**									
Factor	Effect	Std Err.	t(41)	p	-95,% Cnf Limt	+95,% Cnf Limt	Coeff.	Std Err. Coeff.	-95,% Cnf Limt	+95,% Cnf Limt
Mean/Interc.	1,450714	0,009385	154,5065	0,000000	1,431752	1,469676	1,450714	0,009385	1,431752	1,469676
(1)Ultrasonikasyon genliği(L)	0,042424	0,022996	1,8446	0,072328	-0,004023	0,088872	0,021212	0,011500	-0,002012	0,044436
Ultrasonikasyon genliği(Q)	0,033102	0,015851	2,0884	0,043012	0,001092	0,065111	0,016552	0,007926	0,000546	0,032556
(2)Ultrasonikasyon süresi(L)	-0,200104	0,022996	-8,7005	0,000000	-0,246552	-0,153657	-0,100052	0,011500	-0,123276	-0,076828
Ultrasonikasyon süresi(Q)	-0,120397	0,015851	-7,5955	0,000000	-0,152406	-0,088389	-0,060198	0,007926	-0,076203	-0,044194
(3)Aynı işlemin Döngü sayısı(L)	-0,192996	0,022996	-8,3916	0,000000	-0,239447	-0,146551	-0,096498	0,011500	-0,119723	-0,073274
Aynı işlemin Döngü sayısı(Q)	-0,158433	0,015851	-9,9951	0,000000	-0,190444	-0,126421	-0,079216	0,007926	-0,095222	-0,063210
1L by 2L	-0,136486	0,032526	-4,1957	0,000142	-0,202159	-0,070781	-0,068234	0,016263	-0,101079	-0,035391
1L by 3L	-0,096851	0,032526	-3,0396	0,004116	-0,164537	-0,033164	-0,048425	0,016263	-0,082289	-0,016582
2L by 3L	-0,882341	0,032526	-27,1276	0,000000	-0,948027	-0,816654	-0,441170	0,016263	-0,474014	-0,408327

Çizelge 4.33. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve elde edilen deneysel protein değerleri

Deneme	X_3 (Ultrasonikasyon genliği)	X_4 (Ultrasonikasyon süresi)	X_6 (Aynı işlemin döngü sayısı)	Protein miktarı (mg/ml)
1	25	7	7	0,857
2	25	5	5	1,332
3	20	5	3	1,395
4	25	5	5	1,332
5	20	3	5	1,356
6	25	3	3	1,392
7	25	5	5	1,264
8	25	7	3	2,006
9	30	7	5	1,771
10	20	7	5	1,509
11	25	5	5	1,272
12	30	5	7	1,330
13	30	5	3	1,548
14	20	5	7	1,375
15	25	3	7	2,008
16	30	3	5	1,524
17	25	5	5	1,235

Şekil 4.39'da gözlenen ve beklenen protein miktarları verilmiştir. Burada mavi noktaların (gözlenen değerler) kırmızı çizgiye (beklenen değerler) yakın olduğu, sonuçların çoğunlukla birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir.



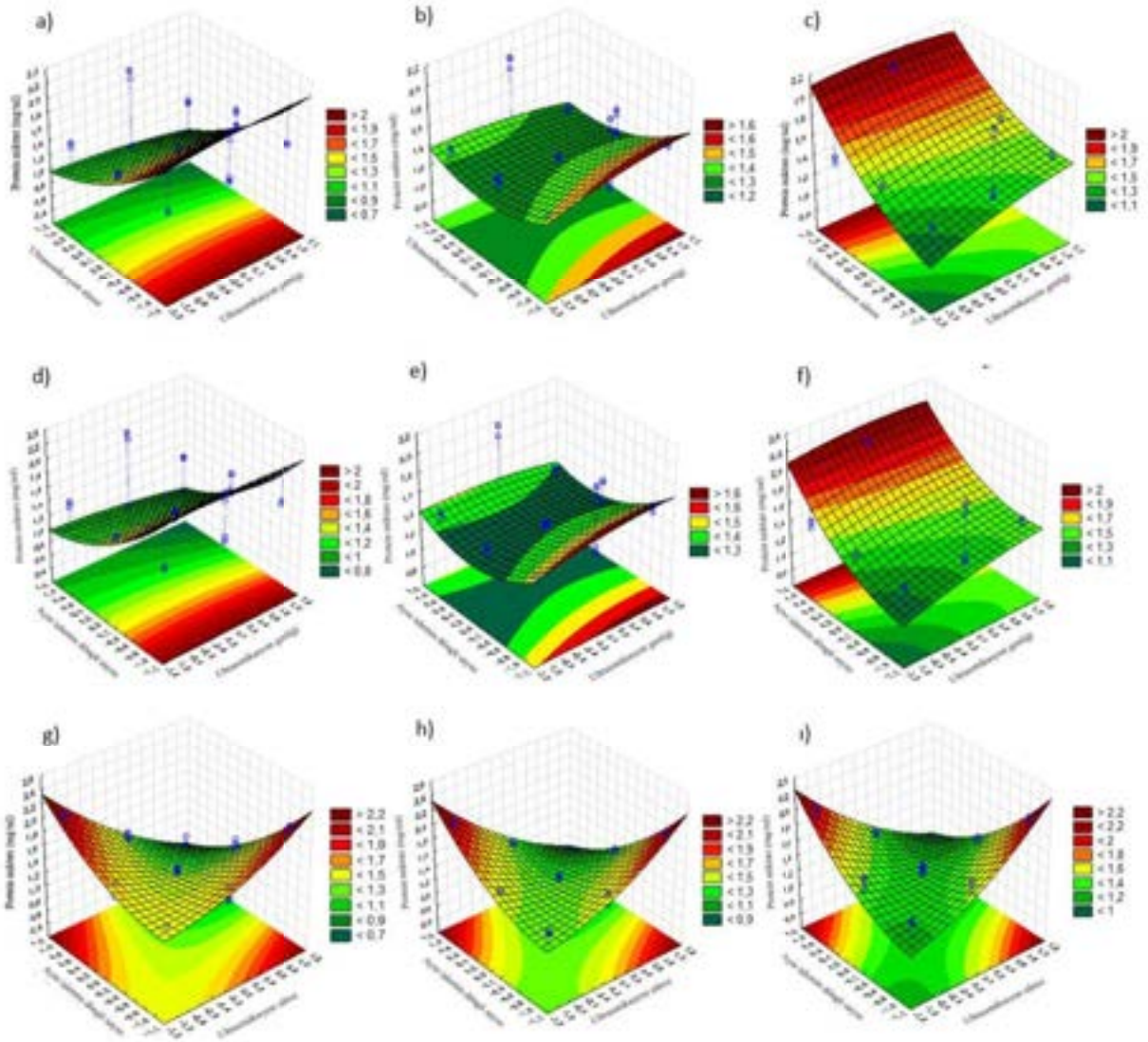
Şekil 4.39. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde beklenen (kırmızı çizgi) ve gözlenen (mavi nokta) değerler

Sonuçların daha iyi anlaşılması amacıyla, fungal ekstraktaki proteinin optimize ekstraksiyon koşullarının üç boyutlu tahmini modelleri Şekil 4.41'de sunulmuştur. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde test edilen değişkenlerin tek başına (L) ve karesel (Q) etkilerini karşılaştırabilmek için Pareto çizelgesi Şekil 4.40'da sunulmuştur. Kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ($p<0.05$) ifade etmektedir. Bu grafikte fungal hücrelerin parçalanmasına bağlı olarak elde edilecek protein miktarını ultrasonikasyon genliğin olumlu etkilediği görülmektedir.



Şekil 4.40. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminin BB Pareto grafiği (2Lby3L: US süresi ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi, 1Lby2L: US genliği ile US süresinin doğrusal etkileşimi, 1Lby3L: US genliği ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi)

Elde edilen sonuçlara göre ultrasonikasyon genliğinin fungal hücrelerin parçalanmasında en etkili parametrelerden biri olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.41'de görüldüğü üzere istatistiksel olarak protein miktarının 2,2 mg/ml nin üzerine çıkması mümkün görülmektedir. Yapılan istatistiksel optimizasyonlar ile PB tasarımında 1,856 mg/ml, BB tasarımında ise 2,008 mg/ml protein miktarı elde edilmiştir.



Şekil 4.41. Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemindeki önemli üç değişkenin cevap yüzey grafikleri (a-c: ultrasonikasyon süresi üç seviyesi, d-f: ultrasonikasyon genliği üç seviyesi, g-ı: Aynı işlemin döngü sayının üç seviyesi)

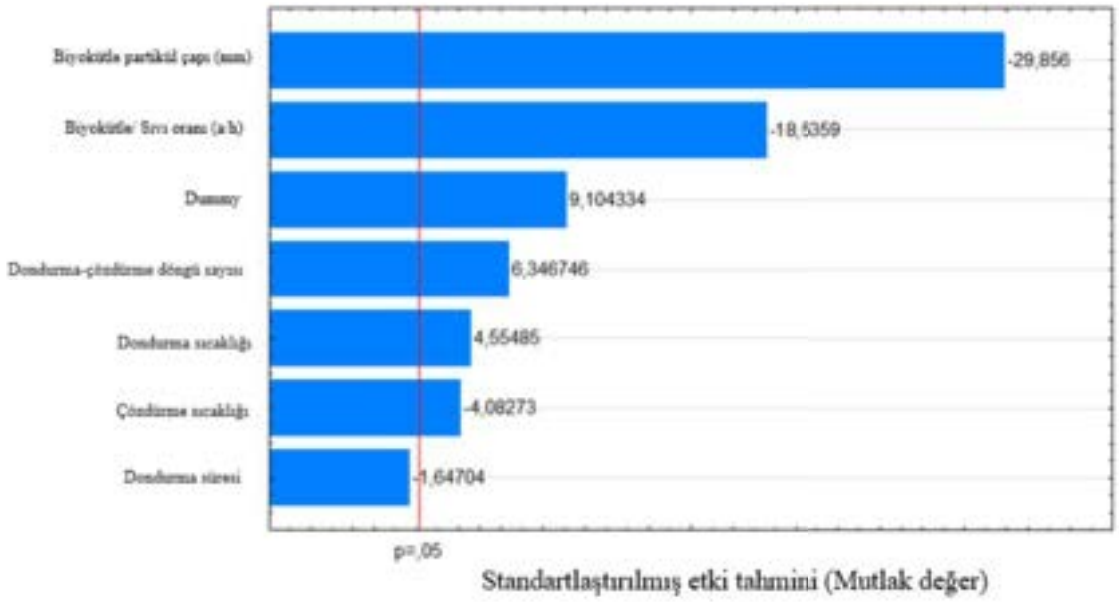
4.3.1.2. Dondurma-çözdürme ile ekstraksiyonun optimizasyonu

Yeşil sürdürülebilirlik hareketi göz önüne alınarak uygulanan bir başka yöntem dondurma-çözdürme yöntemidir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden yüksek oranda protein eldesi için istatiksel yöntemlerden Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.10'da verilmiştir. Kullanılan PB deney tasarımı ve yapılan denemeler sonucunda elde edilen protein miktarları Çizelge 4.34'te verilmiştir. Dondurma-çözdürme ekstraksiyonun verimini etkileyebilecek atık *R. miehei* biyokütlesinin partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2), dondurma sıcaklığı (X_3), dondurma süresi (X_4), çözdürme sıcaklığı (X_5) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_6) olmak üzere 6 farklı değişkenin fungal ekstraktaki protein içeriğine etkileri Şekil 4.49'de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Dondurma-çözdürme yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve sonuçları

Deneme	Partikül çapı (mm)	Partikül/sıvı oranı (a/h)	Dondurma sıcaklığı (°C)	Dondurma süresi (Saat)	Çözme sıcaklığı (°C)	Döngü sayısı	Dummy	Protein miktarı (mg/ml)
1	1	1/10	-86	24	37	5	+	0,139
2	1	1/10	-20	4	25	1	+	0,055
3	1	1/5	-86	24	25	1	–	0,254
4	1	1/5	-20	4	37	5	–	0,244
5	0,5	1/10	-86	4	37	1	–	0,397
6	0,5	1/10	-20	24	25	5	–	0,465
7	0,5	1/5	-86	4	25	5	+	1,011
8	0,5	1/5	-20	24	37	1	+	0,743

Yapılan denemeler sonucunda en düşük protein miktarı (0,055 mg/ml), 1 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin 1:10 partikül/sıvı oranında, -20 °C'de dondurulup 4 saat bekletildikten sonra 25 °C'de çözdürme işleminin 1 kez uygulanması ile (deneme 2) elde edilmiştir. En yüksek protein miktarına (1,011 mg/ml) ise, 0,5 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin 1:5 partikül/sıvı oranında, -86 °C'de dondurulup 4 saat bekletildikten sonra 25 °C'de çözdürme işleminin 5 kez tekrarlanması (deneme 7) ile ulaşılmıştır. Katsayıların işareti ilgili değiskenin hangi düzeyinin protein eldesi üzerinde etkili olduğu konusunda bilgi vermektedir. Pozitif etkiler (+) değiskenin üst düzeyinin, negatif etkiler (-) ise değiskenin alt düzeyinin etkili olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.42. Dondurma-çözdürme yönteminin PB Pareto grafiği

Test edilen tüm değişkenlerinin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüstür ($p<0.05$). Şekil 4.42'ye göre atık *R. miehei* biyokütlesinin protein ağırlıklı mikrobiyolojik besiyeri bileşeni olarak kullanılabilmesi için yapılan dondurma-çözdürme yönteminde dondurma sıcaklığı (X_3), dondurma süresi (X_4) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_6) değişkenlerinin üst düzeylerinin, partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2) ve çözdürme sıcaklığı (X_5) değişkenlerinin de alt düzeylerinin etkili olduğu görülmektedir.

PB deney tasarımı ile gerçekleştirilen dondurma-çözdürme denemelerinde atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında sırasıyla dondurma sıcaklığı (X_3) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_6) değişkenlerinin pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Regresyon ve varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 4.35) modelin istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Modelin, gerçekleştirilen ultrasonikasyonla ekstraksiyon denemelerinde elde edilen sonuçları istatistiki olarak %98,86' sını ($R^2 = 0.98$) temsil ettiği görülmektedir.

Çizelge 4.35. Dondurma-çözdürme yönteminin PB varyans analizi

Factor	Effect Estimates; Var: Don Coz; R-sqr=,98869; Adj:,98374 7 Factor Screening Design; MS Residual=,0018288 DV: Don Coz Effect	Std.Err.	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,452571	0,008721	51,8451	0,000000	0,434072	0,471069	0,452571	0,008721	0,434072	0,471069
Biyokütle partikül çapı (mm)	-0,521241	0,017451	-29,8561	0,000000	-0,558252	-0,484231	-0,260621	0,008721	-0,279127	-0,242116
Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	-0,323611	0,017451	-18,5355	0,000000	-0,360621	-0,286600	-0,161805	0,008721	-0,180311	-0,143300
Dondurma sıcaklığı	0,079521	0,017451	4,5546	0,000321	0,042511	0,116532	0,039761	0,008721	0,021255	0,058266
Dondurma süresi (s)	-0,028751	0,017451	-1,6470	0,119048	-0,065761	0,008256	-0,014371	0,008721	-0,032881	0,004128
Çözdürme sıcaklığı	-0,071271	0,017451	-4,0821	0,000867	-0,108281	-0,034261	-0,035631	0,008721	-0,054141	-0,017130
Dondurma-çözdürme döngü sayısı	0,110801	0,017451	6,3481	0,000010	0,073791	0,147811	0,055401	0,008721	0,036897	0,073906
Dummy	0,158941	0,017451	9,1043	0,000000	0,121931	0,195951	0,079471	0,008721	0,060961	0,097981

Plackett-Burman tasarımı ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında önemli rol oynayan değişkenler belirlenmiştir. Önemli bulunan bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarına etkisi araştırılmıştır. Plackett-Burman deneylerinin sonuçları dikkate alınarak Box-Behnken deney tasarımı oluşturulmuştur. Box-Behnken tasarımı ile seçilen üç değişkenin, +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere üç seviyesi test edilmiştir. Seçilen değişkenler ve seviye değerleri Çizelge 3.12'de verilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.36'de, tasarım ve protein miktarı sonuçları Çizelge 4.37'de verilmiştir.

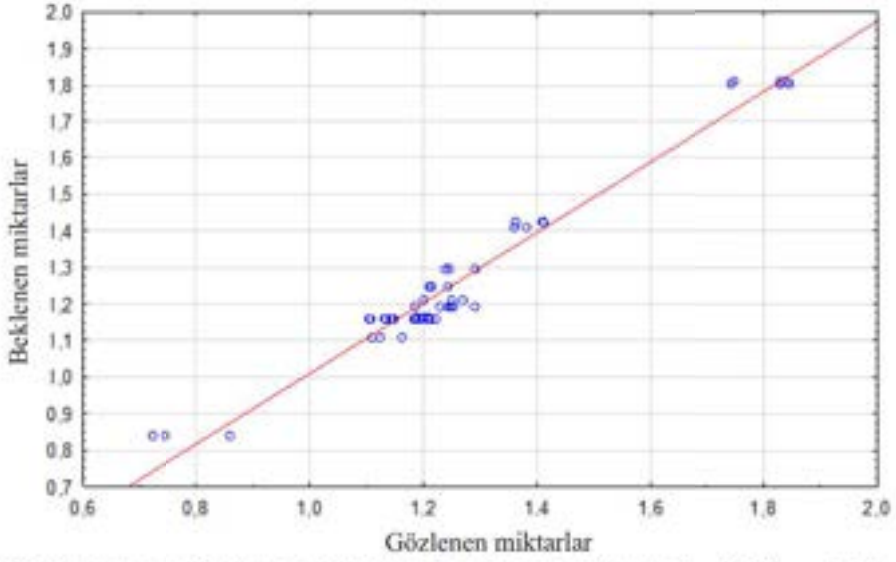
Çizelge 4.36. Dondurma-çözme yönteminin BB analiz sonuçları

Factor	Effect Estimates; Var: **Protein miktarı mg/ml** **Protein miktarı mg/ml**(R-sqr=,96341; Adj:,95538 3 3-level factors, 1 Blocks, 51 Runs; MS Residual=,00255 **Protein miktarı mg/ml** Effect	Std.Err.	t(41)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,307345	0,008416	155,3345	0,000000	1,290347	1,324342	1,307345	0,008416	1,290347	1,324342
(1)Dondurma süresi (s)(L)	0,038028	0,020616	1,8446	0,072326	-0,003606	0,079662	0,019014	0,010308	-0,001803	0,039831
Dondurma süresi (s)(Q)	0,029573	0,014208	2,0814	0,043012	0,000879	0,058267	0,014836	0,007104	0,000489	0,029184
(2)Çözdürme sıcaklığı (L)	-0,179368	0,020616	-8,7005	0,000000	-0,221002	-0,137733	-0,089684	0,010308	-0,110501	-0,068867
Çözdürme sıcaklığı (Q)	-0,107920	0,014208	-7,5955	0,000000	-0,136615	-0,079226	-0,053960	0,007104	-0,068307	-0,039613
(3)Dondurma-çözdürme döngü sayısı(L)	-0,172998	0,020616	-8,3916	0,000000	-0,214633	-0,131364	-0,086499	0,010308	-0,107316	-0,065682
Dondurma-çözdürme döngü sayısı(Q)	-0,142014	0,014208	-9,9951	0,000000	-0,170709	-0,113320	-0,071007	0,007104	-0,085354	-0,056660
1L by 2L	-0,122326	0,029155	-4,1957	0,000142	-0,181208	-0,063446	-0,061163	0,014577	-0,090603	-0,031723
1L by 3L	-0,086907	0,029155	-3,0382	0,004119	-0,147486	-0,026327	-0,043303	0,014577	-0,073743	-0,014863
2L by 3L	-0,790903	0,029155	-27,1276	0,000000	-0,849783	-0,732024	-0,395452	0,014577	-0,424891	-0,366012

Çizelge 4.37. Dondurma-çözdürme yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve gözlenen değerleri

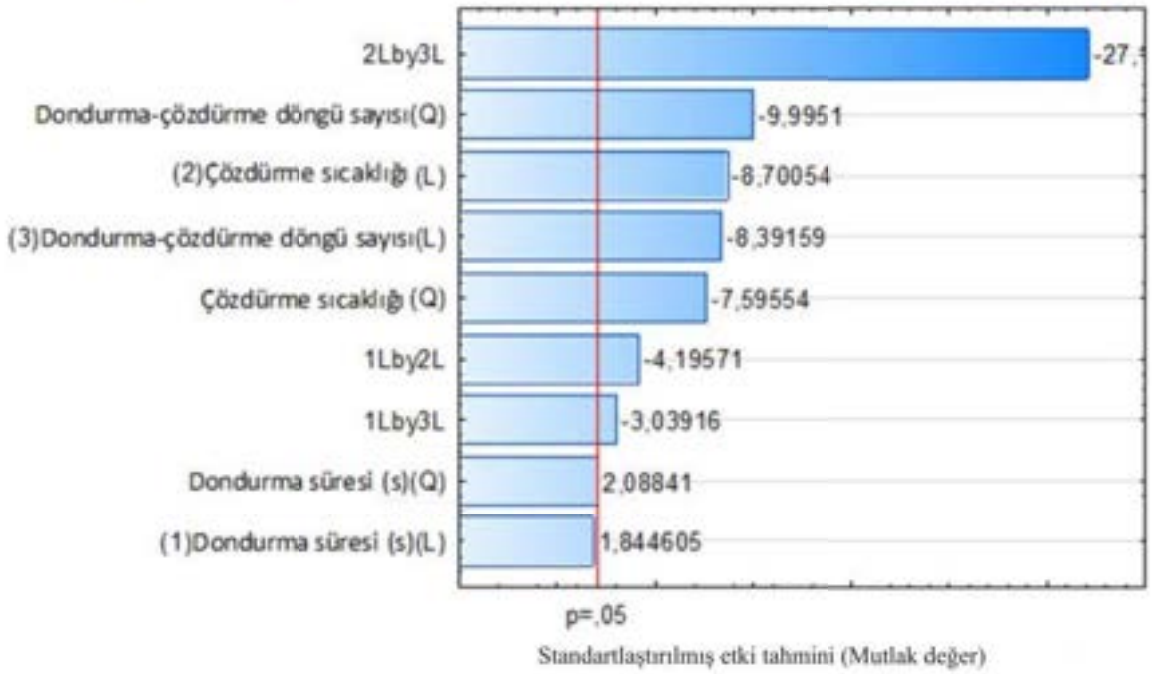
Deneme	X_4 (Dondurma süresi)	X_5 (Çözdürme sıcaklığı)	X_6 (Aynı işlemin döngü sayısı)	Protein miktarı (mg/ml)
1	3	37	7	0,775
2	3	25	5	1,201
3	2	25	3	1,258
4	3	25	5	1,201
5	2	13	5	1,223
6	3	13	3	1,255
7	3	25	5	1,140
8	3	37	3	1,805
9	4	37	5	1,595
10	2	37	5	1,360
11	3	25	5	1,147
12	4	25	7	1,199
13	4	25	3	1,395
14	2	25	7	1,240
15	3	13	7	1,807
16	4	13	5	1,373
17	3	25	5	1,114

Şekil 4.43'de gözlenen ve hesaplanan protein miktarları verilmiştir. Burada mavi noktaların (gözlenen değer) kırmızı çizgiye (beklenen değer) yakın olduğu, sonuçların çoğunluğunun birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Sonuçların daha iyi anlaşılması amacıyla, fungal ekstraktaki proteinin optimize ekstraksiyon koşullarının üç boyutlu tahmini modelleri Şekil 4.45'te sunulmuştur.



