

**KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYAL KAYNAKLARDAN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKTE
KİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONUN ARAŞTIRILMASI**

İbrahim Halil ÇELİK

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEMMUZ 2017
KİLİS**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI danışmanlığında, İbrahim Halil ÇELİK tarafından hazırlanan “Mikrobiyal Kaynaklardan Antimikrobiyal Özellikte Kitosan Üretimi ve Karakterizasyonun Araştırılması” adlı tez çalışması 26/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü **Biyoloji AnaBilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri Unvanı, Adı Soyadı

İmza (Kurumu)

Başkan Prof. Dr. Sadık DİNÇER
(Çukurova Üniv. Biyoloji ABD)

Üye Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI
(Kilis 7 Aralık Üniv. Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD)

Üye Yrd. Doç. Dr. Ayşenur ÖZŞAVLI
(Kilis 7 Aralık Üniv. Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD)

Bu tezin kabulü, Fen Bilimler Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No:

Bu tez çalışması TÜBİTAK 113Z569 “Mikrobiyal kaynaklardan antimikrobiyal özellikte kitosan üretimi ve karakterizasyonun araştırılması” konulu 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL KAYNAKLARDAN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKTE KİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONUN ARAŞTIRILMASI

İbrahim Halil ÇELİK

Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü

Biyoloji AnaBilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI

Yıl: 2017

Sayfa: 129

Antimikrobiyal aktivite gösteren kitosan biyopolimerinin, kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz üretici *Bacillus* sp suşları kullanılarak sentezlenmesi amaçlanmıştır. Mersin Susanoğlu Yapraklı Koy, Silifke Boğsak Koyu ve Adana Karataş liman topraklarından izole edilen *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis*'ten %1 maya özütü, 0.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.15 g KH_2PO_4 , %2 sükröz ve %1 kolloidal kitin (pH 8) içeren ortamda kitosan biyopolimerleri üretilmiştir. Kısmi saflaştırılan 2, 3, 7 ve 8 nolu kitosan preparatlarındaki total karbohidrat miktarı 0.393, 0.213, 0.163 ve 0.2 g/mL olarak hesaplanmıştır. Polimerlerin desetilasyon dereceleri ve moleküler ağırlıkları fourier dönüşümlü kızılötesi raman spektroskopisi (FT-IR) ile sırasıyla %70.23, 78.96, 82.96 ve 80.48; viskozimetre ile moleküler ağırlıkları ise 48.272, 48.461, 53.419 ve 50.188 g/mol olarak hesaplanmıştır. Kitosan preparatlarının 13 test bakterisine karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Preparatların *S. epidermidis* test bakterisine karşı gösterdiği inhibisyonun anlamlı olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık (4, 15, 25, 37 ve 40°C); pH (5, 6, 7, 8 ve 9); kitosan konsantrasyonu (100, 150 ve 250 mg/L); diğer potansiyel bileşikler (SDS, Triton X-100, β -merkaptolanol ve EDTA) ve metal iyonlarının (10, 20 ve 30 mM konsantrasyonlarda MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , NaCl ve KCl) antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri incelenmiştir. % olarak hesaplanan inhibisyonun sadece 30 mM BaCl_2 ve MgCl_2 varlığında arttığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, Kitin Deasetilaz, *Bacillus* sp, Deasetilasyon Derecesi, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT

Msc. Thesis

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN IN ANTIMICROBIAL PROPERTIES FROM MICROBIAL SOURCES

İbrahim Halil ÇELİK

Kilis 7 Aralık University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. H. Aysun MERCİMEK TAKCI

Year: 2017

Sayfa: 129

In our study chitosan biopolymer that exhibits antimicrobial activity is aimed to synthesize by using *Bacillus* sp strains produce chitin deacetylase (CDA) catalyzes the bioconversion of chitin to chitosan. Chitosan biopolymers were produced by adding 1% colloidal chitin in media including 1% yeast extract, 0.4 g (NH₄)₂SO₄, 0.15 g KH₂PO₄ and 2% sucrose (pH 8) from *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis*, isolated from soils taken from Mersin Susanoglu Yapraklı Bay, Silifke Bogsak Bay and Adana Karataş Port region. In the partially purified, 2, 3, 7 and 8 numbered chitosan preparates, the amounts of total carbohydrate were calculated respectively as 0.393, 0.213, 0.163 and 0.2 g/mL. Deacetylation degrees and molecular weights of the polymers were determined by Fourier Transform Infrared Raman Spectroscopy (FT-IR) and viscometer. Deacetylation degrees and molecular weights of the preparates were respectively 70.23, 78.96, 82.96 and 80.48%; of 48,272, 48,461, 53,419 and 50,188 g/mol. Antimicrobial activities of chitosan preparates against 13 bacteria were tested. The inhibition showed against *S. epidermidis* was determined to be significant, compared by chitosan standards with low and medium molecular weight. The effects on their antimicrobial activity of temperature (4, 15, 25, 37 and 40°C); pH (5, 6, 7, 8 and 9); chitosan concentration (100.150 and 250 mg/L); other potential compounds (SDS, Triton X-100, β-mercaptoethanol, and EDTA) and metal ions (10, 20 and 30 mM concentrations of MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, NaCl and KCl) were examined. It was determined that the inhibition calculated as %, only increased in the presence of 30 mM MgCl₂ and BaCl₂.

Keywords: Chitosan, CDA, *Bacillus* sp, Deacetylation Degree, Antimicrobial Activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin yürütülmesi esnasında desteğini ve yardımını esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Danışmanım tarafından yürütülen ve aynı zamanda bursiyer olarak yer aldığım TÜBİTAK 113Z569 “Mikrobiyal kaynaklardan antimikrobiyal özellikte kitosan üretimi ve karakterizasyonun araştırılması” konulu 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programınca projemize verilen destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam ve ders aşaması sırasında çalışmalarında destekte bulunan öğretim üyeleri Dr. Kıvılcım ÇAKTÜ GÜLER, Dr. Çiğdem ACIOĞLU MINGO ve Arş. Gör. Erdal ERTAŞ ve Öğr. Gör. Tuncay ÇELİK'e teşekkür ederim.

Laboratuvar alt yapısının proje süresince kullanılmasına olanak sunan Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne teşekkür ederim.

FT-IR ve Viskozimetre analizlerinin sürdürülmesi sırasında cihazların kullanılmasındaki desteklerinden dolayı Sabancı Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Uzman Dr. Deniz Kadir TAKCI'ya, Merve Senem AVAZ ve Omid Akhlaghi Baghoojari'a Sabancı Üniversitesi'ndeki çalışmalar süresince yardımsever ve özverili yaklaşımlarından dolayı özellikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam sırasında bana destek veren arkadaşlarım; Hümeyra DEMİREL, Nagehan GÜMÜŞ, Halil SANSAR, Ergün BARAK, Mehmet SEVER, Abdulkadir ÇELİK, Mehmet ÇAKIR, Süleyman KOÇER, İbrahim BARAK ve Halil SEVER'e teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak her konuda destekleyen her şeyim olan canım aileme teşekkür ederim.

İbrahim Halil ÇELİK

Temmuz, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Doğal Antimikrobiyal Ajanlar	3
1.2. Kitin	4
1.3. Kitosan	5
1.3.1. Kitosanın suda çözünübilirliği.....	7
1.3.2. Kitosanın karakteristikleri.....	9
1.3.3. Kitosanın biyolojik özellikleri.....	13
1.3.4. Kitosan yan ürünleri.....	22
1.3.5. Kitosanın endüstriyel uygulamaları	23
1.3.6. Kitosanın üretim metotları	28
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
2.1. Materyal	34
2.1.1 Kullanılan besiyerleri	34
2.1.2 Kullanılan çözeltiler.....	37
2.2. Yöntemler	37
2.2.1. Toprak örneklerinin toplanması.....	37
2.2.2. Kolloidal kitin üretimi	38
2.2.3. CDA üretici <i>Bacillus</i> sp.suşlarının izolasyonu.....	39
2.2.4. CDA kültür taraması	39
2.2.5. CDA üretici <i>Bacillus</i> sp.suşların tanımlanması	39
2.2.6. Suşların stoklanması	39
2.2.7. Kitosan üretim ortamının optimizasyonu	40
2.2.8. Sıvı fermantasyon ortamından kitosanların saflaştırılması ve kalitatif tespiti	40
2.2.9. Kitosan preparatlarındaki total karbonhidratın ninhidrin ayracı ile belirlenmesi.....	41
2.2.10. Saflaştırılmış kitosanların antimikrobiyal aktivite analizleri	43
2.2.11. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu	44
2.2.12. FT-IR ile deasetilasyon derecesinin belirlenmesi	45
2.2.13. Viskozimetre ile moleküler ağırlığın belirlenmesi.....	45
3. BULGULAR	47
3.1. CDA Üretici <i>Bacillus</i> sp Suşlarının Seçimi	47
3.2. Kitosan Üretiminin CDA Enzim Varlığına Bağlı Kültür Taraması.....	48
3.3. CDA Üretici İzolatların Tanımlanması ve Stoklanması	49
3.4. Kitosan Üretim Ortamının Optimizasyonu	50
3.4.1. <i>Bacillus cereus</i> 'un optimizasyon sonuçları.....	51
3.4.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in optimizasyon sonuçları.....	53
3.4.3. <i>Bacillus megaterium</i> 'un optimizasyon sonuçları.....	55
3.4.4. <i>Bacillus subtilis</i> 'in optimizasyon sonuçları	58
3.5. Fermantasyon Ortamında Kitin ve Kitosan Varlığı	60
3.6. Kitosan Preparatlarındaki Total Karbohidrat Miktarı.....	61

3.7. Kitosan Preparatların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	61
3.8. Kitosan Preparatların Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyon Sonuçları.....	64
3.8.1. Sıcaklığın antimikrobiyal aktiviteye etkisi	64
3.8.2. pH'nın antimikrobiyal aktiviteye etkisi	66
3.8.3. Kitosan konsantrasyonunun antimikrobiyal aktiviteye etkisi	67
3.8.4. Antimikrobiyal aktiviteye diğer potansiyellerin etkisi	69
3.8.5. Antimikrobiyal aktiviteye metal iyonlarının etkisi	70
3.9. FT-IR Sonuçları.....	73
3.10. Viskozimetre ve Moleküler Ağırlık Ölçümleri	76
4. TARTIŞMA	78
4.1. Tanımlanmış <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Besi Yeri Optimizasyonu	78
4.1.1. Fermantasyon ortamının karbon kaynağı optimizasyonu	78
4.1.2. Fermantasyon ortamının azot kaynağı optimizasyonu	80
4.1.3. Fermantasyon ortamının metal iyonları optimizasyonu	82
4.1.4. Fermantasyon ortamının ph optimizasyonu	83
4.1.5. Fermantasyon ortamının sıcaklık optimizasyonu	85
4.2. Preparatlardaki Biyopolimerlerin Varlığı.....	87
4.3. Kitosan Preparatlarının Antimikrobiyal Aktivite Analizleri.....	87
4.4. Kitosan Preparatlarının Deasetilasyon Derecesi	91
4.5. Kitosan Preparatlarının Moleküler Ağırlığı.....	92
4.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu	93
5. SONUÇLAR	109
6. KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

β :	Beta
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat derece
μM :	Mikromolar
AMPS:	Amonyum persülfat
atm:	atmosfer
aw:	su aktivitesi
ATP:	Adenozin Trifosfat
CDA:	Kitindeasetilaz enzimi
dak.:	dakika
EDTA:	Etilendiaminotetra-asetik asit
g:	Gram
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$:	mikrogram/ mikrolitre
EC:	Enzim Kodu
IUBMB:	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
kDa:	Kilodalton
mM:	Milimolar
mU/ml:	mili unite/mililitre
nm:	Nanometre
pI :	İzoelektrik nokta
rpm:	Dakikada devir sayısı
sp.:	Species (tür)
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris:	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED:	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
U/mg:	Unit/miligram
U/mL:	ünite /mililitre
v/v :	Hacim/Hacim (volume/volume)
w/v:	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
%:	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitin ve selülozun kimyasal yapısının şematik gösterimi (Ak Kalut, 2008)....	4
Şekil 1.2. Kitosanın kimyasal yapısı(Ak Kalut, 2008; Jiang, 2011).....	6
Şekil 1.3. Kitosanın sudaki formu (Demir ve Seventekin, 2009).....	7
Şekil 1.4. Kitosan amino gruplarının kuaternerleşmesine yol açan reaksiyonun şematik gösterimi (Goy ve ark., 2009).....	8
Şekil 1.5. Wang vd.,'larına göre metal-kitosan kompleks modeli (Goy ve ark., 2009) .	18
Şekil 1.6. Kitinin kısmi deasetilasyonu (Demir ve Seventekin, 2009).....	31
Şekil 1.7. Kimyasal ve biyolojik metotla kitinden kitosan eldesi (Arbia ve ark., 2012)	32
Şekil 1.8. Kitinin kitosana enzimatik dönüşümü (İmamoğlu, 2011).....	33
Şekil 2.1. Besi ortamına eklenecek kolloidal kitin.....	39
Şekil 2.2. Soldan sağa kolloidal kitin ve kitosanın kalitatif analizi takiben renklendirme sonucu.....	41
Şekil 2.3. Ninhidrin ayırıcı ile standart örneklerde gözlenen renk değişimi.....	42
Şekil 2.4. Total karbohidrat varlığı için kullanılan kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 3.1. Üst kısımda soldan sağa: 2. izolata ait plakta yayma ile elde edilmiş sarı zonlu koloni oluşumu ve inoküle edilmeden indikatör içeren besi ortamının rengi. Alt kısımda CDA üretici 2 nolu suşun ve aynı sahilden alınan örnekten izole edilmiş ancak CDA üreticisi olmayan izolatların üreme davranışı.....	47
Şekil 3.2. CDA üretici suşların (3, 7 ve 8) plaklarda gösterdiği üreme davranışları.....	48
Şekil 3.3. Tanı kağıtlarındaki renk değişimi.....	48
Şekil 3.4. CDA kültür taraması analizinde fermantasyon ortamında gerçekleşen renk değişimi.....	49
Şekil 3.5. Suşlara ait Gr boyama sonucu (Örnek 2 nolu suşa aittir).....	49
Şekil 3.6. Optimize edilmemiş fermantasyon ortamında 24 saatlik bakteriyel gelişim..	50
Şekil 3.7. <i>Bacillus cereus</i> 'un karbon kaynağı optimizasyon.....	51
Şekil 3.8. <i>Bacillus cereus</i> 'un azot kaynağı optimizasyon sonuçları.....	51
Şekil 3.9. <i>Bacillus cereus</i> 'un metal iyonları optimizasyon sonuçları.....	52
Şekil 3.10. <i>Bacillus cereus</i> 'un pH optimizasyon sonuçları.....	52
Şekil 3.11. <i>Bacillus cereus</i> 'un sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	53
Şekil 3.12. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in karbon kaynağı optimizasyon sonuçları.....	53
Şekil 3.13. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in azot kaynağı optimizasyon sonuçları.....	54
Şekil 3.14. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in metal iyonları optimizasyon sonuçları.....	54
Şekil 3.15. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in pH optimizasyon sonuçları.....	55
Şekil 3.16. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	55
Şekil 3.17. <i>Bacillus megaterium</i> 'un karbon kaynağı optimizasyon sonuçları.....	56
Şekil 3.18. <i>Bacillus megaterium</i> 'un azot kaynağı optimizasyon sonuçları.....	56
Şekil 3.19. <i>Bacillus megaterium</i> 'un metal iyonlarının optimizasyon sonuçları.....	57
Şekil 3.20. <i>Bacillus megaterium</i> 'un pH optimizasyon sonuçları.....	57
Şekil 3.21. <i>Bacillus megaterium</i> 'un sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	58
Şekil 3.22. <i>Bacillus subtilis</i> 'in karbon kaynağı optimizasyon sonuçları.....	58
Şekil 3.23. <i>Bacillus subtilis</i> 'in azot kaynağı optimizasyon sonuçları.....	59
Şekil 3.24. <i>Bacillus subtilis</i> 'in metal iyonu optimizasyon sonuçları.....	59
Şekil 3.25. <i>Bacillus subtilis</i> 'in pH optimizasyon sonuçları.....	60
Şekil 3.26. <i>Bacillus subtilis</i> 'in sıcaklık optimizasyon sonuçları.....	60

- Şekil 3.27.** Sırasıyla *Bacillus cereus* (2 nolu organizma), *Bacillus thuringiensis* (3 nolu organizma), *Bacillus megaterium* (7 nolu organizma) ve *Bacillus subtilis* (8 nolu organizma)'ten elde edilen kalitatif analiz sonucu..... 61
- Şekil 3.28.** 4000-575 cm^{-1} spektral bölgede kitosan örneklerine ait FT-IR spektrumu.. 75
- Şekil 3.29.** Kitosan örneklerine ait viskozimetre sonuçları 77



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kitinin başlıca kaynakları (Jiang, 2011).....	5
Çizelge 1.2. Çeşitli mikroorganizmalara karşı kitosan için MIC değeri (Goy ve ark., 2009)	22
Çizelge 1.3. Kitosan içerikli ticari ürünler (Demir ve Seventekin, 2009)	28
Çizelge 2.1. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri içeriği	34
Çizelge 2.2. Sıvı fermantasyon ortamının içeriği	35
Çizelge 2.3. Tryptic soy agar içeriği	35
Çizelge 2.4. Nutrient broth içeriği	35
Çizelge 2.5. Plate count agar içeriği	36
Çizelge 2.6. Nutrient agar içeriği	36
Çizelge 2.7. Leura-bertani besiyeri içeriği	36
Çizelge 2.8. FT-IR inceleme parametreleri.....	45
Çizelge 2.9. Viskozimetre inceleme parametreleri	46
Çizelge 3.1. Suşların tiplendirme sonuçları.....	51
Çizelge 3.2. Örneklerdeki total karbohidrat miktarı	61
Çizelge 3.3. İnokülasyon öncesi ortalama bakteri sayısı	62
Çizelge 3.4. Kontrol gruplarının % inhibisyon etkisi	62
Çizelge 3.5. 2 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi	63
Çizelge 3.6. 3 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi	63
Çizelge 3.7. 7 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi	64
Çizelge 3.8. 8 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi	64
Çizelge 3.9. Sıcaklığın etkisi	65
Çizelge 3.10. pH'nın etkisi	66
Çizelge 3.11. Kitosan konsantrasyonunun etkisi	68
Çizelge 3.12. Diğer potansiyellerin etkisi.....	69
Çizelge 3.13. Metal iyonların etkisi	70
Çizelge 3.14. Metal iyonların etkisi	72
Çizelge 3.15. Ortalama moleküler ağırlık.....	76

1. GİRİŞ

Bazı mantar hücre duvarlarının yanı sıra deniz diatomları ve alglerin; böcekler, karides, pavyrya, istiridye ve ıstakoz gibi kabukluların dış iskeletinin yapısal bileşeni olarak bulunan kitin, selülozden sonra en çok rastlanan ikinci doğal polimerdir (Ak Kalut, 2008; Jiang, 2011). Kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosan (poli- β -(1 \rightarrow 4)2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz), Rouget tarafından 1859 yılında keşfedilmiş olup glikozamin ve N-asetilglikozamin kopolimerlerinden oluşan lineer polikasyonik doğal bir polisakkarittir (Ak Kalut, 2008; Xie, 2011).

Kitosan, çeşitli özelliklerinde belirleyici olan farklı deasetilasyon dereceleri ile ticari olarak kabuklu deniz ürünlerinin kabuk atıklarından geleneksel yöntemler ile üretilmektedir (Jiang, 2011). En çok kullanılan metot olarak alkali deasetilasyon uygulaması tercih edilirse de enzimatik yöntemler ile kitinden kitosan üretimi mümkündür. Deasetilasyon uygulamaları sırasında, polimer N-asetil bağların kısmi parçalanmasını takiben D-glikozamin ünitelerinin oluşumu söz konusudur. Bu ünitelerin serbest amin grup içermesi polimerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktadır (Ak Kalut, 2008).

İlaç salınım sistemleri, katı polielektrolitler, sürfaktanlar, implantlar, ultra filtrasyon, ters osmoz ve evaporasyon için membran oluşturma gibi pek çok medikal alanda kullanımına izin veren kimyasal direnç, düşük toksisite, metal iyonları ile şelat oluşturma, antitümör, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite, film oluşturma, antibiyoz ve biyoyuymululuk gibi özelliklerinden dolayı gıda, arıtım mühendisliği, kozmetik, sağlık, farmasötik, biyomedikal, tarım ve tekstil gibi pek çok uygulama alanı mevcut biyomateryaller olarak öne sürülmektedir. Bu biyolojik özelliklere ek olarak ağrı kesici, hemostatik, kemik oluşumundan sorumlu osteoblastların üretimini hızlandırıcı, spermisit, merkezi sinir sistemi depresanı, bağışıklık sistemi destekleyicisi ve dişeti dokusu üzerinde rejenaratif etkilerde rapor edilmiştir (Dutta ve ark., 2004; Songa ve ark.,2008; Demir ve Seventekin, 2009; Knezevic-Jugovic ve ark.,2010; Kumar, 2010; Prabu ve Nataraja, 2012).

Özellikle potansiyel ilaç katkısı olarak geleneksel farmasötik cihazların üretiminde uygulama alanı bulmuştur. Mukoza yapışma, protein ve gen salınımına yönelik yeni ilaç üretimlerinde de kitosanın kullanımı rapor edilmiştir (Ak Kalut, 2008).

Pek çok araştırmacı gıda kökenli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı kitosanın antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Gözlemlenen geniş aktivite spektrumundan dolayı, kitosanın antimikrobiyal çalışmalarına yönelik ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Çeşitli deneysel koşullar uygulanarak, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen kitosan örneklerinin incelendiği güncel çalışmalarda antimikrobiyal aktivitede farklılıklar gözlenmiştir. Bu sebeple bilim dünyası aktivitedeki değişimlere ve farklılıklara neden olan faktörleri incelemeye yönelmiştir. Yapılan araştırmalar, antimikrobiyal etkinlik üzerinde moleküler ağırlık (MW), deasetilasyon derecesi (DD), pH ve test organizması gibi içsel ve dışsal faktörlerin etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Jiang, 2011). Ticari olarak kullanılan kitosanların deasetilasyon derecesi %70-95 ve moleküler ağırlığı 50-2000 kDa arasında değişmektedir (Ak Kalut, 2008).

Antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra hipokolesterolemik ve yara iyileştirici gibi özelliklerin belirlenmesi bu polisakkarite olan ilginin, özellikle sağlık alanındaki uygulamaları için mit vericidir. Fakat yeni keşfedilen bir madde olması, farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için karakteristik özellikleri üzerinde değişime neden olan faktörlere yönelik standardizasyon çalışmalarını zorunlu kılmıştır (Ak Kalut, 2008).

Bu tip uygulamalarda kullanılacak kitosan, içsel özellikleri (sağlık, moleküler ağırlık, viskozite ve deasetilasyon derecesi) ve fiziksel formları ile karakterize edilmektedir. Bu karakteristiklerin yanı sıra, uygulama ve üretim proseslerindeki pek çok faktör son ürünün eldesini etkileyebileceği için kitosan ürünün kalitesi ve özellikleri de çeşitlilik gösterebilmektedir (Ak Kalut, 2008).

Ticari olarak kullanılacak kitosanın kalitesi, N-asetil gruplarının deasetilasyon derecesi (kitinin yapısındaki aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılması derecesi), moleküler ağırlığı, sağlığı, üretim prosesi ve homojenliğene bağlı faktörlerin etkisi altında çeşitlilik göstermektedir. Yapı ve özellik arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, çoğu etkin kitosanın fermantasyon koşullarında kontrol edilebilmesini sağlayan yüksek pozitif yük yoğunluğuna sahip ve orta-düşük moleküler ağırlıklı olduğu belirlenmiştir. Deasetilasyon derecesinin belirlenmesine yönelik uygulamalarda ise kitosan toksisitesinin deasetilasyon derecesine (DD) bağlı olduğu ortaya konmuştur. %35'ten yüksek deasetilasyon derecesindeki kitosanların düşük toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyal yöntemlerle üretilen kitosanların genellikle düşük

deasetilasyon derecesi ve orta-düşük moleküler ağırlık gösterdiği literatürde bildirilmiştir (Knezevic Jugovic ve ark., 2010; Jiang, 2011; Prabu ve Nataraja, 2012).

Kitosanın NaOH piroliz (ısı ayrışım) metodu ile kimyasal olarak kitinden üretildiği geleneksel yöntemlerde kullanılan organik asit çözücüler bu biyopolimerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini bozabilmektedir. Ve bu bozunma homojen olmayan düşük kalitede ürünlerin oluşumuna neden olabilmektedir (Kaur ve ark., 2012).

Son ürünün karakteristik özelliklerinde bozulmaların gözlenmesi, çevre kirliliği ve yüksek enerji tüketimi gibi bazı dezavantajlar kimyasal metodun kullanımını sınırlandırmaktadır. Yöntemin dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, endüstriyel açıdan bu denli kullanışlı bir biyopolimerin en yüksek kapasitede elde edilmesine olanak sağlayan biyolojik prosesler önem kazanmaktadır. Bu sebeple ticari amaçla kullanılacak kitosanın, üretim süreçlerindeki kimyasal proseslerin asgari düzeye indirgenmesini ve şeker zincirlerinin biyoparçalanması ile alkalın atıkların azaltılmasını mümkün kılan çevre dostu biyolojik yöntemlerin temel alındığı endüstriyel ürünlerin eldesinde bakteriler, mayalar, mantarlar ve enzimler gibi biyolojik materyallerin kullanımı bilimsel dünyada ön plana çıkmaktadır.