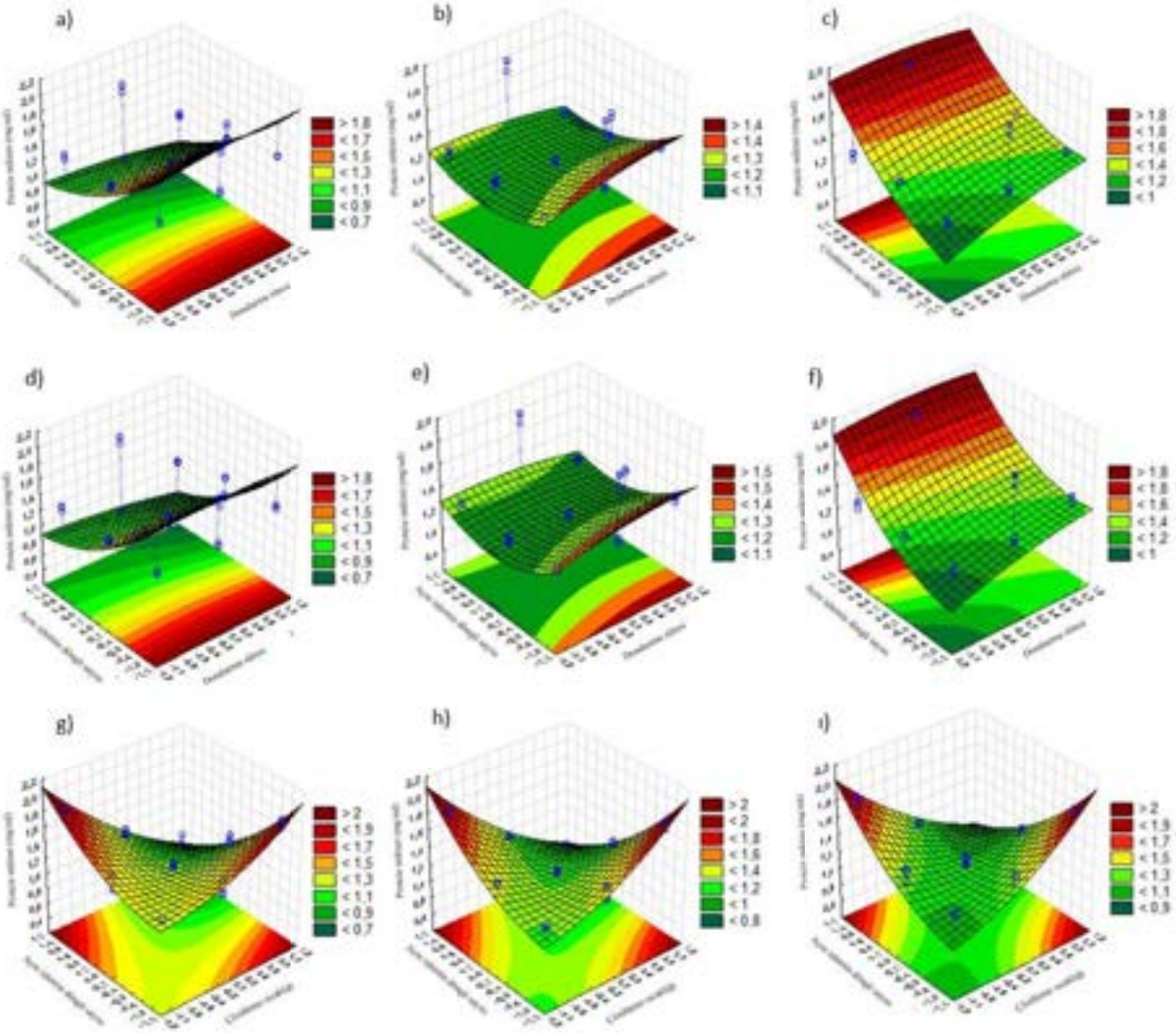
Şekil 4.43. Dondurma-çözdürme yönteminde beklenen (kırmızı çizgi) ve gözlenen (mavi nokta) değerler

Dondurma-çözdürme yönteminde test edilen değişkenlerin tek başına (L) ve karesel (Q) etkilerini karşılaştırabilmek için Pareto çizelgesi Şekil 4.44'de sunulmuştur. Kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ifade etmektedir. Bu grafikte fungal hücrelerin parçalanmasına bağlı olarak elde edilecek protein miktarını, dondurma süresinin olumlu etkilediği görülmektedir.



Şekil 4.44. Dondurma-çözdürme yönteminin BB Pareto grafiği (2Lby3L: Çözdürme sıcaklığı ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi,1Lby2L: Dondurma süresi ile çözdürme sıcaklığının doğrusal etkileşimi, 1Lby3L: Dondurma süresi ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi)

Elde edilen sonuçlara göre dondurma süresinin fungal hücrelerin parçalanmasında en etkili parametrelerden biri olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.45' de görüldüğü üzere istatistiksel olarak protein miktarının 2 mg/ml'a kadar çıkması mümkün görülmektedir. Yapılan istatistiksel optimizasyonlar ile PB tasarımında protein miktarı 1,011 mg/ml iken, BB tasarımında 1,807 mg/ml olarak elde edilmiştir.

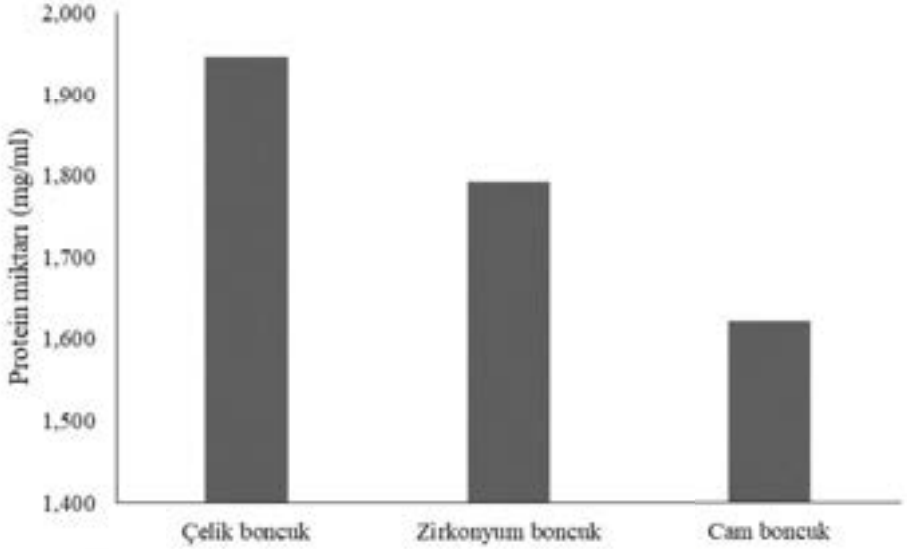


Şekil 4.45. Dondurma-çözdürme yöntemindeki önemli üç değişkenin cevap yüzey grafikleri (a-c: çözdürme sıcaklığı üç seviyesi, d-f: dondurma süresi üç seviyesi, g-ı: Aynı işlemin döngü sayının üç seviyesi)

4.3.1.3. Boncuk ile ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu

Bu yöntemde hücre kırılmasının etkinliği, karıştırma hızı, boncuk boyutu, boncuk yoğunluğu ve çapı, sıvı yoğunluğu gibi bazı değişkenlere bağlıdır. Özellikle boncuk çeşidi oldukça önemlidir. Bu nedenle boncukla öğütme yönteminde kullanılacak olan boncuk çeşidinin belirlenmesi için paslanmaz çelik, zirkonyum ve cam olmak üzere 3 farklı boncuk çeşidi üzerine bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Diğer parametreler (0,5 mm partikül çapı, 1:5 m/v partikül/sıvı oranı, 0,5 mm boncuk çapı, 0,8 g boncuk ağırlığı, 2400 rpm vorteks hızı, 5 dk vorteks süresi, 5'er kez aynı işlemin tekrarlanması) sabit tutularak üç farklı boncuk çeşidinin ekstraksiyona etkisi test edilmiştir. Şekil 4.46'da görüldüğü

üzere çelik boncuklar ile maksimum protein eldesi sağlanmıştır. Bunu takiben zirkonyum boncuklar ve en düşük protein miktarı da cam boncuk ile elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmanın sonraki kısmında çelik boncuklar kullanılmıştır.



Şekil 4.46. Boncuk tipinin elde edilen protein miktarına eldesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden yüksek oranda protein eldesi için istatiksel yöntemlerden Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Boncuk ile ekstraksiyon yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri Çizelge 3.14'te verilmiştir. Kullanılan PB deney tasarımı ve yapılan denemeler sonucunda elde edilen protein miktarları Çizelge 4.36'da verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda en düşük protein miktarı (0,361 mg/ml) 1 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin, 1:10 partikül/sıvı oranında, 0,5 mm çapa sahip çelik boncuklar ile 600 rpm'de 1 dakika olmak üzere 5'er kez aynı işlemin tekrarlanması ile elde edilmiştir. En yüksek protein miktarına (2,070 mg/ml) ise, 0,5 mm partikül çapına sahip fungal biyokütlenin 1 mm çapa sahip çelik boncuklar ile 600 rpm de 5 dakika olmak üzere 5'er kez aynı işlemin tekrarlanması ile ulaşılmıştır (Çizelge 4.38).

Çizelge 4.38. Boncukla ekstraksiyon yönteminde kullanılan Plackett-Burman tasarımı ve sonuçlar

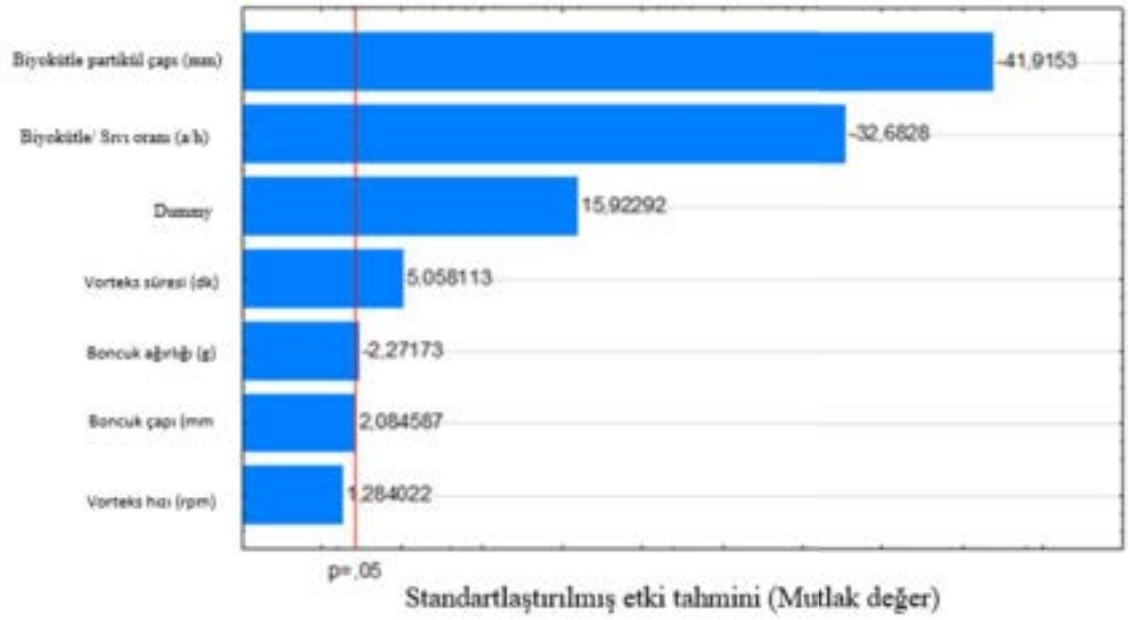
Deneme	Partikül çapı (mm)	Partikül/sıvı oranı (a/h)	Boncuk çapı (mm)	Boncuk ağırlığı (g)	Vorteks hızı (rpm)	Vorteks süresi (dk)	Döngü sayısı	Protein miktarı (mg/ml)
1	1	1/10	1	1	2400	5	5	0,490
2	1	1/10	0,5	0,8	600	1	5	0,361
3	1	1/5	1	1	600	1	1	0,708
4	1	1/5	0,5	0,8	2400	5	1	0,844
5	0,5	1/10	1	0,8	2400	1	1	0,975
6	0,5	1/10	0,5	1	600	5	1	0,963
7	0,5	1/5	1	0,8	600	5	5	2,070
8	0,5	1/5	0,5	1	2400	1	5	1,900

Boncukla ekstraksiyon yönteminde protein ağırlıklı fungal ekstraktın eldesinde etkili olan bağımsız değişkenleri, Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Boncukla ekstraksiyon yönteminin verimini etkileyebilecek atık *R. miehei* biyokütlesinin partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2), boncuk çapı (X_3), boncuk ağırlığı (X_4), vorteks hızı (X_5), vorteks süresi (X_6) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_7) olmak üzere 7 farklı değişkenin fungal ekstraktaki protein içeriğine etkileri Şekil 4.47'de verilmiştir. PB deney tasarımı ile gerçekleştirilen boncukla ekstraksiyon denemeleri ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında sırasıyla dondurma sıcaklığı (X_3), vorteks süresi (X_6) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_7) değişkenlerinin pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte partikül çapı (X_1), partikül/sıvı oranı (X_2) ve vorteks hızı (X_5) değişkenlerinin negatif etkisi olduğu görülmüştür. Regression ve varyans analizi sonuçlarına göre (Çizelge 4.39) modelin istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Modelin, gerçekleştirilen boncukla ekstraksiyon denemelerinde elde edilen sonuçları istatistiki olarak %98,86' ini ($R^2 = 0.98$) temsil ettiği görünkmektedir.

Çizelge 4.39. Boncukla ekstraksiyon yönteminin PB varyans analizi

	Effect Estimates; Var: Boncuk; R-sqr=,99489; Adj:,99265 7 Factor Screening Design; MS Residual=,0026229 DV: Boncukla homojenizasyon									
Factor	Effect	Std.Err.	t(16)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,03894	0,01045	99,381	0,00000	1,01678	1,06110	1,03894	0,01045	1,01678	1,06110
Biyokütle partikül çapı (mm)	-0,87637	0,02090	-41,915	0,00000	-0,92069	-0,83205	-0,43818	0,01045	-0,46034	-0,41602
Biyokütle/ Sıvı oranı (a/h)	-0,68334	0,02090	-32,682	0,00000	-0,72766	-0,63901	-0,34167	0,01045	-0,36383	-0,31950
Boncuk çapı (mm)	0,04358	0,02090	2,084	0,05349	-0,00073	0,08790	0,02179	0,01045	-0,00036	0,04395
Boncuk ağırlığı (g)	-0,04749	0,02090	-2,271	0,03725	-0,09182	-0,00317	-0,02374	0,01045	-0,04591	-0,00158
Vorteks hızı (rpm)	0,02684	0,02090	1,284	0,21741	-0,01747	0,07117	0,01342	0,01045	-0,00873	0,03559
Vorteks süresi (dk)	0,10575	0,02090	5,058	0,00011	0,06143	0,15008	0,05287	0,01045	0,03071	0,07504
Vorteks döngü sayısı	0,33292	0,02090	15,922	0,00000	0,28859	0,37724	0,16646	0,01045	0,14429	0,18862

Boncukla ekstraksiyon yönteminde test edilen değişkenlerin etkilerini karşılaştırabilmek için Pareto çizelgesi Şekil 4.47'de sunulmuştur. Kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ifade etmektedir. Bu grafikte fungal hücrelerin parçalanmasına bağlı olarak elde edilecek protein miktarını, dondurma sıcaklığı (X_3), vorteks süresi (X_6) ve aynı işlemin döngü sayısı (X_7) değişkenlerinin olumlu etkilediği görülmektedir.



Şekil 4.47. Boncukla homjenizasyon yönteminin PB Pareto grafiği

Plackett-Burman tasarımı ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarının arttırılmasında önemli rol oynayan değişkenler belirlenmiştir. Önemli bulunan bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarına etkisi araştırılmıştır. Plackett-Burman deneylerinin sonuçları dikkate alınarak Box-Behnken deney tasarımı oluşturulmuştur. Box-Behnken tasarımı ile seçilen üç değişkenin, +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere üç seviyesi test edilmiştir. Seçilen değişkenler ve seviye değerleri Çizelge 3.16'da verilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilecek proteinin miktarlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.40'da, tasarım ve protein miktarı sonuçları Çizelge 4.41'de verilmiştir.

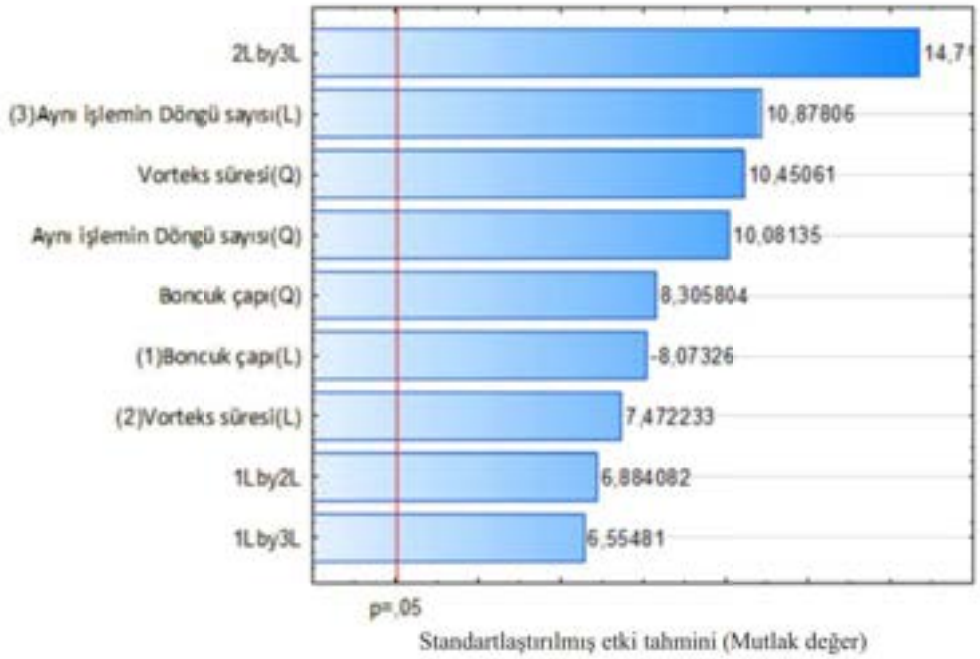
Çizelge 4.40. Boncukla ekstraksiyon yönteminin BB analiz sonuçları

Factor	Effect Estimates; Var: protein miktarı mg/ml; R-sqr=.95441; Adj:.94441 3 3-level factors, 1 Blocks, 51 Runs; MS Residual=.0020046 DV: protein miktarı mg/ml Effect	Std.Err.	t(41)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,740987	0,007462	233,311	0,000000	1,725917	1,756057	1,740987	0,007462	1,725917	1,756057
(1)Boncuk çapı(L)	-0,147566	0,018278	-8,073	0,000000	-0,184476	-0,110656	-0,073783	0,009139	-0,092240	-0,055328
Boncuk çapı(Q)	0,104832	0,012597	8,3056	0,000000	0,079391	0,130273	0,052316	0,006296	0,039696	0,065036
(2)Vorteks süresi(L)	0,136586	0,018278	7,4722	0,000000	0,099666	0,173505	0,068293	0,009139	0,049833	0,086753
Vorteks süresi(Q)	0,131651	0,012597	10,4506	0,000000	0,106210	0,157092	0,065825	0,006296	0,053105	0,078546
(3)Aynı işlemin Döngü sayısı(L)	0,166832	0,018278	10,8781	0,000000	0,161918	0,235746	0,099416	0,009136	0,080958	0,117873
Aynı işlemin Döngü sayısı(Q)	0,126999	0,012597	10,0814	0,000000	0,101558	0,152440	0,063500	0,006296	0,050779	0,076220
1L by 2L	0,177946	0,025846	6,8841	0,000000	0,125745	0,230153	0,088973	0,012923	0,062872	0,115077
1L by 3L	0,169438	0,025846	6,5548	0,000000	0,117234	0,221642	0,084719	0,012923	0,058617	0,110821
2L by 3L	0,380245	0,025846	14,7100	0,000000	0,328042	0,432449	0,190123	0,012923	0,164021	0,216224

Çizelge 4.41. Boncukla ekstraksiyon yönteminin Box-Behnken deneysel tasarımı ve gözlenen değerleri

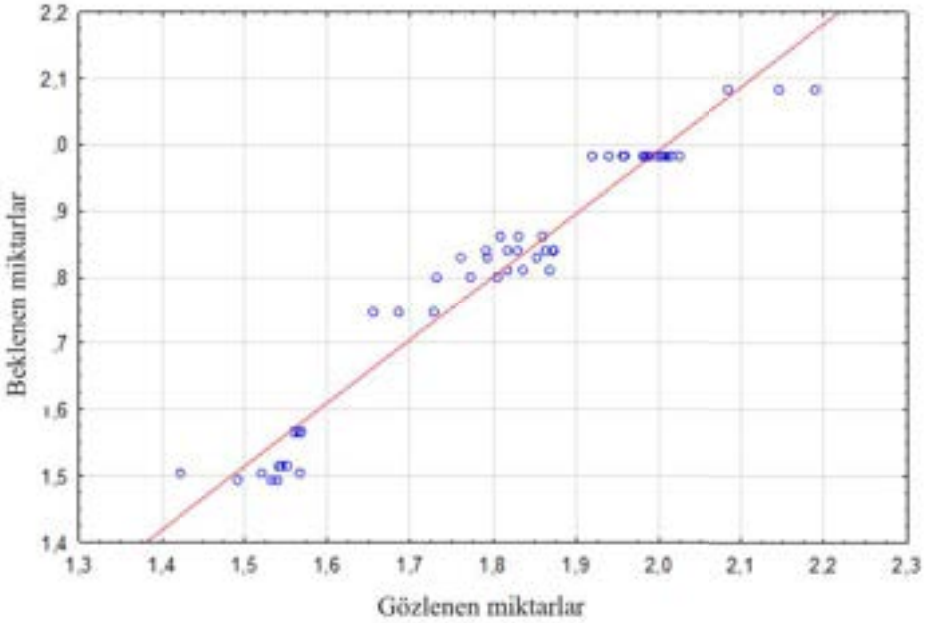
Deneme	X_3 (Boncuk çapı)	X_6 (Vorteks süresi)	X_7 (Aynı işlemin döngü sayısı)	Protein miktarı (mg/ml)
1	**1,5**	**7**	**7**	**2,140**
2	1,5	5	5	1,952
3	1	5	3	1,840
4	1,5	5	5	2,000
5	1	3	5	1,869
6	1,5	3	3	1,690
7	1,5	5	5	1,967
8	1,5	7	3	1,504
9	2	7	5	1,579
10	1	7	5	1,692
11	1,5	5	5	2,001
12	2	5	7	1,833
13	2	5	3	1,521
14	1	5	7	1,812
15	1,5	3	7	1,565
16	2	3	5	1,545
17	1,5	5	5	1,996

Dondurma-çözdürme yönteminde test edilen değişkenlerin tek başına (L) ve karesel (Q) etkilerini karşılaştırabilmek için Pareto çizelgesi Şekil 4.56'da sunulmuştur.



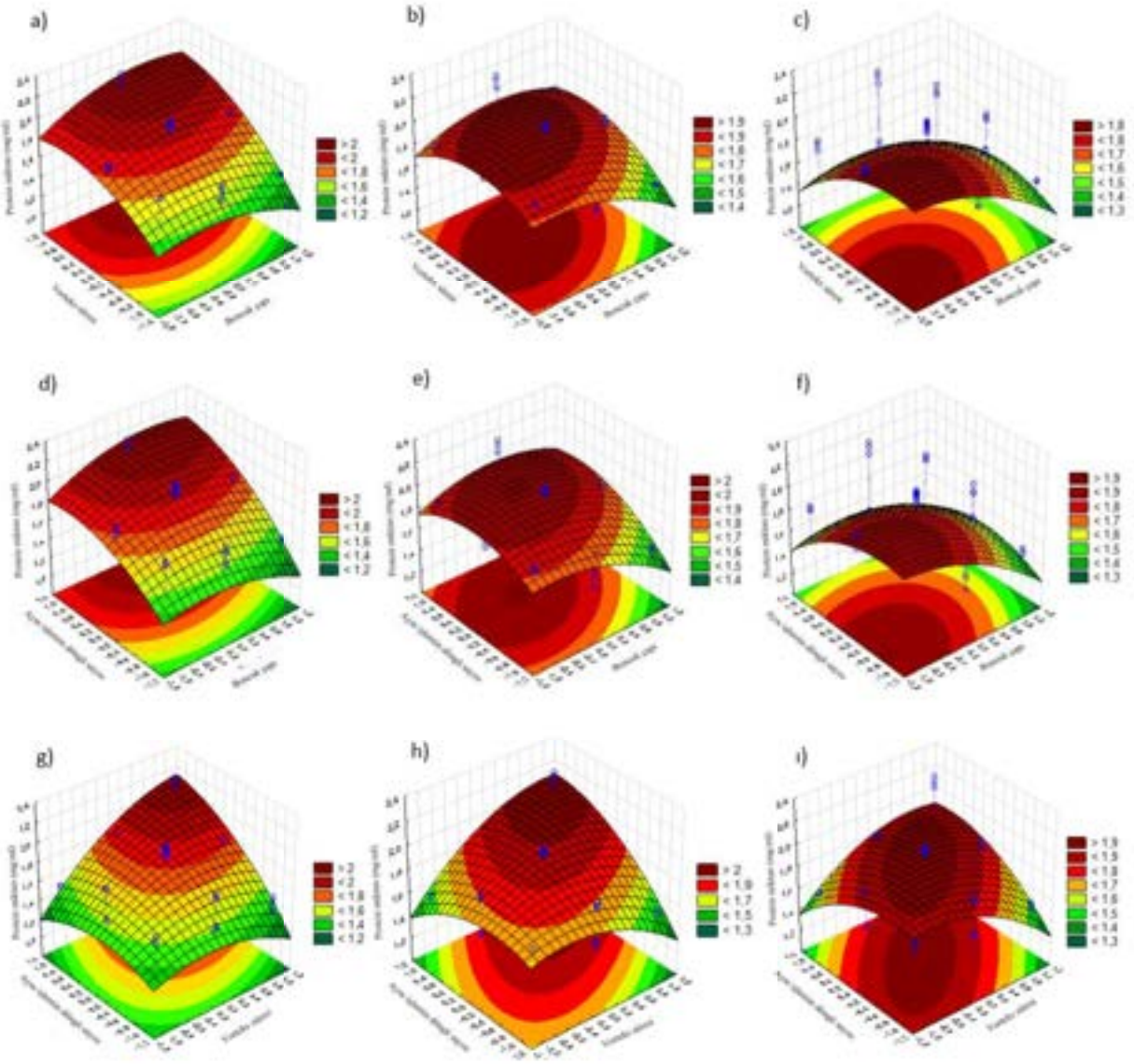
Şekil 4.48. Boncukla homjenizasyon yönteminin BB Pareto grafiği (2Lby3L: Boncuk çapı ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi, 1Lby2L: Boncuk çapı ile vorteks süresinin doğrusal etkileşimi, 1Lby3L: Boncuk çapı ile aynı işlemin döngü sayısının doğrusal etkileşimi)

Şekil 4.48'de ki kılavuz çizgi istatistiksel olarak önem sınırını ifade etmektedir. Bu grafikte fungal hücrelerin parçalanmasına bağlı olarak elde edilecek protein miktarını, boncuk çapı, vorteks süresi ve aynı işlemin döngü sayısının olumlu etkilediği görülmektedir. Vorteks süresi ile aynı işlemin döngü sayısı arasındaki etkileşim ise protein miktarını arttırıcı etki olarak görülmektedir. Vorteks süresinin karesel etkisi de protein miktarının arttırılmasında olumu etkiler sağlamaktadır. Boncuk çapının doğrusal etkisinin ise protein eldesinde olumsuz etkiye sahip olduğu görülmüştür. Boncuk çapı ile aynı işlemin döngü sayısının arasındaki doğrusal etkileşimler sonucunda en düşük olumlu etkinin alınabildiği görülmektedir. Vorteks süresi ile aynı işlemin döngü sayısının arasındaki doğrusal etkileşimler sonucunda ise protein eldesinde en yüksek olumlu etki elde edilmiştir.



Şekil 4.49. Boncukla ekstraksiyon yönteminde beklenen ve gözlenen değerler

Şekil 4.49'da gözlenen ve hesaplanan protein miktarları verilmiştir. Burada mavi noktaların (gözlenen değer) kırmızı çizgiye (beklenen değer) yakın olduğu, sonuçların çoğunluğunun birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Sonuçların daha iyi anlaşılması amacıyla, fungal ekstraktaki proteinin optimize ekstraksiyon koşullarının üç boyutlu tahmini modelleri Şekil 4.50' de sunulmuştur.



Şekil 4.50. Boncukla ekstraksiyon yöntemindeki önemli üç değişkenin cevap yüzey grafikleri (a-c: vorteks süresi üç seviyesi, d-f: boncuk çapı üç seviyesi, g-ı: Aynı işlemin döngü sayının üç seviyesi)

Elde edilen sonuçlara göre boncuk çapı ve vorteks süresinin fungal hücrelerin parçalanmasında en etkili parametrelerden biri olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.50'de görüldüğü üzere istatistiksel olarak protein miktarının 2,2 mg/ml üzerine çıkması mümkün görülmektedir. Yapılan istatistiksel optimizasyonlar ile protein miktarı PB tasarımında 2,070 mg/ml iken, BB tasarımında 2,140 mg/ml olarak elde edilmiştir.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden proteince zengin ekstrakt eldesi amacıyla üç farklı ekstraksiyon yöntemi istatistiksel tasarımlar kullanılarak optimize edilmiştir. Elde edilen

sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 4.42) uygulanan tüm yöntemler ile protein miktarının arttırıldığı görülmektedir. Bununla birlikte boncukla ekstraksiyon yönteminde en yüksek protein miktarına ulaşılmıştır. İkinci en yüksek protein miktarı ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemi ile elde edilirken, en düşük protein miktarı ise dondurma-çözdürme yönteminde bulunmuştur.

Çizelge 4.42. Ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

Protein miktarı (mg/ml)	**Atık *R. miehei* biyokütlesi**	**B-fungal ekstrakt**	**D-fungal ekstrakt**	**U-fungal ekstrakt**
Optimize edilmemiş koşullarda	0,153	-	-	-
PB optimizasyon sonrası	-	2,070	1,011	1,856
BB optimizasyon sonrası	-	2,140	1,807	2,008

Shehadul Islam vd. (2017) boncukla ekstraksiyon yöntemini kullanarak, maya ve bakteri gibi çeşitli hücre türlerinin parçalanarak, hücre içi moleküllerinin serbest hale getirilebildiğini bu hücre parçalama yönteminin verimliliğinin çok yüksek olduğunu bildirmiştir. Ancak boncuklar ve hücreler arasındaki çarpışma nedeniyle bu süreçte ısı üretimi meydana gelebilir ve bu yüksek ısı proteinleri denatüre edebilir. Aynı problem ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde de oluşmaktadır. Bu probleme rağmen test edilen yöntemlerden en çok protein miktarı boncukla ekstraksiyon ve ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilmiştir. Dondurma-çözdürme yönteminde ise fungal hücre duvarının diğer yöntemlere göre verimli şekilde parçalanmadığı düşünülmektedir. Johnson vd. (1994), *E. coli*' den rekombinant proteinlerin eldesinde dondurma-çözdürme döngülerini kullanarak yüksek oranda ayırabildiklerini göstermişlerdir. Dondurma-çözdürme yöntemi bakteriler ve mayalar için daha etkili bir yöntem olabileceği görülmüştür. Miselyal fungus hücrelerinin hücre duvarları daha sağlam yapıda olmasından kaynaklı istenilen verim elde edilemediği (Bowman ve Free, 2006) düşünülmektedir. Klimek-Ochab vd. (2011) tarafından, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhodotorula gracilis* olmak üzere üç farklı fungal organizmadan çözünebilir protein ve aktif glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eldesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Araştırıcılar, ultrasonikasyon, boncukla öğütme, kimyasal uygulanması, osmotik şok gibi bazı teknikler denemişlerdir. Maya ve küfler için en etkili yöntemin kimyasal uygulanması yerine mekanik parçalama olduğunu, en yüksek çözünebilir protein miktarlarına ise ultrasonikasyon ve boncukla öğütme uygulamasında ulaştıklarını bildirmişlerdir. Bu

veriler, çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden proteince zengin ekstrakt eldesi için optimize koşullarda ultrasonikasyonla ekstraksiyon uygulaması önerilmektedir.

4.3.2. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin karakterizasyonu

Atık *R. miehei* biyokütlesinin, mikrobiyolojik besiyerlerinde kullanılan pepton gibi pahalı olan hayvansal ürünler yerine alternatif azot kaynağı olarak kullanım potansiyelini ortaya koyabilmek için üç farklı mekanik hücre lizis yönteminin istatistiksel optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında optimize koşullarda üç farklı yöntemle elde edilen proteince zengin fungal ekstraktların karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır.

4.3.2.1. Toplam kül ve kuru madde miktarının belirlenmesi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U: Ultrasonikasyonla ekstraksiyon, B: Boncukla ekstraksiyon, D: Dondurma-çözdürme ile ekstraksiyon) elde edilen ekstraktların toplam kül ve kuru madde miktarları Çizelge 4.43'de verilmiştir. En yüksek toplam kül ve kuru madde miktarı D-fungal ekstraktta elde edilmiştir.

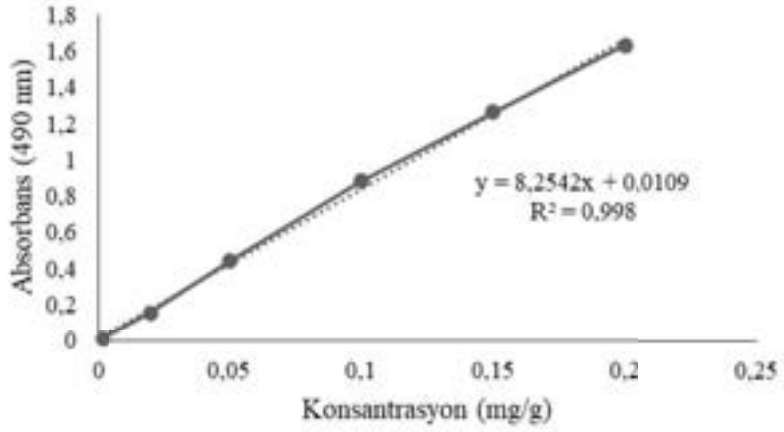
Çizelge 4.43. Toplam kül ve kuru madde miktarları

Bileşen	Toplam kül miktarı (%)	Toplam kuru madde miktarı (%)
Atık *R. miehei* biyokütlesi	9,90	21,52
U-fungal ekstrakt	8,77	25,16
D-fungal ekstrakt	8,16	26,02
B-fungal ekstrakt	9,05	21,77

4.3.2.2. Toplam şeker miktarının belirlenmesi

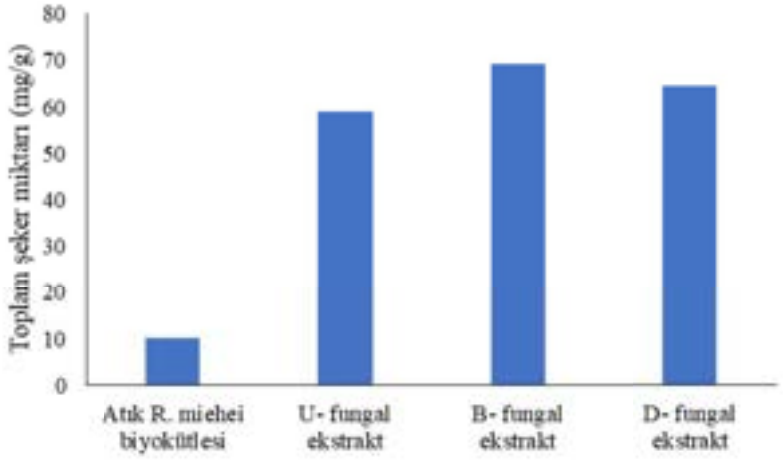
Mikroorganizmaların üremeleri için genellikle besiyerlerine karbon kaynakları (glikoz, laktoz vb.) ilave edilmektedir (Atlas, 2010). Bununla birlikte bazı proses atıklarından melas, peyniraltı suyu, mısır maserasyon suyu içerdikleri şeker, vitamin ve çeşitli elementleri nedeniyle kullanılmaktadırlar (Dhillon vd., 2007; Josh vd., 2008; Zhou vd., 2022). Bilindiği üzere protein içeren hammaddelere organik azot kaynakları da

denilmektedir. Organik azot kaynakları, sadece azot sağlamakla kalmaz, aynı zamanda büyük miktarda karbon da içerdikleri için karbon kaynağı olarakta kullanılabilirler. Bu çalışmada örneklerin toplam şeker miktarı FSA yöntemi ile belirlenmiştir. Standart olarak glikoz kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. Hesaplamalar oluşturulan standart eğriye göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.51). Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenlerinin toplam şeker miktarları (mg/g) Şekil 4.52' da verilmiştir.



Şekil 4.51. Glikoz ile oluşturulan standart eğri

Yapılan bu çalışma sonucunda en düşük toplam şeker miktarı herhangi bir ön işlem yapılmamış atık *R. miehei* biyokütlesinde elde edilmiştir (Şekil 4.52). En yüksek toplam şeker miktarı ise optimize koşullarda gerçekleştirilen B-fungal ekstraktta elde edilmiştir. Boncukla ekstraksiyonun, polisakkaritleri ve benzeri yapıları, hücre duvarından daha fazla ayırarak yüksek toplam şeker miktarı elde edildiği düşünülmektedir. En düşük toplam şeker miktarının ultrasonikasyonla ekstraksiyon yönteminde elde edilmiş olmasının ana nedeni ise yeterince hücre lizise uğrayamadığı için hücreye bağlı şeker bileşiklerinin katılarla birlikte uzaklaştırılması olabilir. Herhangi bir ön işlem yapılmamış atık *R. miehei* biyokütlesinden, yapılan tüm uygulamalar ile %50-60 aralığında şeker içeriği elde edilmiştir.

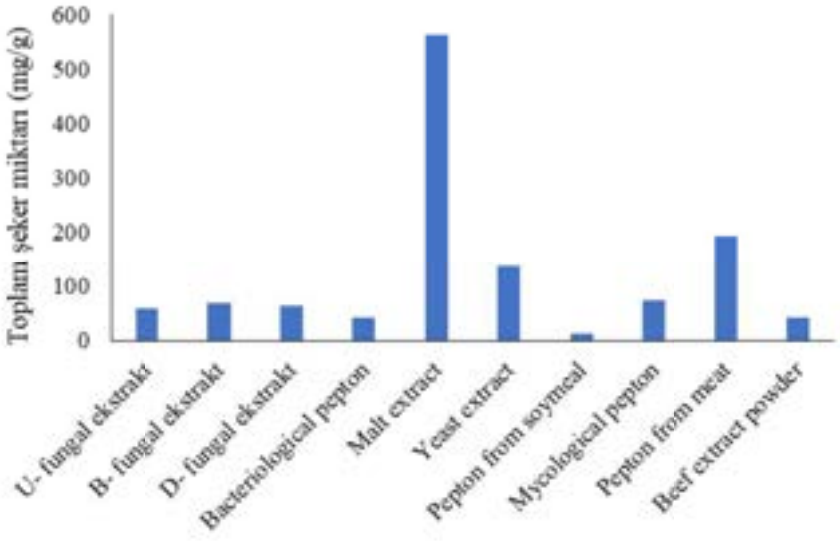


Şekil 4.52. Toplam şeker miktarları

Ticari olarak kullanılan bazı azot kaynaklarının toplam şeker miktarı da karşılaştırma yapabilmek için belirlenmiş (Şekil 4.53) ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır (Şekil 4.54). Bitkisel peptonun şeker içeriği, genellikle hayvansal proteinden daha yüksektir ve farklı hayvansal peptonların şeker içeriği de değişkenlik göstermektedir.



Şekil 4.53. FSA yönteminde meydana gelen renk değişimleri (1:Ultrasonikasyon, 2: Dondurma çözdürme, 3: Boncukla ekstraksiyon, 4: Bacteriological peptone, 5: Malt extract, 6: Yeast extract, 7: Beef extract powder, 8: Mycological pepton, 9: Peptone from soymeal, 10: Peptone from meat)



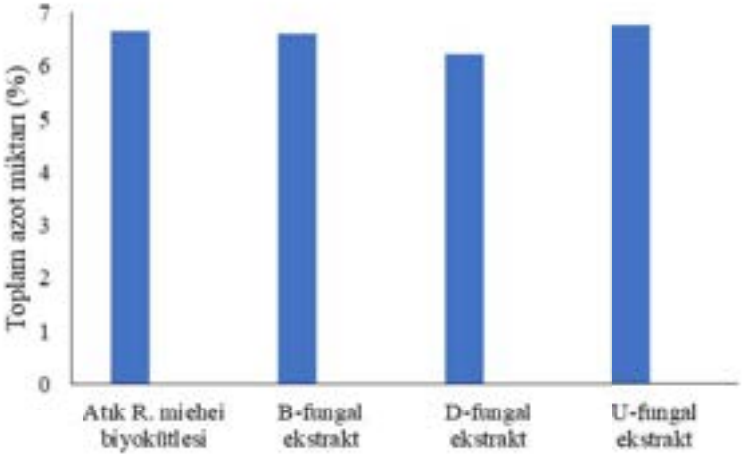
Şekil 4.54. Toplam şeker miktarlarının karşılaştırması

Şekil 4.54 incelendiğinde en yüksek toplam şeker miktarının malt ekstraktta olduğu görülmüştür. Bunu takiben pepton from meat ve yeast ekstrakttaki şeker miktarlarının da diğerlerine göre belirgin şekilde yüksek olduğu görülmektedir. En düşük toplam şeker miktarının ise pepton from soymealda olduğu belirlenmiştir. Malt extract azot kaynağının, bilinenin aksine şeker yönünden yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür (Merck, 2010). Genel olarak toplam şeker miktarlarında geniş bir dağılım olduğu görülmektedir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle elde edilen B-fungal ekstrakt, D-fungal ekstrakt ve U-fungal ekstraktın bacteriological pepton, beef extract powder azot kaynağından daha yüksek toplam şeker miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Atlas, 2010). Literatür incelendiğinde kazein peptonunun şeker içeriği %0,64, tavuk tüyü peptonunun şeker içeriği %0,76 iken balık peptonunun şeker içeriği %1,33' tür (Kurbanoğlu ve Kurbanoğlu, 2004; Taşkın ve Kurbanoğlu, 2011). Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle elde edilen B-fungal ekstrakt, D-fungal ekstrakt ve U-fungal ekstraktın şeker içeriği bakımından kullanımının uygun olduğu görülmüştür.

4.3.2.3. Toplam azot ve aminoasit içeriğinin belirlenmesi

Peptonlar esas olarak mikrobiyal üreme veya ürün sentezinde azot kaynağı sağlamak için bir besin bileşeni olarak kullanılır. Bu nedenle, azot içeriği, peptonların

önemli bir kalite değerlendirme indeksidir. Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinden, optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen azot kaynaklarının toplam azot miktarları Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.63' de verilmiştir. Toplam azot miktarları, birbirine yakın olmakla birlikte U-fungal ekstraktta %6,69, D-fungal ekstraktta %6,22 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar atık biyokütlede bulunan azot kaynaklarının ekstraktlara tamamen alınabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.55. Toplam azot miktarı sonuçları

Yüksek kaliteli hayvansal peptonun toplam azot miktarı %14,5'in üzerinde olmaktadır. Bitkisel peptonlarda ise şeker içeriklerinden dolayı azot miktarları (%8,5-10) daha düşüktür. Taşkın (2011), tavuk tüyü peptonunun azot miktarını %8,93 olarak bildirmiştir. Boso balığından elde edilen peptonun azot içeriği %10,8 olarak bulunmuştur (Priatni vd, 2017). Bu çalışmada, elde edilen azot miktarları, bitkisel peptonlarınkinden nispeten düşük bulunmuştur.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden, optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenlerinin aminoasit içerikleri Çizelge 4.44'te verilmiştir. Sonuçlar, elde edilen fungal ekstrakt bileşimlerinde mikrobiyolojik üreme için gerekli olan aminoasitlerin bulunduğunu göstermiştir. D-fungal ekstraktın en düşük protein miktarına (1,807 mg/ml) sahip olmasına rağmen, en yüksek aminoasit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük aminoasit içeriğine, atık *R. miehei* biyokütlesinin sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.44. Aminoasit kompozisyonları (g/100g)

Aminoasitler	Atık *R. miehei* biyokütlesi	B-fungal ekstrakt	D-fungal ekstrakt	U-fungal ekstrakt
Alanin	1,338	1,683	2,041	1,802
Arginin	0,469	0,340	0,403	0,348
Aspartik asit	1,423	2,307	2,799	2,361
Sistein	0,124	0,097	0,105	0,090
Glutamik asit	2,416	3,106	3,907	3,446
Glisin	0,830	1,231	1,424	1,386
Histidin	0,420	0,434	0,481	0,453
Lisin	0,573	0,709	0,814	0,733
Metiyonin	0,363	0,382	0,432	0,405
Ornitin	0,121	0,236	0,302	0,251
Fenilalanin	0,679	0,704	0,790	0,766
Prolin	1,199	1,493	1,848	1,621
Serin	0,998	1,203	1,538	1,214
Treonin	0,990	1,390	1,675	1,408
Tirozin	0,646	0,702	0,768	0,736
Valin	1,027	1,720	1,947	1,870
Taurin	0,028	0,030	0,033	0,032
Isolösin	0,856	1,440	1,716	1,486
Lösin	1,550	1,818	2,158	1,869

Glutamik asit ve aspartik asit diğer aminoasitlere göre daha fazla bulunan aminoasitlerdir. Kükürtlü aminoasitlerden sistin ve metiyonini, düşük miktarlarda içerdikleri tespit edilmiştir. En düşük bulunan aminoasit ise taurindir. Antioksidan özellikte olan sistein ve fenilalanin gibi aromatik aminoasitleri de içermektedirler. Yapılan bir çalışmada, tavuk tüyü peptonunun aminoasit içeriği bakımından (özellikle glutamik asit, glisin, alanin, serin ve valin) zengin olduğu bununla birlikte, metiyonin ve triptofan aminoasitlerini içermediği rapor edilmiştir (Taşkın, 2011). Bazı ticari peptonlara ait aminoasit kompozisyonlarına dair bilgiler Çizelge 4.45'de verilmiştir. Ticari peptonlarda glutamik asidin en fazla olduğu görülmektedir. Malt ekstrakta bulunan aminoasit miktarlarının elde edilen fungal ekstraktlardaki aminoasit miktarlarına yakın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte hayvansal ve bitkisel peptonlardan düşük miktarlarda aminoasit içerdikleri belirlenmiştir. Neredeyse tüm aminoasit çeşitlerinden olmasına karşın miktarları genele göre düşüktür.

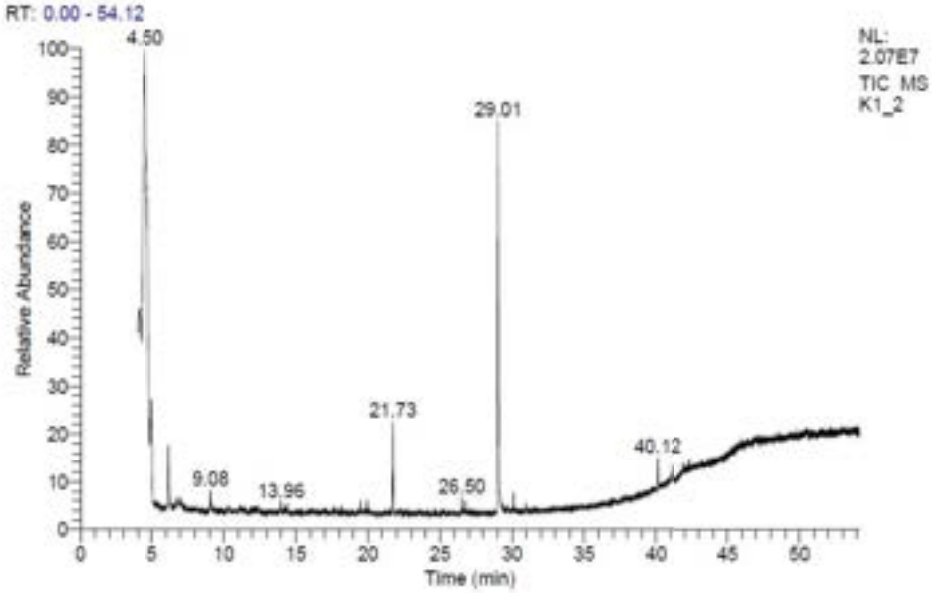
Çizelge 4.45. Bazı ticari peptonların aminoasit kompozisyonları (g/100g) (Merck, 2010)

	Merck Cat. No.	Alanine	Arginine	Aspartic Acid	Cystine	Glutamic acid	Glycine	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Methionine	Phenylalanine	Proline	Serine	Threonine	Tryptophane	Tyrosine	Valine
Peptones from Meat																			
Peptone from Meat (pancreatic)	1.07214.	6.00	4.10	6.80		10.20	8.90	1.80	2.80	5.40	5.40	1.20	3.20	4.70	3.10	2.80		1.00	4.60
Peptone from Meat (peptic)	1.07224.	5.70	4.00	6.90		12.30	7.30	2.50	3.30	6.50	7.60	1.50	3.90	5.90	2.90	3.00		1.10	5.60
Peptone from Poultry (peptic)	1.10245.	5.67	4.97	n.d.		10.90	9.66	1.33	1.99	3.99	4.35	0.79	1.97	5.57	2.37	2.30		0.89	2.50
Peptone from Gelatin (pancreatic)	1.07284.	6.25	5.50	6.50		12.40	13.90	1.52	2.60	4.70	5.20	1.30	2.80	10.00	3.40	2.40		0.70	4.35
Peptone Mixtures																			
Tryptose (tryptic)	1.10213.	3.40	3.20	6.90		17.20	2.80	2.40	4.50	7.40	6.80	1.20	4.20	6.90	3.70	3.20		1.40	5.60
Vegetable Peptone																			
Peptone from Soya (papainic)	1.07212.	2.90	4.20	7.20		13.20	2.90	1.90	3.00	5.20	4.60	0.80	3.40	4.20	3.40	2.50		1.30	4.60
Casein and other milk-derived Peptones																			
Casein hydrolysate, acid hydr.	1.02245.	2.00	2.20	4.40		12.50	1.20	1.80	2.40	3.40	5.60	1.20	2.50	6.10	2.70	2.20		0.60	3.90
Peptone from Casein (pancreatic)	1.11931.	3.10	3.10	6.30		18.40	1.80	2.30	4.10	8.00	6.80	2.30	4.10	9.20	4.40	3.60		2.00	5.30
Peptone from Casein (pancr.); Tryptone	1.07213.	3.10	3.20	6.90		18.50	3.20	2.90	4.90	8.10	7.60	2.40	4.90	9.00	4.10	3.30	1.50	1.50	8.10
Peptone from Casein (pancreatic)	1.02239.	2.55	3.05	6.35		17.40	1.85	2.70	4.25	7.15	6.45	2.35	4.05	8.35	4.20	3.40		1.95	5.10
Extracts																			
Meat Extract	1.03979.	5.40	3.80	7.50		9.60	7.40	1.90	3.00	6.00	7.00	0.90	3.70	4.30	3.00	3.00		1.20	4.80
Malt Extract	1.05391.	0.40	0.50	0.90		1.60	0.40	0.60	0.50	0.60	0.60	0.20	0.70	0.60	0.40	0.40		0.30	0.60
Yeast Extract	1.11926.	8.80	5.10	9.90	0.90	16.30	4.80	2.10	5.50	7.60	8.00	1.40	3.70	4.00	4.60	4.30	1.30	2.40	5.90
Yeast Extract	1.03753.	8.80	5.10	9.90		16.30	4.80	2.10	5.50	7.60	8.00	1.40	3.70	4.00	4.60	4.30		2.40	5.90