Çok geniş bir perspektifte kullanım alanına sahip ve parçalanarak tekrar doğa tarafından emilimi mümkün biyopolimerin, geleneksel proseslerle elde edilenlere kıyasla daha etkin antimikrobiyal aktiviteye sahip kitosanın kısa sürede ve düşük maliyetli enzimatik yöntemlerle üretilmesi çalışmamızın temel amacını oluşturmaktadır.

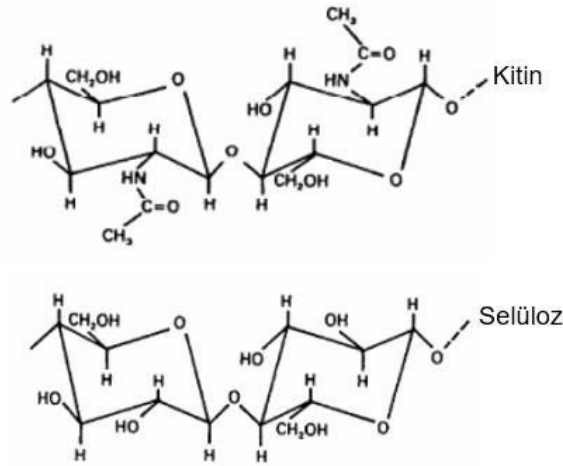
1.1. Doğal Antimikrobiyal Ajanlar

Son on yıldır, özellikle gıda endüstrisi başta olmak üzere pek çok alanda mikrobiyal zararlıların kontrol edilebilmesi için sorbat, benzoat, sülfite gibi geleneksel koruyucu maddeler kullanılmaktadır (Jiang, 2011). Kimyasal olarak sentezlenen bu antimikrobiyal ajanlar yerine, patojenler ile mücadele için doğal ve düşük toksisitede koruyucu maddelerin üretimine ve kullanımına yönelik uygulamaların gün geçtikçe arttığı gözlenmektedir (Jiang, 2011). Doğal antimikrobiyaller mantar (kitosan, antibiyotik, lizozim ve laktoperoksidaz), bitki (aldehitler, esterler, baharatlar ve uçucu

yağlar), mikroorganizmalar (nisin) ve hayvanlar (kitin ve kitosan) gibi pek çok farklı kaynaklardan elde edilmektedir (Jiang, 2011).

1.2. Kitin

Kitin, doğada bol miktarda bulunan hayvan orjinli bir polisakkarittir ve fibros bir yapı ile karakterize edilmektedir (Goy ve ark., 2009). İlk kez Bradconnot tarafından 1811'de kitin ismi kullanılmıştır (Jiang, 2011). β -(1 \rightarrow 4) glikozid bağlarla bağlı 2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukoz (N-asetil-D-glikozamin) tekrar ünitelerinden oluşan ve suda çözünmeyen lineer bir polisakkarittir (Dutta ve ark., 2004; Varesano ve ark., 2011). Kitinin kimyasal yapısı, her monomer üzerinde bir asetilamin grup ile yer değiştiren bir hidroksil gruba sahip olmasıyla selüloze benzerdir (Şekil 1.1) (Goy ve ark., 2009). Selüloz üreten organizmalarda gözlenmemesine rağmen, önceleri bir selüloz yan ürünü olarak düşünülmekteydi. Fakat ilerleyen çalışmalarda kitin polimerinin C2 pozisyonunda asetamid gruplar içermesi ile selülozden farklılığı ortaya konmuştur. Kitinin yıllık olarak hemen hemen selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir (Dutta ve ark., 2004). Kitin çeşitli polimorfik formlar içinde oluşmakta fakat α -kitin mantar duvarlarında en çok bulunan formdur. α -kitinde, tek zincirler mikrofibriller içerisinde kümeleşen güçlü ve sert yapıdır (Knezevic-Jugovic ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Kitin ve selülozün kimyasal yapısının şematik gösterimi (Ak Kalut, 2008)

Karides, pavurya, istiridy ve istakoz gibi kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinin asıl bileşenini oluşturmaktadır (Goy ve ark., 2009; Jiang, 2011). Kitinin başlıca kaynakları Çizelge 1.1'de özetlenmiştir. Kitinin ekstraksiyonu, kalsiyum karbonat yapının sıcaklık muamelesi ile bir asitle uzaklaştırılması (demineralizasyon) ve proteinlerin uzaklaştırılması (deproteinizasyon) aşamalarını içermektedir. Protein

uzaklaştırma basamağı genellikle alkali muameleler ile (NaOH gibi) gerçekleştirilmektedir. Ekstre edilmiş saf formunda, kitin beyaz, sert, yüksek düzeyde kristalin, yarı saydam, elastik ve oldukça dirençli bir yapıya sahiptir. Bununla birlikte, düşük çözünürlük ve düşük reaktivite göstermektedir (Goy ve ark., 2009). Nitrojen varlığına rağmen kitinin immünojenitesi oldukça düşüktür (Jiang, 2011).

Çizelge 1.1. Kitinin başlıca kaynakları (Jiang, 2011)

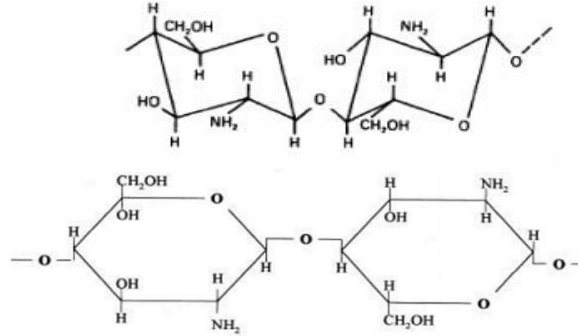
	Organizma	Kitin içeriği (%)
Kabuklular	Yengeç	72.1
	Karides	69.1
	Istakoz	69.8
Böcekler	Sinek	54.8
	Kelebek	64.0
Mantarlar	<i>Aspergillus niger</i>	42.0
	<i>Mucor rouxii</i>	44.5

Kitinin yapısı, glikan halka üzerindeki C2 pozisyonunda amin radikallerine bağlı asetil grupların, konsantre alkali solüsyonlar ile yüksek sıcaklıklarda kimyasal hidrolizasyonu sonucu yapıdan uzaklaştırılması ile modifiye edilebilmektedir. Asetil amin grupların fraksiyonu %35-40 kadar azaltıldığında, ortaya çıkan ürün kitosan ((1-4)-2-amin-2-deoksi- β -D-glukan ve (1-4)-2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukan) olarak ifade edilen bir kopolimerdir (Goy ve ark., 2009).

1.3. Kitosan

Kitosan, kitinin alkali deasetilasyonu (%40-50) ile üretilen bir biyomateryaldir. Bu deasetilasyon tam anlamıyla gerçekleşmediği için, kitosan kitinin kısmi N-deasetile edilmiş yan ürünü olarak ifade edilmektedir (De Britto ve ark., 2011). Fermantasyon teknolojisinde biyolojik materyal olarak mantarın (*Aspergillus niger*) kültüvasyonu ile kitosan elde edilmektedir. Mantarlar bu polimer için alternatif bir kaynaktır. Yapısal olarak kitosan, $\beta(1\rightarrow4)$ bağlı iki monosakkarit N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozamin'den oluşan yüksek moleküler ağırlıkta lineer polikasyonik bir heteropolisakkarittir. Kitosan C2 pozisyonundaki amino grup ve C3-C6 pozisyonlarındaki birincil ve ikincil hidroksil grupları olmak üzere 3 tip reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. Şekil 1.2'de kitosanın kimyasal yapısı gösterilmiştir. Kitosan polimerindeki iki monosakkaritin oranları, molekülün deasetilasyon derecesine,

moleküler ağırlığına, viskozitesine ve pKa değerlerine göre değişkenlik göstermektedir (Jiang, 2011).



Şekil 1.2. Kitosanın kimyasal yapısı(Ak Kalut, 2008; Jiang, 2011)

Molekülün söz konusu özellikleri fizikokimyasal yapısını ve uygulama alanlarını doğrudan etkilemektedir. Kitinin çözünmemesine 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 moleküler ağırlığı (MW) ve deasetilasyon derecesi (DA) ile karakterize edilmektedir. Moleküler ağırlığı 100-1000 kDa arasında değişen ve deasetilasyon üniteleri %85'ten fazla olan kitosan polimerleri ticari olarak kullanışlıdır. Polimerin moleküler ağırlığını belirlemek için spesifik standart yoktur. Fakat düşük moleküler ağırlık < 50 kDa, orta moleküler ağırlık 50-150 kDa ve yüksek moleküler ağırlık > 150 kDa olarak kabul edilmiştir (Goy ve ark., 2009).

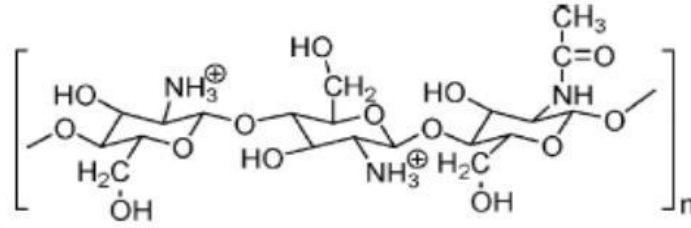
Kitosan zayıf bir bazdır ve suda çözünmez fakat pKa'sı yaklaşık 6.3'ün aşağısındaki dilüe sulu asidik solüsyonlarda çözünebilir. Bu asidik muamele ile glukozamin üniteler (NH₂) çözünebilir protonlu forma (-NH₃⁺) dönüşmektedir. Kitosanın çözünebilirliği biyolojik kaynağına, moleküler ağırlığına ve asetilasyon derecesine bağlı olarak değişebilmektedir (Goy ve ark., 2009).

Dilüe asit solüsyonlarında çözünebildiği için, sıkı ve porlu yapıdaki kitosan filmler kalıba dökme veya daldırma ile hazırlanabilmektedir. Biyofonksiyonel materyal olarak kitosan filmler, canlı dokularca tolere edilebildiklerinden dolayı özellikle taze gıdaların kalitesini korumak ve raf ömrünü uzatmak için yenilebilir kaplamalar olarak da kullanılmaktadır. Tıbbi alanda ise, doku ve kemik mühendisliğinde iskele olarak ve tedavi edici yara pansuman malzemesi olarak test edilmektedir. Bunun yanı sıra, kitosan polimerinde, biyoyumluluğu artırarak mekaniksel ve çözünebilirlik

özelliklerinin manüplasyonu için kimyasal türevlendirilmesi izin veren fonksiyonel gruplar mevcuttur (Goy ve ark., 2009).

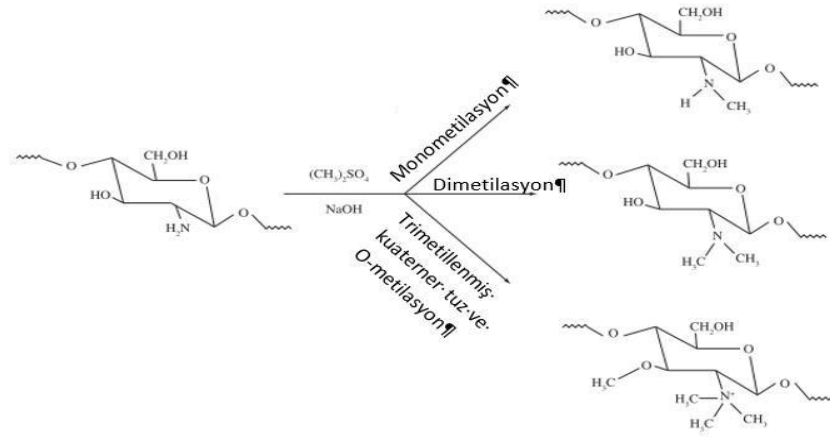
1.3.1. Kitosanın suda çözünebilirliği

Kitin ve kitosan çeşitli antimikrobiyal özellikleri ile ilgi çekici biyomakromoleküller olmalarına rağmen, her iki molekül suda çözünür olmadığı için uygulamalar oldukça sınırlıdır. Kitosanın sudaki formu Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Kitosanın sudaki formu (Demir ve Seventekin, 2009)

Suda çözünebilir kitosan yan ürünleri, sulu besi ortam pH'sının katyonik bir polielektrolit karakteristik bağımsızlığı ile polimer zincirlerin sürekli pozitif yüklenmeleri sonucu kazanılabilmektedir. Bu yüklenme amino grupların nitrojen atomlarının kuaternerleştirilmesi için başarılıdır. Bunun için, kitosanın dimetilsülfat, NaCl ve NaOH içerisinde sürdürülen, N,N,N-trimetilkitosan oluşumu ile sonuçlanan geniş bir metilasyon gerektirir (Şekil 1.4). Kitosan yan ürünlerinin sentezi C2 pozisyonundaki amino gruplar üzerinde metil fonksiyonellik aşılması ile gerçekleştirilmektedir (Goy ve ark., 2009).



Şekil 1.4. Kitosan amino gruplarının kuaternerleşmesine yol açan reaksiyonun şematik gösterimi (Goy ve ark., 2009)

Kitosanın kuaterner tuzlarının bakterilere karşı kitosandan daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Jia ve ark. (2001) N-propil-N,N-dimetil kitosan yan ürününün *E. coli*'ye karşı aktivitesinin kitosandan 20 kat daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular özellikle katyonik yüklü yan ürünlerin yüksek aktivite gösterdiğine işaret etmektedir. Kitosan yan ürünlerin önemli bir özelliği de alkil kısmın antimikrobiyal aktivitede önemli bir rol oynadığına yönelik kanıtlardır. Xie ve ark., (2011) göre, nötral pH'da, NH_2 'nin protonasyon derecesi çok düşüktür böylece NH_3^+ 'ün itimi zayıftır. Böyle koşullar altında, moleküler arası ve molekül içi hidrojen bağlar, bakteri hücre duvarı ve yan ürün arasındaki yapısal çekimi doğrulayan polimer zincirin hidrofobik ve hidrofilik kısımlarında hidrofobik mikro-bölgenin oluşumuna neden olmaktadır.

Rabea ve ark. (2003) antimikrobiyal aktivitenin alkil kısım içeriğinin artmasıyla arttığını ortaya koymuştur. Yapmış oldukları çalışmada, zincir uzunluğu üzerinde alkil yer değişiminin artmasıyla antibakteriyel aktivite de artmıştır.

Kitosanın kuaterner tuzlarının yanı sıra, hidroksipropil ve karboksimetil kitosanlar gibi diğer suda çözünebilir yan ürünleri de mevcuttur. Yüksek değiştirim dereceli (DS) hidroksipropil kitosan yan ürünler suda çözünmez, fakat maleik asitle aşılama sonrası ürün nötral pH'da çözünebilir forma dönüşür ve diğer yan ürünlere göre daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterir. Bu yan ürünlerin çalışmaları, mikrobiyal-antimikrobiyal ajan etkileşiminde söz konusu mekanizmaların açıklanmasında çok önemlidir. Örneğin, nötral ve alkalın besi ortamı için, kitosanın katyonik doğası antibakteriyel aktivitesini

tam olarak açıklayamamaktadır. Ancak kitosan zincirindeki NH₂ gruplarının güçlü eşgüdüm kabiliyeti olası bir mekanizmayı tanımlayabilmektedir.

Sun ve ark. (2006) tarafından yapılan karboksimetil kitosan ile ilgili çalışmada, hem pozitif hem de negatif yer değişimli gruplar içeren yan ürün ortaya konmuştur. Bu sonuçlar antimikrobiyal mekanizmanın açıklanmasına yön vermiştir. Karboksimetil kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ya kuaterner grupların yer değiştirme derecesi ya da moleküler ağırlıktan etkilenmektedir. Karboksimetil grupların yer değiştirme derecesinin etkisi açık değildir (Goy ve ark., 2009).

1.3.2. Kitosanın karakteristikleri

Kitosanda deasetilasyon derecesi

Deasetilasyon prosesi kitinin moleküler zincirinden asetil grupların ayrılmasını takiben, yüksek düzeyde kimyasal reaktif amino gruplar taşıyan bir bileşiğin (kitosan) oluşumu ile sonlanan reaksiyonları içermektedir. Deasetilasyon derecesi kitosanın fizikokimyasal özelliklerini etkilediği gibi biyoparçalanma ve immünolojik aktivitelerini de etkilemektedir (Ak Kalut, 2008). Kitin ve kitosan arasında deasetilasyon derecesine dayalı kesin bir adlandırma sınırı tanımlanamamıştır. Ortalama olarak zincirdeki her altı ve yedi kökte bir serbest amino grubun varlığına yönelik sonuçlar elde edilmiştir.

Kitosanın deasetilasyon derecesi elde edilen kaynağa ve uygulama metotlarına bağlı olarak ortalama %80 olmakla birlikte %56 ve 99 arasında değişkenlik göstermektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için ninhidrin testi, lineer potansiyometrik titrasyon, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, yakın kızıl ötesi spektroskopisi, hidrojen bromür titrimetri, kızıl ötesi spektroskopisi gibi çeşitli metotlar kullanılmaktadır (Ak Kalut, 2008).

Moleküler ağırlık

Kitosan yüksek moleküler ağırlıkta bir biyopolimerdir. Kompozisyonu gibi, moleküler ağırlığı da kaynağına ve elde edilen metoda göre değişkenlik göstermektedir. Saf kitinin moleküler ağırlığı genellikle bir milyon daldondan daha büyüktür. Genelde yüksek sıcaklık, çözünebilir oksijen ve basınç stresi kitosanı parçalayabilmektedir. Örneğin 280°C'de kitosanın termal yıkımı gerçekleşir ve polimer zincirleri hızlıca yıkılır. Sonuç

olarak düşük moleküler ağırlıkta bir ürün elde edilir. Bunun yanı sıra, yüksek sıcaklıkların ve konsantre asitlerin (asetik asit ve sülfirik asiti takiben HCl) kullanımı ile yürütülen depolimerizasyon basamağı da moleküler ağırlığı etkilemektedir. Kitosanın moleküler ağırlığı kromatografi, viskozimetre ve ışık saçılım metotları ile belirlenebilmektedir (Ak Kalut, 2008).

Viskozite

Viskozite kitosanın moleküler ağırlığının belirlenmesinde önemli bir faktör olduğu kadar gıda sistemleri gibi kompleks biyolojik çevrelerde ticari kullanımı etkileyen bir parametredir. Yüksek moleküler ağırlıkta kitosanlar sıklıkla endüstriyel proseslerde arzu edilmeyen yüksek viskoz solüsyonlar oluşturur. Kitosanın viskozitesi demineralizasyon süresinin artması ile azalmaktadır. Asetik asit içerisinde kitosanın viskozitesi pH azalması ile artma eğilimindedir. Fakat HCl içerisindeki pH azalması ile viskozite azalmaktadır. Bu durum iyon kuvveti yanı sıra iyonizasyon derecesinin bir fonksiyonu olan kitosanın ‘İçsel Viskozitesi’ olarak tanımlanmaktadır. Kitin hazırlamada %3 NaOH ile deproteinizasyon ve demineralizasyon aşamalarının eliminasyonu ile elde edilen kitosanın viskozitesinin azaldığı rapor edilmiştir. Ağartıcı materyallerin (aseton ve sodyum hipoklorit) kullanımının da kitosanın viskozitesini azalttığı belirlenmiştir (Ak Kalut, 2008).

Benzer şekilde kitosanın viskozitesinin fiziksel (öğütme, ısıtma, otoklavlama ve ultrasonikasyon; dondurma hariç) ve kimyasal (ozon) metotlara bağlı olarak muamele süresi ve uygulanan sıcaklık arttıkça azaldığı belirtilmiştir. Kitosan solüsyonunun +4°C’de depolanması süresince viskozite stabilitesini korumaktadır. Partikül büyüklüğünün kalite üzerindeki etkisi açıklanmıştır. Kitosan ürünlerindeki 1 mm partikül büyüklüğünün 2 veya 6.4 mm’ye yükselmesi daha yüksek moleküler ağırlığa ve viskoziteye işaret etmektedir. Ayrıca partikül büyüklüğünün artışı şişme zamanını uzattığından ürünün düşük bir deasetilasyon derecesine sahip olduğuna yönelik kanıtlar da elde edilmiştir (Ak Kalut, 2008).

Çözünürlük

Kitin pek çok organik çözücüde çözünmemesine karşın, kitosan pH 6.0’ın altındaki dilüe asidik solüsyonlarda kolaylıkla çözünebilmektedir. Asetik asit, formik asit ve

laktik asit gibi organik asitler kitosanın çözünmesi için kullanılmaktadır. Referans olarak, genellikle pH 4.0'da %1'lik asetik asit solüsyonu tercih edilmektedir. Kitosan %1'lik HCl solüsyonunda da çözünebilir ancak sülfirik asit ve fosforik asitte çözünemez. İnorganik asitte kitosanın çözünebilirliği sınırlıdır. Yüksek sıcaklıklarda konsantrasyon asetik asit solüsyonlarında kitosanın depolimerizasyonu gerçekleşir. pH 7.0'ın üzerinde kitosanın çözünebilirliğinin stabilitesi azalmaktadır. Yüksek pH'da presipitasyon veya jelasyon eğilimleri söz konusudur. Jel formunda, kitosan solüsyon anyonik hidrokolloid ile poli-iyon kompleks oluşturur (Ak Kalut, 2008).

Kitosan ve asit arasındaki konsantrasyon oranı çözünebilirlikte önemli bir faktördür. Organik çözücünün %50 kadar yüksek konsantrasyonunda kitosan bir viskozifer olarak davranır. Sıcaklık, deasetilasyon zamanı, alkali konsantrasyon, kitin izolasyonu sırasında uygulanan öncü muameleler, kitin oranı ve partikül büyüklüğü gibi önemli faktörler kitosanın çözünebilirliğini etkilemektedir (Ak Kalut, 2008).

Çözünebilirlik deasetilasyon derecesi ile kontrol edilmektedir. İstenilen çözünebilirliği kazanmak için en az %85 deasetilasyon derecesinin gerekli olduğu tahmin edilmektedir. Saf kitinin %45-50'lik NaOH çözeltide 10-30 dk. ön muamelesi ile elde edilen asit çözünebilir kitosanlar için, %1'lik asetik asit çözeltisinde %95'in üzerinde çözünebilirlik elde edilmiştir. %45'lik NaOH ile yalnızca 5 dk.; %40'lık NaOH ile 30 dk. muamele edilmiş kitinlerden elde edilen kitosanın %1'lik asetik asit çözünebilmesi için yeterli deasetilasyon gerçekleşmemiştir (Ak Kalut, 2008).

Hacimsel yoğunluk

Karidesten elde edilen kitinin hacimsel yoğunluğu (0.06 g/mL), yengeçten üretilene (0.17 g/mL) göre daha fazla porlu olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada dikenli ıstakoz kabuğundan elde edilen kitin ve kitosanın hacimsel yoğunluğu 0.39 g/cm^3 olarak hesaplanmıştır. Dikenli ıstakoz kabuğunun demineralizasyon ve deproteinizasyon veya her iki metotla muamele edildiğinde kitin ve kitosan arasında hacimsel yoğunlukta belirgin bir fark elde edilememiştir. Kitosanın hacimsel yoğunluğu elde edilen kaynağın yani kabukluların türüne göre ve ön muamele işlemlerine göre farklılık taşımaktadır. Böylelikle ticari ürünler arasındaki farklılık daha net anlaşılmaktadır. Aynı çalışmada deasetilasyon derecesinin artışıyla, hacimsel yoğunluğun azaldığı da rapor edilmiştir.(Ak Kalut, 2008).

Renk

Kabukluların kabuğundaki pigment kitinle kompleks (4-keto ve üç 4, 4'-diketo-β-karoten yan ürünler) oluşturmaktadır. Kitosan tozu doğada oldukça zayıftır ve rengi soluk sarıdan beyaza kadar çeşitlilik göstermektedir (Ak Kalut, 2008).

Su ve yağ tutma kapasitesi (WBC ve FBC)

Kitosanın su tutma kapasitesi selülozden hatta kitinden bile önemli düzeyde fazladır. Kitosanın su tutma kapasitesi temel olarak ortalama %581 ile %702-1150 arasında değişmektedir. Kitosanın su ve yağ tutma kapasitesi üzerinde demineralizasyon ve deproteinizasyon gibi basamakların belirgin bir etkisi olduğu da rapor edilmiştir. Demineralize edilmiş kabuğun deproteinizasyonu, deproteinize edilmiş kabuğun demineralizasyonu ile karşılaştırıldığında kitosana yüksek su tutma kapasitesi kazandırmıştır. Ayrıca ağartıcı kullanılmamış dekolorizasyon prosesleri kitosanın su tutma kapasitesinde bir azalmaya neden olmaktadır (Ak Kalut, 2008).

Kitin ve kitosanın yağ tutma kapasiteleri kitosanda kitine göre daha düşük olmakla birlikte %315 ve 170 olarak belirlenmiştir. Kitosanın üretimi süresince uygulanan dekolorizasyon çalışmalarının kitosanların yağ tutma kapasitesini azalttığı ortaya konmuştur. Azalmış viskozite de yağ tutma kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır (Ak Kalut, 2008).

Deproteinizasyondan önce demineralizasyon ve takiben deasetilasyon basamakları uygulandığında, demineralizasyon öncesi deproteinizasyon aşamasının yürütülmesine göre kitosanın yağ tutma kapasitesinde artma kaydedilmiştir (Ak Kalut, 2008).

Emülsiyonlaştırma

Kitosan tek başına emülsiyonlar üretememesine rağmen kontrol ile karşılaştırıldığında kitosanın eklenmesiyle yumurta sarısının emülsiyonlaştırma kapasitesinin arttığı rapor edilmiştir. %0.1 veya 0.3 ile karşılaştırıldığında %0.5 kitosan konsantrasyonunda en iyi emülsiyonlaştırma kapasitesi gözlenmiştir. Genel olarak, kitosan emülsiyonları sıcaklık değişimlerinde oldukça stabildir. Viskozite ve deasetilasyon derecesinin kitosanın emülsiyonlaştırma özelliği için belirleyici bir faktör olduğu öne sürülmüştür. Orta deasetilasyon derecesindeki kitosan içeren protein solüsyonunun, yüksek deasetilasyon

derecesindeki kitosan içerene göre düşük etkili emülsiyon ürettiği ortaya konmuştur (Ak Kalut, 2008).

Film oluşturma

Kitosan kaplamaların domates, çilek gibi sebze ve meyvelerin bozulmasını önemli düzeyde önlediği gözlenmiştir. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında, kitosan kaplı meyvelerin depolaması ile yalnızca yüksek titrasyon asitliği değil aynı zamanda daha az pigmentasyon ve bozulmada yavaşlama belirlenmiştir (Jiang, 2011). Düşük moleküler ağırlıkta kitosan fitopatogenlere karşı, yüksek moleküler ağırlıktaki kitosandan daha fazla inhibitör etkiye sahiptir (Ak Kalut, 2008).

Kitosan, taze veya paketlenmiş balık ve işlenmiş et ürünlerindeki psikotropik patojenlerin kontrolü için gıda koruyucu olarak kullanıma uygun film oluşturma yeteneğine sahiptir. Kitosanın en yüksek potansiyel uygulamaları meyve koruma proseslerinde kaplama ajanı olarak yer bulmasıdır. Kitosanın biyoparçalanabilirliği, plastik tabanlı petrokimyasalların belirsiz yıkımı ile meydana gelen çevresel kirlilik açısından avantajlı özelliklerinden biridir (Ak Kalut, 2008).

N, O-karboksimetil kitosan oksijen ve hidrojen gibi gazlara nispeten geçirgen güçlü bir film oluşturur. Elmalar bu materyalle kaplanarak altı aydan fazla bir süre için tazeliğini koruyabilmektedir. Kitosan kaplamaların muzun olgunlaşmasını 30 gün kadar ertelediği de belirlenmiştir (Ak Kalut, 2008).

1.3.3. Kitosanın biyolojik özellikleri

Kitosan ve yan ürünlerinin biyoparçalanabilirlik, biyoyumluluk ve düşük toksisite gibi önemli özelliklere sahip olmasından dolayı tıp, farmasötik ve endüstriyel uygulamalar bakımından bu polimerler ticari olarak ilgi odağı haline gelmiştir (Raafat ve Sahl, 2009; Jiang, 2011). Buna ek olarak kitosanın analjezik, antitümör, hemostatik, hipokolesterolemik, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri de rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2004; Jiang, 2011).

Biyoparçalanabilirlik

Geleneksel olarak, kitosan oligomerlerini üretebilmek için fiziksel, kimyasal ve enzimatik metotlar kullanılmaktadır. Ozon muamelesi ve ultraviyole radyasyonu içeren

fiziksel metotlar kitosanın parçalanmasını hızlandırdığı için tercih edilmektedir. Kitosan memelilerde mevcut değildir fakat lizozim, pepsin, papain, selüloz, pektinaz, proteazlar ve lipazlar gibi çeşitli spesifik olmayan enzimlerce *in vitro* parçalanabilmektedir. Bununla birlikte kitosanaz (kitosan *N*-asetil-glikozamin-hidrolaz) tarafından da katalizlenmektedir.

Kitosanın biyoparçalanabilirliği glikozamin glikanlar ve glikoproteinleri içeren çeşitli uzunlukta toksik olmayan oligosakkaritlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Jiang, 2011).

Kitosan parçalanma kinetiğinin, deasetilasyon derecesi ile kontrol edilen kristallik derecesine bağlı olduğu gözlenmektedir. Dahası, asetil grupların yıkımı da biyoparçalanabilirliği etkiler. Asetil grupların yokluğu enzimatik parçalanmayı çok düşük düzeylerde bırakır.

Bazı çalışmalarda deasetilasyon derecesi azalırken parçalanma oranının arttığı gözlenmiştir. Örneğin, lizozim varlığında kitosan solüsyonlarının viskozitesinde kitosanların enzimatik davranışlarındaki değişimler incelenmiştir. Düşük deasetilasyon dereceli kitosanların daha hızlı parçalanabildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, kitosan molekülünde asetamid grupların yıkımındaki çeşitliliklerden dolayı parçalamadaki farklılıkları rapor etmişlerdir. Bu durum molekül içi ve moleküller arası itme kuvvetinin değişimiyle kitosan solüsyonunun viskozitesini etkileyen deasetilasyon koşullarındaki farklılıktan ileri gelmektedir. Böylece, kitosanın biyoparçalanma oranının yalnızca deasetilasyon derecesine bağlı olmadığı ortaya konmaktadır (Jiang, 2011).

Biyoyumluluk

Kitosanın ilgi çekici diğer bir biyolojik özelliği de biyoyumluluktur. Örneğin, kitosanın fonksiyonu konaktan etkilenmez ve herhangi bir beklenmedik lokal ve sistemik etkilere yol açmaz. Kitosan nazal epitelyumun yanı sıra deri, oküler membranlar içeren canlı dokular tarafından tolere edilmektedir. Bu özellik örneğin karakteristiğine (doğal kaynak, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi ve üretim metotları) de bağlıdır (Jiang, 2011).

Düşük toksisite

Doğal polisakkaritlerle karşılaştırıldığında, düşük toksisite kitosanın dikkat çeken diğer özelliklerindedir. Kitosanın fareler üzerinde sürdürülen *in vivo* toksisite analizlerinde tuz ve glukoz için elde edilen değerlere benzer olarak ortalama öldürücü dozu 16g/kg (LD₅₀)'dır. Kitosanın toksisitesi deasetilasyon derecesine bağlıdır. Önceki çalışmalarda %35'ten yüksek deasetilasyon dereceli kitosanın düşük toksisite gösterdiği ancak %35'in altındaki bir deasetilasyon derecesinin ise doz bağımlı toksisiteye neden olduğu gözlenmiştir (Jiang, 2011).

Antimikrobiyal aktivite

Kitin ve farklı formlarda kitosan (solüsyonlar, filmler ve kompozitler) *in vivo* ve *in vitro* interaksiyonları içeren deneysel çalışmalarda algler, bakteriler, mayalar ve mantarlar gibi geniş hedef organizmalara karşı antimikrobiyal materyal olarak incelenmektedir (Rhim ve ark., 2006). Kitin, kitosan ve yan ürünlerinin antimikrobiyal potansiyelleri 1980-1990'lardaki çalışmalarda tanımlanmıştır. Genellikle bu çalışmalarda, sıklıkla aktiviteler arasında kesin bir ayırım olmamakla birlikte bakterisidal (yaşayan bakterileri veya bazı fraksiyonlar içerisindeki bakterileri öldürme) veya bakteriyostatik (bakterilerin gelişimini engelleme fakat bakterileri öldürüp öldürmediği ifade edilemeyen) aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Kesin mekanizmanın tam anlamıyla anlaşılabilmesi ve çeşitli diğer faktörlerin antibakteriyel harekete katkı sağlayabilmesine rağmen literatürdeki son veriler, kitosanı bakterisidalden çok bakteriyostatik olarak karakterize etme eğilimindedir (Goy ve ark., 2009).

Günümüze değin kitosana yönelik üç antibakteriyel mekanizma ortaya konmuştur. En çok kabul edilebilir model, pozitif yüklü kitin/kitosan molekülleri ve negatif yüklü mikrobiyal hücre membranı arasındaki etkileşimdir. Bu modelde, etkileşime membran yüzeyindeki elektronegatif bölgeler için Ca⁺² ile yarışan negatif kalıntılar ve protonlu NH₃⁺ grupları arasındaki elektrostatik kuvvet aracılık etmektedir (Goy ve ark., 2009).

Bu elektrostatik etkileşim iki yönlü müdahale içerisinde sonlanır: 1. Membran-duvar geçirgenliği özelliğindeki değişimin tetiklenmesi ile iç ozmotik dengesizliğe neden olmak ve sonuç olarak mikroorganizmaların gelişiminin inhibe edilmesi, 2. Mikroorganizma duvarındaki peptidoglikanların hidrolizi ile potasyum iyonları ve diğer düşük moleküler ağırlıklı proteinli bileşenler (proteinler, nükleik asitler, glukoz

ve laktat dehidrogenaz) gibi intrasellüler elektrolitlerin sızmasına neden olma (Xiao-Fang ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012)

Bu model Raafat ve ark. (2008) tarafından güncel bir çalışmada incelenmiştir. Pozitif yüklü kitosana maruz bırakılan *S. simulans* 22 hücrelerinin ultrastrüktürel değişimleri geçirimli elektron mikroskopisiyle gözlenmiştir. Bakteri hücre yüzeyine bağlanmış kitosan moleküllerini gözlemek ve tanımlamak olasıdır. Etkileşim bölgesindeki duvar altında vakuol benzeri yapıların oluşumuna neden olan, hücre membranının bölgesel olarak hücre duvarından ayrılmaya başlaması kaydedilmiştir. Bu ayrılma, iç hücre basıncında azalmaları tetikleyen iyonların ve suyun dışarı akışına neden olmaktadır. Etkili bir membran lizisinin görsel kanıtları gram pozitif ve gram negatif bakterilerde rapor edilmiştir (Goy ve ark., 2009).

Bu mekanizma elektrostatik etkileşime bağlı olduğu için, pozitif yüklenmiş aminlerin sayısı arttıkça antimikrobiyal aktivitenin artacağı da ileri sürülmektedir. Bu fikir kitosan için bulunan aktivitenin kitin için kaydedilenden yüksek olmasını deneysel olarak kanıtlamaktadır. Yüklü bir bakteriyel yüzeye bağlanmak için bulunan polikasyonik kitosan miktarı, kitosan konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı gözlenmeye değerdir. Solüsyonda hala kitosan varken, yüklü bölgelerin fazla olması durumunda, zincirlerin moleküler toplanma ile kümeler oluşturma eğilimde olması olası bir açıklamadır. Gözlemler yüksek konsantrasyonlardaki kitosanın, bakteri tiplerinden bağımsız olarak yüzeye bağlanma gerektirmeden bakteri üzerinde bir tabaka oluşturma eğilimini teyit etmektedir. Böyle durumda, pH ayarlamaları iyi düzeyde çözünübilirlik ve zincirlerin birbirinden korunması için nihai öneme sahiptir (Goy ve ark., 2009).

Bakteri yüzey polaritesine ilişkin, gram negatif bakterilerin dış membranı, gram pozitiflerde gözlenenden (teikoik asitler ve polisakkaritlerle ilişkilendirilen peptidoglikandan oluşan membran) yoğun negatif yüklü yüzeyi ifade eden fosfat ve pirofosfat gruplarını içeren lipopolisakkaritlerden oluşmaktadır. Bu gram pozitiflerde rapor edilenden daha çok gram negatiflerde, kitosan tarafından gerçekleştirilen intrasellüler materyallerin sızıntısına yönelik gözlemlere dair kanıtları desteklemektedir. Bu tip kanıtların varlığına karşın, kitosan solüsyonlarının gram negatiflerde gram pozitiflere kıyasla daha etkin olduğu kanısına hala varılamamaktadır. Çünkü polimerin etkinliğine bakteri hücre yüzey polaritesi dışında pH ve sıcaklık gibi pek çok parametre etkilemektedir (Goy ve ark., 2009).

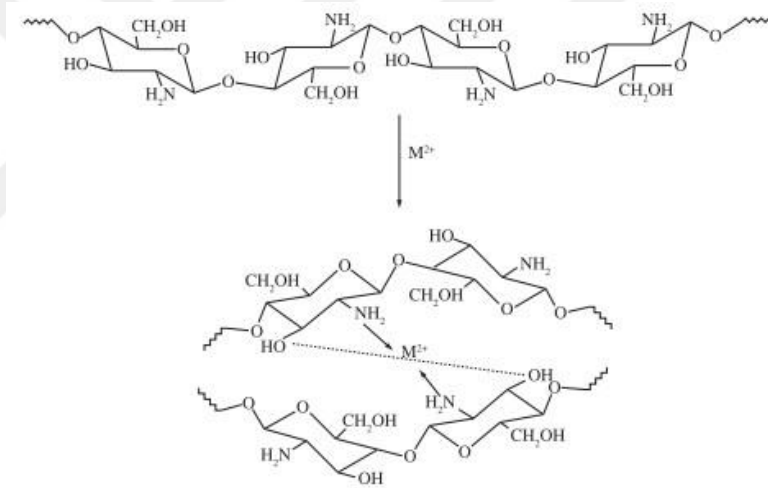
Gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerindeki kitosana dair antibakteriyel etkinlik oldukça tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar ise kitosanın gram negatiflerden (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* vb.) daha çok gram pozitif (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaris* vb.) bakteriler üzerinde daha güçlü bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Buna karşılık gram negatiflerdeki hidrofilitenin gram pozitiflerden önemli düzeyde yüksek olması ve gram pozitiflerle karşılaştırıldığında morfolojik değişimlerin artması sonucu kitosana karşı gram negatiflerin daha duyarlı olduğuna ilişkin bulgulara *in vitro* deneylerde rastlanmıştır. Hücre yüzeyindeki yük yoğunluğu adsorblanan kitosanın miktarını saptamak için belirleyici bir faktördür. Fazla miktarda kitosan adsorblanmasının, membran geçirgenliğinde ve yapıda büyük değişimlere neden olduğuna yönelik kanıtlar mevcuttur. Bu durum, antibakteriyel davranışın konak mikroorganizmaya bağlı olduğunu ortaya koymaktadır (Goy ve ark., 2009).

Diğer önerilen antimikrobiyal mekanizma ise; kitosanın mikroorganizmanın çekirdeği içerisine penetrasyonu sonucu mRNA ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açan mikrobiyal DNA ile kitosanın bağlanmasıdır. Bu mekanizma da kitosan molekülünün, çapraz bağlı mureinin çok katmanlı bakteri hücre duvarından geçerek plazma membranına varabildiği düşünülmektedir. Eşodaklı lazerli tarama mikroskopisinden kazanılan gözlemler, farklı koşullar altında kitosana maruz bırakılan *E. coli* içerisinde kitosan oligomerlerin varlığına işaret etmektedir. Kabul edilmiş olası bir mekanizma olmasına karşın, son zamanlardaki ağırlıklı görüşler, kitosanın nüfus edici materyalden çok dış membran yıkıcısı olarak aktivite gösterdiği yönündedir (Goy ve ark., 2009).

Üçüncü mekanizma, metallerin şelasyonu, spor elementlerinin baskılanması ve mikrobiyal gelişim için gerekli besinlere bağlanma şeklindedir. Kitosan molekülünde, şelasyonla metal katyonların tutulumundan sorumlu amin grupların bulunduğu bölgede mükemmel bir metal-bağlama kapasitesinden bahsedilmektedir. Protonlanmamış amin gruplar ve amin nitrojen üzerinde metal iyonlarına aktarılacak elektron çiftinin mevcut olması, böyle bir mekanizmanın pozitif iyonların kitosana bağlandığı bölgede yüksek pH'da daha da etkili olabileceğini vurgulamaktadır. Kitosan-Cu sistemine bağlı bir modelde aktivite, polisakkarit omurgada etkileşim için bulunan bölgelerin üzerindeki pH bağımlılığı ile ilişkilendirilmektedir. pH 6.7'den büyük iken kompleks oluşumunda

muhtemelen iki NH₂ grubu mevcut, pH 6'dan düşük koşullarda ise kompleks yalnızca bir NH₂ grubu ve üç hidroksiller veya H₂O molekülleri içermektedir. Yüksek pH 7-9 için hidroksil grupların proton kaybının iki -NH₂ ve iki hidroksil grupların ayrılması ile baskın kompleksin oluşumunu düşündürmektedir. Benzer bir şekilde, Wang vd. tarafından ifade edilen son bir modelde ise, Şekil 1.5'te metalin bir veya daha çok kitosan zincirlerle ilişkili bir elektron alıcısı olarak düzenlendiği ve hidroksil gruplarla köprüler oluşturduğu gösterilmiştir (Goy ve ark., 2009).

Bakteriyi sarmış kitosan moleküllerinin hücre ölümüne katkı sağlayacak kompleks metaller ve bazı gerekli besinlerin geçişi için tıkanmalar oluşturabilmesi şüphesizdir. Yine de bu bulgular, etkileşim için bulunan bölgelerin sınırlı olması ve kompleksin metal konsantrasyonun fonksiyonunda doygunluğa ulaşması belirgin antimikrobiyal hareket için geçerli bir kanıt değildir (Goy ve ark., 2009).



Şekil 1.5. Wang vd.,'lerine göre metal-kitosan kompleks modeli (Goy ve ark., 2009)

Kitosanın *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi, viskozite, çözücü, pH, test suşları, sıcaklık ve metal iyonları gibi içsel ve dışsal çeşitli faktörlere bağlıdır.

No ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışmada moleküler ağırlığın azalmasıyla gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinin arttığını rapor etmelerine karşın gram pozitifler için aynı sonuçlara ulaşamamışlardır. 470 kDa ağırlığındaki kitosanın gram negatif bakteriler üzerinde etkisi gözlenmiş ancak aynı molekülün gram pozitifler üzerindeki etkisinin az olduğu ortaya konmuştur. Diğer bir çalışmada ise 5-10 kDa kadar düşük moleküler ağırlıkta kitosanın patojenlere karşı güçlü etki gösterdiği

saptanmıştır. 40 kDa ağırlığındaki kitosan *S. aureus* ve *E. coli* gelişimini %90 oranında inhibe ederken 180 kDa ağırlığındaki molekülün ise her iki organizmayı tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2001) yüksek deasetilasyon derecesindeki kitosanların düşük deasetilasyon derecesindekilere göre protonlu amin grupların yüksek yüzdelere dolayısı ile bakteriyel gelişimi üzerinde daha yüksek inhibisyon gösterdiğini saptamışlardır (Jiang, 2011).

Kitosan pH 6.5'in üzerinde çözünmediği için yalnızca asidik besi ortamlarında antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bu durum kitosanın çözünmemesinin yanı sıra pozitif yüklenmemiş amin grupların baskın bulunuşundan ileri gelmektedir. Besi ortamındaki iyonik gücün değişimi kitosanın antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir. Tsai ve Su (1999) yapmış oldukları çalışmada divalent katyonların varlığında *E. coli*'ye karşı kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin azaldığını belirlemişlerdir. Metal özellikle divalent iyonların artmasıyla kitosanın şelatlama kapasitesinin azaldığına dair benzer sonuçlar Kong ve ark. (2010) tarafından da rapor edilmiştir (Goy ve ark., 2009).

Pek çok çalışma kitosanın biyolojik aktivitesinin önemli ölçüde moleküler ağırlığına (MW) ve deasetilasyon derecesine (DD) bağlı olduğunu göstermektedir. Her iki parametre kitosanın antimikrobiyal aktivitesini bağımsız bir şekilde etkilemektedir. Öyleki antimikrobiyal aktivite üzerinde moleküler ağırlığın etkisinin, deasetilasyon derecesinden daha fazla olduğu ileri sürülmektedir. *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Klebsiella pneumonia* üzerinde sürdürülen son çalışmalarda gözlemlendiği gibi, düşük moleküler ağırlıklı kitosan için mikroorganizma gelişimini ve çoğalmasını azaltıcı etki gösterdiği ortaya konmuştur (Zivanovic ve ark., 2004). Büyüklük ve yapı kavramlarının, düşük moleküler ağırlıkta kitosanın etkinliğini anlamak için temel olduğu düşünülmektedir. Küçük zincirlerin hareketi, çekimi ve iyonik etkileşimi, membran yüzeyine bağlanma etkinliği ve uzamış yapının adaptasyonunu kolaylaştırması büyük olanlarıkinden daha kolaydır (Kumar ve ark., 2005)

Benzer olarak farklı yoğunluktaki kitosanın antimikrobiyal etkinliğinin düşük deasetilasyon derecesinde arttığı ortaya konmuştur. Farklı deasetilasyon dereceli kitin ve kitosan molekülleri üzerindeki antimikrobiyal çalışmalar, mantarlar (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*) gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria*

monocytogenes) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*) bakterilere karşı analiz edilmiştir.

Tüm analiz sonuçlarında, antimikrobiyal aktivitenin deasetilasyon derecenin azalmasıyla arttığı belirlenmiştir (Goy ve ark., 2009). Daha önceden de bahsedildiği gibi deasetilasyon derecesi, kitosan molekülündeki –NH₂ ve –OH grupların baskın reaktif bölgeleri çözünürlükte ve yük oluşumunda belirleyici faktördür. Deasetilasyon derecesi azaldığında, kitosan molekülündeki serbest amino gruplar artacak ve antimikrobiyal aktivite yükselecektir.

Antifungal aktivite

Bakterilere benzer şekilde, mantarlara karşı gözlenen aktivitenin konak ve mantarlarda düzenleyici değişimlerle ilişkilendirilen bir potansiyelle fungisidalen çok fungistatik olduğu sanılmaktadır. Genellikle, kitosanın dairesel gelişim, üreme tüplerinin uzaması ve spor çimlenmesinin inhibisyonunda çok etkili olduğu rapor edilmiştir. Mayalar üzerindeki araştırmaların çoğu bitki ve gıda bozulması ile ilişkilendirilmektedir. Bunun için kitosanın varlığında çeşitli biyolojik prosesler, biyotrofik ve nekrotrofik mikoparazitler, entomopatojenik mantar ve veziküler arbusküler mikorizal mantarlar üzerindeki hareketle kitinazların indüklendiği bitki dokularında aktive edilmiştir (Goy ve ark., 2009).

Kitosanın antifungal mekanizması, bakteri hücrelerinde gözlenen etkilere benzer bir şekilde, direkt olarak mantar gelişimine müdahale eden kitosan molekülleri ile hücre duvar morfogenezini içermektedir. Kitosan oligomerlerinin, mantar gelişimlerinden sorumlu enzim aktivitelere engel olacak şekilde hücrelerin içerisine nüfuz ettiğine yönelik mikroskopik gözlemler de ortaya konmuştur. Mantar hücre duvarları üzerinde kitosanın parçalayıcı hareketinin şiddeti lokal pH, deasetilasyon derecesi ve konsantrasyona bağlıdır. *R. solani* ve *S. rolfii* kültürlerinde yapılan çalışmalar besi ortamındaki kitosan konsantrasyonunun artmasıyla mantar çimlenme yüzdesinin azaldığı ortaya konmuştur. Genellikle, esas olarak lag fazının uzunluğu üzerinde etkinlik kaydedilmiştir. İnhibisyon prosesinde besi ortamı alkaliye doğru kaydırıldığında kitosan etkisinin azaldığı belirlenmiştir (Goy ve ark., 2009).

Phomopsis asparagi gibi bitki mantarlarına karşı kaydedilen inhibisyon oranı %80 iken, *Fusarium oxysporum*, *Cucumernum owen* ve *Rhizoctonia solani* karşı %95 kadar yüksektir. *Fusarium oxysporum*'a karşı etkinin düşük kitosan konsantrasyonu (20-150 mg/L) ile meydana geldiği bilinmektedir (Goy ve ark., 2009).

Kitosana karşı mikroorganizmaların duyarlılıkları

Geniş aktivite spektrumundan dolayı kitosan düzenli tip dezenfektanlara göre çeşitli avantajlara sahiptir. Kitosanın mantarlar üzerinde bakterilerden daha hızlı hareketi gözlenmektedir. Tifoid organizmalara karşı etki klinik uygulamalarda kullanılan standart antibiyotiklerle karşılaştırılmıştır. Bu antimikrobiyal aktivite tartışıldığı gibi moleküler ağırlığa ve deasetilasyon derecesine bağlı olup mikroorganizma suşlarına göre de çeşitlilik göstermektedir.

Kitin, kitosan, yan ürünleri veya kombinasyonları için en düşük inhibitör konsantrasyon (MIC) konusunda farklı mikroorganizmalar için farklı sonuçlar içeren pek çok çalışma vardır. MIC, bir gecelik inkübasyondan sonra bir mikroorganizmanın gözle görülebilir gelişimini inhibe edecek bir antimikrobiyalin, en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Standardize edilmemiş prosedürler ve pek çok faktöre bağlılık, MIC sonuçlarının yazardan yazara karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. MIC değeri seçilmiş patojenik bir mikroorganizmaya karşı öncelikli aktivitenin pratik indikatörü olarak kullanılabilir. Çizelge 1.2'de çeşitli mikroorganizmalara karşı kitosan için bulunan bazı MIC değerlerinin gösterildiği çalışmaların kısa bir özeti verilmiştir (Andrews, 2001).

Çizelge 1.2. Çeşitli mikroorganizmalara karşı kitosan için MIC değeri (Goy ve ark., 2009)

Duyarlı organizma	MIC (ppm)
Gram negatif	
<i>Escherichia coli</i>	20, 100, 468, 650, 1000
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000, 1500, 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>200, 1700
<i>Vibrio cholera</i>	200
<i>Shigella dysenteriae</i>	>200
Gram pozitif	
<i>Bacillus cereus</i>	<1000
<i>Lactobacillus brevis</i>	1000
<i>Listeria monocytogenes</i>	800
<i>Staphylococcus aureus</i>	20, 100, >800
<i>Bacillus megaterium</i>	800
Mantar	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000
<i>Candida albicans</i>	500, 600, >1250

1.3.4. Kitosan yan ürünleri

Kitosanın eşsiz antimikrobiyal özelliklerine rağmen, nötral ve bazik pH'da çözünmemesi bir gıda koruyucusu olarak uygulamalarını ve diğer kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Kitosanın suda çözünübilirliğini arttırmak için kitosanın fonksiyonel yan ürünlerinin hazırlanması ile uygulama alanları genişletilebilmektedir. Kitosan ve indirgen şekerler (glukoz ve glikozamin) arasında tanımlanan Maillard reaksiyonu ile suda çözünabilir kitosan yan ürünler üretilmektedir (Dutta ve ark., 2004; Chung ve ark., 2011).