4.3.2.4. Yağ asidi içeriğinin belirlenmesi

Fungal hücreler, bitkisel yağlara benzer özelliklere sahip yüksek miktarda yağ biriktirebilirler (Vicente vd. 2009). Mayalar ve küfler doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol depolarlar. En fazla biriktirdikleri yağ asitleri C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 metil esterleridir (Meng vd., 2009). *Mucor circinelloides* fungusundan özellikle biyodizel kullanımı için çeşitli çözücülerle yağ asitleri ekstrakte edilmiştir. Yapılan bu çalışmada C18:1 (%37.1), C18:2 (%14.3), C18:3 (%18.5) yağ asitleri içerdiği rapor edilmiştir (Vicente vd., 2009). Bununla birlikte mikroorganizmaların gelişiminde kullanılan azot kaynaklarının düşük yağ içeriğine sahip olması önerilmektedir (Bridson 1995). Ancak kullanım alanına göre de yağ içermesi de gerekebilir. Örneğin, Sardalya (*Sardinella aurita*) balığından elde edilen peptonun *Bacillus subtilis*' in proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır (Ellouz vd., 2001). Yüksek yağ oranı içeren balık peptonunun, ticari peptonlara göre proteaz üretimini arttırdığı rapor edilmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden

optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenlerinin yağ asidi içerikleri türevlendirme yöntemi kullanılarak GC' de belirlenmiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinin GC kromatogramı Şekil 4.56'da, görülen piklerin tanımlamaları Çizelge 4.46' de verilmiştir. Atık R. miehei biyokütlesinde düşük miktarlarda propiyonik asit, oleik asit, gliserin, gibi çoklu doymamış yağ asitlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

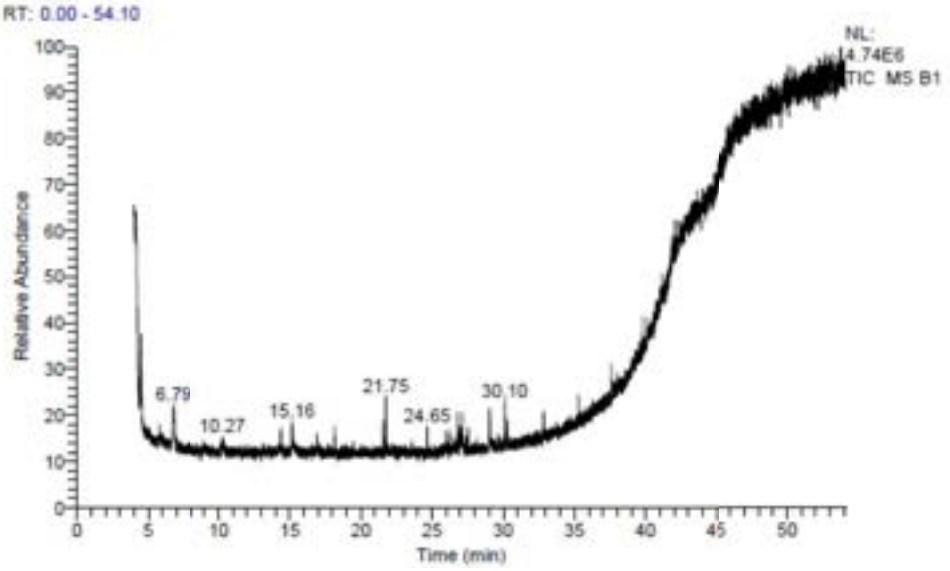


Şekil 4.56. Atık *R. miehei* biyokütlesinin GC kromatogramı

Çizelge 4.46. Atık *R. miehei* biyokütlesinin yağ asidi kompozisyonları

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
1	4.11	2.39	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester
2	4.50	55,92	1,3,5-Pentanetriol, 3-methyl
3	4.98	5,07	Cyclopentanol (Siklopentanol) (uçucu bileşen)
4	6,16	3,16	1,2,3-Propanetriol (gliserin)
5	6,97	0,64	8,11-Octadecadiynoic acid, methyl ester (Oleikasit)
6	9,08	1,13	Cyclododecanone, thiosemicarbazone (uçucu bileşen)
7	13,96	0,60	Propanoic acid, 2-oxo
8	19,49	0,54	9-Octadecenoic acid (Z)
9	19,94	0,63	Phosphorothioic acid
10	21,73	4,52	Benzaldehyde, 3,5-dimethyl (uçucu bileşen)
11	26,50	0,62	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)
12	26,77	0,55	13,16-Octadecadiynoic acid, methyl ester
13	29,01	18,60	1,2,3-Propanetriol (gliserin)
14	30,09	0,72	13,16-Octadecadiynoic acid, methyl ester
15	30,94	0,38	Hi-oleic safflower oil
16	40,12	1,32	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6, 9-diene-2,8-dione
17	41,15	0,93	Folic Acid

B-fungal ekstraktın GC kromatogramı Şekil 4.57' de, görülen piklerin tanımlamaları Çizelge 4.47' de verilmiştir. B-fungal ekstraktın, dekanoik asit (doymuş yağ asidi) oleik asit, glikolik asit, gliserin gibi yağ asitlerine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.57. B-fungal ekstrakt GC kromatogramı

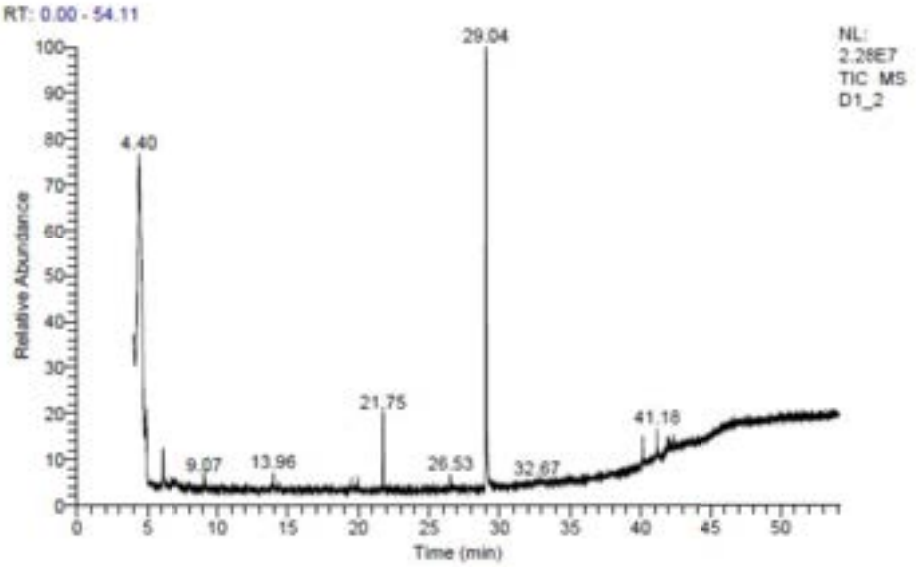
Çizelge 4.47. B-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
1	4,16	14,91	Decanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
2	4,47	13,32	1,3-Propanediol, 2-ethyl-2-(hydroxymethyl)
3	6,79	7,63	Norbornadiene-7-methanol
4	15,16	4,68	2H-Pyran, tetrahydro-2-(2,5-undecadiynyloxy)
5	18,16	3,40	2-Methylamino-1-phenylethanol
6	21,75	6,64	Oxirane, 2-Methyl-2-Phenyl
7	24,65	2.19	Androstane-11,17-dione, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, 17-[O-(phenylmethyl)oxime], (3à,5à)
8	26,79	3,51	13,16-Octadecadiynoic acid, methyl ester
9	26,95	2,64	Phenol, 4-(1-methyl-1-phenylethyl)
10	27,13	4,15	4a-Methyl-1-methylene-1,2,3,4,4a,9,10,1 0a-octahydrophenanthrene
11	27,54	2,40	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsil
12	29,03	4,60	5,7-Dodecadiyn-1,12-diol
13	30,11	4,96	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
14	30,27	1,66	2-Methylamino-1-phenylethanol
15	35,29	2,41	Glycine, N-[(3à,5à)-24-oxo-3-[(trimethylsilyl)oxy]cholan-24-yl]-, methyl ester
16	37,61	2.43	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsil yl)oxy]methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-

Çizelge 4.47. B-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları (devam)

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
17	39,79	2,25	Glycocholic Acid Methyl Ester TMS
18	42,06	4,66	7,12-Dihydro-6,7-bis(4-hydroxyphenyl)-6H-[1,2,4]triazolo[1',5':1,2]pyrimido[5,4-c]chromen-2-ol
19	53,43	3,14	9-Octadecenoic acid, (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl ester, cis

D-fungal ekstraktın GC kromatogramı Şekil 4.58'de, görülen piklerin tanımlamaları Çizelge 4.48' de verilmiştir. D-fungal ekstraktın, gliserin, heptanoik asit, linoleik asit, gibi yağ asitlerine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.58. D-fungal ekstrakt GC kromatogramı

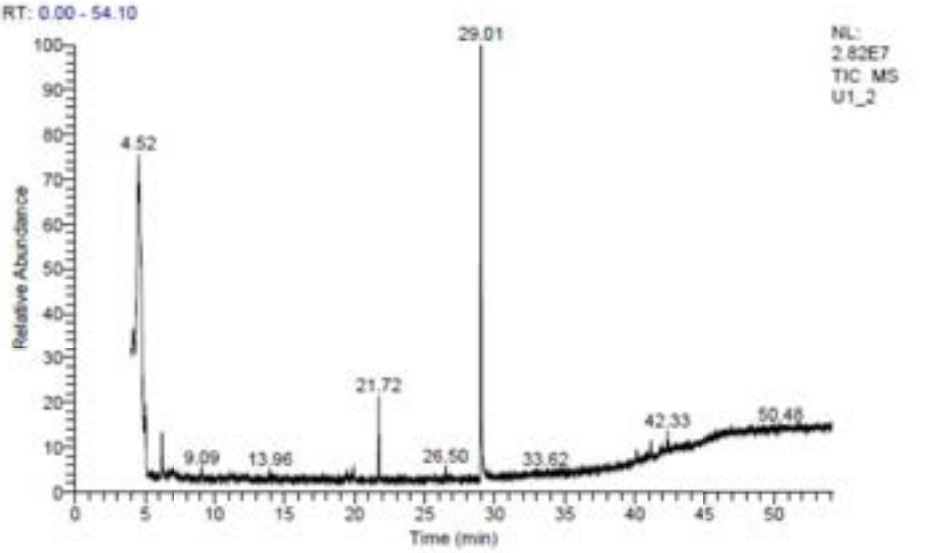
Çizelge 4.48. D-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
1	6,10	2,48	1,2,3-Propanetriol
2	6,69	0,55	1-[1-(2,2-Dichlorovinylimino)-2,2-dimethylpropyl]-3-(p-tolyl)thiourea
3	6,92	0,59	8,11-Octadecadiynoic acid, methyl ester
4	9,08	0,97	Cyclododecanone, thiosemicarbazone
5	13,97	1,19	Heptanoic acid
6	33,19	0,65	Oxiranecarboxamide, 2-ethyl-3-propyl-
7	19,97	0,72	Phosphorothioic acid, S-[2-(ethylsulfonyl)ethyl] O,O-dimethyl ester
8	21,75	4,65	Benzaldehyde, 3,5-dimethyl-
9	29,04	25,65	1,2,3-Propanetriol (gliserin)

Çizelge 4.48. D-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları (devam)

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
10	40,14	1,67	10-Heptadecen-8-ynoic acid, methyl ester, (E)- (CAS)
11	42,36	0,79	3,12-Oleandione

U-fungal ekstraktın GC kromatogramı Şekil 4.59'da, görülen piklerin tanımlamaları Çizelge 4.49'da verilmiştir.



Şekil 4.59. U-fungal ekstrakt GC/ kromatogramı

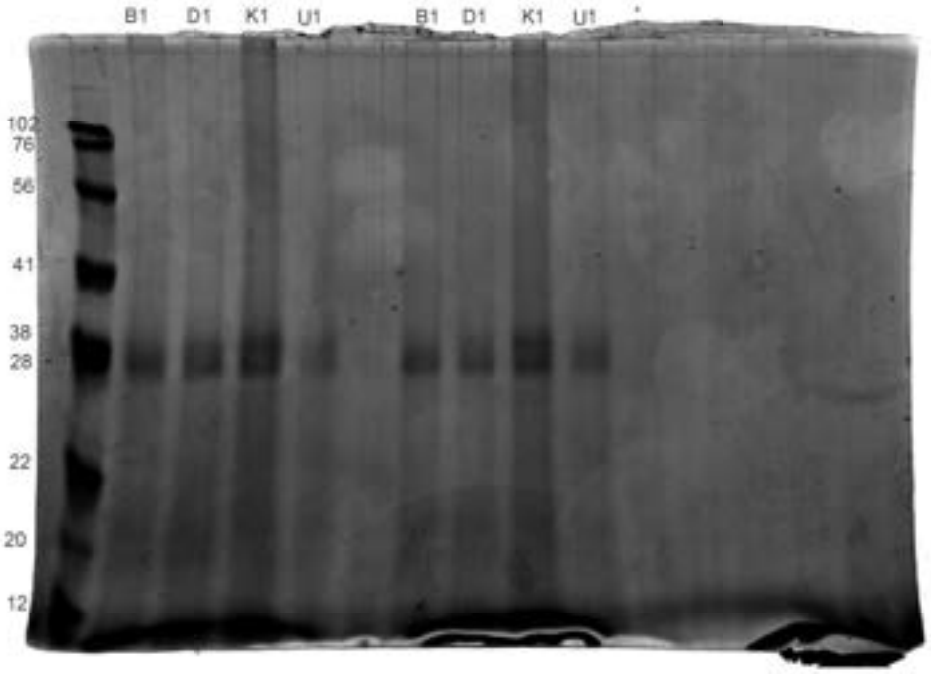
Çizelge 4.49. U-fungal ekstrakt yağ asidi kompozisyonları

Pik	Alıkonma zamanı (dk)	Yüzde alan	Yağ asidi
1	4,16	2,63	Propanoic acid, 2-methyl-, butyl ester
2	4,53	50,10	3,6,9,12,15-Pentaoxananadecan-1-ol
3	5,01	4,08	Cyclopentanol
4	6,18	2,65	1,2,3-Propanetriol (gliserin)
5	6,98	0,50	8,11-Octadecadiynoic acid, methyl ester
6	7,11	0,60	8,11-Octadecadiynoic acid, methyl ester
7	9,08	0,82	Acetic acid, mercapto-, 1,2-ethanediyl ester
8	13,95	0,85	Butanoic acid, 3-Methyl
9	19,93	0,76	Phosphoric acid, triethyl ester
10	29,01	25,20	1,2,3-Propanetriol (glycerin)
11	41,15	1,19	Folic Acid
12	41,89	0,38	9-Octadecenoic acid

U-fungal ekstraktın, gliserin, linoleik asit, bütonik asit, rinoleik asit gibi yağ asitlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Genel olarak incelendiğinde en zengin yağ asidine U-fungal ekstraktta rastlanmıştır. Tüm ekstraktlarda ortak olan (çoklu doymamış yağ asidi) linoleik asit ve gliserin olmuştur. Heptanoik asit, sadece D-fungal ekstraktta, dekanoik asit B-fungal ekstraktta, bütonik asit, rinoleik asit sadece U-fungal ekstraktta tespit edilmiştir.

4.3.2.5. Moleküler ağırlık dağılımının analizi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenlerindeki proteinlerin moleküler ağırlık dağılımları belirlenmiştir. SDS-PAGE tekniği ile elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.69' da verilmiştir.



Şekil 4.60. Proteinlerin moleküler ağırlık dağılımları (K: atık *R. miehei* biyokütle, B: boncukla ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen fungal ekstrakt, U: ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen fungal ekstrakt, D: Dondurma-çözdürme ile ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen fungal ekstrakt)

Şekil 4.69 incelendiğinde, aynı veya birbirine yakın molekül ağırlıkları olan bantların ayrımı çok net yapılamamaktadır. Tüm fungal ekstraktlarda belirgin bir şekilde seçilen 28-38 kDa ağırlıklı protein bandı öne çıkmaktadır. B, D, K fungal ekstraktlarında yoğun olmamakla birlikte 20 kDa protein bandı görülürken bu bant U-fungal ekstraktında

seçilememektedir. Tüm fungal ekstraktlarda 38kDa üstünde bant görülememiştir. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenlerindeki proteinlerin moleküler ağırlık dağılımları birbirine benzer bulunmuştur. Krishnaswamy vd. (2019) liyofilize *Aspergillus terreus, Sarocladium strictum, Cladosporium cladosporioides, Hortaea werneckii, Acremonium alternatum, Purpureocillium lilacinum, Penicillium citrinum, Engyodontium sp. Aspergillus flavus ve Pleurotus ostreatus* biyokütlelerinden yüksek kalitede maksimum protein elde etmek için farklı lizis yöntemleri ve çeşitli ekstraksiyon tamponları üzerine çalışma gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon sonrası proteinlerin dağılımını SDS-PAGE ile belirlemiştir. Genel olarak 14kDa ile 98kDa aralığında türler arası farklılaşan bantların olduğu rapor edilmiştir (Krishnaswamy vd., 2019). Balık atıklarından pepton eldesi üzerine yapılan çalışmalarda, protein hidrolizasyonu aşamasında proteinin düşük seviyede parçalandığını gösterilmiştir (Jaziri vd., 2020). Ticari soya fasulyesinden elde edilen soya peptonunun moleküler ağırlığının ≤6 kDa, boso balığından (*Oxyeleotris marmorata*) elde edilen peptonun moleküler ağırlık dağılımının 17-28 kDa olduğu bildirilmiştir (Priatni vd., 2016). Başka bir çalışmada test edilen tüm peptonların benzer moleküler ağırlık dağılımına sahip olduğu ve hepsinin %80'inden fazlası 1 kDa'nın altında, geri kalanının 10 kDa'nın altında olduğu bildirilmiştir. Bitkisel peptonlar, daha düşük moleküler ağırlıklarına sahip olmasıyla hücre gelişiminde daha etkilidirler (Davami vd., 2015). Bu çalışmada elde edilen fungal ekstraktların moleküler ağırlıklarının literatüre göre yüksek olduğu görülmüştür (Onah vd., 2017).

4.3.3. Elde edilen besiyeri bileşenlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen azot kaynakları içeren sıvı ve katı besiyerinde test mikroorganizmalarının üremelerine etkileri araştırılmıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol olarak bakteriler için TSB, mayalar için SDB, küfler için PDB besiyerleri kullanılmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenleri ile 7 farklı ticari azot kaynağı ile karşılaştırılmıştır.

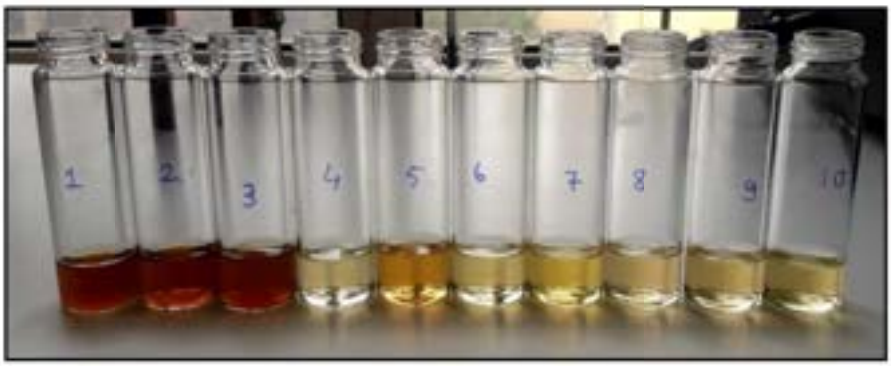
4.3.3.1. Sıvı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması

Mikroplakalara yüklenmesi için hazırlanan besiyerlerinin otoklav öncesi ve sonrası pH değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.50). Otoklav öncesi pH ölçümü yapıldıktan sonra pH ayarlaması yapılarak steril edilmiştir. Otoklav sonrası elde edilen besiyerlerinin renk görünümleri Şekil 4.61'de verilmiştir.

Çizelge 4.50. Farklı besiyeri bileşenleri ile hazırlanan besiyeri pH değerleri

Kod	Test edilen besiyeri bileşenleri (%1)	Otoklav öncesi pH	Otoklav sonrası pH
1	Ultrasonikasyonla ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiş fungal ekstrakt (U)	6,53	6,94
2	Dondurup çözdürme yöntemiyle elde edilmiş fungal ekstrakt (D)	6,39	6,75
3	Bocukla ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiş fungal ekstrakt (B)	6,47	7,10
4	Bacteriological peptone (Hmedia)	6,42	7,18
5	Malt extract (Merck)	5,63	7,11
6	Yeast extract (Merck)	6,74	6,99
7	Beef extract powder (Acumedia)	6,40	7,17
8	Mycological pepton (LabM)	4,80	6,91
9	Peptone from soymeal (Merck)	6,17	7,08
10	Peptone from meat (Merck)	6,46	7,04
11	Triptik soy broth (Merck)	7,64	7,07
12	Sabouraud dextrose broth (Merck)	5,90	5,6
13	Potato dekstroz broth (PDB)	5,57	5.1

Malt extract ve mycological pepton ile hazırlanan besiyerlerinin otoklav öncesi pH değerleri düşüktür. Diğer bileşenlerle hazırlanan besiyerlerinin pH değerleri 6,17-6,74 aralığındadır.

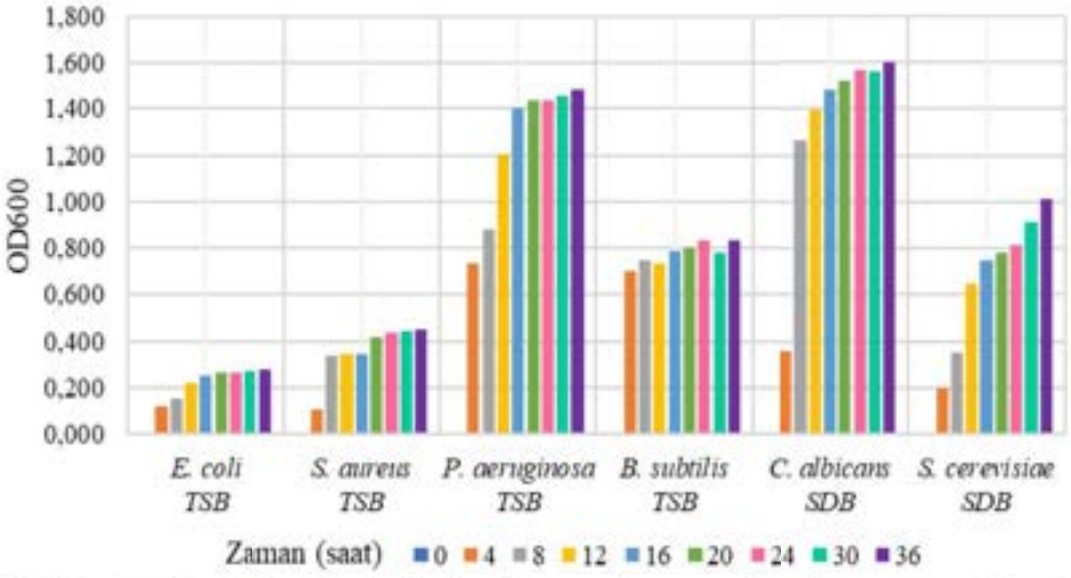


Şekil 4.61. Otoklav sonrası besiyerlerinin (%1 konsantrasyonlarında) görünümü (1:U-fungal ekstrakt, 2: D-fungal ekstrakt, 3: B-fungal ekstrakt, 4: Bacteriological peptone,

5: Malt extract, 6: Yeast extract, 7:Beef extract powder, 8: Mycological pepton, 9: Peptone from soymeal, 10:Peptone from meat)

Azot kaynaklarının uygun konsantrasyonda kullanılması mikroorganizmaların başarılı biçimde üremesi için oldukça önemlidir. Uygun olmayan konsantrasyonlar mikroorganizma gelişimini baskılayıcı veya durdurucu etkiye neden olabilirler (Kurbanoğlu ve Kurbanoğlu, 2002; Safari vd., 2011). Bu çalışmada, seçilen test mikroorganizmaları için her azot kaynağının farklı konsantrasyonları (%1, 2 ve 3) araştırılmıştır. Test edilen konsantrasyonlarda pH değişimi çok olmamış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bakteri ve mayaların çalışmaları mikroplakalarda gerçekleştirilmiştir. Başlangıç (0. saat), 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30 ve 36. saatlerde mikroplaka okuyuculara 600 nm de bulanıklık ölçümü yapılmıştır.

Standart olarak kullanılan besiyerlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi Şekil 4.62'de verilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda test miroorganizmalarının üreyebilir ve aktif olduklarının da kontrolü olmuştur. İnkübasyon süreci (36 saat) açısından değerlendirildiğinde *E. coli* ve *S. aureus*' a göre *P. aeruginosa*' nın TSB'de üreme hızının en yüksek olduğu görülmektedir. *B. subtilis*'in ilk 4 saatte hızlı çoğaldığı, daha sonra üreme hızının yavaşladığı belirlenmiştir. Tüm test mikroorganizmalarında 16. saatten sonra üreme hızının düştüğü görülmektedir. Mayalar kendi içinde değerlendirildiğinde *C. albicans'* ın üreme hızının *S. cerevisiae* 'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.62. Standart kullanılan besiyerlerinin test mikroorganizmalarının üremesine etkisi

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenleri *E. coli*'ye karşı toksik etki göstermemiştir. On farklı azot kaynağının üç farklı konsantrasyonun (%1, %2, %3) *E. coli*' nin zamana bağlı üremesine etkisi Çizelge 4.51'de sunulmuştur. Bakterilerin üreme hızının yüksek olması özellikle klinik çalışmalarda erken tanı için önem arz etmektedir. Çalışma bu açıdan değerlendirildiğinde %1'lik konsantrasyonda beef extract powder öne çıkmaktadır. Bunu yeast ekstrakt ve mycological pepton takip etmektedir.