Kitosanın *N*-ftalilasyonunun, amino gruplar üzerindeki hidrojen atomlarını yıkarak sert iskelet için yapıya hacimli bir grup bağlaması ile kitosanın çözünübilirliğinde etkili olduğu düşünülmektedir. Tamamen deasetile kitosan *N*-ftalil-kitosan elde etmek için DMF içerisinde ftalik anhidritle muamele edilir. Oluşan bu ürün polar organik çözücülerde kolaylıkla çözünmektedir (Dutta ve ark., 2004).

Su çözünübilirliğini arttırmak için uzatıcı kol olarak trietilen glikol, merkez nokta olarak gallik asit kullanılarak dendronize kitosan-sialik asit hibritleri sentezlenmiştir. Bu yeni yan ürünlerin amin fonksiyonitesini uzaklaştırarak *N*-süksinilasyon ile suda çözünübilirliği arttırılabilmektedir (Dutta ve ve ark., 2004).

Baba ve ark. (2002) sulu amonyum nitrat solüsyonlarından metal iyonlarına yönelik selektiviteyi incelemek için metiltiokarbamil ve feniltiokarbamil kitosan yan ürünlerini üretmişlerdir.

Katalizörün yokluğunda kitosan hidrojellerinin sentezi için, kitosana direkt D,L laktik ve/veya glikolik asit eklenmesi araştırılmıştır. Laktik ve/veya glikolik asit eklenmesiyle kitosan zincirleri ve su arasında güçlü bir etkileşim olduğu gösterilmiştir. Yan zincirler kümeleşir ve fiziksel çapraz bağlanmalar oluşur. Sonuç olarak pH duyarlı kitosan hidrojeller üretilmektedir. Bu hidrojellerin poliester yan zincirlerinden dolayı pansuman malzemeleri ve ilaç salınım sistemi gibi biyomedikal uygulamalar için kullanışlı olduğu düşünülmektedir (Dutta ve ark., 2004).

Cds kuantum dotlu (QDs) yan ürünler kitosanın stabilitesini ve çözünübilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca kitosanın termal parçalanmasını da etkilemektedir. Bu ürünün varlığında kitosanın termal bozulma sıcaklığı 50°C'dir (Dutta ve ark., 2004).

Kitosan-gadopentetik asit kompleks nanopartiküllerin üretimi için gadolinyum nötron yakalama terapisi kullanılmıştır. Gadolinyum yüklü nanopartiküllerin sert tümörlere intratümöral enjeksiyon için uygun olduğu ortaya konmuştur.

Araştırmacılar kuru ve katı koşullarda yeni bir kompozitin mekano-kimyasal hazırlanmasını incelemişlerdir. Yeni tip bir polisakkarit kompozit sentezlemişlerdir. Sentezlenen nanokompozit temelli kitosan-polilaktik asit, akıllı ilaç üretiminde kullanılmaktadır (Dutta ve ark., 2004).

1.3.4. Kitosanın endüstriyel uygulamaları

Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı kitosan kozmetik ve farmasötik ürünlerden sanayi, bitki koruma, atık su arıtım teknolojilerine kadar oldukça geniş bir yelpazede kullanım alanı bulmaktadır.

Kozmetik

Doğal bir aminopolisakkarit olan kitosan, çoğu polianyonik hidrokolloidlerin aksine, asitle nötralize yüzeylerde viskoz oluşturması, deri ve saç ile etkileşimini kolaylaştırmaktadır. Çeşitli hidrofobik ürünleri içeren mikrokapsüllerin yanı sıra 1-10 µ kitosan veya kitosan-aljinat kompozitler deri, saç ve ağız bakımı gibi kozmetik alanlarında aktif olarak kullanılmaktadır. Kitosan ve saç birbirlerine zıt elektriksel yük (kitosan pozitif; saç negatif) taşımalarından dolayı kitosan içeren şampuanlar, saçın

mekaniksel gücünü, yumuşaklığını ve düzlüğünü arttırarak saç üzerinde temiz ve elastik bir film oluşturmaktadır. Ayrıca bu materyal alkol ve su eklendiğinde jel oluşturabilmektedir. Kitosan şampuan, boya, saç spreyi, saç toniği, jöle ve perma ürünlerine katkı maddesi olarak eklenmektedir. Deriye hızlıca nüfuz etmesine engel olan oldukça yüksek moleküler ağırlığa ve pozitif elektriksel yüke sahip olması nemlendirici krem, losyon, tırnak cilası, oje, göz farı, ruj, makyaj temizleyiciler ve banyo köpüklerinde kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Diş macunu, gargara ve sakız gibi ağız sağlığında önemli ürünlerin eldesinde kullanılmakta olup diş macununa eklenen kitosan tuzları, silikon oksidinin hoş olmayan tadını maskeleymektedir (Kumar, 2000; Dutta ve ark., 2004; George ve ark., 2011).

Atık su arıtımı

Polikatyonik karakteri bu kimyasala, atık su arıtımında yumaklaştırıcı ve şelatlaştırıcı ajan olarak kullanım olanağı vermektedir. 1999'da Bhavani ve Dutta adsorbant olarak kitosan kullanarak boyahane atıklarından renk maddesinin giderimini rapor etmişlerdir. Kitosan molekülleri çökelti ve yumak oluşturmak için anyonik karakterdeki atıkları bir araya getirir ve böylelikle gıda işleme atıklarının tekrar kullanımı için bir flokülant gibi aktivite gösterir. Atık sulardan, ağır metaller ve boyaların uzaklaştırılmasında sentetik reçineler kadar etkin olup kitosan içerikli membranlar osmoz, ters osmoz, mikrofiltrason, diyaliz, tuzsuzlaştırma ve hemodiyaliz gibi proseslerde de kullanılmaktadır. Kitosanın kitin karışımı kontamine içme sularından arsenik, atık sulardan petrol ve petrol ürünlerinin uzaklaştırılması, meyve suyu, şarap ve bira gibi içeceklerin de berraklaştırılmasında kullanımına olanak sunmaktadır (Kumar, 2000; Wang ve ark., 2004; Ak Kalut, 2008; Arbia ve ark., 2012).

Kağıt endüstrisi

Selüloza benzer yapısı ve biyolojik olarak parçalanabilirliği kitosana geri dönüşümlü kağıt üretiminde hammadde olarak kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Bu şekilde üretilmiş kağıtlar yumuşak bir yüzeye sahip olup neme karşı dirençlidir. Tuvalet kağıdı, karton ve ambalaj kağıtlarının üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Dutta ve ark., 2004).

Gıda uygulamaları

Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı fonksiyonel özellikleri, besinsel ve fizyolojik aktiviteleri ile ilişkilendirilmektedir. Gıda takviyesi olmasının yanı sıra kitosanın su, yağ ve boya bağlama kapasitesi ve emülsiyonlaştırma özellikleri bu molekülün herhangi bir sürfaktan olmaksızın sabit emülsiyonların hazırlanmasında kullanışlı olduğunu göstermektedir. Kitosan kaplamaların (film) çürümeye neden olan tirosinaz enzimini inaktive ederek domates, çilek gibi sebze ve meyvelerin çürüme veya bozulmalarını önemli ölçüde geciktirerek ürünlerinin raf ömrünü arttırdığı saptanmıştır. Taze, işlenmiş veya paketlenmiş et ve balık ürünlerindeki psikotropik patojenlerin kontrolü için gıda koruyucu olarak, film formu şeklinde kullanılmaktadır. Kitosana hazırlanmış membranların orta derecede su, düşük oksijen, azot ve karbondioksit geçirgenliği ve antimikrobiyal özelliği ambalajlama da kullanımı açısından ciddi avantajlar sağlamaktadır. Gıdalarda esmerleşme inhibitörü sülfidlerin yerine alternatif bir bileşik olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır (Shahidi ve ark., 1999; Knezevic-Jugovic ve ark., 2010; Koç ve Özkan, 2011).

Tarım ve bitkisel gelişim

Kitin/kitosan muamele tohumlar (özellikle buğday) için çimlenmeyi hızlandırıcı ve gelişimi arttırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Saksı topraklarına eklenmesiyle, kök boğum solucanı istilasının azalması ve mantar patojenlerin baskılanması ile doğal bitki savunmalarını desteklemek amacıyla çevre dostu bir biyopestisit olarak da kullanılmaktadır (Dutta ve ark., 2004).

Fotoğrafçılık

Kitosan, aşınmaya olan direnci, optik karakteristikleri ve film oluşturma yeteneği gibi özellikleri ile fotoğrafçılıkta önemli uygulamalara sahiptir. Gelişmiş fotoğrafçılık sanatında önemli bir basamak olan difüzyonun kalitesini arttırmak için yardımcı ajan ve asit boyalar için bağlayıcı malzeme olarak kullanılmaktadır (Dutta ve ark., 2004).

Kromatografik separasyon

Serbest amino grupları, birincil ve ikincil hidroksil grupların varlığı kitosanın kullanışlı bir kromatografik yatak olarak değerlendirmesine olanak sağlamaktadır. Nükleik

asitlerin TLC ile ayrımında, HPLC ile fenol ve klorofenollerin katı faz ekstraksiyonu için sorbent materyal olarak kullanılmıştır (Dutta ve ark., 2004).

Tekstil endüstrisi

Tekstil alanında kitosanın kullanımı liflere antimikrobiyal özellik kazandırması ile paralellik göstermektedir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal etkisi nedeniyle kitosanın kuaternize-N-benzilidin-kitosan gibi suda çözünebilen modifiye formları çapraz bağlayıcı sitrik asit kullanılarak doldurma, kurutma ve sertleşme metotları ile pamuklu ürünlere uygulanabilmektedir. Antimikrobiyal aktivite dışında, yünlü kumaşlara çekmezlik sağlaması, reaktif boyamada tuz oluşumunu azaltması ve pamuğa asit boyalarla boyanabilirlik kazandırması gibi özelliklerinden de bu endüstride yararlanılmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).

LED ve NLO uygulamaları için kitosan jeller

Son zamanlarda kitosan jeller içeren boyalar, lazerlerde ve ışık yayıcı cihazlarda (Ledler) potansiyel bileşen olarak yer bulmaktadır. NLO uygulamaları için bir asma grup olan azomethin kromofor içeren kitosan kullanımı rapor edilmiştir (Dutta ve ark., 2004).

Katı hal piller

Suda çözünmemesinden dolayı kitosan, katı hal proton iletken polimer pillerin üretimine tek başına katılamamaktadır. Böylelikle iyonik iletkenliği elde etmek için asetik asitte çözdürülerek kullanılmaktadır. Bu proton transportunun polimerde boşluklar meydana getirdiği düşünülmektedir (Dutta ve ark., 2004).

Biyomedikal

Günde kg başına 17 g limit dozda toksik olmamaları, insan vücudunda biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumluluk, antibakteriyel, yara iyileştirme, immünolojik ve hemostatik aktivite gibi özelliklerinden dolayı kitosan hücre kültürlerinde, oftalmoloji, yapay deri ve doku mühendisliğinde, yara pansuman malzemesi üretiminde, yanık tedavilerinde ve ilaç salınımında aktif olarak kullanılmaktadır (Arbia ve ark., 2012). Kitosan membranlar elverişli geçirgenlik ve yüksek gerilim kuvvetinden dolayı yapay

böbrek membranı olarak da kullanılmaktadır. Polikatyonik doğasından ötürü doku mühendisliğinde hızlandırıcı bir etkiye sahiptir. Bu özellikle polimer ile hücre etkileşimini arttırmaktadır (Dutta ve ark., 2004).

Dirençli, su emici ve biyoyumlu filmler oluşturabilmesi yanık tedavilerinde potansiyel bir aday olarak kullanılmasına neden olmaktadır (Kumirska ve ark., 2011) Oksijen geçirgenliği ve vücut enzimleriyle parçalanabilir olması kitosan asetatları içeren sulu solüsyonların uygulanması ile direkt yanık üzerinde filmlerin oluşturulabilmesi önemli bir avantajdır. Abdominal yüzeylerde deri altı dokusunda ve deride neşter tarafından oluşan yaraların tedavisine yönelik kitosanın kullanıldığına yönelik çalışmalar rapor edilmiştir.

Oftalmoloji alanında kontak lenslerin oluşturulması için optik netlik, mekaniksel stabilite, yeterli optik doğruluk, gaz geçirgenliği, ıslanabilirlik ve immünolojik uyum gibi gerekli tüm karakteristik özellikleri taşımaktadır. Oküler bandaj lenslerin geliştirilmesinde yara tedavi edici, antimikrobiyal ve film oluşturma özellikleri kitosanı uygulanabilir hale getirmektedir.

Canlı konakta herhangi bir biyolojik zarara yol açmaması ve ucuz elde edilebilir olması, kitosanın ticari ilaçların içeriğinde farklı dozajlarda kullanımını uygun kılmaktadır. Peptid ilaçların kalın bağırsağa salınımı ve doğum kontrolü için uzun süreli hormon salınımı gibi kontrollü ilaç salınım uygulamaları en önemli kullanım alanını oluşturmaktadır. Kitosan temelli jellerin biyoyapışma karakteri sayesinde dokuya yapışıp uzun süren salınımlar gerçekleştirilebilmektedir. Daha öncede bahsedilen toksik olmaması, biyoyumluluğu, kanser yapıcı olmaması, kanın pıhtılaşma mekanizmasını tetiklememesi, biyolojik parçalanabilirliği ve yüksek ilaç depolayabilme kapasitesi vücut içerisine yerleştirilerek içerisindeki ilacın salınımına izin vermesi implant olarak kullanımını kolaylaştırmaktadır. Kitosan, glikozamin glikanlara benzeyen yapısal özellikleri ile deri değişimi için bir alt katman geliştirilmesinde de kullanılabilir (Kumar, 2000; Roberts, 2009). Çizelge 1.3'te günümüzde aktif olarak kitosan içerikli ürünlerin, üretici firmaları ve uygulama alanlarına bazı örnekler verilmiştir.

Çizelge1.3. Kitosan içerikli ticari ürünler (Demir ve Seventekin, 2009)

Ürün	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Evason R	Kişisel Bakım	Chito-Boss, Ancona, İtalya
Depolimerize kitosan	Saç Bakım	Wella, Almanya
Kitosan içeren makarna	Diyet ürünlerinde (Hipokolestrol maddesi)	NihonKayaku, Inc., Tokyo, Japonya
Kitosan sıvı (CM-kitin)	Cilt Bakım	Ichimarn, Farukosu, Gifu, Japonya
Nonwoven kitin kumaş	Yanık tedavisinde	Yunichika, Inc., Kyoto, Japonya
Kitin lifi	Biyoparçalanabilir ameliyat ipliği	Yunichika, Inc., Kyoto, Japonya
Kitosan-kollajen kompozit	Yapay deri	Katakurachikkarin, Inc., Kyoto, Japonya

1.3.6. Kitosanın üretim metotları

Geleneksel olarak kitosan oligomerlerinin üretimi için fiziksel (ozonlama ve ultraviyole radyasyon), kimyasal ve enzimatik gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Kimyasal metot

Genel olarak *Crustacea* kabukları mevsime ve türlere göre değişiklik göstermekle birlikte %30-40 protein, %30-50 kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat ile %20-30 kitinden oluşmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009). Kitosanın izolasyonu öncelikli olarak kabukta bulunan diğer maddelerin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Kitinden kitosan eldesi dört ana basamakta incelenmektedir. Bu basamaklar; (Kuzgun ve İnanlı, 2013).

- 1. Kabukların hazırlanması:** Kimyasal işlemlere tabii tutulmadan önce kabukların yıkanma, kurutulma ve mekaniksel işlemler ile ezilme gibi prosedürleri içermektedir.
- 2. Demineralizasyon (Minerallerin uzaklaştırılması):** Deniz kabuklu atıklarının geleneksel demineralizasyon prosesleri ekonomik açıdan pahalı olmalarının yanı sıra çevresel problemlere neden olmaktadır. Genel olarak kabuklu atıkların demineralizasyonunda en çok kullanılan kimyasal HCl asittir (Ak Kalut, 2008). Kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi minerallerin yapıdan uzaklaştırılması için de sulandırılmış HCl uygulaması yapılmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009)

Güçlü asitlerin kullanımı kitin ve beraberinde kitosan gibi oluşacak yan ürünlerin fizikokimyasal özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Ekstraksiyon aşamalarında kullanılan kimyasallar bu tür biyopolimerlerin moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi gibi antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili parametrelerini de olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple son zamanlarda yeni ve zararsız demineralizasyon prosesleri geliştirilmiştir. Laktik ve asetik asit gibi organik asitlerin kullanıldığı proseslerde söz konusu asitlerin ucuz olması ve reaksiyon sonucu organik tuzlar gibi doğaya verilen çevre dostu atıkların buzlanmayı önleyici ajanlar olarak değerlendirilmesi önem arz etmektedir (Ak Kalut, 2008).

3. Deproteinizasyon (Proteinlerin uzaklaştırılması): Kitin proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır. Bu proteinlerin bazıları kolaylıkla ekstre edilebilmesine karşın diğerleri ise kitine kovalent bağlarla bağlandığı için bu prosesi zorlaştırmaktadır. Bu proteinlerin kitine aspartil veya hisitidil rezidüleri veya her ikisi ile kovalent olarak bağlanması ortaya stabil bir glikoprotein kompleksi çıkarmaktadır (Ak Kalut, 2008). Söz konusu yapının çözünmesi için NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, Ca(HSO₃)₂, Na₃PO₄ ve Na₂S gibi çeşitli kimyasal maddeler denenmiştir (Demir ve Seventekin, 2009). Ancak yapılan araştırmalar sonucunda deproteinizasyon basamağı, kabuklu atıkların 65-100°C sıcaklıklarda, %1-10 arasında değişen konsantrasyonlarda NaOH çözeltisi ile muamele edilmesi sonucu başarılmıştır (Ak Kalut, 2008).

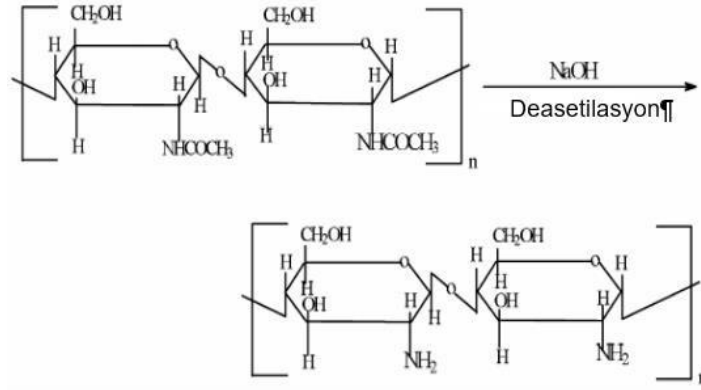
Bu proses sorunsuz bir şekilde tamamlandığında kitinin protein içeriği %1 civarında kalmaktadır. NaOH, kitinin kısmen deasetillenmesine ve biyopolimerin hidrolize olması sonucu molekül ağırlığının azalmasına da neden olmaktadır. Ayrıca pepsin, papain, tripsin ve proteaz gibi proteolitik enzimler de kitinden protein uzaklaştırma amacıyla kullanılmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009). Bu reaksiyon süresi hazırlama metoduna bağlı olarak genellikle 0.5 ile 12 saat arasında değişkenlik göstermektedir. Uzayan alkali muamele depolimerizasyon ve deasetilasyona neden olmaktadır. Reaksiyonda istikrar elde etmek için alkali solüsyonda katının oranını arttırmak tavsiye edilmektedir.

Böylelikle polimerlerin aktivitelerine en az zarar verildiği düşünülmektedir (Ak Kalut, 2008).

- 4. Dekolorizasyon (Pigmentlerin uzaklaştırılması):** Asit ve alkali muameleler sonunda yalnızca renkli bir kitin ürünü elde edilmektedir. Ticari açıdan kabul edilebilirlik için deniz kabuklularından elde edilen kitinin, astaksanthinler ve pigmentlerin ortamdaki uzaklaştırılması veya beyaz kitin tozu elde edilmesi için dekolorize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda deniz kabuklularının kabuklarında kitinle kompleks halindeki pigment, bir 4-keto ve üç 4,4'diketo β -karoten yan ürünlerin kırmızı yosun yengecinin dış kabuğundaki kitine bağlı olduğu tanımlanmıştır (Ak Kalut, 2008).

Pigmentler ve kitinin etkileşim seviyesi kabuklular arasında türden türe bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu kuvvetli bağın çözünebilmesi için çeşitli ayıraçlar kullanılmasına rağmen son zamanlarda geliştirilen prosedürlerin etkili olmadığı görülmüştür. Bu proses basamağında kitin ve kitosanın fizikokimyasal ve funksiyonel özelliklerinin etkilenmemesi için asetonla ekstraksiyon sonrası beyazlamış kitin oda sıcaklığında 2 saat kurutulmuştur. Takiben %4.25 klorin içeren %0.315'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile 5 dakika beyazlaştırılmıştır. Fakat elde edilen kitinin rengi orta pembeyi andıran krem beyazdır. Aseton ekstraksiyonu olmaksızın, 1 saatten fazla beyazlaşma aşaması ile ticari olarak kabul edilebilir beyaz renk elde edilmiştir (Ak Kalut, 2008).

- 5. Deasetilasyon:** Kitosan eldesinin ana prosedürü kitinin alkali deasetilasyonudur. Güçlü alkalik solüsyonları ile gerçekleştirilen bu süreçte, kitinden asetil grupların uzaklaştırılması sonucu kitosan yan ürünü elde edilmektedir. Genel olarak %40-50 konsantrasyonda sodyum veya potasyum hidroksit solüsyonları ile 100°C'de 30 dk. veya daha uzun süre bekletilerek polimerden asetil gruplar uzaklaştırılmaktadır (Ak Kalut, 2008). (Şekil 1.6) Kitinin azot içeriği, deasetilasyon derecesine göre değişmekle birlikte genellikle %58 arasında değişmektedir. %1.25 azot içeriği ile selülozden daha yüksek azot içeriği bulundurmaları kitin ve kitosanın özellikle atık sularda metal bağlayıcı (şelatlama maddesi) olarak kullanılmaları açısından büyük avantaj sağlamaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).

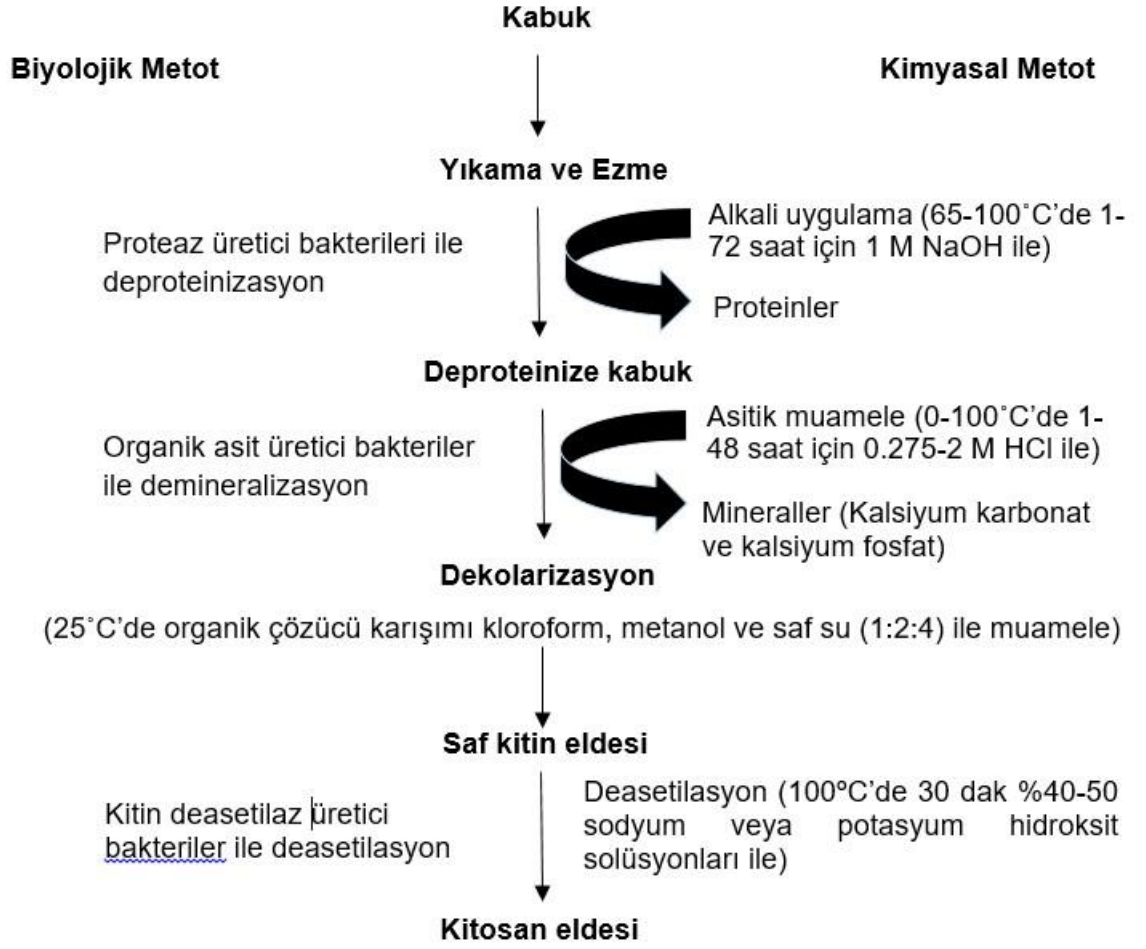


Şekil 1.6.Kitinin kısmi deasetilasyonu (Demir ve Seventekin, 2009)

Biyolojik metotlar

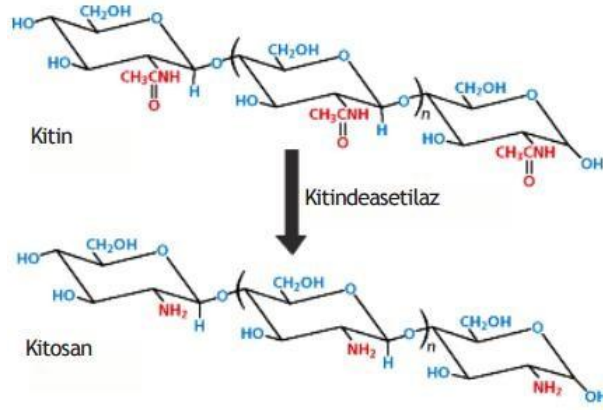
Kitinden kitosan eldesi sırasında kimyasal madde kullanımı yerine proteazlar *Crustacea* kabuklarının deproteinizasyonu için kullanılabilir. Söz konusu proteolitik enzimlerin kullanılmasına yönelik ilk çalışmalar Takeda ve Abe (1962), Takeda ve Katsuura (1964) ve Broussignac (1968) tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmalarda; tuna proteinaz, papain, pepsin, tripsin veya bakteriyel proteinazları kullanmışlardır. Ve enzimlerle muamele sonucunda kitin ile birlikte bulunan protein miktarının yaklaşık %5 olduğu belirtilmiştir. Shimahara ve Takiguchi (1988) *Pseudomonas maltophilia*'dan saflaştırdıkları proteazı *Crustacea* kabukları ile muamele etmiş ve 24 saat sonunda kabuklardaki protein miktarının %1'e kadar düştüğünü gözlemişlerdir (Gagne, 1993).

Kitinin kitosana deasetilasyonunu katalizleyen kitin deasetilaz enzimi Araki ve Ito (1974) tarafından izole edilmiş ve saflaştırılmıştır (Gagne, 1993). Kitosanın mikrobiyal sentezi *Mucor rouxii* ve *Phycomyces blakesleeanus* gibi çeşitli organizmalar da tanımlanmıştır. Bu organizmaların hücre kültürleri kitosan üretimi için kullanılmış ve *Aspergillus niger* gibi bir kitin kaynağının kültür ortamına eklenmesi ile ürünlerin eldesi geliştirilmiştir. Böylelikle bu üretim mekanizması kitinin deasetilasyonuna katkı sağlamıştır. 96 saatlik inkübasyon sonrası bu kültürlerde deasetilasyon derecesi %8.9'dan 0.6'ya kadar azaltılmış kitosan polimeri elde edilmiştir (Gagne, 1993). Şekil 1.7'de kimyasal ve biyolojik metotlar ile kitinden kitosan eldesi şematize edilmiştir.



Şekil 1.7. Kimyasal ve biyolojik metotla kitinden kitosan eldesi (Arbia ve ark.,2012)

Kitinin N-asetilglukozamin birimlerindeki asetamid gruplarını hidrolize ederek glukozamin ve asetik asitin oluşumunu katalizleyen kitin deasetilaz enzimi (EC 3.4.1.41: CDA), kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen önemli bir enzimdir. Bu enzim karbohidrat esterazların bir üyesi olup, moleküler ağırlığı 25-80 kDa arasında değişmektedir (Zhao, 2010). (Şekil 1.8) Mantarlar (özellikle *Mucorales*), (Peter, 2005) deniz bakterileri ve birkaç böcek tipinde kitin deasetilaz enzimi bulunmaktadır (Wangtueai ve ark.,2006; Toharisman ve Suhartono, 2008; Pagnoncello ve ark.,2010). Deniz bakterileri dışında diğer bakterilerden CDA üretimi çok nadir olarak rapor edilmiştir (Kaur ve ark.,2012).



Şekil 1.8. Kitinin kitosana enzimatik dönüşümü (İmamoğlu, 2011)

Kitin deasetilazın saflaştırıldığı organizma gruplarına, *Mortierella* sp, *Mucor rouxii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Aspergillus nidulans*, *Scopulariopsis brevicaulis* gibi mantarlar; *Escherihia coli*, *Bacillus thermoleovorans*, *Vibrio* sp, *Bacillus papandayan* gibi bakteriler; *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Helicoverpa armigera*, *Tribolium castaneum*, *Anopheles gambiae* gibi böcekler örnek olarak verilebilir (Zhao ve ark.,2010).

Literatür incelemeleri göz önüne alındığında, deniz kabuklularının yenilebilir kısmı ayrıldıktan sonra, atık olarak kalan miktarının sadece %20'si ürün olarak değerlendirilmektedir. Deniz kabuklularının toplanması, kitinin uzaklaştırılması ve kitinden kitosan eldesini kapsayan deproteinizasyon, demineralizasyon, ağartma ve deasetilasyon gibi kimyasal prosesler sonucunda kitosan piyasaya sürülebilir forma dönüştürülmektedir. Ticari amaçla kullanılacak kitosanın, üretim süreçlerindeki kimyasal proseslerin asgari düzeye indirgenmesini mümkün kılacak bakteriler gibi biyolojik materyaller kullanılarak üretimi de söz konusudur.

Bu sebeple çalışmamız kapsamında Karataş ve Mersin kıyılarından temin edilen toprak örneklerinden biyodönüşüm aşamalarını gerçekleştiren *Bacillus* sp izolasyonu, yüksek verimde üretim için fermantasyon ortamının optimizasyonu ve saflaştırılan biyopolimerin antimikrobiyal aktivite ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen kitosanın, endüstriyel ve tıbbi boyutta kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan kitosan üretici *Bacillus* suşları Mersin ve Karataş sahillerinden aseptik koşullarda alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu tezde CDA üretici suşların belirlenmesi, izolasyonu, tanımlanması, kitosan üretim ortamının optimizasyonu, kitosan saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında, çeşitli besiyerleri, tampon çözeltiler ve pH metre (Starter 3000), steril kabin (Class 2), su banyosu (JSWB-22T), yağ banyosu, UV/VIS spektrofotometre (TETRA), otoklav (JSAC40), etüv (JSOF-050), çalkalamalı inkübatör (JSSI-200C ve optic ivymen system 306AFDED), santrifüj (MİKRO 220R), ışık mikroskobu (Leica), koloni sayıcı (J.P.Selecta 230V) ile temel laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

2.1.1. Kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri

Kitinin kitosana biyodönüşümünü enzimatik olarak gerçekleştirebilen *Bacillus* suşlarının izolasyonu amacıyla kullanılmıştır (Toharisman ve Suhartono, 2008).

Çizelge 2.1. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	7
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1
Maya özütü	2
Tripton	1
Kolloidal kitin	10
4-nitroasetinalid	0.5
Agar agar	15

4-nitroasetinalid hariç besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0-7.2'ye ayarlanıp otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 4-nitroasetinalid içeren süspansiyon 0.45 µm'lik steril filtreden geçirilerek besiyerine eklenmiştir.

2.1.1.2. CDA kültür tarama besiyeri

Kitin deasetilaz üretici suşların CDA kültür taraması amacıyla sıvı fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır (Kaur ve ark.,2012).

Çizelge 2.2. Sıvı fermantasyon ortamının içeriği

Besiyeri içeriği	%
Maya Özütü	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4
KH ₂ PO ₄	0.15
pH	8

2.1.1.3. Tryptic soy agar (TSA)

VITEK identifikasyon analizleri öncesinde suşların aktifleştirilmesi için kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Tryptic soy agar içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
Kazein peptonu	15
Soya peptonu	5
NaCl	5
Agar agar	15

pH'sı 7.3±0.2'ye ayarlanmış hazır besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.1.4. Nutrient broth

Saflaştırılmış kitosanın test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı karakterizasyon basamaklarında suşların bir gecelik taze kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Nutrient broth içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
Et peptonu	5
Et özütü	3

pH'sı 7.0±0.2'ye ayarlanmış hazır besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.1.4. Plate count agar

Saflaştırılmış kitosanın test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması ve karakterizasyon çalışmaları sırasında canlı bakteri sayımı için kullanılmıştır.

Çizelge 2.5. Plate count agar içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
Kazein peptonu	5
Maya özütü	2.5
D-Glukoz	1
Agar agar	15

pH'sı 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanmış hazır besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda 121°C 'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.1.6. Nutrient agar

Mikroorganizmaların stoklanması için eğik katı kültür şeklinde hazırlanarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.6. Nutrient agar içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
Et peptonu	5
Et özütü	3
Agar agar	15

pH'sı 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanmış hazır besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda 121°C 'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.1.7. Leura-Bertani besiyeri

Gliserol stok kültürlerin hazırlanmasında mikroorganizmaların aktifleştirilmesi için kullanılmıştır.

Çizelge 2.7. Leura-bertani besiyeri içeriği

Besiyeri içeriği	g/L
NaCl	10
Maya özütü	5
Tripton	5
Agar agar	15

pH'sı 7.5 ± 0.22 'ye ayarlanmış hazır besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavda 121°C 'de 1.2 atm basınçta 15 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan çözeltiler

0.1 N NaOH çözeltisi: 0.4 g sodyum hidroksitin 100 mL saf suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

1 N NaOH çözeltisi: 4 g sodyum hidroksitin 100 mL saf suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

1 N HCl çözeltisi: 8.58 mL konsantre HCl 100 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

%0.1 glasiyel asetik asit çözeltisi: 0.1 mL glasiyel asetik asit 100 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

%2'lik glasiyel asetik asit çözeltisi: 2 mL glasiyel asetik asit 100 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

%3'lük glasiyel asetik asit çözeltisi: 3 mL glasiyel asetik asit 100 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

%1'lik H_2SO_4 çözeltisi: 1 mL sülfirik asit 100 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır.

İyot-potasyum iyodür çözeltisi: 3 g iyot ve 5 g potasyum iyodür (KI)'ün 1000 mL saf suda çözdürülmesi ile hazırlanmış ve karanlık koşullarda cam şişede saklanmıştır.

Ninhidrin ayıracı: 0.35 g ninhidrinin 100 mL etanol içerisinde çözdürülmesi ile hazırlanmış ve karanlık koşullarda cam şişede saklanmıştır.

Steril fizyolojik tuzlu çözeltisi: 0.9 g sodyum klorürün 100 mL saf suda çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Toprak örneklerinin toplanması

Kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen, kitin deasetilaz üretici bakteriler, kitin kalıntılarındaki mevcut nitrojenin geri dönüşümünden sorumlu olup; habitat olarak deniz, okyanus ve nehir ağzı sularına ve bu suların etrafındaki topraklara (sahiller gibi) dağılım göstermişlerdir (Kaur ve ark.,2012). Literatürdeki bu bilgiye dayanarak, Orman Bakanlığı'ndan alınan izinler doğrultusunda koordinatları verilmiş Mersin iline bağlı

Susanoğlu deniz sahili Yapraklı Koy (36°25'9"N 34°5'30"E), Silifke ilçesine bağlı Boğsak Koyu (36°16'23"N 33°48'50"E) ve Adana ili Karataş ilçesine bağlı liman bölgesinden (36°33 '45"N 35°22 '49"E) aseptik koşullarda toprak örnekleri alınmış ve bu örnekler CDA üretici *Bacillus* suşlarının izolasyonu için laboratuvarında bekletilmeden analiz edilmiştir.

2.2.2. Kolloidal kitin üretimi

Wen vd. (2002) tarafından belirtilen yöntem tarafımızca modifiye edilerek kullanılmıştır.

1. 5 g toz halindeki kitin içeren 5 L'lik cam burgulu kapaklı şişeye, 100 mL konsantre HCl yavaş yavaş ilave edilmiştir.
2. Süspansiyon +4°C'de bir gece yüksek devirde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.
3. Karışıma 2 L soğuk %95'lik etil alkol ilave edilmiş ve bir gece 25°C'de bekletilmiştir.
4. Karışım filtre kağıdından geçirilerek toplanan presipitat 5500 rpm'de 10 dk. +4°C'de santrifuj edilerek bir araya toplanmıştır.
5. Distile su ile pellet iki kez yıkanmış (5500 rpm'de 10 dk. +4°C'de) ve yine distile su ile süspanse edilmiştir.
6. Süspansiyonun pH'sı 0.01 N'lik NaOH ile nötralize (pH 7.0) edilmiştir.
7. Elde edilen nötral presipitat cam bir kaba alınarak oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilmiş ve kullanılabilece kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştır.

Kullanılmak üzere saklanan kolloidal kitin Şekil 2.1'de verilmiştir. Saf kitinin kimyasal işlemlerden geçirilmesi ile elde edilen kolloidal kitin %35 verimle üretilmiştir.



Şekil 2.1. Besi ortamına eklenecek kolloidal kitin

2.2.3. CDA üretici *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu

Steril fizyolojik tuzlu ile süspansiyon edilmiş toprak örnekleri *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için 65°C'de 30 dk. su banyosunda ön işlemden geçirilmiştir. Muameleyi takiben seri sulandırma yapılarak 10^{-3} , 10^{-5} ve 10^{-8} sulandırma katsayılarından 100 µL alınarak CDA aktivite besiyerine yayma preparasyon şeklinde inoküle edilmiştir. Takiben petri plakları 30°C'de bir hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince bakteri kolonileri etrafındaki renk değişimi gözlenmiştir.

2.2.4. CDA kültür taraması

Substrat olarak koloidal kitin içeren katı besiyerlerinde kitin deasetilaz enzimini sentezleme karakteri gösteren suşlar, sıvı fermantasyon ortamında kültür taramasına tabii tutulmuştur. İzolatlar söz konusu ortamda 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besi ortamının 2 mL'si, etanolde çözdürülmüş 4-nitroasetanilid emdirilen ve akabinde havada kurutulmuş tanı kağıtlarını içeren steril bir test tüpüne aktararak 25°C'de 12-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Takiben tanı kağıtlarında sarı renk oluşumu gözlenmiştir (Fang ve ark.,2010; Zhou ve ark.,2010; Kaur ve ark.,2012).

2.2.4. CDA üretici *Bacillus* sp. suşların tanımlanması

Gram boyama analizleri ile morfolojik karakterleri belirlenen suşlar VITEK II (Biomeriux) identifikasyon sistemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bunun için VITEK II analizi öncesi suşlar Triptik Soy Agar (TSA)'da 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 mL %0.45-0.5 NaCl (pH 4.5-7.0) içeren tüplere 1 gecelik kültürden öze dolusu inoküle edilerek, tüplerin Mac-Farland bulanıklığı 0.5-0.63 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteriler gram boyanma karakterlerine uygun kitler kullanılarak tiplendirmek üzere cihaza yüklenmiştir.

2.2.6. *Bacillus* sp. suşların stoklanması

CDA üretici olarak tiplendirilmiş *Bacillus* sp. suşlarının LB besiyerinde 37°C'de geliştirilmiş 1 gecelik kültürlerinden, toplam hacmin %30'u steril gliserol olacak şekilde ependorf tüplerine aktarılıp suşlar -20°C'de saklanmıştır.

2.2.7. Kitosan üretim ortamının optimizasyonu

Kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen CDA enzimini sentezleyen bakterilerin izolasyonu ve tiplendirmesini takiben, suşlardan en yüksek verimde kitosan eldesi için kitosan üretim ortamının optimizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Optimizasyon çalışmalarına öncelikle fermantasyon ortamına besin kaynaklarının eklenmesiyle başlanmış olup sırasıyla, karbon kaynağı olarak %2 konsantrasyonda glukoz, laktoz ve sükröz; %1 konsantrasyonda et özütü, maya özütü, kazein peptonu, gibi organik; amonyum sülfat ve sodyum nitrat gibi inorganik azot kaynakları; %0.04 konsantrasyonda metal iyonları ($MgSO_4$, $ZnCl_2$, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $CuSO_4$) eklenerek besi ortamındaki bakteriyel gelişim ilk 12 saat için her iki saatte bir alınan örneklerin OD_{600} nm'de spektrofotometrik analizleri yapılarak takip edilmiştir. 48 saat sürdürülen gelişim için pH (5, 4.5, 6, 6.5, 7, 7.5 ve 8) ve inkübasyon sıcaklığı (35, 37, 40, 43 ve 45°C) gibi parametrelerde aynı koşullar altında incelenmiştir.

Her suş aynı fermantasyon ortamının 5 mL'sini içeren tüplerde 25°C'de 180 rpm'de ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Bir gecelik taze kültürlerin optik yoğunluğu aynı sıvı besiyeri ile 0.4'e ayarlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarına, 95 mL'lik besi ortamını içeren 250 mL'lik cam burgulu şişelere kültürlerin inoküle edilmesi ile başlanmıştır. Ve bu ön inkübasyon aşamasına her optimizasyon parametresini takiben besiyerinin içeriğindeki değişikliklerle birlikte optik yoğunluk 0.4'e ayarlanarak devam edilmiştir. Sonuçlar suşların aynı inkübasyon koşullarında optimizasyon öncesi fermantasyon ortamında 24 saatlik gelişimlerinin izlenmesi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Hüresel gelişimler kültür ortamının spektrofotometrik optik yoğunluğu (OD_{600}) temel alınarak belirlenmiştir.

2.2.8. Sıvı fermantasyon ortamından kitosanların saflaştırılması ve kalitatif tespiti

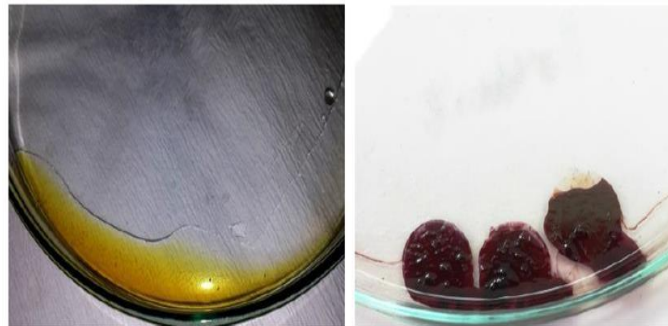
Kitosan üretim ortamının optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına dayanarak izolatların en yüksek gelişim gösterdiği besi ortamına %1 kolloidal kitin eklenerek suşlar 37°C'de çalkalamalı koşullarda (180 rpm) 12 saat inkübe edilmiştir.

Kitosan varlığının kalitatif tespiti için, inkübasyonu takiben sıvı fermantasyon ortamı 5500 rpm'de 30 dk. +4°C'de santrifüj edilmiştir. Bakteri, kitin ve kitosan karışımı içeren pellet 0.1 N NaOH çözeltisinin 10 mL'si ile süspanse edilerek iyice karıştırılmıştır. Ve 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. Tüplerin oda sıcaklığına gelmesi

beklenmiş ve alkali muamele sonucu tüm hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Tüpler tekrar 5500 rpm'de 30 dk. +4°C'de santrifüj edilmiştir. Kitin, kitosan ve az da olsa hücre kalıntıları içeren pellet %2'lik glasiyel asetik asitin 10 mL'si ile yıkanmış ve kitosanın çözünmesi için karışım 1 gece oda sıcaklığında çalkalanmıştır.

Tüp içeriği tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiş ve süpernatantın pH'sı 1 N NaOH ile nötrale edilmiştir. 5500 rpm'de 15 dk. santrifüjleme sonrası elde edilen beyaz pellet 2 kez distile su ile yıkanmış ve 5 mL distile suda süspansiyon edilmiştir. Bu aşamada elde edilen süspansiyon ham kitosan preparatı olarak değerlendirilmiş olup +4°C'de steril falkon tüplerinde muhafaza edilmiştir. Bu süspansiyonun 1 mL'si daha önceden ağırlığı bilinen cam petri veya saat camına alınarak 55°C'de 2-6 saat arası kuru sıcak fırında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemini takiben cam kapların ağırlığı tekrar ölçülerek %1 kolloidal kitinden mikrobiyal dönüşümle ortalama olarak ne kadar kitosan üretildiği % verim olarak hesaplanmıştır.

Kuru presipitatın üzerine 2-3 damla iyot/potasyum iyodür solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve karışıma 2-3 damla %1'lik H₂SO₄ eklenmiştir. İyot/potasyum iyodür solüsyonun eklenmesi ile önce koyu kahve olan presipitat sülfirik asit eklenmesiyle koyu pembe renk almıştır (Ortega-Ortiz ve ark.,2010). Bu tayin %2'lik glasiyel asetik asitte çözülmüş standart kitosan ve kolloidal kitinin oluşturduğu renkler referans alınarak optimize edilmiştir. Şekil 2.2'de kolloidal kitin sarı-kahverengi, kitosan ise koyu pembe renk vermiştir.



Şekil 2.2. Soldan sağa kolloidal kitin ve kitosanın kalitatif analizi takiben renklendirme sonucu

2.2.9. Kitosan preparatlarındaki total karbonhidratın ninhidrin ayıracağı ile belirlenmesi

Kalitatif analizleri takiben, ninhidrin ayıracağının kullanıldığı spektrofotometrik analizler ile preparatlardaki karbohidrat varlığı ve miktarı belirlenmiştir. Ayıraç kaynatıldığında

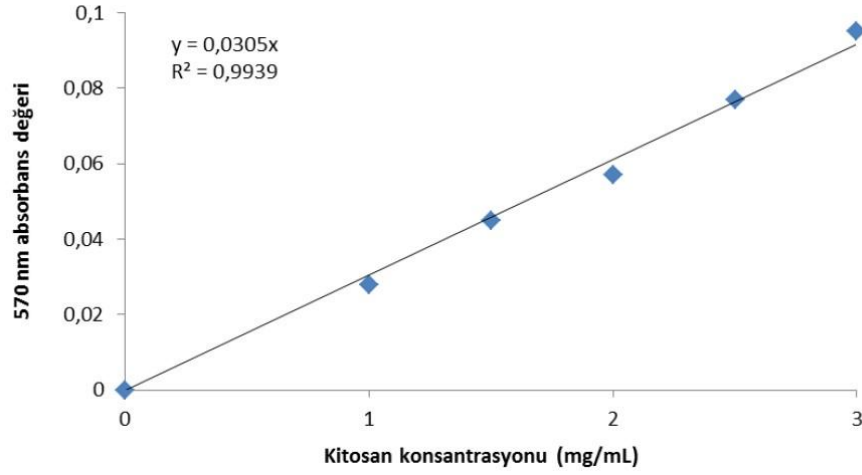
örnekteki protein içeriği ile mavi-mor kompleks; karbohidrat içeriği ile ise şarap kıvrılı rengini vermektedir.

0.3 g standart kitosanın %3'lük glasiyel asetik asitin 100 mL'sinde çözdürülerek 3 mg/mL konsantrasyonda kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden hazırlanan farklı konsantrasyonlar belirtilen prosedür ile analiz edilerek kalibrasyon eğrisi çizdirilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır. 5 mL standart kitosan örneğine 1 mL ninhidrin ayıracağı eklenerek karıştırılan örnekler su banyosunda 30 dk. kaynatılmıştır. Su banyosunda soğutulan reaksiyon içeriğine %50 (v/v) etanol/su karışımının 3 mL'si eklenerek sulandırılmıştır. Vortex ile karıştırılan renkli içerik 570 nm'de köre (%3'lük glasiyel asetik asit) karşı okutularak analiz edilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı yürütülmüştür. Sırasıyla 0; 1; 1.5; 2; 2.5 ve 3 mg/mL konsantrasyonda standart kitosan örneklerindeki renk değişimi Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Ninhidrin ayıracağı ile standart örneklerde gözlenen renk değişimi

0; 1; 1.5; 2; 2.5 ve 3 mg/mL konsantrasyonda standart kitosan çözeltileri kullanılarak çizdirilen kalibrasyon eğrisi Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Total karbohidrat varlığı için kullanılan kalibrasyon eğrisi

2.2.10. Saflaştırılmış kitosanların antimikrobiyal aktivite analizleri

Kısmi olarak saflaştırılmış kitosan süspansiyonlarının, kendi kültür koleksiyonumuzda bulunan mikroorganizmalara (Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella* spp, *Enterobacter cloacae*, Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) ve *Listeria monocytogenes*) karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir.

Kitosan solüsyonlarının antimikrobiyal aktivitesine, kimyasal yöntemlerle kitinden elde edilmiş orta (~400.000) ve düşük (50.000-190.000) moleküler ağırlıktaki standart kitosanlarla karşılaştırılarak anlam yüklenmiştir. Bunun için %0.1'lik glasiyel asetik asit içinde 2 mg/mL konsantrasyon da hazırlanmış standart kitosan solüsyonları referans olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin çözücüden kaynaklı olup olmadığını belirlemek için de steril %0.1'lik glasiyel asetik asit çözeltisi negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Ürünlerin endüstriyel kullanımının anlamlandırılması için sadece standart kitosanlar değil aynı zamanda standart antibiyotik (2 mg/mL konsantrasyonda steril kloramfenikol) de kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite analizleri için, nutrient broth besi ortamında 37°C'de 24 saat geliştirilen bakteriler 5500 rpm'de 15 dk. santrifüj sonrası steril fizyolojik tuzlu suyla süspansiyon edilmiştir. Bakterilerin optik yoğunlukları OD₆₀₀ 3'e ayarlanmıştır. Söz konusu yoğunluktaki test bakterilerinin ortalama koloni sayısı PCA kullanılarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite testleri 250 mg/L final konsantrasyonda standart kitosan çözeltileri, %0.1'lik glasiyel asetik asit, kloramfenikol ve kitosan süspansiyonlarını içeren pH'sı 7'ye ayarlanmış nutrient brothlarda sürdürülmüştür. Test bakterilerinin steril fizyolojik tuzlu su ile süspansiyon edilmiş kültürlerinin 0.1 mL'si 37°C, 120 rpm'de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin 0.1 mL'si PCA plaklarına yayılarak 37°C'de 12-18 saat inkübe edilmiştir. Ve 12. saatte bakteri sayımları yapılmıştır.