Çizelge 4.51. *E. coli*'nin üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri (absorbans)

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,304	0,349	0,352	0,367	0,642	0,672	0,708	0,743
	D-fungal ekstrakt	0,034	0,044	0,051	0,051	0,035	0,065	0,041	0,076
	B-fungal ekstrakt	0,091	0,205	0,217	0,226	0,232	0,262	0,283	0,318
	Bacteriological pepton	0,05	0,07	0,07	0,046	0,046	0,1011	0,131	0,144
	Malt extract	0,099	0,187	0,212	0,216	0,254	0,284	0,296	0,391
	Yeast extract	0,129	0,289	0,295	0,299	0,795	0,825	0,88	0,915
	Beef extract powder	0,078	0,1	0,144	0,17	0,428	0,458	0,461	0,496
	Mycological pepton	0,163	0,26	0,265	0,333	0,368	0,398	0,372	0,407
	Pepton from soymeal	0,027	0,028	0,014	0,039	0,051	0,081	0,06	0,095
	Pepton from meat	0,244	0,306	0,314	0,329	0,407	0,437	0,387	0,422
%2	U-fungal ekstrakt	0,028	0,15	0,12	0,123	0,159	0,189	0,161	0,196
	D-fungal ekstrakt	0,083	0,124	0,127	0,136	0,147	0,177	0,175	0,21
	B-fungal ekstrakt	0,034	0,159	0,175	0,211	0,234	0,364	0,392	0,487
	Bacteriological pepton	0,018	0,045	0,14	0,211	0,308	0,305	0,419	0,416
	Malt extract	0,137	0,226	0,241	0,283	0,378	0,408	0,488	0,493
	Yeast extract	0,142	0,818	0,84	0,951	1,123	1,153	1,211	1,246
	Beef extract powder	0,149	0,152	0,213	0,25	0,355	0,385	0,398	0,433
	Mycological pepton	0,132	0,223	0,222	0,261	0,31	0,34	0,28	0,315
	Pepton from soymeal	0,131	0,138	0,197	0,212	0,273	0,293	0,371	0,396
	Pepton from meat	0,229	0,267	0,268	0,278	0,316	0,346	0,392	0,427
%3	U-fungal ekstrakt	0,104	0,2	0,217	0,285	0,347	0,377	0,383	0,395
	D-fungal ekstrakt	0,035	0,045	0,048	0,06	0,09	0,139	0,141	0,176
	B-fungal ekstrakt	0,017	0,02	0,016	0,005	0,095	0,125	0,12	0,155
	Bacteriological pepton	0,033	0,03	0,115	0,185	0,181	0,251	0,243	0,268
	Malt extract	0,201	0,202	0,212	0,259	0,258	0,288	0,287	0,322
	Yeast extract	0,083	0,162	0,291	0,377	0,734	0,764	0,782	0,817
	Beef extract powder	0,14	0,153	0,236	0,278	0,367	0,397	0,399	0,447
	Mycological pepton	0,189	0,481	0,504	0,55	0,62	0,65	0,653	0,658
	Pepton from soymeal	0,096	0,114	0,118	0,191	0,198	0,288	0,291	0,304
	Pepton from meat	0,255	0,267	0,289	0,331	0,412	0,442	0,518	0,553

E. coli en düşük üreme hızını D-fungal ekstraktın %1 konsantrasyonunda göstermiştir. Test edilen %2' lik konsantrasyonda ise mycological pepton öne çıkmaktadır. Bunu yeast ekstrakt ve pepton from meat takip etmektedir. D-fungal ekstraktın %2

konsantrasyonunda, *E. coli* en düşük üreme hızını göstermiştir. Royce vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada spesifik olarak, heksanoik (C6), oktanoik (C8) ve dekanoik asitler (C10) gibi kısa zincirli yağ asitleri tarafından *E. coli*'nin inhibe olabildiği bildirilmiştir. Bu nedenle elde edilen fungal ekstraktlardaki yağ asitlerinin *E. coli*'nin üremesini yavaşlattığı düşünülmektedir. Test edilen %3'lük konsantrasyonda mycological pepton öne çıkmaktadır. Bunu yeast ekstrakt ve pepton from meat takip etmektedir. D-fungal ekstraktın %3 konsantrasyonunda, *E. coli* en düşük üreme hızını göstermiştir. Üç farklı konsantrasyondaki azot kaynaklarının *E. coli* sonuçları değerlendirildiğinde, konsnatrasyon arttıkça genel olarak üreme hızının arttığı görülmüştür. En iyi ticari azot kaynakları yeast extract, mycological pepton olarak belirlenmiştir. U-fungal ekstraktın ise *E.coli*'nin üremesini en az pepton from meat azot kaynağı kadar desteklediği tespit edilmiştir. Yapılan istatiksel analiz sonucunda, test edilen bileşenlerin konsantrasyonları arttıkça *E.coli*'nin üremesini arttırıcı yönde etki yaptığı görülmüştür ($p<0,001$). D-fungal ekstrakt, mycological pepton alternatifi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte *E.coli*'nin üremesinde en yüksek olumlu etkiyi U-fungal ekstrakt göstermektedir.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden optimize edilmiş üç farklı yöntemle (U, B, D) elde edilen besiyeri bileşenleri *S. aureus*'a karşı toksik etki göstermemiştir. (%1, %2, %3) On farklı azot kaynağının üç farklı konsantrasyonunun *S. aureus*'un zamana bağlı üremesine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.52'de sunulmuştur. %1'lik konsantrasyonda mycological pepton ve pepton from meat öne çıkmaktadır. Bunu D-fungal ekstrakt ve U-fungal ekstrakt takip etmektedir. *S. aureus* en düşük üreme hızını bacteriological peptonun %1 konsantrasyonunda göstermiştir. *S. aureus* pepton from soymeal varlığında 8. saatten itibaren çoğalmaya başlamıştır. İlk 4 saatte, U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt, malt extract ve pepton from meat içeren besiyerlerinde *S. aureus* üremeye başlamıştır. Test edilen %2'lik konsantrasyonda yeast ekstrakt, mycological pepton ve pepton from meat öne çıkmaktadır. Bunu pepton from soymeal ve U-fungal ekstrakt takip etmektedir. *S. aureus* en düşük üreme hızını bacteriological peptonun %2 konsantrasyonunda, göstermiştir. %3'lük konsantrasyonda ise aynı şekilde yeast ekstrakt, mycological pepton ve pepton from meat öne çıkmaktadır.

Konsantrasyonun artması ile birlikte tüm besiyerlerinde *S. aureus*' ın çoğalması artmıştır. Üç farklı konsantrasyondaki azot kaynaklarının *S. aureus* üremesine ait sonuçları değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça genel olarak üreme hızının arttığı görülmüştür.

En iyi ticari azot kaynakları yeast extract, mycological pepton ve pepton from meat olarak belirlenmiştir. B-fungal ekstraktın *S. aureus*' un üremesini en az pepton from soymeal kadar desteklediği tespit edilmiştir. D-fungal ekstrakt, mycological pepton alternatifi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte pepton from meat, *S. aureus*'un üremesinde en yüksek olumlu etkiyi göstermektedir. U-fungal ekstrakt, diğer ekstraktlara göre (B, D) *E. coli*' de olduğu gibi *S. aureus*' un gelişimine olumlu etki yapmıştır.

Çizelge 4.52. *S. aureus*'un üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri (absorbans)

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,08	0,38	0,55	0,63	0,67	0,69	0,71	0,72
	D-fungal ekstrakt	0,03	0,06	0,22	0,51	0,60	0,62	0,71	0,72
	B-fungal ekstrakt	0,12	0,22	0,21	0,37	0,48	0,50	0,79	0,80
	Bacteriological pepton	0,02	0,01	0,11	0,30	0,37	0,39	0,48	0,49
	Malt extract	0,12	0,10	0,11	0,12	0,11	0,13	0,13	0,14
	Yeast extract	0,13	0,73	0,98	1,12	1,15	1,17	1,23	1,24
	Beef extract powder	0,07	0,40	0,53	0,58	0,61	0,63	0,61	0,62
	Mycological pepton	0,06	0,19	0,43	0,79	0,97	0,99	1,06	1,07
	Pepton from soymeal	0,00	0,01	0,11	0,34	0,58	0,60	0,63	0,64
	Pepton from meat	0,24	0,37	0,73	1,13	1,31	1,33	1,32	1,33
%2	U-fungal ekstrakt	0,09	0,16	0,16	0,20	0,25	0,27	0,30	0,31
	D-fungal ekstrakt	0,01	0,10	0,11	0,21	0,32	0,32	0,65	0,66
	B-fungal ekstrakt	0,07	0,10	0,10	0,13	0,16	0,18	0,29	0,30
	Bacteriological pepton	0,03	0,21	0,33	0,46	0,50	0,52	0,58	0,59
	Malt extract	0,08	0,09	0,07	0,11	0,13	0,15	0,14	0,15
	Yeast extract	0,09	0,98	1,14	1,23	1,23	1,25	1,30	1,31
	Beef extract powder	0,04	0,31	0,42	0,49	0,52	0,54	0,54	0,55
	Mycological pepton	0,15	0,77	0,97	1,08	1,14	1,16	1,12	1,13
	Pepton from soymeal	0,12	0,14	0,35	0,66	0,83	0,85	0,77	0,78
	Pepton from meat	0,18	0,42	0,98	1,15	1,27	1,29	1,28	1,29
%3	U-fungal ekstrakt	0,03	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,24	0,25
	D-fungal ekstrakt	0,07	0,14	0,17	0,19	0,21	0,21	0,24	0,25
	B-fungal ekstrakt	0,04	0,10	0,11	0,11	0,14	0,16	0,19	0,20
	Bacteriological pepton	0,04	0,06	0,20	0,44	0,53	0,55	0,67	0,68
	Malt extract	0,06	0,12	0,15	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19
	Yeast extract	0,10	0,77	1,07	1,18	1,18	1,20	1,25	1,26
	Beef extract powder	0,09	0,29	0,39	0,43	0,47	0,49	0,50	0,51
	Mycological pepton	0,17	0,92	1,05	1,14	1,18	1,20	1,17	1,18
	Pepton from soymeal	0,11	0,66	0,82	0,92	0,99	1,01	0,91	0,92
	Pepton from meat	0,20	0,37	1,18	1,37	1,48	1,50	1,52	1,53

Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen alternatif azot kaynakları *P. aeruginosa*'ya karşı toksik etki göstermemiştir. Ekstrakte edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının *P. aeruginosa*'nın üremesine zamana bağlı etkisi Çizelge 4.53'de sunulmuştur. Test edilen %1'lik konsantrasyonda

yeast extract ve B-fungal ekstrakt öne çıkmaktadır. Bunu pepton from soymeal ve U-fungal ekstrakt takip etmektedir. *P. aeruginosa* en düşük üreme hızı bacteriological peptonun %1 konsantrasyonunda elde edilmiştir. Test edilen %2'lik konsantrasyonda yeast ekstrakt ve mycological pepton öne çıkmaktadır (Şekil 4.79). Bunu pepton from soymeal ve D-fungal ekstrakt takip etmektedir. *P. aeruginosa* en düşük üreme hızını U-fungal ekstraktın %2 konsantrasyonunda göstermiştir. %3' lük konsantrasyonda ise aynı şekilde yeast ekstrakt ve U-fungal ekstrakt öne çıkmaktadır. Üç farklı konsantrasyondaki azot kaynaklarının P. aeruginosa üremesine etkisine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça genel olarak üreme hızının arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.53. *P. aeruginosa*'nın üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri (absorbans)

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,10	0,55	0,89	1,15	1,22	1,23	1,23	1,31
	D-fungal ekstrakt	0,09	0,27	0,52	0,76	0,84	0,85	0,89	0,90
	B-fungal ekstrakt	0,22	0,65	0,95	1,17	1,23	1,24	1,24	1,24
	Bacteriological pepton	0,04	0,13	0,37	0,58	0,60	0,61	0,65	0,67
	Malt extract	0,12	0,10	0,11	0,21	0,33	0,34	0,69	0,77
	Yeast extract	0,30	0,56	1,17	1,25	1,38	1,38	1,38	1,40
	Beef extract powder	0,04	0,17	0,76	0,80	0,82	0,83	0,89	0,90
	Mycological pepton	0,03	0,39	0,80	1,07	1,09	1,10	1,10	1,17
	Pepton from soymeal	0,54	0,66	0,88	1,10	1,24	1,25	1,29	1,30
	Pepton from meat	0,27	0,36	0,44	0,52	0,62	0,63	0,63	0,63
%2	U-fungal ekstrakt	0,13	0,30	0,70	0,99	1,22	1,23	1,23	1,30
	D-fungal ekstrakt	0,22	0,34	0,69	1,03	1,10	1,11	1,16	1,16
	B-fungal ekstrakt	0,16	0,50	0,82	1,14	1,21	1,22	1,31	1,32
	Bacteriological pepton	0,04	0,21	0,57	0,74	0,76	0,77	0,80	0,88
	Malt extract	0,18	0,38	0,65	0,87	0,91	0,92	0,92	0,95
	Yeast extract	0,13	0,54	1,25	1,36	1,43	1,44	1,43	1,51
	Beef extract powder	0,03	0,21	0,83	0,91	0,92	0,93	0,94	1,00
	Mycological pepton	0,13	0,33	0,79	1,08	1,13	1,13	1,20	1,24
	Pepton from soymeal	0,62	0,66	0,91	1,16	1,16	1,16	1,17	1,18
	Pepton from meat	0,24	0,30	0,32	0,61	0,75	0,76	0,77	0,85
%3	U-fungal ekstrakt	0,07	0,14	0,38	0,81	0,88	0,89	0,89	0,89
	D-fungal ekstrakt	0,08	0,16	0,70	0,79	0,81	0,82	0,83	0,83
	B-fungal ekstrakt	0,09	0,10	0,16	0,22	0,23	0,24	0,24	0,26
	Bacteriological pepton	0,11	0,21	0,63	0,87	0,87	0,88	0,89	0,90
	Malt extract	0,20	0,49	0,78	1,02	1,10	1,11	1,18	1,19
	Yeast extract	0,11	0,42	1,21	1,54	1,60	1,57	1,58	1,58
	Beef extract powder	0,06	0,12	0,67	0,76	0,73	0,74	0,75	0,76
	Mycological pepton	0,22	0,52	0,96	1,14	1,23	1,24	1,34	1,36
	Pepton from soymeal	0,46	0,62	0,99	1,21	1,22	1,23	1,26	1,27
	Pepton from meat	0,13	0,16	0,28	0,65	0,80	0,81	0,86	0,94

En iyi ticari azot kaynakları yeast extract, mycological pepton ve pepton from soymeal olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'nın üremesini en az B-fungal ekstraktın desteklediği tespit edilmiştir. D-fungal ekstrakt ve U-fungal ekstrakt, *P. aeruginosa*'nın üremesinde en yüksek olumlu etkiyi göstermektedir. Bilindiği üzere *Pseudomonas aeruginosa*, piyosiyanin (mavi-yeşil) pigmenti üretebilir. Pigment üretimi, kültür koşullarına bağlı olduğundan pigment üretimlerini arttırmak için çeşitli özel besiyerleri geliştirilmiştir (Akoğlu, 2006). Bu çalışmada kullanılan bazı besiyerlerinde de yeşil renk oluşumu gözlenmiştir. İnkübasyonun 12. saatinden sonra 16. saatinde bacteriological peptonun %1'lik konsantrasyonunda, pepton from soymeal ve mycological peptonun %1 ve 2'lik konsantrasyonlarında yeşil renk oluşumu görülmüştür. Test edilen U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt besiyerlerinin rengi koyu kahverengi olduğu için yeşil renk oluşumu tespit edilememiştir. Yeşil renk oluşumu test edilen diğer azot bileşenlerini (malt extract, yeast extract, beef extract powder, pepton from meat) içeren besiyerlerinde inkübasyon süresi boyunca görülmemiştir.

Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen besiyeri bileşenleri *B. subtilis'e* karşı da toksik etki göstermemiştir. Azot kaynaklarının *B. subtilis*'in üremesine zamana bağlı olarak etkisi Çizelge 4.54'de sunulmuştur. Test edilen %1'lik konsantrasyonda yeast extract ve B-fungal ekstrakt öne çıkmaktadır. Bunu pepton from soymeal ve beef extract powder takip etmektedir. Malt ekstraktın %1 konsantrasyonunda, *B. subtilis* en düşük üreme hızını göstermiştir. Test edilen %2'lik konsantrasyonda yeast ekstrakt ve pepton from soymeal öne çıkmaktadır. Bunu B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt takip etmektedir. Mycological peptonun %2 konsantrasyonunda, *B. subtilis* en düşük üreme hızını göstermiştir. %3'lük konsantrasyonda ise aynı şekilde yeast ekstrakt ve pepton from soymeal öne çıkmaktadır. Üç farklı konsantrasyondaki azot kaynaklarının *B. subtilis* sonuçları değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça genel olarak üreme hızının da arttığı görülmüştür. En iyi ticari azot kaynakları yeast extract ve pepton from soymeal olarak belirlenmiştir. Yapılan istatiksel analiz sonucunda, test edilen bileşenlerin konsantrasyonları arttıkça *B. subtilis'* in üremesini arttırıcı yönde etki yaptığı görülmüştür ($p<0,001$). B-fungal ekstraktın *B. subtilis*'in üremesini en az desteklediği tespit edilmiştir. D-fungal ekstrakt ve U-fungal ekstrakt, *B. subtilis*'in üremesinde en yüksek olumlu etkiyi göstermektedir.

Çizelge 4.54. *B. subtilis*'in üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,02	0,02	0,07	0,19	0,23	0,25	0,29	0,40
	D-fungal ekstrakt	0,11	0,15	0,16	0,20	0,23	0,25	0,25	0,34
	B-fungal ekstrakt	0,07	0,15	0,16	0,19	0,20	0,22	0,29	0,39
	Bacteriological pepton	0,09	0,10	0,15	0,22	0,26	0,34	0,36	0,36
	Malt extract	0,11	0,19	0,20	0,23	0,29	0,30	0,39	0,39
	Yeast extract	0,16	0,33	0,37	0,43	0,49	0,51	0,59	0,59
	Beef extract powder	0,04	0,15	0,15	0,16	0,18	0,19	0,26	0,30
	Mycological pepton	0,08	0,12	0,13	0,15	0,29	0,31	0,36	0,36
	Pepton from soymeal	0,38	0,42	0,48	0,48	0,54	0,56	0,59	0,60
	Pepton from meat	0,32	0,36	0,37	0,38	0,43	0,44	0,44	0,50
%2	U-fungal ekstrakt	0,11	0,13	0,15	0,31	0,57	0,69	0,87	0,97
	D-fungal ekstrakt	0,12	0,22	0,24	0,27	0,45	0,67	0,85	0,95
	B-fungal ekstrakt	0,13	0,16	0,17	0,21	0,26	0,28	0,36	0,56
	Bacteriological pepton	0,05	0,12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,18	0,27
	Malt extract	0,10	0,19	0,25	0,28	0,30	0,31	0,43	0,53
	Yeast extract	0,13	0,35	0,50	0,66	0,75	0,77	0,78	0,79
	Beef extract powder	0,05	0,12	0,16	0,18	0,25	0,26	0,31	0,39
	Mycological pepton	0,15	0,20	0,21	0,24	0,28	0,30	0,39	0,39
	Pepton from soymeal	0,41	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,52	0,59
	Pepton from meat	0,17	0,26	0,27	0,30	0,36	0,38	0,38	0,38
%3	U-fungal ekstrakt	0,08	0,19	0,41	0,68	0,78	0,80	0,93	0,97
	D-fungal ekstrakt	0,05	0,10	0,14	0,20	0,29	0,29	0,36	0,36
	B-fungal ekstrakt	0,13	0,14	0,16	0,21	0,25	0,27	0,42	0,63
	Bacteriological pepton	0,04	0,14	0,23	0,44	0,52	0,54	0,56	0,59
	Malt extract	0,11	0,34	0,34	0,38	0,40	0,42	0,48	0,50
	Yeast extract	0,09	0,22	0,26	0,31	0,33	0,35	0,47	0,50
	Beef extract powder	0,03	0,09	0,11	0,13	0,13	0,13	0,15	0,25
	Mycological pepton	0,12	0,25	0,25	0,29	0,36	0,38	0,38	0,39
	Pepton from soymeal	0,30	0,51	0,58	0,64	0,67	0,68	0,75	0,75
	Pepton from meat	0,07	0,07	0,09	0,09	0,10	0,17	0,21	0,31

C. albicans'a karşı atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen besiyeri bileşenlerinin toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Zamana bağlı üremesi incelenen *C. albicans*'a ait sonuçlar Çizelge 4.55'de sunulmuştur. En düşük konsantrasyonda (%1) malt extract öne çıkmaktadır. Bunu bacteriological pepton ve B-fungal ekstrakt takip etmektedir. Mycological peptonun %1 konsantrasyonunda, *C. albicans* en düşük üreme hızını göstermiştir.Test edilen %2'lik konsantrasyonda mycological pepton ve B-fungal ekstrakt öne çıkmaktadır. Bunu pepton from soymeal takip etmektedir. Bacteriological peptonun %2 konsantrasyonunda, *C. albicans* en düşük üreme hızını göstermiştir. Test edilen %3'lük konsantrasyonda ise bacteriological pepton ve malt extract öne çıkmaktadır. *C. albicans* üremesinin azot kaynağı konsantrasyonu ile doğrusal ilişiki içinde olduğu görülmüştür.

En iyi ticari azot kaynakları malt extract ve bacteriological pepton olarak belirlenmiştir. Bacteriological peptonun *C. albicans*'ın üremesini en az desteklediği tespit edilmiştir. B-fungal ekstrakt ve pepton from soymeal, *C. albicans*'ın üremesinde en yüksek olumlu etkiyi göstermektedir.

Çizelge 4.55. *C. albicans*'ın üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,12	0,24	0,15	0,18	0,64	0,69	0,77	0,77
	D-fungal ekstrakt	0,05	0,11	0,03	0,04	0,00	0,03	0,31	0,31
	B-fungal ekstrakt	0,05	0,09	0,04	0,05	0,04	0,04	0,08	0,08
	Bacteriological pepton	0,12	0,25	0,19	0,21	0,22	0,27	0,23	0,23
	Malt extract	0,13	0,26	0,28	0,33	0,36	0,41	0,35	0,36
	Yeast extract	0,12	0,25	0,21	0,25	0,29	0,34	0,80	0,81
	Beef extract powder	0,21	0,33	0,26	0,28	0,23	0,36	0,46	0,48
	Mycological pepton	0,08	0,21	0,13	0,14	0,26	0,27	0,37	0,39
	Pepton from soymeal	0,08	0,23	0,16	0,23	0,34	0,50	0,60	0,62
	Pepton from meat	0,14	0,28	0,19	0,22	0,23	0,18	0,18	0,20
%2	U-fungal ekstrakt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20
	D-fungal ekstrakt	0,04	0,08	0,02	0,04	0,03	0,08	0,30	0,30
	B-fungal ekstrakt	0,05	0,06	0,04	0,05	0,09	0,14	0,09	0,09
	Bacteriological pepton	0,11	0,13	0,14	0,17	0,21	0,26	0,32	0,33
	Malt extract	0,06	0,12	0,13	0,30	0,42	0,47	0,38	0,38
	Yeast extract	0,06	0,06	0,06	0,08	0,15	0,20	0,17	0,17
	Beef extract powder	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,30	0,40	0,42
	Mycological pepton	0,07	0,11	0,13	0,19	0,38	0,47	0,57	0,59
	Pepton from soymeal	0,01	0,04	0,01	0,07	0,07	0,07	0,17	0,19
	Pepton from meat	0,08	0,07	0,09	0,12	0,18	0,28	0,38	0,40
%3	U-fungal ekstrakt	0,01	0,02	0,00	0,01	0,04	0,09	0,22	0,22
	D-fungal ekstrakt	0,04	0,08	0,04	0,05	0,06	0,12	0,25	0,25
	B-fungal ekstrakt	0,08	0,16	0,09	0,13	0,26	0,31	0,33	0,33
	Bacteriological pepton	0,09	0,18	0,08	0,10	0,12	0,17	0,16	0,17
	Malt extract	0,12	0,25	0,29	0,49	0,69	0,74	0,77	0,78
	Yeast extract	0,07	0,13	0,05	0,07	0,08	0,13	0,11	0,11
	Beef extract powder	0,04	0,26	0,24	0,31	0,33	0,50	0,60	0,62
	Mycological pepton	0,03	0,16	0,24	0,45	0,54	0,67	0,77	0,79
	Pepton from soymeal	0,06	0,21	0,12	0,27	0,36	0,65	0,75	0,77
	Pepton from meat	0,08	0,19	0,04	0,08	0,10	0,25	0,35	0,37

S. cerevisiae üremesi de kullanılan azot kaynaklarından olumsuz etkilenmemiş olup azot kaynaklarının etkisine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.56'da sunulmuştur. Test edilen %1' lik konsantrasyonda pepton from meat öne çıkmaktadır. Bunu malt ekstrakt takip etmektedir. D-fungal ekstraktın % 1 konsantrasyonunda, *S. cerevisiae* en düşük üreme hızını göstermiştir. Test edilen %2'lik konsantrasyonda yeast ekstrakt öne çıkmaktadır. B-

fungal ekstrakt %2 konsantrasyonunda, *S. cerevisiae* en düşük üreme hızını göstermiştir. Test edilen %3'lük konsantrasyonda ise malt extrakt öne çıkmaktadır.