Kitosan süspansiyonlarının test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkisi, kontrol grupları ile karşılaştırılarak PCA plaklarında canlı hücre sayımı ile analiz edilmiştir. PCA'da canlı hücre sayımı şeklinde incelenen antimikrobiyal analizler üç tekrarlı olarak sürdürülmüştür. Antimikrobiyal aktivite $[(C-T)/C] \times 100$ formülüne göre % değer olarak hesaplanmıştır (kontrol plaklarındaki (C) ve test örnek plaklarındaki (T) koloni sayımı) (Chung ve ark.,2011).

2.2.11. Antimikrobiyal aktivitenin karakterizasyonu

Sıcaklığın etkisi: Son konsantrasyonda 250 mg/L olacak şekilde kitosan ve test organizması eklenen besi ortamı farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 37 ve 40°C) 120 rpm'de 6 saat inkübe edilmiştir. En iyi aktivite gözlenen sıcaklık için aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

pH'nın etkisi: Sıvı besi ortamlarının pH'sı 1N'lik NaOH ve HCl ile 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerlerine ayarlanarak test edilmiştir.

Kitosan konsantrasyonunun etkisi: En yüksek antimikrobiyal aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık ve pH'da besi ortamına farklı konsantrasyonlarda (100-150-250 mg/L) kitosan eklenerek analiz edilmiştir.

Diğer potansiyel bileşiklerin etkisi: %0.1 konsantrasyonda SDS, Triton X-100; βmerkaptoetanol gibi deterjanlar ve 5 mM EDTA içeren besi ortamlarına kitosan eklenerek yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarının antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Metal iyonlarının etkisi: Sıvı besi ortamına 0, 10, 20 ve 30 mM gibi çeşitli konsantrasyonlarda MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, NaCl ve KCl eklenerek incelenmiştir.

Yukarıda verilen pH, sıcaklık, kitosan konsantrasyonu, metal iyonlarının ve diğer bileşiklerin aktivite üzerindeki etkisi PCA plaklarında canlı hücre sayımı ile analiz

edilmiştir. Antibakteriyel aktivite $[(C-T)/C] \times 100$ formülüne göre % değer olarak hesaplanmıştır (kontrol plaklarındaki (C) ve test örnek plaklarındaki (T) koloni sayımı).

2.2.12. FT-IR ile deasetilasyon derecesinin belirlenmesi

Kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitesini belirleyen parametrelerden biri olarak tanımlanan deasetilasyon derecesi, Fourier Transform Infrared Raman Spectroscopy (FT-IR) ile belirlenmiştir. Bu analizler Sabancı Üniversitesi'nde The Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™10 FT-IR Spectrometer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kitosan örneklerinden potasyum bromit (KBr) film ve disk hazırlanmadan, çözücü içerisindeki örnekler oda sıcaklığında kurutulup toz haline getirilerek incelenmiştir. Söz konusu cihazın inceleme parametreleri Çizelge 2.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. FT-IR inceleme parametreleri

Parametre	Değer
Detektör	DTGS KBr
Işın ayırıcı	KBr
Kaynak	IR
Aksesuar	Smart iTR
Pencere	Elmas
İncelenen spektral aralık limitleri	
En yüksek aralık	4000
En düşük aralık	525
Optik hız	0.4747

2.2.13. Viskozimetre ile moleküler ağırlığın belirlenmesi

Kitosan preparatlarının ortalama moleküler ağırlıkları (M_v) viskozimetre ile belirlenmiştir. Asetik asit çözeltisinde hazırlanan kitosan preparatları, Anton Paar Modular Compact Rheometer 302 cihazı kullanılarak Sabancı Üniversitesi'nde analiz edilmiştir. Söz konusu cihazın inceleme parametreleri Çizelge 2.9'da gösterilmiştir. İnceleme oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.9.Viskozimetre inceleme parametreleri

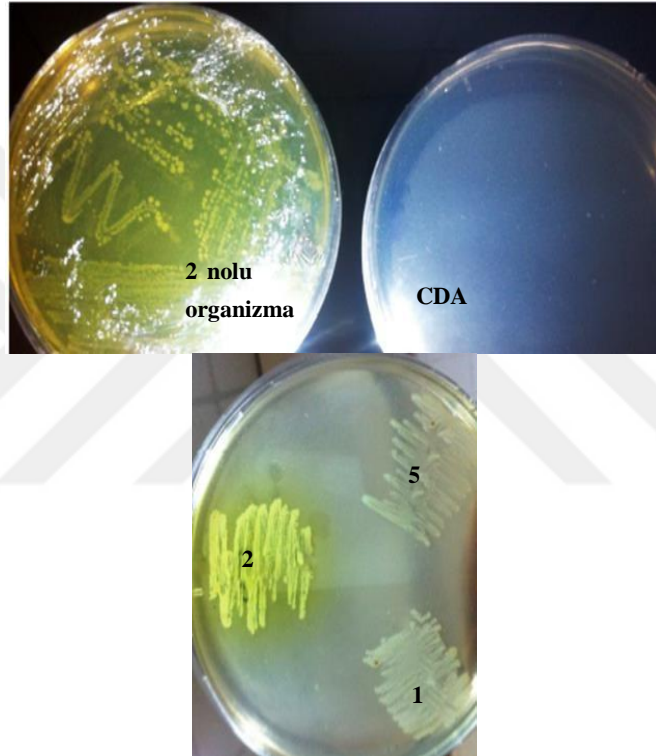
Parametre	Değer
Uygulama	RHEOPLUS/32 V3.61 21005865-33024
Cihaz	MCR302 SN81040995; FW3.84; Slot(4,-1)
Ölçüm Sistemi	CP25-2-SN31129; d=0.103 mm
Aksesuar	TU1=P-PTD200+H-PTD200-SN80400813-81039968
Kayma gerilimi	$\tau = 0.1 \dots 100 \text{ Pa log}$; $ \text{Slope} = 6 \text{ Pt. / dec}$
Zaman profili	19 Meas. Pts. Meas. Pt. Duration 10 ... 2 s log



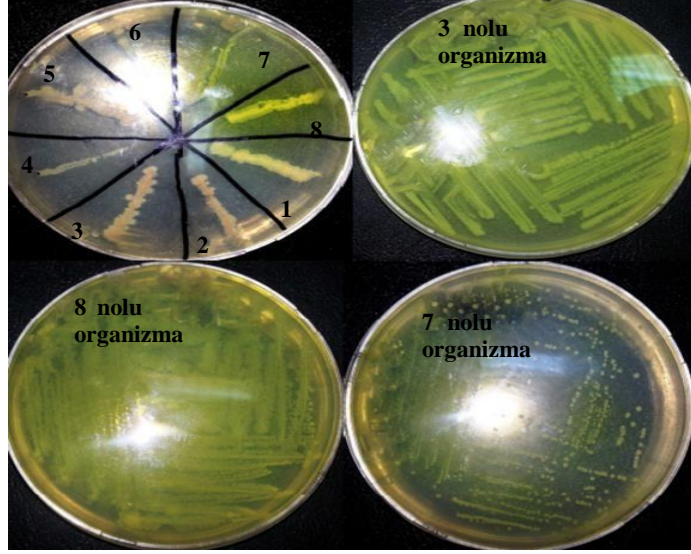
3. BULGULAR

3.1. CDA Üretici *Bacillus* sp. Suşlarının Seçimi

Katı besiyerinde kitin deasetilaz üretici *Bacillus* spp'lerin seçimi indikatör olarak kullanılan 4-nitroasetinalidin renk değişimine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre inkübasyon süresi sonunda kolonisi etrafında sarı zon oluşturarak üreme davranışı gösteren suşlar seçilmiştir. Bu suşların plaklarda göstermiş olduğu üreme davranışları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Üst kısımda soldan sağa: 2. izolata ait plakta yayma ile elde edilmiş sarı zonlu koloni oluşumu ve inoküle edilmeden indikatör içeren besi ortamının rengi. Alt kısımda CDA üretici 2 nolu suşun ve aynı sahilden alınan örnekten izole edilmiş ancak CDA üreticisi olmayan izolatların üreme davranışı



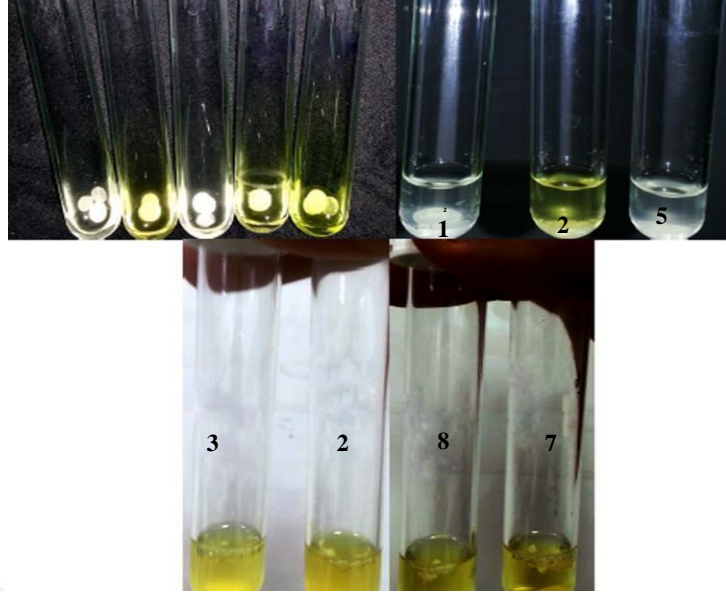
Şekil 3.2. CDA üretici suşların (3, 7 ve 8) plaklarda gösterdiği üreme davranışları

3.2. Kitosan Üretiminin CDA Enzim Varlığına Bağlı Kültür Taraması

İndikatör emdirilmiş tanı kağıtlarındaki sarı renk oluşumu ile katı besiyerlerinde gözlenen renk değişiminin suşların CDA üretiminden kaynaklandığı doğrulanmıştır. İnkübasyon süresinin 24 saate uzatılmasıyla sadece tanı kağıtlarının değil, fermantasyon ortamının renginin de sarıya dönüştüğü gözlenmiştir. Bu renk değişimleri negatif kontrol grupları ile karşılaştırılarak Şekil 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Tanı kağıtlarındaki renk değişimi

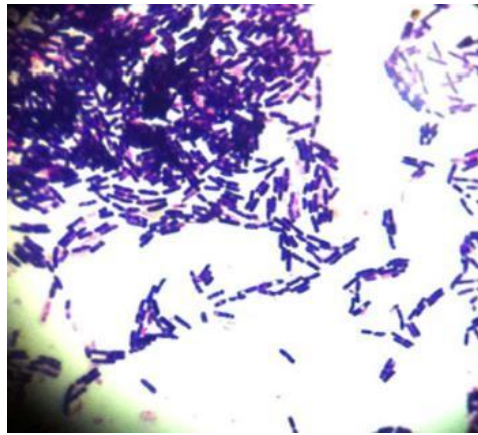


Şekil 3.4. CDA kültür taraması analizinde fermantasyon ortamında gerçekleşen renk değişimi

Tanı kağıtları ve fermantasyon ortamında renk değişimi gösteren 4 adet suş CDA üretici bakteri izolatları olarak kabul edilmiştir. İzolatlar 2, 3, 7 ve 8 şeklinde numaralandırılmıştır. Bu suşlardan 2 ve 3 nolu suş Karataş sahilinden, 7 ve 8 nolu suşlar ise Mersin sahil örneklerinden izole edilmiştir.

3.3. CDA Üretici İzolatların Tanımlanması ve Stoklanması

Mikroskopik analizler sonucunda Gr (+) basil olarak morfolojik karakterleri belirlenen suşlar (Şekil 3.5), VITEK II (Biomeriux) identifikasyon sistemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır (Çizelge 3.1).



Şekil 3.5. Suşlara ait Gr boyama sonucu (Örnek 2 nolu suşa aittir)

Gr boyanma karakterlerine uygun kitler kullanılarak VITEK identifikasyon sistemi ile tiplendirilen suşlara ait tanımlama sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

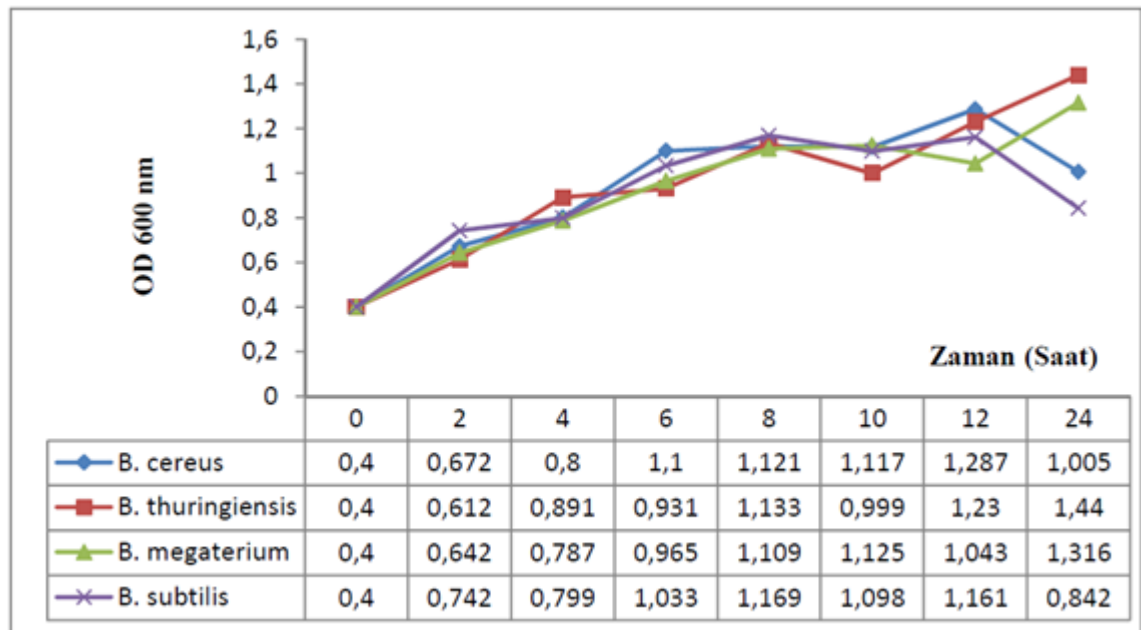
Çizelge 3.1. Suşların tiplendirme sonuçları

Bakteri No	Tiplendirme Sonucu	% İdentifikasyon Başarısı
2	<i>Bacillus cereus</i>	95
3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	85-90
7	<i>Bacillus megaterium</i>	92
8	<i>Bacillus subtilis</i>	95

CDA üretici olarak tiplendirilmiş *Bacillus* sp.’ler gliserol stoklamanın yanı sıra Nutrient Agar içeren tüplerde eğik katı şeklinde hazırlanmış kültürlerle her 6 ayda bir pasajlama yapılarak da muhafaza edilmiştir. Ve bu suşlar kitosan üretimi için hedef kaynak olarak değerlendirilmiştir.

3.4. Kitosan Üretim Ortamının Optimizasyonu

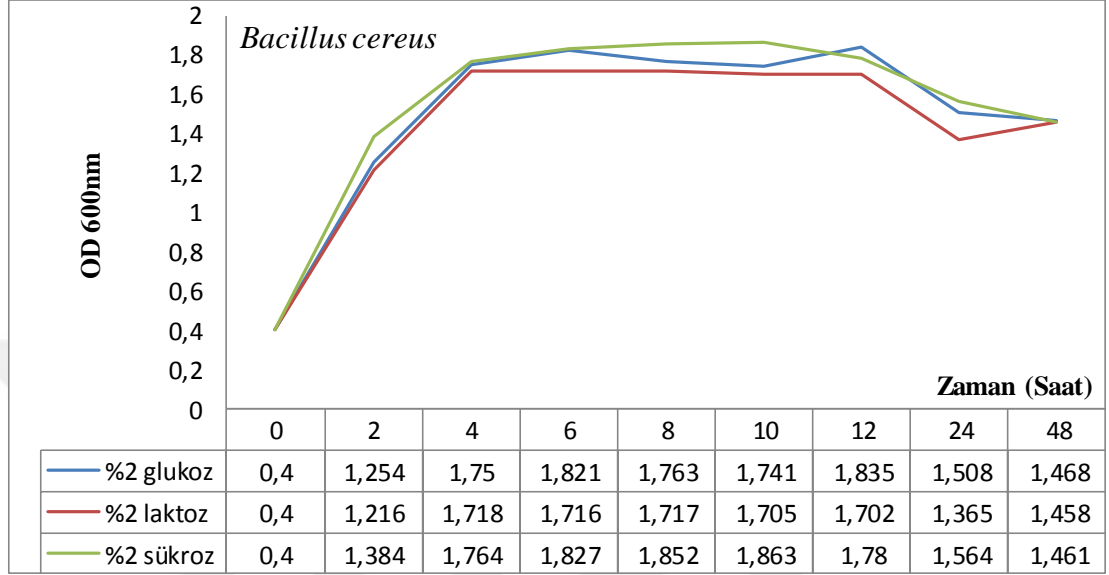
Optimizasyon sonuçları, aynı inkübasyon koşullarında suşların sıvı fermantasyon ortamında optimizasyon öncesi 24 saatlik gelişimlerinin izlenmesi (Şekil 3.6) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Hücresel gelişim, kültür ortamının spektrofotometrik optik yoğunluğu (OD₆₀₀) şeklinde belirlenmiştir. Her *Bacillus* sp suşu için ayrı ayrı raporlanan optimizasyon sonuçları aşağıdaki gibi grafize edilmiştir.



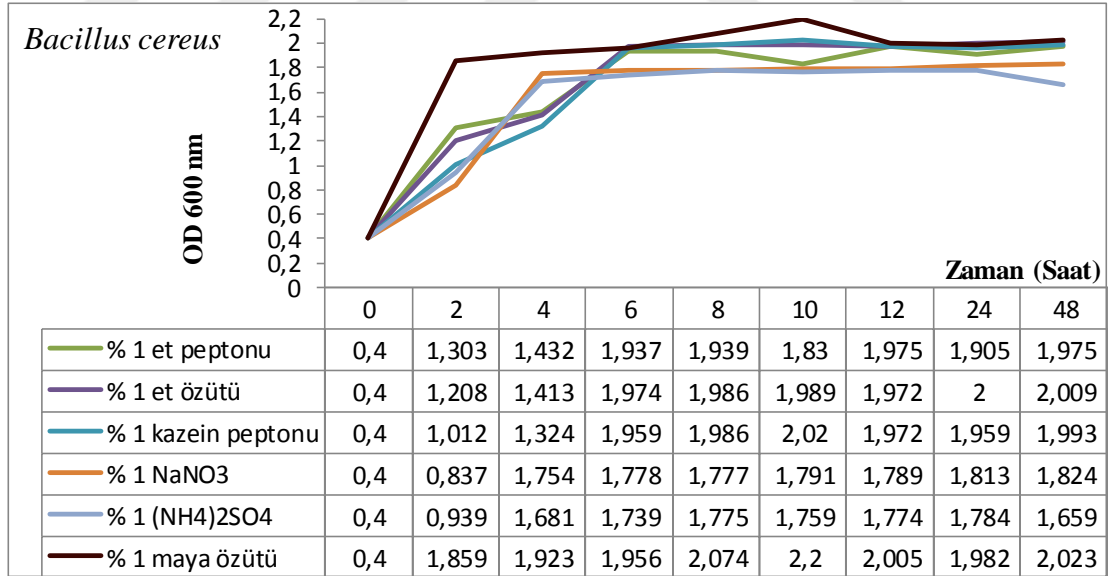
Şekil 3.6. Optimize edilmemiş fermantasyon ortamında 24 saatlik bakteriyel gelişim

3.4.1. *Bacillus cereus*'un optimizasyon sonuçları

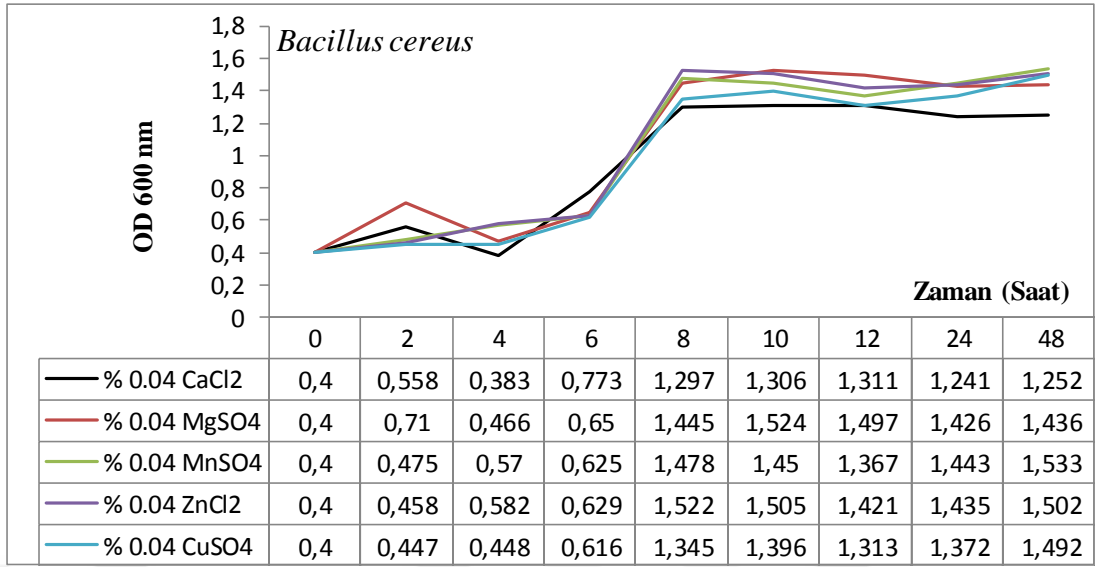
Bacillus cereus için sıvı fermantasyon ortamının optimizasyon sonuçları Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11'de incelenen her parametre için ayrı ayrı grafize edilmiştir.



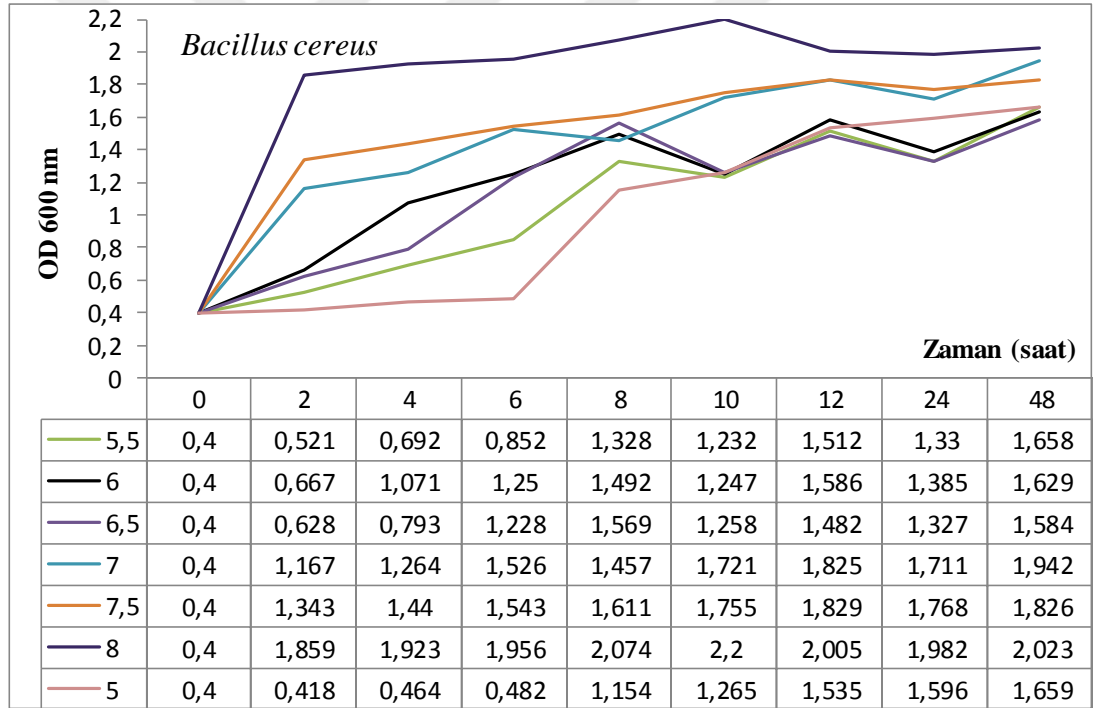
Şekil 3.7. *Bacillus cereus*'un karbon kaynağı optimizasyon



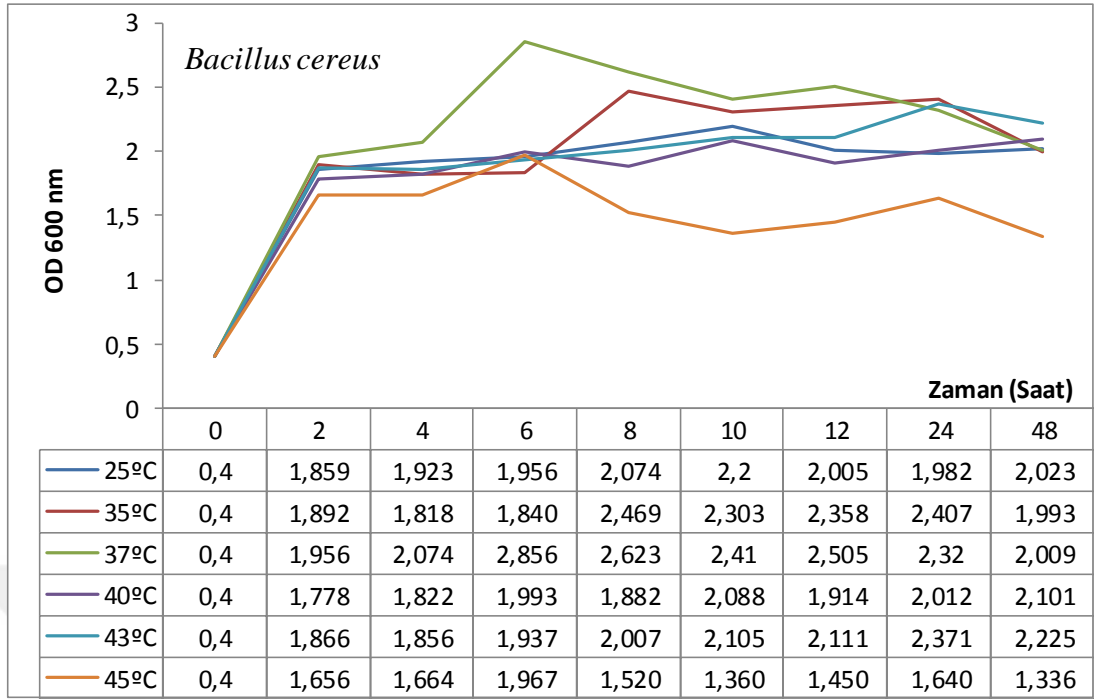
Şekil 3.8. *Bacillus cereus*'un azot kaynağı optimizasyon sonuçları



Şekil 3.9. *Bacillus cereus*'un metal iyonları optimizasyon sonuçları



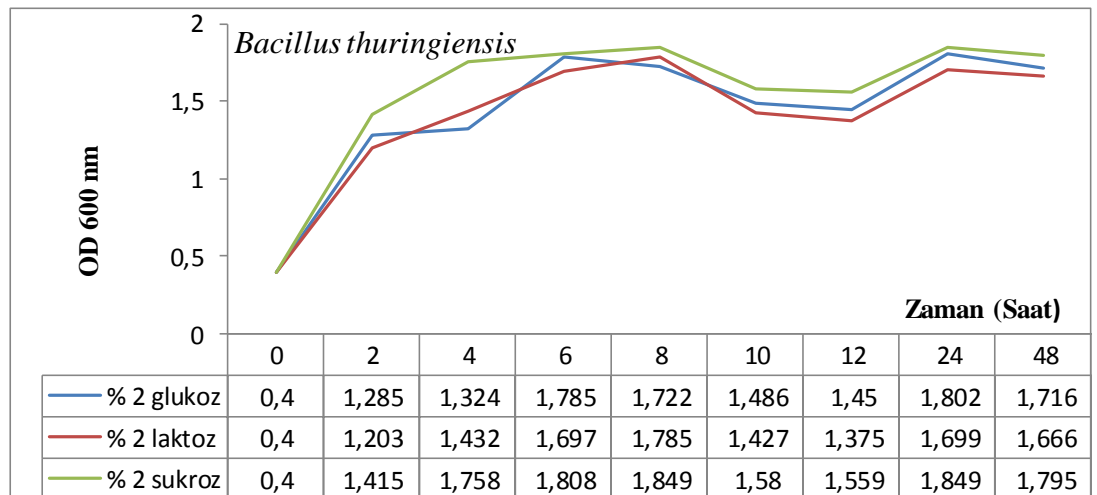
Şekil 3.10. *Bacillus cereus*'un pH optimizasyon sonuçları



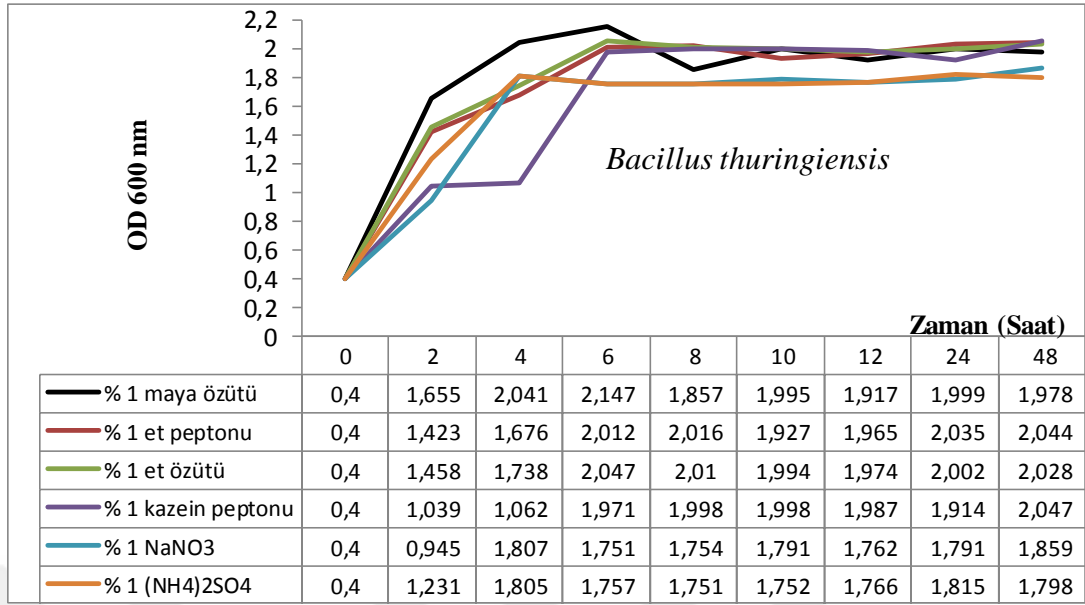
Şekil 3.11. *Bacillus cereus*'un sıcaklık optimizasyon sonuçları

3.4.2. *Bacillus thuringiensis*'in optimizasyon sonuçları

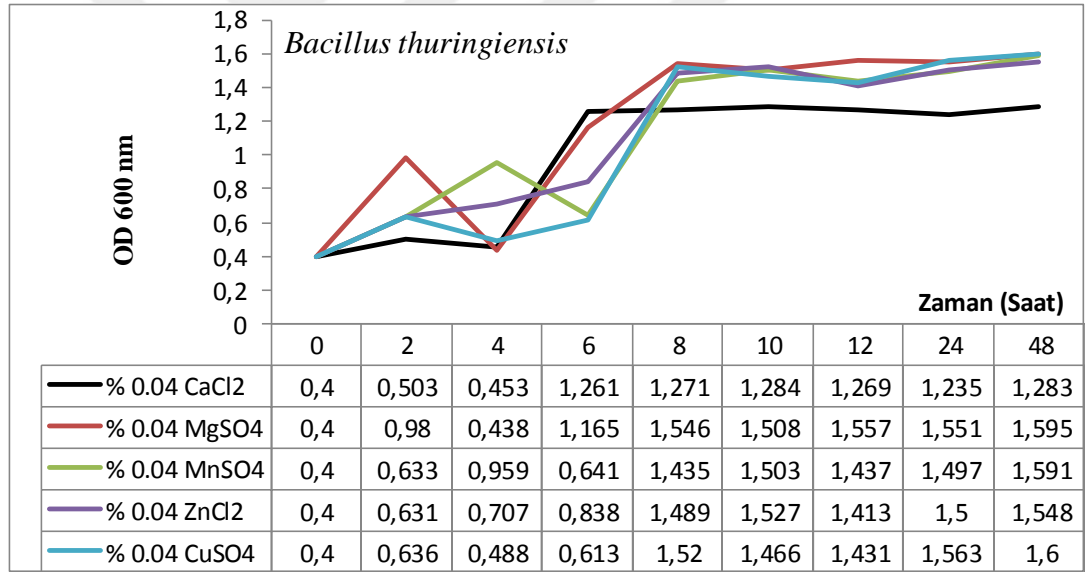
Bacillus thuringiensis için sıvı fermantasyon ortamının optimizasyon sonuçları Şekil 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'da incelenen her parametre için ayrı ayrı grafize edilmiştir.



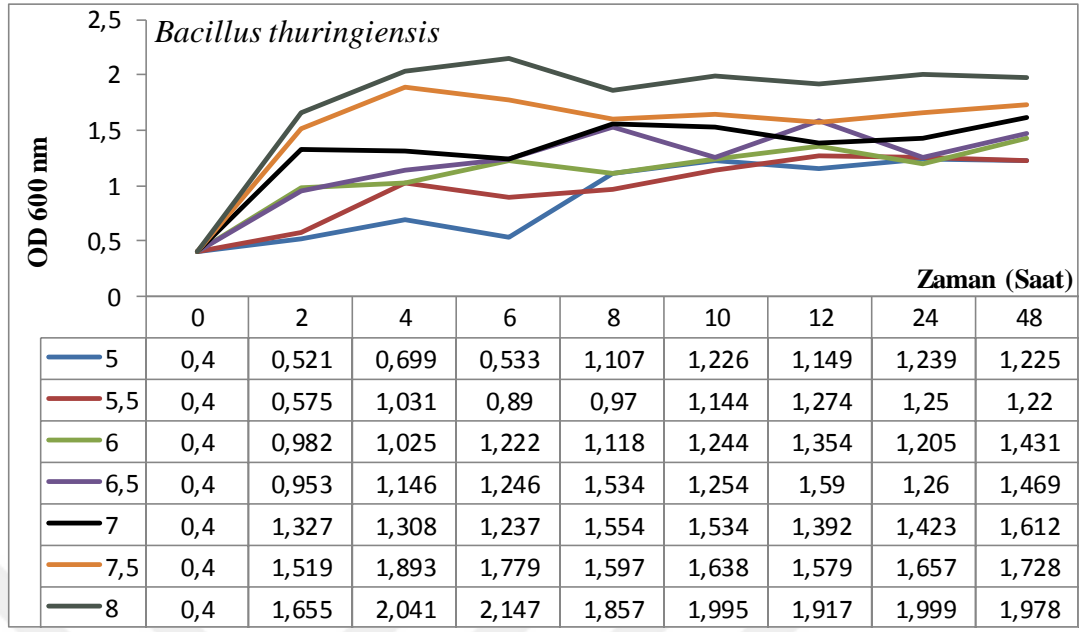
Şekil 3.12. *Bacillus thuringiensis*'in karbon kaynağı optimizasyon sonuçları



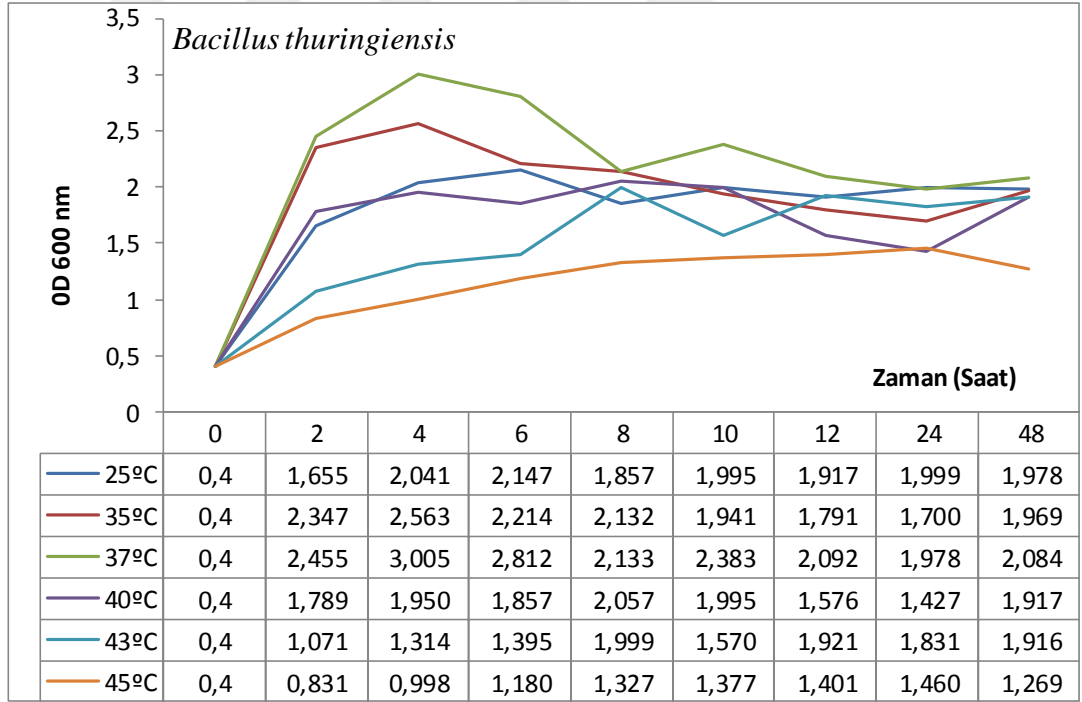
Şekil 3.13. *Bacillus thuringiensis*'in azot kaynağı optimizasyon sonuçları



Şekil 3.14. *Bacillus thuringiensis*'in metal iyonları optimizasyon sonuçları



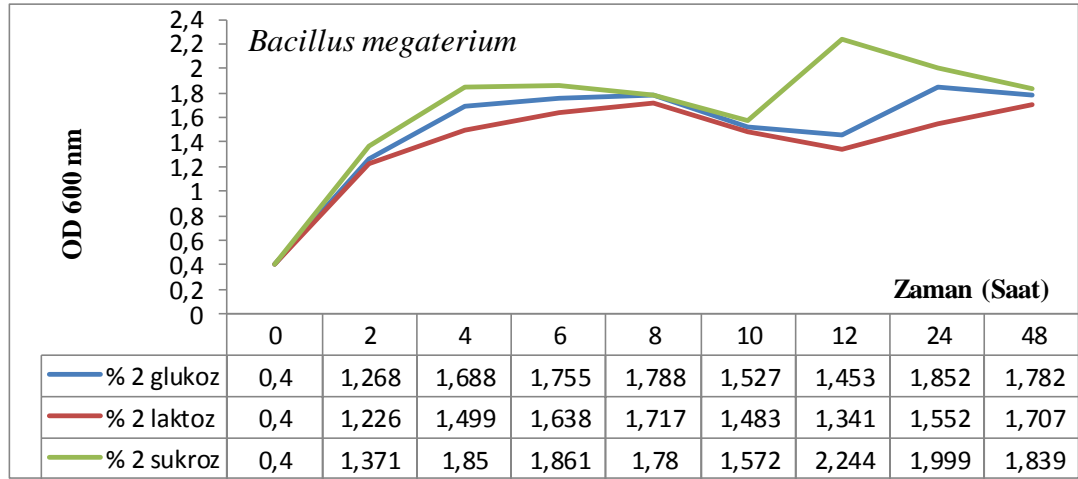
Şekil 3.15. *Bacillus thuringiensis*'in pH optimizasyon sonuçları



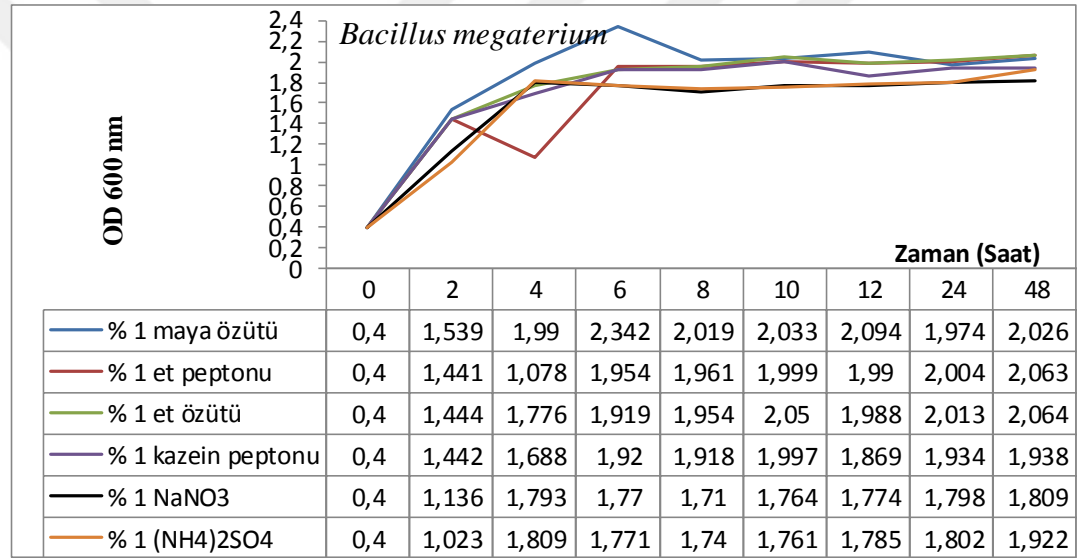
Şekil 3.16. *Bacillus thuringiensis*'in sıcaklık optimizasyon sonuçları

3.4.3. *Bacillus megaterium*'un optimizasyon sonuçları

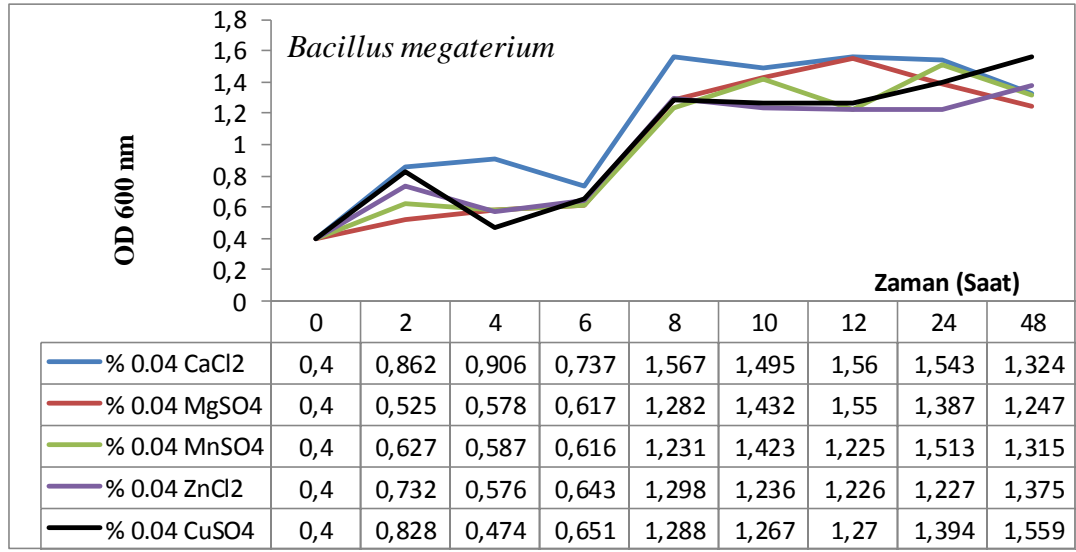
Bacillus megaterium için sıvı fermantasyon ortamının optimizasyon sonuçları Şekil 3.17, 3.18, 3.19, 3.20 ve 3.21'de incelenen her parametre için ayrı ayrı grafize edilmiştir.



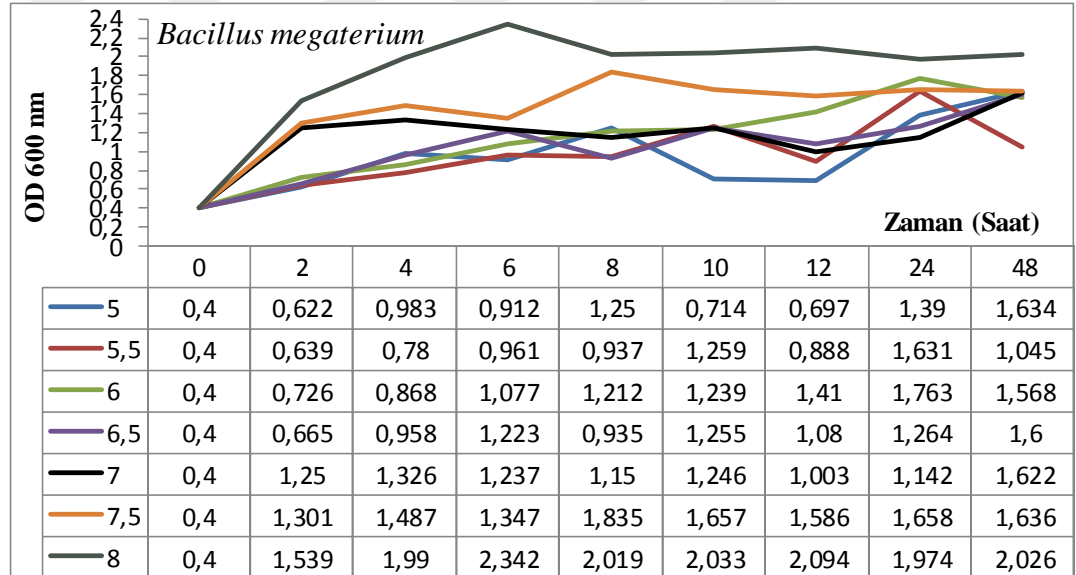
Şekil 3.17. *Bacillus megaterium* 'un karbon kaynağı optimizasyon sonuçları



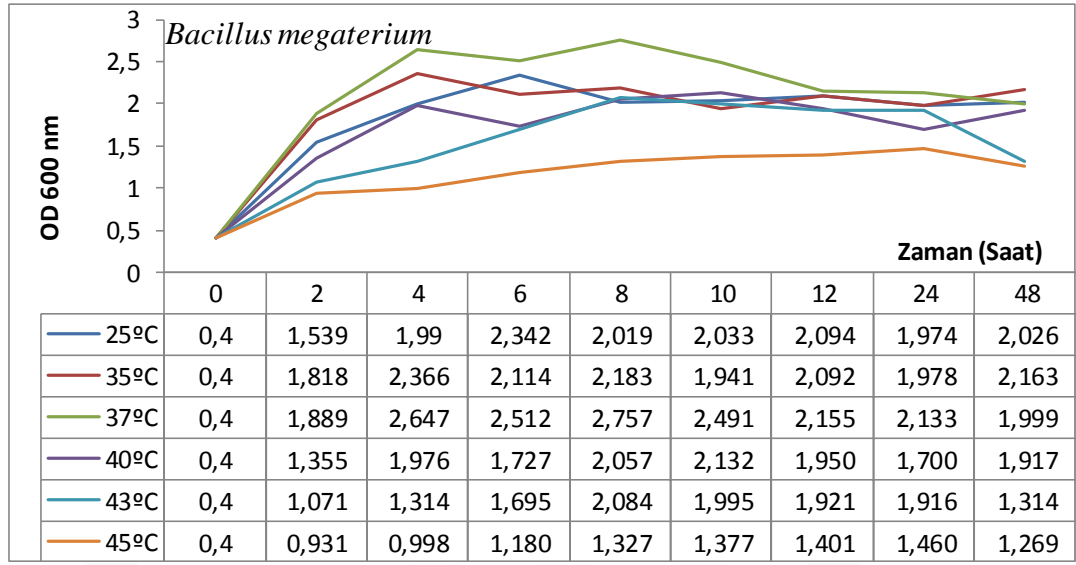
Şekil 3.18. *Bacillus megaterium* 'un azot kaynağı optimizasyon sonuçları



Şekil 3.19. *Bacillus megaterium* 'un metal iyonlarının optimizasyon sonuçları



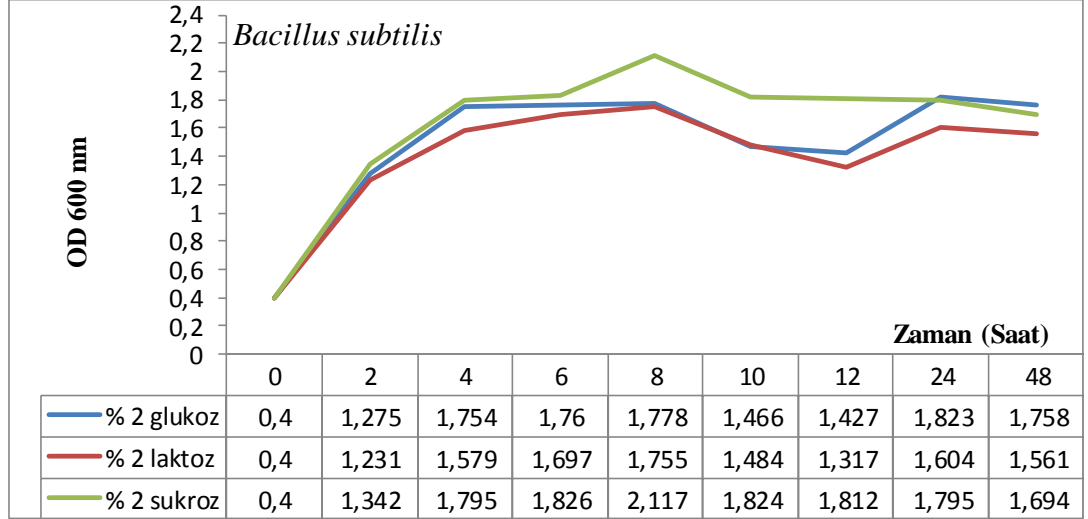
Şekil 3.20. *Bacillus megaterium* 'un pH optimizasyon sonuçları