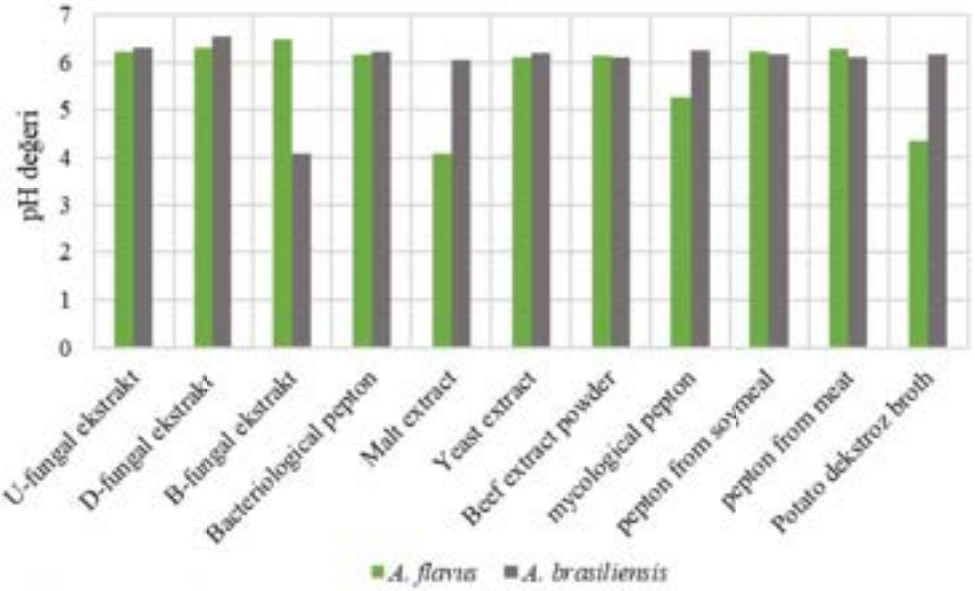
Çizelge 4.56. *S. cerevisiae*'nin üç farklı konsantrasyonda zamana bağlı değişimleri

Bileşen ve Konsantrasyon \ Zaman (Saat)		4	8	12	16	20	24	30	36
%1	U-fungal ekstrakt	0,04	0,12	0,16	0,17	0,22	0,24	0,29	0,30
	D-fungal ekstrakt	0,05	0,12	0,18	0,19	0,28	0,32	0,37	0,38
	B-fungal ekstrakt	0,00	0,06	0,06	0,07	0,06	0,12	0,17	0,18
	Bacteriological pepton	0,06	0,19	0,28	0,30	0,29	0,32	0,37	0,38
	Malt extract	0,00	0,01	0,01	0,06	0,08	0,08	0,11	0,11
	Yeast extract	0,10	0,20	0,21	0,23	0,23	0,27	0,32	0,33
	Beef extract powder	0,04	0,18	0,25	0,28	0,30	0,37	0,42	0,43
	Mycological pepton	0,04	0,11	0,12	0,15	0,22	0,31	0,36	0,37
	Pepton from soymeal	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,11	0,12
	Pepton from meat	0,07	0,16	0,20	0,21	0,22	0,28	0,33	0,34
%2	U-fungal ekstrakt	0,00	0,02	0,01	0,03	0,02	0,22	0,27	0,28
	D-fungal ekstrakt	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,26	0,31	0,32
	B-fungal ekstrakt	0,02	0,01	0,02	0,04	0,02	0,10	0,15	0,16
	Bacteriological pepton	0,05	0,05	0,07	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13
	Malt extract	0,08	0,20	0,27	0,32	0,49	0,49	0,50	0,51
	Yeast extract	0,18	0,21	0,24	0,27	0,28	0,34	0,39	0,40
	Beef extract powder	0,09	0,11	0,11	0,15	0,16	0,29	0,34	0,35
	Mycological pepton	0,05	0,10	0,09	0,14	0,25	0,77	0,82	0,83
	Pepton from soymeal	0,06	0,10	0,11	0,13	0,16	0,13	0,18	0,19
	Pepton from meat	0,14	0,12	0,13	0,16	0,21	0,64	0,69	0,70
%3	U-fungal ekstrakt	0,00	0,02	0,03	0,05	0,06	0,27	0,32	0,33
	D-fungal ekstrakt	0,01	0,00	0,02	0,05	0,22	0,32	0,37	0,38
	B-fungal ekstrakt	0,00	0,00	0,01	0,03	0,05	0,22	0,27	0,28
	Bacteriological pepton	0,08	0,06	0,07	0,08	0,09	0,08	0,13	0,14
	Malt extract	0,06	0,05	0,15	0,39	0,52	0,55	0,60	0,61
	Yeast extract	0,17	0,18	0,21	0,23	0,22	0,25	0,30	0,31
	Beef extract powder	0,03	0,09	0,08	0,12	0,13	0,15	0,15	0,16
	Mycological pepton	0,07	0,13	0,15	0,16	0,15	0,17	0,22	0,23
	Pepton from soymeal	0,01	0,01	0,03	0,08	0,10	0,10	0,09	0,08
	Pepton from meat	0,02	0,09	0,13	0,20	0,23	0,49	0,54	0,55

Azot kaynaklarının konsantrasyonu arttıkça genel olarak *S. cerevisiae* üreme hızının da arttığı görülmüştür. En iyi ticari azot kaynakları malt extract ve pepton from meat olarak belirlenmiştir. Yeast extractın *S. cerevisiae*'nin üremesini en az desteklediği tespit edilmiştir. B-fungal ekstrakt ve malt extract *S. cerevisiae*'nin üremesinde en yüksek olumlu etkiyi göstermektedir.

Küfler (*A. flavus* ve *A. brasiliensis*) 28±2 °C sıcaklıkta, 7 gün statik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası pH değerleri ölçülmüş ve ortalama sonuçları Şekil

4.63' da verilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen biyokütle Whatman filtre kağıdından süzülmüş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. *A. flavus* mikroorganizması, Potato dekstroz broth (PDB) besiyerinde ve malt extract içeren besiyerlerinde ortam pH'sını oldukça düşürmüştür. *A. brasiliensis* mikroorganizması, sadece B-fungal ekstrakt içeren besiyerlerinde ortam pH'sını düşürmüştür. Bu pH düşüşü, küflerin şeker tüketimine bağlı olarak üretilen organik asitlerin ortam pH'sını düşürmesiyle açıklanabilir (Fang ve Zhong, 2002). Özellikle ticari PDB ve malt extractta bulunan şekerin *A. flavus* tarafından kullanılarak daha fazla organik asit ürettiği düşünülmektedir. *A. brasiliensis*'in sadece B-fungal ekstrakt içeren besiyerlerinde ortam pH'sını düşürmesinin nedeni ise güncel verilerle açıklanamamıştır.



Şekil 4.63. Küflerin inkübasyon sonrası besiyerlerinin ortalama pH değerleri

Her azot kaynağının farklı konsantrasyonlarının (%1, %2, %3) seçilen küflerin üremesine etkisine ait veriler Çizelge 4.57 ve Çizelge 4.58 te sunulmuştur. *A. brasiliensis* için bileşen ve konsantrasyon ana etkileri anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Azot kaynağı bileşeni ile konsantrasyon etkileşim etkisi anlamsız olarak tespit edilmiştir ($p>0,05$). Azot kaynağı bileşeni ile konsantrasyon etkileşim etkisi anlamsız olarak bulunduğundan ana etkiler değerlendirmeye alınmıştır.

Çizelge 4.57. *A. brasiliensis*'nin üç farklı konsantrasyonda biyokütle (g) değişimleri

Konsantrasyon / Bileşen	%1	%2	%3
U-fungal ekstrakt	0,17	0,080	0,094
D-fungal ekstrakt	0,11	0,048	0,062
B-fungal ekstrakt	0,14	0,087	0,110
Bacteriological pepton	0,06	0,160	0,174
Malt extract	0,07	0,161	0,142
Yeast extract	0,07	0,099	0,114
Beef extract powder	0,09	0,090	0,105
Mycological pepton	0,11	0,058	0,072
Pepton from soymeal	0,07	0,058	0,073
Pepton from meat	0,10	0,056	0,070

A. brasiliensis için pepton from soymeal, D-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt, U-fungal ekstrakt azot kaynağı düzeylerinin etkisi kendi aralarında anlamlı ölçüde farklılık göstermemiştir. Benzer şekilde, beef extract powder, pepton from meat, malt extract, mycological pepton, yeast extract ve bacteriological pepton kendi arasında anlamlı ölçüde farklılık yaratmamıştır. Pepton from soymeal en düşük olumlu etkiyi gösterirken bacteriological peptone en yüksek olumlu etkiyi göstermiştir. *A. brasiliensis* için konsantrasyon düzeyleri; %1 ve %2 düzeyleri anlamlı ölçüde fark göstermemiştir. %3'lük konsantrasyonda en yüksek biyokütle eldesi sağlanmıştır.

Çizelge 4.58. *A. flavus*'un üç farklı konsantrasyonda biyokütle (g) değişimleri

Konsantrasyon / Bileşen	%1	%2	%3
U-fungal ekstrakt	0,088	0,075	0,090
D-fungal ekstrakt	0,115	0,040	0,055
B-fungal ekstrakt	0,096	0,059	0,074
Bacteriological pepton	0,055	0,073	0,088
Malt extract	0,075	0,081	0,096
Yeast extract	0,074	0,100	0,115
Beef extract powder	0,090	0,028	0,036
Mycological pepton	0,074	0,060	0,075
Pepton from soymeal	0,081	0,059	0,074
Pepton from meat	0,036	0,066	0,081

A. flavus için bileşen ve konsantrasyon ana etkileri anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Azot kaynağı bileşeni ile konsantrasyon etkileşim etkisi anlamsız olarak tespit edilmiştir ($p>0,05$). Azot kaynağı bileşeni ile konsantrasyon etkileşim etkisi anlamsız olarak bulunduğundan ana etkiler değerlendirmeye alınmıştır. *A. flavus* için malt extract en düşük olumlu etkiyi gösterirken mycological pepton en yüksek olumlu etkiyi göstermiştir. *A. flavus* için konsantrasyon düzeyleri; %1 ve % 2 düzeyleri anlamlı ölçüde fark

göstermemiştir. Test edilen %3'lük konsantrasyonda en yüksek biyokütle eldesi sağlanmıştır.

Sonuç olarak sıvı besiyerinde kullanım potansiyellerinin en yüksek %3 konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle test mikroorganizmalarının katı besiyerinde kullanım potansiyelleri tek konsantrasyon (%3) azot kaynağı bileşeni içeren besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.2. Katı besiyerinde kullanım potansiyelinin araştırılması

Test besiyerlerinde geliştirilen bakteriler (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *B. subtilis*) ve mayaların (*C. albicans* ve *S. cerevisiae*) koloni sayımları sırasıyla inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinin sonunda gerçekleştirilmiştir. Bakteri ve mayaların koloni sayımlarıyla ilgili olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.59'da verilmiştir.

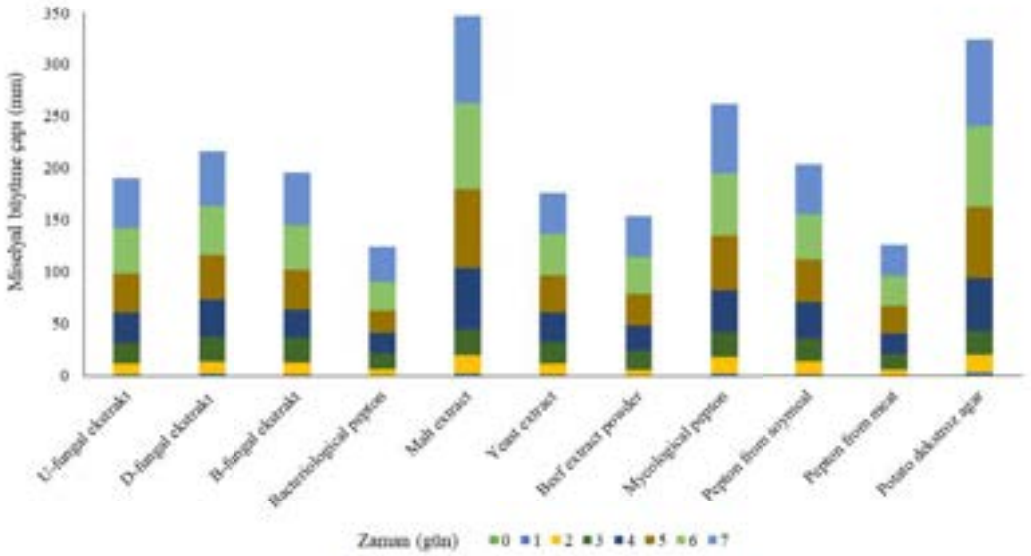
Çizelge 4.59. Test bakteri ve mayaları geliştirme potansiyellerinin karşılaştırılması

Test Bileşeni	Koloni sayısı (Log 10)					
	E. coli	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*C. albicans*	*S. cerevisiae*
Beef extract powder	7,03	7,02	7,67	6,99	6,27	6,24
Bacteriological pepton	6,93	6,92	7,56	6,89	6,40	6,37
Mycological pepton	7,08	7,07	7,71	7,03	6,43	6,40
U-fungal ekstrakt	6,98	6,97	7,61	6,94	6,44	6,41
B-fungal ekstrakt	7,20	7,19	7,83	7,16	7,15	7,12
D-fungal ekstrakt	6,55	6,54	7,18	6,51	7,49	7,46
Pepton from meat	7,08	7,07	7,71	7,04	7,65	7,62
Malt extract	6,99	6,98	7,63	6,95	6,82	6,79
Yeast extract	7,15	7,14	7,79	7,11	7,07	7,04
Pepton from soymeal	7,01	7,00	7,64	6,97	6,82	6,78

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda test edilen katı besiyerleri için tüm test mikroorganizmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). *E. coli* için en düşük koloni sayısı D-fungal ekstrakt, en yüksek koloni sayısı B-fungal ekstrakt ile elde edilmiştir. *S. aureus* için en düşük koloni sayısı bacteriological pepton, en yüksek koloni sayısı B-fungal ekstraktta yapılmıştır. *P. aeruginosa ve B. subtilis* için en düşük koloni sayısı D-fungal ekstraktta, en yüksek koloni sayısı B-fungal ekstrakt içeren besiyerinde belirlenmiştir. Bakterilerin koloni gelişimlerinin en iyi olduğu besiyerinin %3 konsantrasyonunda B-fungal ekstrakt içeren besiyeri olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte en düşük koloni sayısının %3 konsantrasyonunda D-fungal ekstrakt içeren besiyerinde elde edilmesi dikkat çekicidir. *C. albicans* ve *S. cerevisiae* için

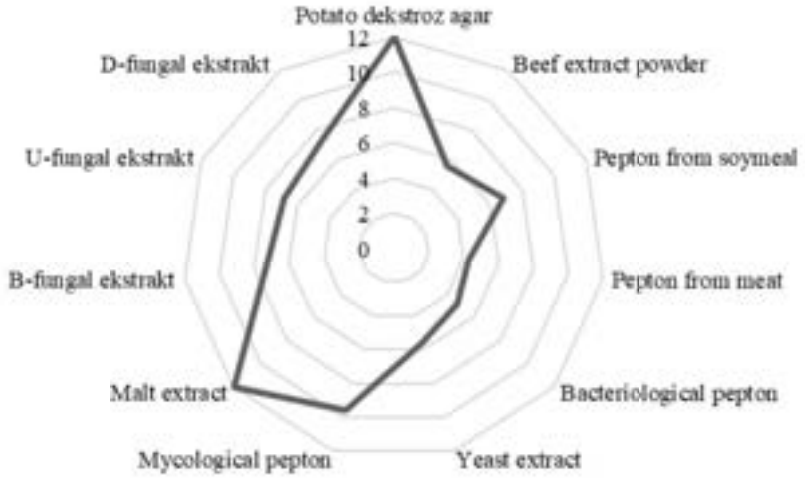
ise en yüksek koloni sayısı pepton from meat, en düşük koloni sayısı beef extract powder içeren besiyerlerinde görülmüştür. U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt kendi içinde değerlendirildiğinde en yüksek koloni sayısı D-fungal ekstrakt içeren katı besiyerinde elde edilmiştir. Bakterilerin aksine mayaların üretilmesinde D-fungal ekstraktın daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Küflerin gelişimi için sıvı besiyerinde kullanım potansiyellerinin en yüksek %3 konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle *A. brasiliensis* ve *A. flavus* mikroorganizmalarının katı besiyerinde kullanım potansiyelleri tek konsantrasyon (%3) azot kaynağı bileşeni içeren besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerinin merkezine küf sporları tek nokta ekimi ile ekilmiştir ve 7 gün boyunca günlük miselyal üreme çapları ölçülmüştür. *A. brasiliensis* mikroorganizmasının katı besiyerindeki gelişimine ait elde edilen sonuçlar, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65'de sunulmuştur.

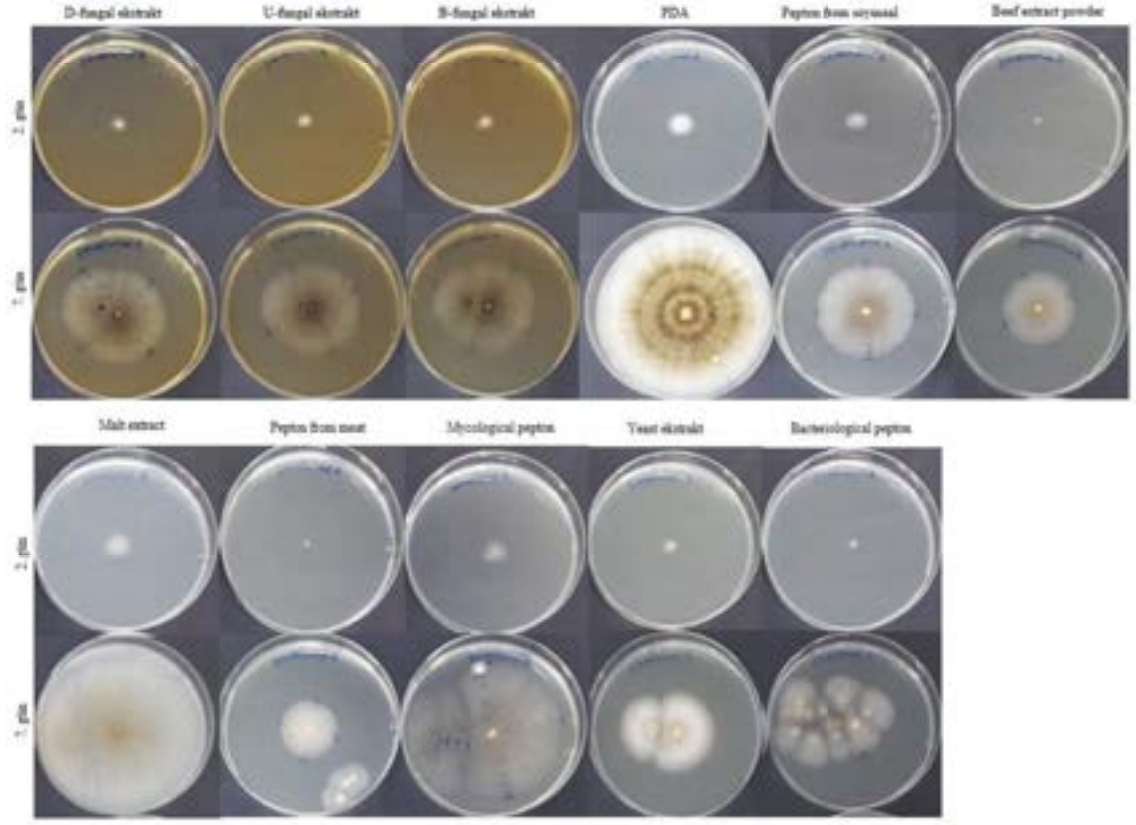


Şekil 4.64. *A. brasiliensis* küfünün koloni büyüme çapı

Şekil 4.65 incelendiğinde en yüksek miselyal büyüme hızına PDA ve malt extractta ulaşılmıştır. En düşük miselyal büyüme hızı ise pepton from meat içeren besiyerinde elde edilmiştir. U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt kendi içinde değerlendirildiğinde *A. brasiliensis*' in birbirine yakın miselyal büyüme hızına sahip oldukları görülmüştür.



Şekil 4.65. *A. brasiliensis* küfünün miselyal büyüme hızı

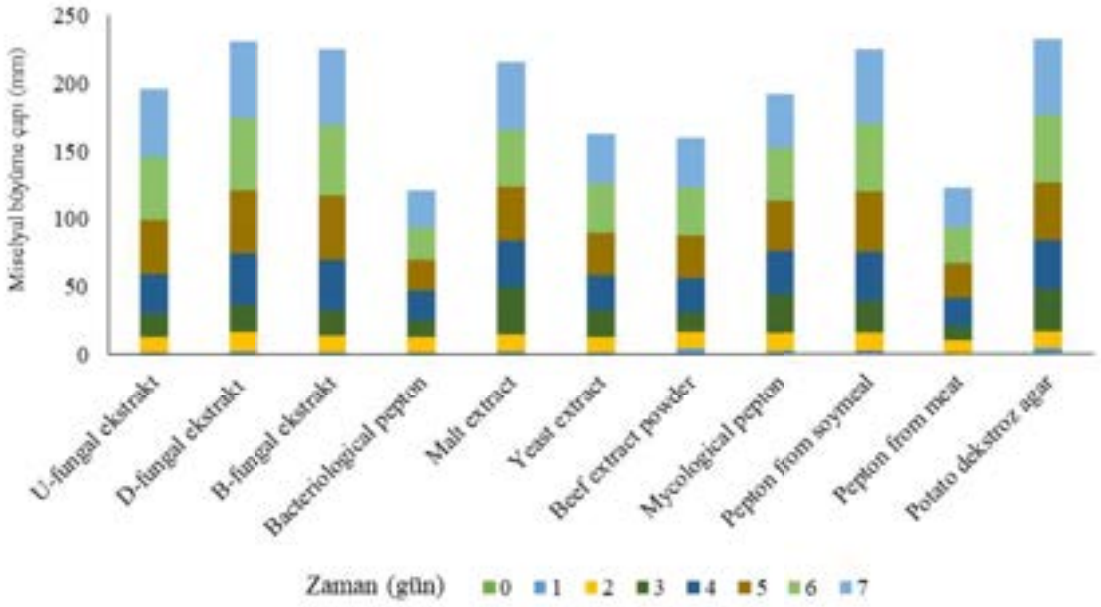


Şekil 4.66. *A. brasiliensis* küfünün 2. ve 7. gün morfolojik görünümleri

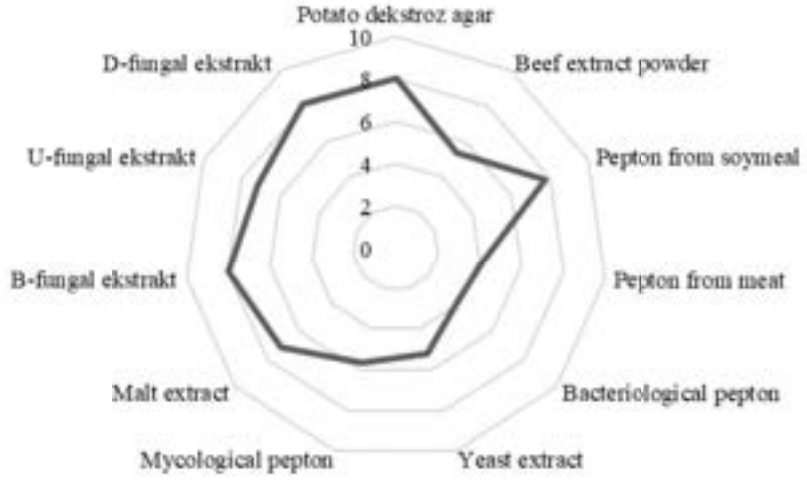
En büyük miselyal büyüme çapı 7. günde %3 konsantrasyonunda malt extract içeren besiyerinde elde edilmiştir. Bunu takiben ticari olarak küflerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan Potato dekstroz agar (PDA) ve mycological pepton besiyeri

gelmektedir (Şekil 4.66). D-fungal ekstrakt ise miselyal büyüme çapında diğer U ve B fungal ekstraktlardan öne çıkmıştır.

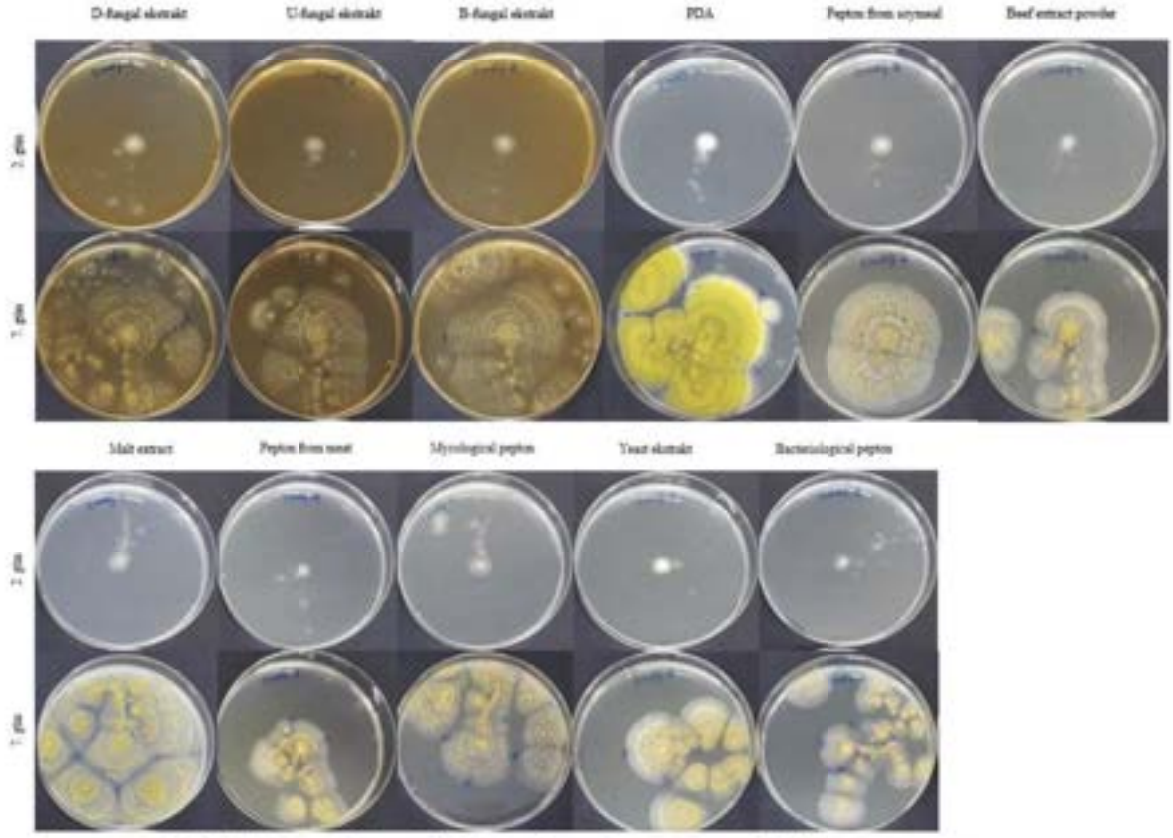
A. flavus mikroorganizmasına katı besiyerindeki gelişimine ait elde edilen sonuçlar Şekil 4.67 ve Şekil 4.68' de sunulmuştur. En büyük koloni çapı 7. günde %3 konsantrasyonunda PDA besiyerinde elde edilmiştir (Şekil 4.67). Bunu takiben ticari olarak küflerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan pepton from soymeal, B-fungal ekstrakt, D-fungal ekstrakt ve malt extract içeren besiyerleri gelmektedir. En düşük koloni çapı ise pepton from meat ve bacteriological peptonda ölçülmüştür. Şekil 4.68 incelendiğinde en yüksek koloni çapına sırasıyla PDA, pepton from soymeal ve B-fungal ekstraktta ulaşılmıştır. En düşük koloni çapı ise bacteriological pepton içeren besiyerinde elde edilmiştir. U-fungal ekstrakt, B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt kendi içinde değerlendirildiğinde *A.* flavus' un B-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt içeren katı besiyerlerinde birbirine yakın koloni çapına sahip oldukları, U-fungal ekstrakt içeren katı besiyerinde ise koloni çapının daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.69).



Şekil 4.67. *A. flavus* küfünün koloni büyüme çapı



Şekil 4.68. *A. flavus* küfünün miselyal büyüme hızı



Şekil 4.69. *A. flavus* küfünün 2. ve 7. gün morfolojik görünümleri

Bütün azot kaynağı içeren besiyerlerinde her test küfü için en hızlı miselyal büyüme performansı inkübasyonun 48-120. saatleri arasında tespit edilmiştir. 120. saatten sonra test küflerinin miselyal büyüme çaplarında çok fazla bir artış gözlenmemiştir.

Çalışmada küflerin koloni çaplarının yanı sıra sporulasyon durumları da değerlendirilmiştir (Çizelge 4.60; Çizelge 4.61). Test edilen besiyerlerinde *A. brasiliensis*, *A. flavus*'a göre daha hızlı miselyal koloni büyümesi ve sporlanma göstermiştir. *A. brasiliensis* ve *A. flavus*'un PDA besiyerinde sporulasyonu 72. saatte başlamıştır. *A. brasiliensis*'in 72. saatte B-fungal ekstrakt, U-fungal ekstrakt ve D-fungal ekstrakt içeren besiyerlerinde de başlamıştır. *A. flavus*'un 72. saatte B-fungal ekstrakt, U-fungal ekstrakt, D-fungal ekstrakt içeren besiyerlerinin yanı sıra malt extract içeren besiyerinde de sporulasyon başlamıştır.

Çizelge 4.60. *A. brasiliensis*'in zamana bağlı sporulasyon sonuçları

Test Bileşeni	**İnkübasyon süresi (Saat)**						
	24	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
Beef extract powder	-	-	-	-	-	-	-
Bacteriological pepton	-	-	-	-	-	-	-
Mycological pepton	-	-	+	+	+	+	+
U-fungal ekstrakt	-	-	+	+	+	+	+
B-fungal ekstrakt	-	-	+	+	+	++	++
D-fungal ekstrakt	-	-	+	+	+	++	++
Pepton from meat	-	-	-	-	-	-	-
Malt extract	-	-	-	+	++	++	++
Yeast extract	-	-	-	-	-	-	-
Pepton from soymeal	-	-	+	++	++	++	++
PDA	-	-	+	++	+++	+++	+++

(-: yok, +:az, ++:orta, +++:çok)

Çizelge 4.52. *A. flavus*'un zamana bağlı sporulasyon sonuçları

Test Bileşeni	**İnkübasyon süresi (Saat)**						
	24	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**
Beef extract powder	-	-	+	+	+	+	+
Bacteriological pepton	-	-	-	-	+	+	+
Mycological pepton	-	-	+	+	+	++	++
U-fungal ekstrakt	-	-	+	++	++	++	++
B-fungal ekstrakt	-	-	+	++	++	++	++
D-fungal ekstrakt	-	-	+	++	++	++	++
Pepton from meat	-	-	+	+	+	++	++
Malt extract	-	-	+	++	++	++	++
Yeast extract	-	-	+	+	+	++	++
Pepton from soymeal	-	-	+	+	+	++	++
PDA	-	-	++	++	+++	+++	+++

(-: yok, +:az, ++:orta, +++:çok)

Çeşitli mikroorganizmaların geliştirilmesinde ve biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılan azot kaynakları oldukça pahalıdır. Bu nedenle birçok araştırmacı atıklardan azot kaynağı eldesi üzerine yoğunlaşmıştır. Özellikle balık atıklarından hayvansal pepton eldesindeki araştırmalar yoğunluk kazanmıştır (Horn vd., 2005; Vieira

vd., 2005; Vasileva-Tonkova vd., 2007; Tonkova vd., 2007; Lasekan vd., 2013; Jaziri vd., 2020). Tarımsal atıkların değerlendirilerek bitkisel pepton üzerine de bazı çalışmalar yapılmaktadır (Rozman vd., 2005; Raisa vd., 2016).

Bazı bakterilerin (*E. coli, B. subtilis, L. monocytogenes, S. aureus, Citrobacter* sp. ve *Salmonella* sp.) üretimi için koç boynuzundan elde edilen pepton ile diğer peptonların karşılaştırıldığı bir çalışmada, koç boynuzundan elde edilen peptonun ticari peptonlara yakın sonuçlar verdiği ve kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kurbanoğlu ve Algur, 2002). *Staphylococcus simulans* tarafından lipaz enzimi üretimi için balık protein hidrolizatı kullanılan bir çalışmada elde edilen lipaz enziminin yüksek aktiviteye sahip olduğu ve endüstriyel üretimlerde kullanılabileceği önerilmiştir (Souissi vd., 2009). Moleküler ağırlığı 17-28 kDa olan ve boso balığından elde edilen peptonun *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarının üremesine en az ticari peptonlar kadar desteklediği bildirilmiştir (Priatni vd., 2006). *Aspergillus flavus, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'un üreme ortamları için test edilen *Trygon sephen* balığından elde edilen peptonun sıvı besiyerinde ticari peptonlara göre benzer biyokütle oranlarına ulaşıldığı belirlenmiştir (Poernomo ve Buckle, 2002). Hayvansal kaynaklı peptonlar, uzun kimyasal (asit vb.) hidroliz işlemleri veya pahalı enzimlerin (Alcalase® vb.) kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (Vasileva-Tonkova vd., 2007; Safari vd., 2011). Bu nedenle her ne kadar hammaddesi bir atık olsa da bu atıktan pepton eldesi maliyetli ve yeni atıkların oluştuğu bir sisteme dönüşmektedir. Kurutulmuş *Spirulina platensis*' ten besleyici protein hidrolizatının eldesi için yapılan çalışmada gram negatif ve pozitif bakteriler ile mayaların geliştirilmesinde katı ve sıvı besiyerinde hayvansal olmayan protein kaynağı olarak kullanımlarının uygun olduğu rapor edilmiştir (Raisa vd., 2016). Yapılan başka bir çalışmada soya peptonu için hidroliz yöntemi olarak papain enzimi yerine hidroklorik asit kullanımı gerçekleştirilmiştir (Al-Bahri vd., 2009). Domates, havuç, kabak ve balkabağı gibi bitkisel atıklarının karışımları kullanılarak elde edilen besiyerlerinde, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. ve *Klebsiella* sp. bakterilerinin üremeleri araştırılmıştır. Çiğ sebzelerden oluşturulan ortamların mikroorganizmaların gelişimi için kullanılabileceği önerilmiştir (Deivanayaki ve Antony Iruthayaraj, 2012). Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinden azot açısından zengin fungal ekstrakt ilk kez elde edilmiş olup, mikrobiyolojik besiyeri bileşeni olarak kullanımı değerlendirilmiştir. Elde edilen ekstraktların, mikroorganizmaların üremelerinde başarılı biçimde kullanılabilecekleri ortaya konulmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde fermentasyon tekniğiyle, endüstriyel öneme sahip çeşitli mikrobiyal enzimler üretilebilmektedir. Bu şekilde üretilen lipaz ve proteaz enzimlerinin ana üreticilerinin başında *Rhizomucor miehei* ve *Aspergillus niger* gelmektedir (Ferreira vd. 2013; Dzurendova vd., 2021). Fermentasyon sonrası enzimlerin saflaştırılmasıyla geriye miselyal atık olan biyokütle kalmaktadır. Bu atıkların büyük bir kısmı çamur göletlerinde toplanır, kanalizasyon arıtma sistemine atılır veya yakılır. Günümüzün çevre kirliliğinin nedenlerinden biri de bu biyokütle atıklarıdır (Ren ve Zhao, 2013). Ancak bu biyokütleler lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve amino asitlerin yanı sıra önemli miktarda değerli maddeler de (vitamin, kitosan vb.) içerir (Dzurendova vd., 2021). Bu nedenle atık *R. miehei* biyokütlesinden kitosan eldesi ve fungal ekstraktının alternatif protein kaynağı olma durumunun ortaya çıkarılması ile geriye dönüşüm sistemine katkı sağlanması öngörülmektedir. Ülkemizin kaynaklarını daha etkili ve verimli kullanılabilmesi için bu potansiyellerin ortaya çıkarılması elzemdir. Bu çalışma ile sürdürülebilir kalkınma ilkeleri çerçevesinde oluşturulan "Sıfır Atık" uygulamaları içinde çeşitli endüstriyel üretim yapan şirketlere bir bakış açısı ve çözüm alternatifi getirilmiş olunacaktır.

Son yıllarda, mantarlar, kitin ve kitosan üretimi için ucuz ve çevre dostu olmaları nedeniyle alternatif kaynak olarak oldukça dikkat çekmektedirler. Bol miktarda üretilebilen kültür mantarlarının yanında çeşitli endüstrilerde biyoteknolojik proseslerin sonucu olarak atık biyokütle olarak ortaya çıkan misel atıklarının önemli bir kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca atıkların sürdürülebilir yönetimi için katma değeri yüksek ürünleri dönüştürülmesi oldukça önemlidir. Bu projede atık *Rhizomucor miehei* biyokütlesinin geri kazanımı ile katma değeri yüksek ürünlerin eldesi (fungal kitosan, vermikompost hammaddesi ve mikrobiyolojik besiyeri bileşeni) amaçlanmıştır. Özellikle bu ürünlerin eldesinde daha az atık çıkabilecek yöntemler üzerinden çalışmalar tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir. Bu süreç içerisinde bir atığı dönüştürürken daha fazla çevreye zararlı atık çıkmaması dikkate alınmıştır.

Bu çalışmada öncelikle *R. miehei* biyokütlesindeki kitosan varlığı ortaya konulmuştur. Ve optimizasyon çalışmaları ile atık *R. miehei* biyokütlesinden 70,6 mg/g

kitosan elde edilmiştir. Bu çeşitli fungal miselyal atıkların kitosan kaynağı olarak kullanılabileceğini ve ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesiyle bu oranının arttırılabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle ülkemizde gerçekleştirilen diğer fungal fermentasyonlar sonucu oluşan atıklarında kitosan kaynağı olarak kullanılma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu konudaki araştırmalara sürdürülmelidir.

Ayrıca atık R. miehei biyokütlesinden elde edilen kitosanın karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve düşük moleküler ağırlığı ile gıda, biyomedikal, tekstil gibi alanlarda kullanılabilirlikleri belirlenmiştir. Elde edilen kitosan ile biyoaktif filmlerinin üretiminin mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile antimikrobiyal, antioksidan ve yara iyileştirici aktivitesi sayesinde birçok alanda kullanılmasının mümkün olduğu ortaya konulmuştur. Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen kitosanın ticari olarak kullanım potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür ve fungal atıkları olan üreticilerin atıklarını fungal kitosan üretiminde değerlendirmeleri önerilmektedir. Özellikle ambalaj sanayi de kitosan içeren biyoaktif filmlerin kullanılması birçok geri kazanımı da beraberinde getirecektir. Günümüzde oldukça önemli olan gıdaların geç bozunması konusunda etken bir rol oynayabilir. Sadece gıda ve ambalaj sektöründe değil yara iyileştirici özelliği nedeniyle biyoteknolojik ürünlerin eldesinde de kullanılabilinir.

Organik atıkların geri kazanımında en çok kullanılan yöntemlerden biri hayvan yemi olarak kullanılmasıdır. Özellikle miselyal atıklar tavuk, domuz gibi bazı hayvanlara protein kaynağı olarak verilmektedir. Bu çalışmada atık *R. miehei* biyokütlesinin solucan maması olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Ve % 50 oranına kadar ahır gübresi ile karıştırılarak solucan maması olarak kullanılması önerilmektedir. Aynı zamanda vermikompost, tarımsal üretimde sürdürülebilirliği sağlayan ekonomik yöntemlerden biridir. Özellikle katı organik atıkların parçalanması ve geri dönüşümünde önemli çevre sorunlarına çözümler sunmaktadır. Bu nedenle atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen vermikompostların marul yetiştiriciliğinde kullanılma potansiyeli üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada %25 atık *R. miehei* biyokütlesi ile üretilen vermikompostun %40'a varan oranlarda torf ile karışımından hazırlanan ortamların marul fide yetiştirme ortamı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Bu çalışma ile atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen vermikompostların marul yetiştiriciliğinde kullanılması önerilmektedir.

Atık *R. miehei* biyokütlesinin, mikrobiyolojik besiyerlerinde kullanılan pepton gibi pahalı olan hayvansal ürünler yerine alternatif azot kaynağı olarak kullanım potansiyelini ortaya koyabilmek için üç farklı mekanik hücre lizis yönteminin istatistiksel optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimize koşullarda üç farklı yöntemle elde edilen proteince zengin fungal ekstraktların karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma ile fungal miselyal atıkların yeni bir kullanım alanının olabileceği gösterilmiştir. Yani fungal miselyal atıklar, biyoteknolojik ve klinik araştırmalarda kullanılmak üzere pepton alternatifi bir bileşene dönüştürülebilmektedir. Ayrıca kimyasal kullanımı yerine mekanik yöntemlerin tercih edilmesiyle biyosürdürebilirlik göz önünde bulundurulmuştur. Mekanik yöntemler optimize edilerek yüksek protein içeriği elde edilebilecek prosesler geliştirilmiştir. Buradan elde edilen fungal ekstraktların tüm test mikroorganizmalarına karşı toksik etki göstermediği ve gelişmelerine katkısı olduğu ispatlanmıştır. Atık *R. miehei* biyokütlesinden elde edilen ekstraktların karakterizasyonlarına göre çeşitli mikroorganizmaların gelişimi için hem sıvı hem de katı besiyeri bileşeni olarak kullanılması önerilmektedir.

Fungal miselyal atıklar, biyoteknolojik yöntemlerle doğal ürünlere dönüştürülerek yeni teknolojileri kullanma ve geliştirme, çevresel kirliliğini azaltma, yeni ürünler eldesi, katma değer sağlama yönünden önem teşkil etmektedir. Yapılan bu çalışma ile fungal miselyal atıkların döngüsel ekonomiye kazandırılmasının mümkün olduğu çeşitli katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesiyle ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Gawad, K., Hifney, A., Fawzy, M., Gomaa, M. 2017. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. Food Hydrocolloids. 63:593-601. 10.1016/j.foodhyd.2016.10.001

Agrawal, K. S., Sarda, A. V., Shrotriya, R., Bachhav, M., Puri, V., Nataraj, G. 2017. Acetic acid dressings: Finding the Holy Grail for infected wound management. Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 50(3):273–280.

Agullo, E., Rodriguez, M., Ramos, V., Albertengo, L., 2003. Present and future role of chitin and chitosan in food. Macromoleculer Bioscience. 3:521-530.

Ahmad, F., Akmal, M., Amran, A., Hasni, M. H. 2020. Characterization of chitosan from extracted fungal biomass for piezoelectric application. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 778. 012034. 10.1088/1757-899X/778/1/012034

Albrecht, J., Carrez, D., Cunningham, P., Daroda, L., Mancia, R., Raschka, A., Carus, M., Piotrowski, S. 2010. The Knowledge Based Bio-Economy (KBBE) in Europe: Achievements and Challenges. 10.13140/RG.2.2.36049.94560

Altunlu, H. 2021. Mikrobiyal gübre ve vermikompost uygulamalarının baş salata (*Lactuca sativa* L. var *capitata*) yetiştiriciliğinde bitki gelişimi, verim ve nitrat içeriğine etkisi. Mediterranean Agricultural Sciences, 34(1): 135-140.

Akbaş, P. 2013. *Locusta migratoria* çekirgesi kullanılarak mikrobiyolojik amaçlı pepton üretimi. Yayınlanmış Doktora Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Akoğlu, A. 2006. Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 68s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Akyüz Yılmaz, B., Karaduman, T., Cicek, M., Akata, I., Kaya, M. 2021. Production and Characterization of Nontoxic and Biodegradable Chitosan–Ectomycorrhizal Fungi Spores Blend Films. Waste Biomass Valor. 12:5899–5908.

Al-Bahri M.B.A.G., Al-Naimi S.A., Ahammed S.H., 2009. The optimum conditions for production of soya peptone by acidic hydrolysis of soya proteins. Al-Khwarizmi Engineering Journal. 5:1-19.

Anonim, 2018. Tarımda Kullanılan Organik Mineral ve Mikrobiyal Kaynaklı Gübrelere Dair Yönetmelik. Resmi Gazete, 23 Şubat 2018 Cuma, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/02/20180223-4.htm

Anonim, 2022a. Çöpüme Nasıl Sahip Çıkarım? https://www.copunesahipcik.org/nasil-yaparim/copume-nasil-sahip-cikarim (Erişim tarihi: 01.06.2022)

Anonim, 2022b. Atık Yönetimi Nedir? https://hlccevre.com/atik-yonetimi-nedir/ (Erişim tarihi: 01.06.2022)

Arcidiacono, S., Kaplan, D.L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucor rouxii under different culture and processing conditions. Biotechnology Bioengineering. 39:281-286.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. ve Heras, A., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan, Current Chemical Biology, 3, 203-230.

Atlas, R. M. 2010. Handbook of microbiological media. 3rd ed. CRC Press; Boca Raton, FL.

Aydınşakir, K., Ünlü, A., Yılmaz, S., Arı, N. 2011. Kentsel Katı Atık Kompost Uygulamalarının Toprak Özellikleri ve Düğün Çiçeği (*Ranunculus Asiaticus* 'Orange')'nin Verim ve Kalitesi Üzerine Etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 24(1): 55-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Aygün, S. 2015. Fındık zurufu kompostunun toprak kalitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 91s, Ordu.

Azlan, N. S., Edinur, H. A., Ghafar, N. A., Rasudin, N. S. 2020. Optimization and characterization of chitosan extracted from *Mucor rouxii*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 596, No. 1, p. 012030). IOP Publishing.

Bayatbalay, G., Karpuz, E., Palabıyık, İ. 2021. Propolis Püskürtülmüş Ambalaj Filmlerin Antibakteriyel Aktiviteleri. Akademik Gıda. 21-27. 10.24323/akademik-gida.927633

Ban, Z. Horev, B., Rutenberg, R., Danai, O., Bilbao, C., Mchugh, T., Rodov, V., Poverenov, E. 2018. Efficient production of fungal chitosan utilizing an advanced freeze-thawing method; quality and activity studies. Food Hydrocolloids.81(4).

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.

Belakhov, V., Garabadzhiu, A. 2015. Directions of practical application of mycelial wastes of microbiological production of antibiotics in various areas of industry and agriculture (Review). Russian Journal of General Chemistry. 84. 2664-2676.

Bellitürk, K. 2016. Sürdürülebilir Tarımsal Üretimde Katı Atık Yönetimi İçin Vermikompost Teknolojisi. Çukurova Tarım Gıda Bil. Der. 31(3): 1-5.

Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., De Alcântara, S.R.C., Da Silva, A.C., Da Silva, A.M., Do Nascimento, A.E., Campos-Takaki, D., Maria, G. 2014. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. Int. J. Mol. Sci. 15:9082–9102.

Beşirli G., Sönmez, İ., Albayrak, B., Polat, Z. 2021. Organik Marul Yetiştiriciliği. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Enstitü Yayın No:111, Yalova, ISBN 978-625-8451-31-3

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bilal, T., Keser, O. 2009. Kitosan oligosakkaritin hayvan beslemede kullanımı ı-bağışıklık sistemi ve performans üzerine etkisi. Lalahan Hayv. Araş. Enst. Dergisi. 49(2):137-147.

Borah, M. C., Mahanta, P., Kakoty, S. K, Saha, U. K, Sahasrabudhe, A. D. 2007. Study of quality parameters in vermicomposting. Indian J. Biotechnol. 6(3): 410-413.

Brody, L. A., Strupinsky, E. R., Kline, L. R. 2001. Active Packaging for Food Applications. CRC Press, LLC. USA.

Candan T, Bağdatlı A 2018. Gıda Ürünlerinde Yenilebilir Film ve Kaplama Uygulamaları. El Cezeri Journal of Science and Engineering 5(2): 645-655.

Cazon, P., Vazquez, M. 2020. Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. Environ Chem Lett. 18:257–267.

Chatelet, C., Damour O., Domard, A., 2001. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, Biomaterials. 22:261-268.

Chertow, M. R. 2000. Industrial symbiosis: literature and taxonomy. Annual Review of Energy and the Environment, 25(1):313-337.

Crestini, C., B. Kovac and G. Giovannozzi–Sermanni, 1996. Production and isolation of chitosan by submerged and solid–state fermentation from Lentinus edodes. Biotechnol. and Bioeng. 50:207-10.

Crognale S, Russo C, Petruccioli M, D'Annibale A. 2022. Chitosan Production by Fungi: Current State of Knowledge, Future Opportunities and Constraints. *Fermentation*. 8(2):76. https://doi.org/10.3390/fermentation8020076

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Çağlar S., 2014. Fındık zuruf kompostu ve çay kompostu karışımlarının kıvırcık marulda (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) verim ve kaliteye etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.

Çakmak P., 2011. Farklı dikim zamanları ve organik gübrelerin topraksız tarım koşullarında kıvırcık yapraklı salata (*Lactuca sativa* var. *crispa*) yetiştiriciliğinde verim ve kalite özelliklerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Coşkan, A., Şenyiğit, U. 2019. Farklı Sulama Suyu Düzeyi ve Vermikompost Dozlarının Marul Bitkisinin Mikro Element Alımına Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi Özel Sayısı. 348-356.

Cui, L., Gao, S., Song, X., Huang, L., Dong, H., Liu, J., Chen, F., Yu, S. 2018. Preparation and characterization of chitosan membranes. RSC Advances. 8(50):28433-39.

Dai, T., Tanaka, M., Huang Y. Y., Hamblin, M. R. 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther. 9(7):857-879.

Davami, F., Eghbalpour, F., Nematollahi, L., Barkhordari, F., Mahboudi, F. 2015. Effects of Peptone Supplementation in Different Culture Media on Growth, Metabolic Pathway and Productivity of CHO DG44 Cells; a New Insight into Amino Acid Profiles. Iranian biomedical journal. 19. 10.7508/ibj.2015.04.002

Deliboran A, Savran Ş. 2015. Toprak Tuzluluğu ve Tuzluluğa Bitkilerin Dayanım Mekanizmaları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 8 (1):57-61.

Demircioğlu, E., Ever, D. 2020. Döngüsel Ekonomiye Geçişte Endüstriyel Simbiyozun Maliyetler Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi. 29(3):461-473.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Deivanayaki M., Antony Iruthayaraj P. 2012. Alternative vegetable nutrient source for microbial growth. International Journal of Biosciences (IJB). 2(5):47-51.

Dhillon, G.S., Bansal, S. and Oberoi, H.S., 2007. Caulifl ower waste incorporation into cane molasses improves ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 178. Indian Journal of Microbiology. 47:353–357.

Dikel, Ç. ve Yanar, Y. 2018. Effect of Gelatin Coating Incorporated with Chitosan on the Chemical Quality of Refrigerated (+4 °C) Sea Bream (*Sparus Aurata* L., 1758) Fillets. Journal of Food Processing and Preservation. 35:74-81.

Dotto, G.L., Filho, S.P.C. 2017. Frontiers in Biomaterials Volume 3: Chitosan Based Materials and Its Applications. (3):334.

Dönmez, S., Özçelik, F. 1986. *Mucor miehei*' den Rennet Üretiminde Bazı Azotlu Katkı Maddelerinin Enzim Üretimine Etkisi Üzerinde bir Araştırma. Gıda. 11(2): 67-73.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Analytical Chemistry. 28(3):350-356.

Ebrahimzadeh, M., Chabra, A., Gharaei, E., Pourmorad, F. 2013. Preparation of chitosan from *Penicillium* spp. and determination of their degree of deacetylation. Indian Journal of Biotechnology. 12:231-235.

Er, B., Sarımehmetoğlu, B. 2009. Süt endüstrisinde mikrobiyel enzim kullanımı. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi. 80(1):25-30.

Erarslan, S. 2019. Fibroblast Büyüme Faktörü Uygulamasının Yara Dokusu Oksidan Olaylarına Etkisi. Gazi Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Erdogan, S., Kaya, M., Akata, I. 2017. (February). Chitin extraction and chitosan production from cell wall of two mushroom species (Lactarius vellereus and Phyllophora ribis). In AIP Conference Proceedings (Vol. 1809, No. 1, p. 020012). AIP Publishing LLC.

Erşahin, S., 2010. Vermikompost ürünleri organik üretime ne sunabilir. Türkiye IV. Organik Tarım Sempozyumu, 28 Haziran–1 Temmuz 2010, Erzurum. 330–334.

Euopean Commission (EC), 2012. Innovating for sustaianble growth: A Bioeconomy for Europe.

Fang, Q.H., Zhong, J.J. 2002. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of Ganoderma lucidum. Process Biochemistry. 37:769-774.

Feng, P., Luo, Y., Ke, C., Qiu, H., Wang, W., Zhu, Y., Hou, R., Xu, L., Wu, S. 2021. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 9. 10.3389/fbioe.2021.650598

Foster, L.J.R., Butt, J. 2011. Chitosan films are NOT antimicrobial. Biotechnol. Lett. 33:417-421.

Goy, R. C., Assis, O. B. G. 2014.Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 31(3):643-648.

Gow, N.A., Gadd, G.M. 1995. The Growing Fungus. Chapman and Hall, London, UK.

Gökçe, Y. 2008. Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 s. Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gül, Ü. D. 2020. Güncel Doğal Polimer Sentezi Yaklaşımları: Biyopolimer Üretiminde Mantarların Kullanımı, Sağlık Araştırmalarında Transdisipliner Yaklaşımlar Kitabı, syf 71, İksad yayınları.

Gür, B., Karagölge, Z. 2016. Sustainable Chemistry: Green Chemistry. Journal of the Institute of Science and Technology. 6:89-89. 10.21597/jist.2016218851

Halkman, A.K. 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. 1. Baskı, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. Ankara.

Hamed, I., Ozogul, F., Regenstein, J. 2016. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. Trends in Food Science & Technology. 48:40-50. 10.1016/j.tifs.2015.11.007

Hınıslı N. 2014. Vermikompost gübresinin kıvırcık bitkisinin gelişmesi üzerine etkisinin belirlenmesi ve diğer bazı organik kaynaklı gübrelerle karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Horn, S. J., Aspmo, S. I., And Eijsink, V. G. H. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolisates of fish viscera. Journal of Applied Microbiology. 99:1082-1089.

Huq, T., Khan, A., Brown, D., Dhayagude, N., He, Z. Ni, Y. 2022. Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. Journal of Bioresources and Bioproducts. 7:85-98.

Jaworska, M.; Konieczna, E. 2001. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus Absidia orchidis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:220–224.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jaziri, A., Wardani, D., Wan N., Huda, N. 2020. Fish Side-Stream: As a Potential Peptone Production: Towards Zero Waste Fish Processing. 1st International Conference on Fisheries and Marine Research (ICoFMR 2020)At: Universitas Brawijaya, Malang, East Java, Indonesia, 4 November 2020.

Jiang, L. 2011. Comparison Of Disk Diffusion, Agar Dilution,and Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing Of Five Chitosans, (Ms Thesis), Louisiana StateUniversity China.

John Kasongo, K., Tubadi, D.J., Bampole, L.D. et al. 2020. Extraction and characterization of chitin and chitosan from Termitomyces titanicus. SN Appl. Sci. 2:406.

Josh, 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.

Julshamn, K., Maage, A., Norli, H. S., Grobecker, K. H., Jorhem, L. and Fecher, P. 2007. Determination of arsenic, cadmium, mercury, and lead by inductively coupled plasma/mass spectrometry in foods after pressure digestion: NMKL interlaboratory study. Journal of AOAC International. 90(3):844-856.

Kacar, B. ve İnal, A. 2008. Bitki Analizleri. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

Kalyoncu F., Oskay M., Sağlam H., Erdoğan T., Tamer A.Ü. 2010. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Mycelia of 10 Wild Mushroom Species J Med Food. 13(2):415-419.

Kannan, M.J., Rajarathinam, K. 2010. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. Advance biological Research. 4:10.

Karagül, M., Altuntaş, B. 2018. Liyofilizasyon: Genel Proses Değerlendirmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 29. 10.35864/evmd.513002.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Karakuş, E., Ayhan, Z. 2019. Gıda Atıklarından Çevre Dostu Biyobozunur Ambalaj Malzemesi Üretimi. Gıda. 44 (6):1008-1019. 10.15237/gida.GD19102

Karakuş, E., Kibar Balballı, E. , Ara, İ., Ayhan, Z. 2021. Polisakkarit ve Protein Bazlı Aktif Biyokompozit Malzemelerin Gıda Ambalajlama Açısından Değerlendirilmesi. Akademik Gıda. 19 (1):74-88. 10.24323/akademik-gida.927700

Karpukhin, V. F., Krymskiĭ, M. V., Ivanov, I. A., Makridin, N. I., Kalashnikov, V. I. 1985. Utilization of mycelial waste of antibiotic production in the technology of kilned construction materials. Antibiotics and medical biotechnology. 30(1):32-35.

Kayıkçıoğlu H. H., Okur N., Bayız O. 2016. Toprak solucanları ile kompostlaştırılmış tütün atıklarının vermikompost olarak değerinin belirlenmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 53(1): 89-97.

Keskin, M., Setlek, P., Demir, S. 2017. Use of color measurement systems in food science and agriculture. International Advanced Researches & Engineering Congress, 16-18 November, Osmaniye, Turkey.

Kıran, Ö, Çömlekçioglu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi. 9(1):12-19.

Kibar, B. 2020. Mikrobiyal gübre uygulamasının marul ve beyaz baş lahanada çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkileri. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi. 6(3): 389-398.

Klimek-Ochab, M., Brzezińska-Rodak, M., Żymańczyk-Duda, E. et al. 2011. Comparative study of fungal cell disruption-scope and limitations of the methods. Folia Microbiol 56:469.

Konica Minolta 2007. Precise color communication. Konica Minolta Photo Sensing Inc., Japan.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kowalczyk, D.; Kordowska-Wiater, M.; Nowak, J.; Baraniak, B. 2015. Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. Int. J. Biol. Macromol. 77:350-359.

Kravanja, G., Mateja P., Željko K. and Maja L. 2019. Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications. Molecules 24(10):1960.

Krishnaswamy, A., Barnes, N., Lotlikar N. P., Damare S. R. 2019. An Improved Method for Protein Extraction from Minuscule Quantities of Fungal Biomass. Indian Journal of Microbiology. 59(1):100-104.

Kul R. 2014. Balık gübresi, mineral gübre ve kombinasyonlarının marulda (*Lactuca sativa* L.) bitki gelişimi ve besin elementi içeriği üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kurita, K. 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. Marine Biotechnology. 8(3):203-226.

Kurbanoğlu, E.B. 1999. Boynuz hidrolizatının bakteriler için besiyeri olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kurbanoglu, E.B., Algur, O.F. 2002. Use of ram horn hydrolysate as peptone for bacterial growth. Turk. J. Biol. 26:115-123.

Kurbanoğlu, E. B., Kurbanoğlu N. I. 2002. A new process for utilization as of ram horn waste. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94:202-206.

Kütük, C., Çaycı, G., Baran, A., Başkan, O and Hartmann, R. 2003. Effects of Beer Factory Sludge on Soil Properties and Growth of Sugar Beet (*Beta vulgaris saccharifera* L.). Biosource Technology. 90:75-80.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lasekan, A., Fatimah, A. B., Dzulkifly, H. 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. Waste Management. 33:552-565.

Lecointe, K. Cornu, M., Leroy, J., Coulon, P., Sendid, B. 2019. Polysaccharides Cell Wall Architecture of Mucorales. Frontiers in Microbiology. 10:469.

Li, J., Zhuang, S. 2020. Antibacterial Activity of Chitosan and Its Derivatives and Their Interaction Mechanism with Bacteria: Current State and Perspectives. European Polymer Journal. 138:109984. 10.1016/j.eurpolymj.2020.109984

Liang, J., Li, Z., Yan, X., Ren, X., Zhao, F. 2015. Study on Gypsum Plasters with Modified Waste Mycelium as Retarder. 10.2991/isci-15.2015.294

Mahlangu, R. I. S., Maboko, M. M., Sivakumar, D., Soundy, P., Jifon, J. 2016. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth, yield and quality response to nitrogen fertilization in a non-circulating hydroponic system. Journal of Plant Nutrition. 39(12):1766-1775.

Malinowska-Pańczyk, E., Staroszczyk, H., Gottfried, K., Kołodziejska, I., Wojtasz-Pajak, A. 2015. Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films. Polimery -Warsaw-. 61:735-741. 10.14314/polimery.2015.735

Mamo, J., Assefa, F. 2018. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. Journal of Food Quality. 1-15. 10.1155/2018/7957269

Mane, S.R., Pathan, E.K., Kale, D., Ghormade, V., Gadre, R.V., Rajamohanan, P.R., Badiger, M.V., Deshpande, M.V. 2017. Optimization for the production of mycelial biomass from *Benjaminiella poitrasii* to isolate highly deacetylated chitosan. J. Polym. Mater. 34:145-156.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy. 34:1-5.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

McCormick, K., Kautto, N. 2013. The bioeconomy in Europe: An overwiew. Sustainability (5): 2589-2608.

Mısırlıoğlu M. 2016. Solucan Gübresi nedir? TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi, Eylül, Sayı: 586, s. 46.

Mısırlıoğlu, M. 2017. Toprak solucanları – Biyolojileri, Ekolojileri, Zirai Yönleri, Türkiye Türleri ve Türlerin Taksonomik Özellikleri, Nobel Akademik Yayıncılık.

Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K., Onodera, K. 1992. Characterization of some fungal chitosans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1901-1905.

Moore G.K., Roberts G.A.F. 1980. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. Int J Biol Macromol. 2:115-116.

Negrea, P., Caunii, A., Saraç, İ., Butnariu, M. 2015. The study of infrared spectrum of chitin and chitosan extract as potential sources of biomass. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 10(4):1129-1138.

Nwe, N., Chandrkrachang, S., Stevens, W.F., Maw, T., Tan, T.K., Khor, E., Wong, S.M. 2002. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. Carbohydr. Polym. 49:235–237.

Odabaş, A. 2020. Gıda atıklarından kolajen ekstraksiyonu ve kitosan, polihidroksialkanoat kompozitlerinin hazırlanması. Marmara Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. 48s.

Onah, A., Okore, V., Onah, O.F., Uronnachi, E. 2017. Evaluation Of Prosopis Africana Seed Hydrolysates As Source Of Peptone For Microbial Culture Media. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences. 16:36-47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Owen, W. G., Lopez, R. G. 2015. End-of-production supplemental lighting with red and blue light-emitting diodes (LEDs) influences red pigmentation of four lettuce varieties. HortScience. 50(5):676-684.

Özel, N., Elibol, M. 2021. A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes. Carbohydrate Polymers. 262.

Özdemir, Ö. 2019. Marulda (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) humik asit ve bor uygulamalarının verim ve kaliteye etkisi. Ordu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Özel D.D., İğci N., Peker S., Ayhan B. 2014. Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2.

Özen, N., Sönmez, S. 2019. Farklı inkübasyon dönemlerinde uygulanan vermikompostun marul bitkisinin bitki besin element içeriği üzerine etkileri. Mediterranean Agricultural Sciences. Cilt: 32 Sayı: Özel Sayı, 115-119. 10.29136/mediterranean.559339

Öztürk, M., Erbaş, M. 2021. Sitrik Asit Üretimi ve Saflaştırılması. The Journal of Food. 296-310. 10.15237/gida.GD20133

Paulino, A. T., Julliana I. S., Juliana C. G., Jorge N. 2006. Characterization of Chitosan and Chitin Produced from Silkworm Crysalides. Carbohydrate Polymers 64(1):98-103.

Pehlivan, E., Yazıcı, M., Güner, G. 2014. Endüstriyel Katı Atıklar ve Geri Kazanım, 2. International Symposium on Innovative Tecnologies in Engineering and Science (ISITES2014), 18-20 June, Karabük, Türkiye.

Pellegrini, R.E.R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Evans, C.R. 1999. Antioxidant Activity Applying An İmproved Abts Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology and Medicine. 26(9/10):1231-1237.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Peksen, A., Uzun, S. 2008. Effect of chemical compositions of seedling media prepared by spent mushroom compost on seedling growth and development of kale and broccoli. Asian Journal of Chemistry. 20:3002-3008.

Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. Letters in Applied Microbiology. 35:17-21.

Poernomo, A., Buckle, K.A., 2002. Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18:333-340.

Polat E., Onus A.N. ve Demir H. 2004. Atık Mantar Kompostunun Marul Yetiştiriciliğinde Verim ve Kaliteye Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 17(2):149-154.

Poverenov, E., Zaitsev, Y., Arnon, H., Granit, R., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Weinberg, T., Fallik, E. 2014. Effects of a composite chitosan−gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. Postharvest Biol. Technol. 96:106-109.

Premuzic, Z., Garate, A., Bolilla, I. 2002. Production of lettuce under different fertilization treatments, yield and quality. Acta Hort. 571:65-72.

Priatni, S., Kosasih, W., Budiwati, T., Ratnaningrum, D. 2017. Production of peptone from boso fish (*Oxyeleotris marmorata*) for bacterial growth medium. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 60. 012009. 10.1088/1755-1315/60/1/012009

Raisa, Z., Jesús, Q.M., Tamara, L.R., Graciela, C.E., Lorena, O.H., Rodríguez Martínez, C., Castro-Escarpulli, G. 2016. New Protein Hydrolysate from *Spirulina platensis* used as Peptone in Microbiological Culture Media. Journal of Natural Products and Resources. 2:71-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ramos Berger L.R., Montenegro Stamford T.C., de Oliveira K.Á.R, de Miranda Pereira Pessoa A., de Lima M.A.B., Estevez Pintado M.M, Saraiva Câmara M.P., de Oliveira Franco L., Magnani M., de Souza E.L. 2018. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit Colletotrichum species. Int J Biol Macromol. 108:635-641.

Rane, K. D., Hoover, D. G. 1993a. Production of chitosan by fungi. Food Biotechnology. 7:11-33.

Rane, K. D., Hoover, D. G. 1993b. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. Process Biochemistry. 29:115–118.

Ren, X.Q., Zhao, Q.F. 2013. Waste Mycelium Processing and Resource Utilization. Advanced Materials Research, Trans Tech Publications, Ltd., Aug. 746:58-61.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. Progress in Polymer Science. 31:603-632.

Roy, J.C. , Salaün, F., Giraud, S., Ferri, A. 2017. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In (Ed.), Solubility of Polysaccharides. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.71385

Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., Jarboe, L. R. 2013. The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. Applied microbiology and biotechnology. 97(18):8317–8327.

Rowell, D. L. 1996. "Soil Science Methods & Applications". Harlow: Wesley Longman Limited.

Rozman, D., Pertot E., Beli I. and Komel R. 2005. Soybean peptones as nutrients in the fermentative production of eline ergot alkaloids with *Claviceps fusiformis*. Biotechnology Letters. 7:563-566.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Safaei, Z., Karimi, K., Zamani, A. 2016. Impact of phosphate, potassium, yeast extract, and trace metals on chitosan and metabolite production by *Mucor indicus*. Int. J. Mol. Sci. 17: 1429.

Safari, R., Saravi, N. H., Pourgholar, R., Motalebi, A. A., and Ghoroghi, A. 2011. Use of hydrolysates from silver carp (*Hypopthalmichthys molitrix*) head as peptone for Vibrio anguillarum and optimization using response surface method (RSM). J. Aquat. Food Prod. T. 20:247-257.

Sarıkürkçü C., Tepe B., Yamac M. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir – Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. Bioresource Technology. 99:6651-6655.

Shahlaei, M., Pourhossein, A. 2013. Biomass of *Aspergillus niger*: Uses and applications. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences. 2:83-89.

Shajahan, A., Sathiyaseelan, A., Narayan, K., Raj, E., Narayanan, V., Kaviyarasan, V. 2014. Preparation of Nanocomposite Based Film from Fungal Chitosan and Its Applications. (IJIRSE) International Journal of Innovative Research in Science & Engineering. 1-9. ISSN (Online) 2347-3207.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-ellouz, Y. 2009. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. African Journal of Biotechnology. 8:451-457.

Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A.A.Q. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. Food Chem. 60:605–610.

Şahin, S., & Ataklı, S. B. 2021. Effects of Vermicompost and Mycorrhiza Applications on Seedling Growth of Cowpea in Lime Soil. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology. 9(sp):2659-2662.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S. 2008. Özel Sebzecilik. Sevil Cilt Evi ve Matbaası, Tekirdağ.

Şeker, S., Beyenal, H., Ayhan, F., Tanyola, A. 1998. Production of Microbial rennin from *Mucor miehei* in a continiously fed fermenter, Enzyme and Microbial Technology 23: 469-474.

Şen O., Mısırlıoğlu M., Temel V. 2017. Vermikompost. II. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi-09-12 Temmuz 2017, Afyon.

Şenyiğit, U., Toprak, M., Coşkan, A. 2021. Farklı sulama suyu düzeyleri ve vermikompost dozlarının cam sera koşullarında yetiştirilen fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin su tüketimi ve verimine etkileri. Türk Bilim ve Mühendislik Dergisi. 3(1):37-43.

Tajdini, F., Amini, M.A., Nafissi-Varcheh, N., Faramarzi, M.A. 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. Int. J. Biol. Macromol. 47:180-183.

Talon, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M.,´ Vargas, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. 2017. Antioxidant edible films´ based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. Carbohydr. Polym. 157:1153-1161.

Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., Khor, E. 1996. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. Carbohydr. Polym. 30:239-242.

Tan, Y. M., Lim, S. H., Tay, B. Y., Lee, M. W., Thian, E. S. 2015. Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology. Materials Research Bulletin. 69:142-146.

Tao, W. 2004. Production and characterization of fungal chitin and chitosan. Master's thesis, University of Tennessee.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Taşar, O., Erdal, S., Taşkın, M. 2016. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. International Journal of Biological Macromolecules. 89. 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.007

Taşkın M., 2011. Tavuk Tüyü Atığından Elde Edilen Peptonun Mikroorganizmaların Üretiminde Kullanımı. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Taşkın, M. ve Kurbanoğlu E.B. 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. Journal of Applied Microbiology. 111(4),826-834.

Tavalı, İ.E. 2019. Vermikompost kullanımının sera koşullarında kıvırcık marul (*Lactuca sativa* Var. Crispa)' da toprak verimliliği ile fide üretimi, verim ve kalite özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Doktora tezi.

Tavuç, İ. 2016. Farklı Atıklardan Hazırlanan Kompost Bileşiminin Solucan Gübresinin Nitel Ve Nicel Özelliklerine Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı.

Teke, Ş., Coşkan, A., Aktaş, H. 2019. Vermikompostun domateste verim ve kalite parametreleri üzerine etkileri. Türk Bilim ve Mühendislik Dergisi. 1(1):23-27.

Tian, B., Liu, Y. 2020. Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application. Polymers for Advanced Technologies. 31. 10.1002/pat.5010.

Tianwei, T., Binwu,W., Xinyuan, S. 2002. Separation of chitosan from *Penicillium chrysogenum* mycelium and its applications. J. Bioact. Compat. Polym. 17:173-182.

Tokatlı, K., Demirdöven, A. 2015. Kitosan ve Kitosan Bazlı Yenilebilir Film Uygulamaları (Chitosan and Chitosan Based Edible Film Applications). Akademik Gıda. 13:347-352.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tonkova, E.V., Nustrova, M., Gushterova, A. 2007. New protein hydrolysates from collagen wastes used as pepton efor bacterial growth. Current Microbiology. 54:54-57.

Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., Pan, C. L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. Fish. Sci. 68: 170-177.

Tsiakaras, G., Petropoulos, S. A., Khah, E. M. 2014. Effect of GA3 and nitrogen on yield and marketability of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Australian Journal of Crop Science. 8(1): 127-132.

TÜİK, 2021. Bitkisel Üretim İstatistikleri (http://www.TÜİK.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul)

Uçan T. F., Mercimek, H. 2013. Gıda Endüstrisinde Kitosan Filmlerin Önemi. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 1:79. 10.24925/turjaf.v1i2.79-85.21

Unat, 1980. Türkiye Bakteriyolojisinde Besiyeri Sorunu. XIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (11-16 Ekim 1980 Ankara)'ne rapor ve ana konuları. 10-24.

Ünal A. 2021. Bilgi temelli biyoekonomi ağı ve Türkiye'deki uygulamalar. Ögel ZB, editör. Gıda Biyoteknolojisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri. 48-54.

Üner Bahar, D. 2021. Yara İyileştirme Özellikli Polimerlerin Yara Örtülerinde Kullanımı . İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. (13):157-181.

Wang, H., Jun Q., Fuyuan, D. 2018. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. Journal of agricultural and food chemistry. 66(2):395-413.

Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Cai, J., Kennedy, J.F. 2008. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. Carbohydr. Polym. 74:127-132.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wu, T. 2004. Production and characterization of fungal chitin and chitosan. Master's Thesis. Tennessee: University of Tennessee.

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W. S., Sams, C. E. 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. J Agric Food Chem, (53):3888-3894.

Vaingankar, P.N., Juvekar, A.R. 2014. Fermentative Production of Mycelial Chitosan from Zygomycetes: Media Optimization and Physico-Chemical Characterization. Adv. Biosci. Biotechnol. 5:940–956.

Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M. and Gushteroval, A. 2007. New Protein Hydrolysates from Collagen Wastes Used as Peptone for Bacterial Growth. Current Microbiology. 54:54- 57.

Vicente, G., Bautista, L.F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F.J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. and Garre, V. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus, Biochem. Eng. J. 48:22-27.

Vieira, G., Vieira, R., Macrae, A., Sousa, O. 2005. Peptone preparation from fishing by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85:1235-1237.

Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Yada, R.Y., Nakai, S. 1986. Secondary Structure of some Asaprtyl Proteinasesî, Journal Food Biochemistry. 10:155-183.

Yamaç M., Pekşen A. 2016. Atık Mantar Kompostu/Substratının Kullanım Alanları – 2: Lignoselülozik Enzim Ekstraksiyonu. Mantar Dergisi. 7(1):66-77.

Yegin, S., Dekker, P.J. 2013. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. Dairy Science & Technology. 93:565-594.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yıldırım, Z., Öncül, N., Yıldırım, M. 2016. Kitosan ve Antimikrobiyal Özellikleri. NGU J. Eng. Sci. 5:19-36.

Yılmaz, C., Sırça, E., Özer, H., Pekşen, A. 2018. *Agaricus* ve *Pleurotus* atık mantar kompostlarının domates fide üretiminde yetiştirme ortamı olarak kullanımı. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi. 5(3):229-235.

Yüksek, T. 2019. Farklı Tip Yemle Beslemenin Kırmızı Kaliforniya Solucanında Solucan Sayısı ve Ağırlığına Etkisi. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences.(Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi). 4(1):1-6.

Zamani, A., Edebo, L., Sjöström, B., Taherzadeh, M.J. 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. Biomacromolecules. 8:3786-3790.

Zhou, K., Yu, J., Ma, Y. et al. 2022. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. Appl Biochem Biotechnol. 194:3280-3295.

Ek-A

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name : Chitosan

Cas number : 9012-76-4

Molecular Formula : $(C_6H_{11}NO_4)_n$

Lot number : 070891

Native Source : Shrimp Shell

TEST	SPECİFİCATİON	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	Off-white to pink	complies
APPEARANCE(FORM)	powder	complies
PURİTY	≥70-95%(deacetylated)	80-85%
İNSOLUBLE MATTER	≤1.0%	0.72%
SOLUBILITY(COLOR)	Colorless to very light yellow	complies
SOLUBILITY(TURBIDITY)	clear	complies
SOLUBILITY(METHOD)	in 1% AcOH	complies
PH	4.5-6.5	complies
HEAVY METALS	≤40 ppm	complies
TOTAL PROTEIN	≤1% (w/dry weight)	complies
TOTAL ASH	≤1.5%(w/dry weight)	1.16%
SALMONELLA	Not delected	complies
TOTAL YEASTS/MOLDS	≤100 cfu/g	complies
STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXİN	Not delected	complies
COLİFORM BACTERİA	≤10	complies