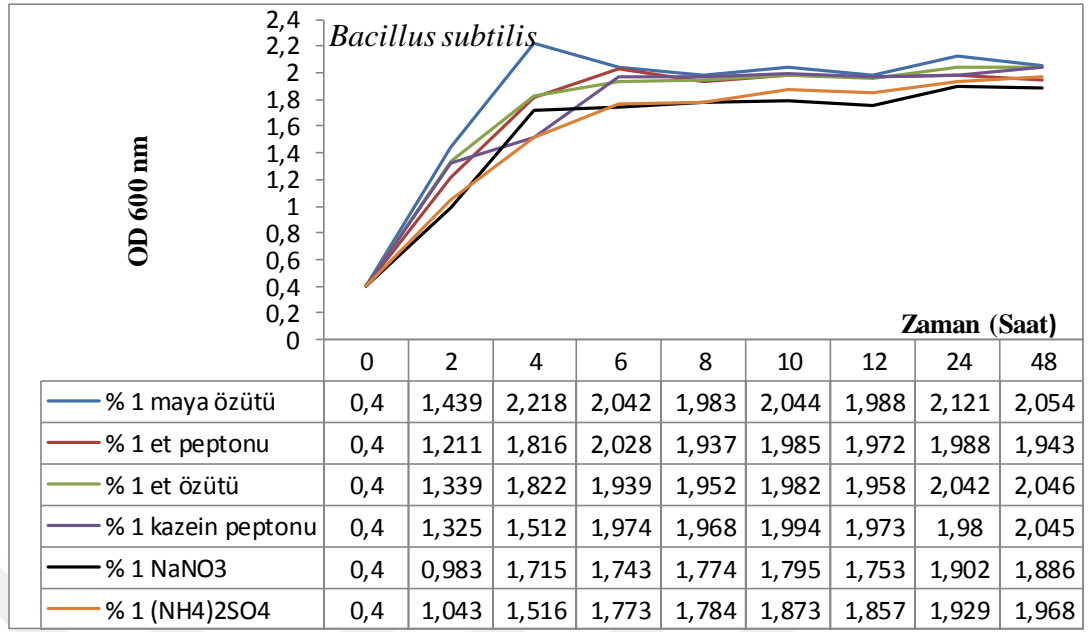
Şekil 3.21. *Bacillus megaterium*'un sıcaklık optimizasyon sonuçları

3.4.4. *Bacillus subtilis*'in optimizasyon sonuçları

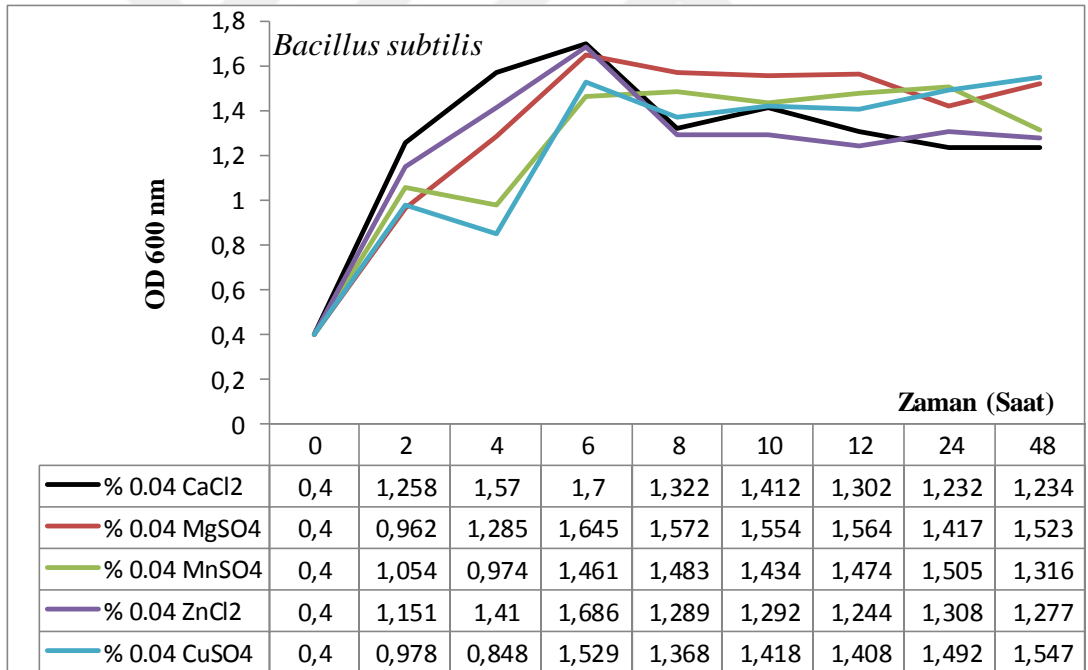
Bacillus subtilis için sıvı fermantasyon ortamının optimizasyon sonuçları Şekil 3.22, 3.23, 3.24, 3.25 ve 3.26'da incelenen her parametre için ayrı ayrı grafize edilmiştir.



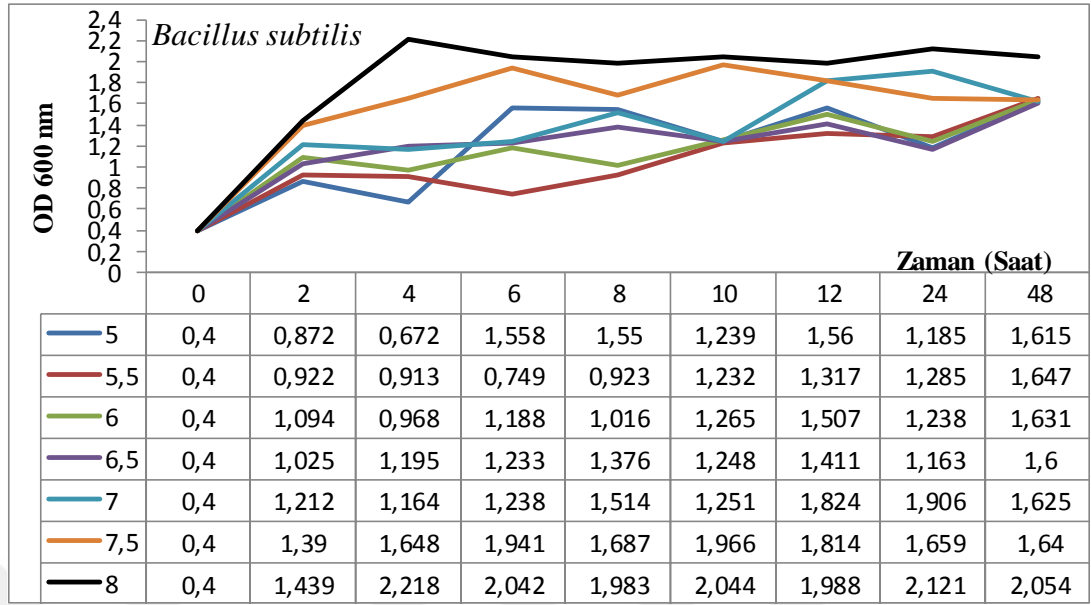
Şekil 3.22. *Bacillus subtilis*'in karbon kaynağı optimizasyon sonuçları



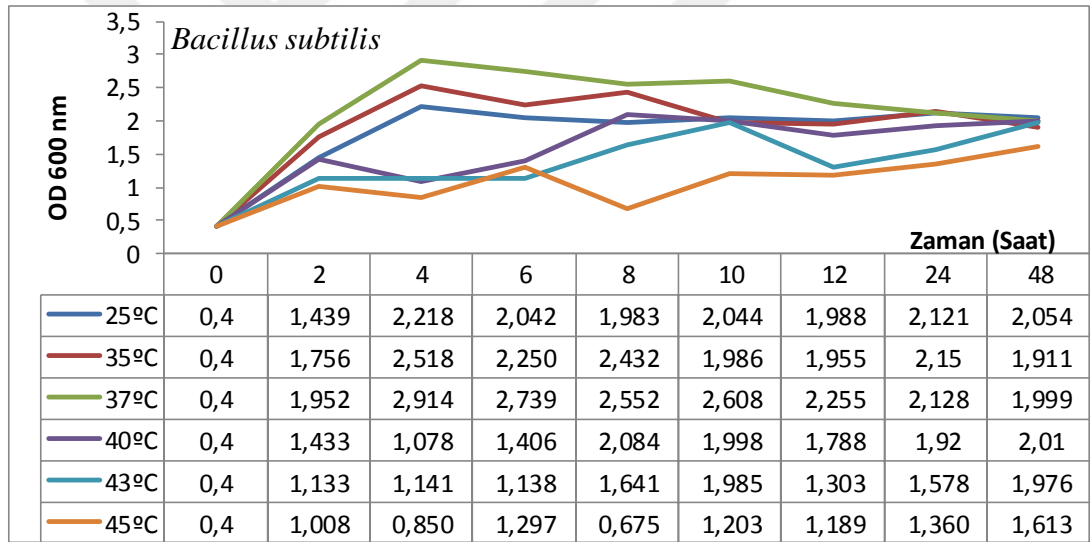
Şekil 3.23. *Bacillus subtilis*'in azot kaynağı optimizasyon sonuçları



Şekil 3.24. *Bacillus subtilis*'in metal iyonu optimizasyon sonuçları



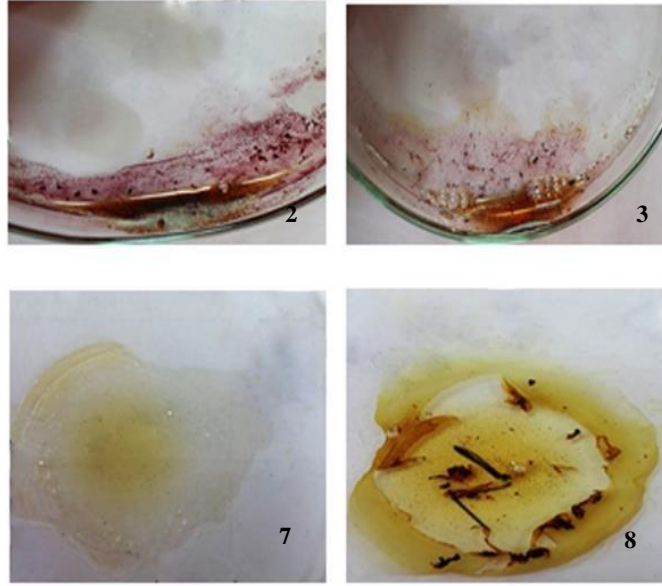
Şekil 3.25. *Bacillus subtilis* 'in pH optimizasyon sonuçları



Şekil 3.26. *Bacillus subtilis* 'in sıcaklık optimizasyon sonuçları

3.5. Fermantasyon Ortamında Kitin ve Kitosan Varlığı

Optimizasyon analizleri sonunda, başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış %1 maya özütü, 0.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.15 g KH_2PO_4 ve %2 sükröz içeren besi ortamında 37°C'de 48 saatlik inkübasyon süresince en yüksek gelişim değerleri elde edilmiştir. Sıvı fermantasyon ortamı kullanılarak kitosan saflaştırma analizleri sürdürülmüştür. Elde edilen kitosan preparatlarında polimerlerin varlığı kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Sırasıyla *Bacillus cereus* (2 nolu organizma), *Bacillus thuringiensis* (3 nolu organizma), *Bacillus megaterium* (7 nolu organizma) ve *Bacillus subtilis* (8 nolu organizma)'ten elde edilen kalitatif analiz sonucu

Kitosan preparatlarındaki total karbohidrat miktarı ninhidrin ayıracağı kullanılarak sürdürülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Örneklerdeki total karbohidrat miktarı

Kitosan Preparatları	Total Karbohidrat Miktarı (mg/mL)
<i>Bacillus cereus</i> /2 nolu preparat	0.393
<i>Bacillus thuringiensis</i> /3 nolu preparat	0.213
<i>Bacillus megaterium</i> /7 nolu preparat	0.163
<i>Bacillus subtilis</i> /8 nolu preparat	0.2

3.7. Kitosan Preparatların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite analizleri için kitosan içerikli nutrient brotlara inoküle edilen test bakterilerinin optik yoğunlukları OD₆₀₀ 3'e ayarlanmıştır. Söz konusu yoğunlukta test bakterilerindeki ortalama bakteri sayısı PCA kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 3.3'teki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. İnokülasyon öncesi ortalama bakteri sayısı

Test Bakterileri	Bakteri sayısı ($\sim \times 10^7$ cfu/mL)
Metisilin-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	54.2
<i>Bacillus cereus</i>	28
<i>Bacillus subtilis</i>	29.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52.7
<i>Klebsiella</i> spp	37.9
<i>Escherichia coli</i>	34
<i>Salmonella</i> spp	41.8
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	27.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	14.75
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	42.26
<i>Shigella</i> spp	19.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	22.72
<i>Listeria monocytogenes</i>	9

İnokülasyon öncesi ortalama koloni sayımı yapılmış ve kitosan süspansiyonlarının test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkisi belirtilen yöntemler ile sürdürülmüştür. Ve Çizelge 3.4’te belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.4. Kontrol gruplarının % inhibisyon etkisi

Kontrol grupları	%0.1 glasiyel asetik asit	2 mg/mL konsantrasyonda kloramfenikol süspansiyonu	2 mg/mL konsantrasyonda düşük moleküler ağırlıkta kitosan süspansiyonu	2 mg/mL konsantrasyonda orta moleküler ağırlıkta kitosan süspansiyonu
Test Bakterileri				
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	53	35	61
<i>Bacillus subtilis</i>	0	99	92	96
<i>P. aeruginosa</i>	0	45	PCA'larda üreme yok	99
<i>Klebsiella</i> spp	0	55	97	99
<i>Escherichia coli</i>	0	75	80	98
<i>Salmonella</i> spp	0	83	97	99
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	29	0
<i>Shigella</i> spp	0	89	84	68
<i>E. cloacae</i>	0	0	82	57
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	PCA'larda üreme yok	44
<i>E. faecalis</i>	0	42	0	0

Kısmi saflaştırılmış kitosan süspansiyonlarının test bakterileri üzerindeki % cinsinden hesaplanan antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. 2 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi

Test Bakterileri	% inhibisyonu
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	23
<i>Bacillus subtilis</i>	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
<i>Klebsiella</i> spp	0
<i>Escherichia coli</i>	36
<i>Salmonella</i> spp	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	0
<i>S. epidermidis</i>	34
<i>Shigella</i> spp	41
<i>E. cloacae</i>	25
<i>L. monocytogenes</i>	19
<i>E. faecalis</i>	32

Çizelge 3.6. 3 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi

Test Bakterileri	% inhibisyonu
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	10
<i>Bacillus subtilis</i>	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
<i>Klebsiella</i> spp	0
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Salmonella</i> spp	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	0
<i>S. epidermidis</i>	33
<i>Shigella</i> spp	8
<i>E. cloacae</i>	0
<i>L. monocytogenes</i>	11
<i>E. faecalis</i>	0

Çizelge 3.7. 7 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi

Test Bakterileri	% inhibisyonu
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Klebsiella</i> spp	0
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Salmonella</i> spp	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	0
<i>S. epidermidis</i>	14
<i>Shigella</i> spp	0
<i>E. cloacae</i>	0
<i>L. monocytogenes</i>	0
<i>E. faecalis</i>	0

Çizelge 3.8. 8 nolu kitosan süspansiyonunun % inhibisyon etkisi

Test Bakterileri	% inhibisyonu
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Klebsiella</i> spp	0
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Salmonella</i> spp	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	0
<i>S. epidermidis</i>	19
<i>Shigella</i> spp	0
<i>E. cloacae</i>	0
<i>L. monocytogenes</i>	0
<i>E. faecalis</i>	0

3.8. Kitosan Preparatların Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyon Sonuçları

3.8.1. Sıcaklığın antimikrobiyal aktiviteye etkisi

Son konsantrasyonda 250 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları ve test organizmaları eklenen besi ortamları 4, 15, 25, 37 ve 40°C farklı sıcaklıklarda 120 rpm’de 6 saat inkübasyonu takiben % cinsinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9 Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık		4°C	15°C	25°C	37°C	40°C
		Test bakterileri ve kitosan				
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i>	2	-*	0	0	0	0
	3	-	0	0	0	0
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2	-	8.9	15	23	17.4
	3	-	4.4	7	10	9.7
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2	-	20	11	17	14.6
	3	-	4	10.6	16	14.5
	7	-	0	0	0	0
	8	-	2.6	4.1	7	6.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	-	-	29	41	32
	3	-	-	33	49	39.9
	7	-	-	3	9	8.4
	8	-	-	0	11	9.1
<i>Klebsiella spp</i>	2	-	0	0	0	0
	3	-	0	0	0	0
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2	-	-	22	36	32.7
	3	-	-	2.2	6	4.2
	7	-	-	2	3	2.7
	8	-	-	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	2	-	0	0	0	0
	3	-	0	0	0	0
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	2	-	0	0	0	0
	3	-	0	0	0	0
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	-	0	0	34	32.8
	3	-	0	0	33	26
	7	-	0	0	14	12.2
	8	-	0	0	19	14.5
<i>Shigella spp</i>	2	-	-	0	41	39.9
	3	-	-	0	8	0
	7	-	-	0	0	0
	8	-	-	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	2	-	0	0	25	22.4

	3	-	0	0	0	0
	7	-	0	0	0	0
	8	-	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	2	-	-	8.3	19	17.5
	3	-	-	0	11	6.6
	7	-	-	0	0	0
	8	-	-	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	-	-	22.9	32	28
	3	-	-	0	0	0
	7	-	-	0	0	0
	8	-	-	0	0	0

*: - PCA'larda üreme olmadığını göstermektedir.

3.8.2. pH'nın antimikrobiyal aktiviteye etkisi

Son konsantrasyonda 250 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları ve test organizmaları eklenen besi ortamlarının başlangıç pH'ları 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanarak 37°C sıcaklıkta 120 rpm'de 6 saat inkübasyonu takiben % cinsinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10. pH'nın etkisi

pH		pH				
		pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Test bakterileri ve Kitosan						
<i>Metisilin-dirençli S. aureus</i>	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2	0	19.6	23	10.9	8.8
	3	0	9.93	10	4.54	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	14.78	17	14.54	4.61
	3	0	14.9	16	12.5	8.09
	7	0	0	0	0	0
	8	0	4.53	7	3.77	2.54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	37.5	41	22.44	12.11
	3	0	44.45	49	23.14	17.09
	7	0	6.2	9	4.84	0
	8	0	9.72	11	3.09	0
<i>Klebsiella spp</i>	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0

	8	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2	0	29.5	36	16.99	9.84
	3	0	0	6	0	0
	7	0	0	3	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
Vankomisin-dirençli <i>Enterococci (VRE)</i>	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	0	32.04	34	23.07	7.42
	3	0	24.49	33	22.22	18.18
	7	0	10	14	6.19	1.36
	8	0	16.20	19	13.4	3.39
<i>Shigella spp</i>	2	0	23.52	41	34.7	12.5
	3	0	0	8	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	2	0	23.34	25	11.11	0
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	2	0	18.9	19	9.07	0
	3	0	6.09	11	2.63	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	0	26.15	32	17.16	7.37
	3	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0

3.8.3. Kitosan konsantrasyonunun antimikrobiyal aktiviteye etkisi

Son konsantrasyonda 100, 150 ve 250 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları ve test organizmaları eklenen besi ortamlarının başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanarak 37°C sıcaklıkta 120 rpm'de 6 saat inkübasyonu takiben % cinsinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11.Kitosan konsantrasyonunun etkisi

Kitosan Test bakterileri ve kitosan konsantrasyonları		2	3	7	8
		100	0	0	0
Metisilin-dirençli S. aureus	150	0	0	0	0
	250	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
Bacillus cereus	150	10.47	0	0	0
	250	23	10	0	0
	100	0	0	0	0
Bacillus subtilis	150	9.09	7.44	0	0
	250	17	16	0	7
	100	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	150	33.33	30.72	0	0
	250	41	49	9	11
	100	0	0	0	0
Klebsiella spp	150	0	0	0	0
	250	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
Escherichia coli	150	20.4	0	0	0
	250	36	6	3	0
	100	0	0	0	0
Salmonella spp	150	0	0	0	0
	250	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
Vankomisin-dirençli Enterococci (VRE)	150	0	0	0	0
	250	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
S. epidermidis	150	21.21	23.07	8.73	7.39
	250	34	33	14	19
	100	0	0	0	0
Shigella spp	150	27.27	0	0	0
	250	41	8	0	0
	100	0	0	0	0
E. cloacae	150	14.38	0	0	0
	250	25	0	0	0
	100	0	0	0	0
L. monocytogenes	150	4.42	0	0	0
	250	19	11	0	0
	100	0	0	0	0
E. faecalis	150	10.52	0	0	0
	250	32	0	0	0

3.8.4. Antimikrobiyal aktiviteye diğer potansiyellerin etkisi

Son konsantrasyonda 250 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları ve test organizmaları eklenen besi ortamlarının başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanarak, ortama %0.1 konsantrasyonda SDS, Triton X-100; β -merkaptotanol gibi deterjanlar ve 5 mM EDTA eklenerek 37°C sıcaklıkta 120 rpm'de 6 saat inkübasyonu takiben % cinsinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Diğer potansiyellerin etkisi

Test bakterileri ve Kitosanlar	Diğer potansiyeller			
	%0.1 SDS	%0.1 Triton X-100	%0.1 β -merkaptotanol	5 mM EDTA
Metisilin-dirençli S. aureus	2	0	0	0
	3	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
Bacillus cereus	2	0	0	12.82
	3	0	0	2.87
	7	0	0	0
	8	0	0	0
Bacillus subtilis	2	0	0	9.81
	3	0	0	8.82
	7	0	0	0
	8	0	0	1.95
Pseudomonas aeruginosa	2	-	0	19.08
	3	-	0	23.28
	7	-	0	0
	8	-	0	5.64
Klebsiella spp	2	0	0	0
	3	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
Escherichia coli	2	0	0	12.19
	3	0	0	2
	7	0	0	0
	8	0	0	0
Salmonella spp	2	0	0	0
	3	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
Vankomisin-dirençli Enterococci (VRE)	2	0	0	0
	3	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
S. epidermidis	2	-	0	19.5
	3	-	0	18.18

	7	-	0	8.77	8.95
	8	-	0	8.43	9.81
<i>Shigella</i> spp	2	0	0	16.12	19.1
	3	0	0	3.48	5.81
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	2	0	0	12.13	16.23
	3	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	2	0	0	10.52	12.13
	3	0	0	7.05	9.07
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	0	0	13.17	14.52
	3	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0

3.8.5. Antimikrobiyal aktiviteye metal iyonlarının etkisi

Son konsantrasyonda 250 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları ve test organizmaları eklenen besi ortamlarının başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanarak, 10, 20 ve 30 mM konsantrasyonlarda MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, NaCl ve KCl eklenerek eklenerek 37°C sıcaklıkta 120 rpm'de 6 saat inkübasyonu takiben % cinsinden elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.13 ve 3.14'te verilmiştir.

Çizelge 3.13. Metal İyonların Etkisi

Metal İyonları		NaCl			KCl		
		10 mM	20 mM	30 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Test bakterileri ve Kitosanlar							
	<i>Metisilin-dirençli S.aureus</i>	2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0
8		0	0	0	0	0	
<i>Bacillus cereus</i>	2	0	0	12.77	0	0	12.66
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	0	4.24	0	0	9.03
	3	0	0	4.74	0	0	10.15
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	2	0	14.85	22.82	0	17.60	28.65

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0	9.32	27.74	0	14.80	28.98
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
Klebsiella spp	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0	24.29	0	0	29.12
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
Vankomisindirençli Enterococci (VRE)	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	0	0	28.31	0	0	28.9
	3	0	0	0	0	0	27.13
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella spp</i>	2	0	0	27.13	0	0	27.65
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	2	0	0	10.49	0	0	14.04
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	2	0	0	0	0	0	8.54
	3	0	0	0	0	0	8.08
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	0	0	21.59	0	0	27.43
	3	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.14. Metal iyonların etkisi

Metal İyonları Test bakterileri ve Kitosanlar	MgCl ₂			CaCl ₂			BaCl ₂			
	10mM	20mM	30mM	10mM	20mM	30mM	10mM	20mM	30 mM	
Metisilindirençli <i>S. aureus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B. cereus</i>	2	0	18.7	23.8	0	0	13.1	22.3	22.7	26.7
	3	0	9.76	10.0	0	0	0	9.09	10.3	11.1
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	2	0	14.9	17.6	0	0	0	14.9	14.32	17.5
	3	0	13.3	16.1	0	0	0	14.3	14.9	16.7
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	6.58	7.04	0	0	0	6.88	7.34	7.77
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	37.3	43.9	0	0	29.8	40.0	41.30	41.73
	3	0	42.5	43.1	0	0	38.6	46.1	47.61	48.39
	7	0	7.96	12.8	0	0	4.07	8.95	10.11	10.25
	8	0	10.8	11.5	0	0	0	10.8	11.37	12.5
<i>Klebsiella spp</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	2	0	28.2	32.2	0	0	20	36.3	37.8	38.09
	3	0	4.11	6.2	0	0	0	4.25	4.39	6.55
	7	0	2.12	2.24	0	0	0	2.54	2.83	3.09
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vankomisindirençli <i>Enterococci</i> (VRE)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	0	22.3	33.3	0	0	20.4	33.3	34.08	36.2
	3	0	27.4	31.3	0	0	23.8	31.8	32.1	34.73
	7	0	11.1	13.4	0	0	10	12.1	12.29	14.06
	8	0	16.9	19.7	0	0	13.4	19.2	19.7	20.7
<i>Shigella spp</i>	2	0	28.6	39.1	0	0	24.7	42.2	42.4	43.51
	3	0	7.84	9.03	0	0	0	7.36	8.43	8.77
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	2	0	20.6	27.1	0	0	17.2	24.8	24.2	26.81
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	2	0	14.2	20.8	0	0	11.9	19.5	19.4	19.6
	3	0	9.20	11.6	0	0	0	9.09	10.5	13.04
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	0	20.7	21.7	0	0	24.6	30.6	31.4	32.8
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.9. FT-IR Sonuçları

FT-IR sonuçları Khan ve ark.,(2002) tarafından belirtilen formüller esas alınarak değerlendirilmiştir.

$$\%DD = 100 - [(A1655/A3450) \times 100/1.33]$$

ve

$$\%DD = 100 - [(A1655/A3450) \times 115]$$

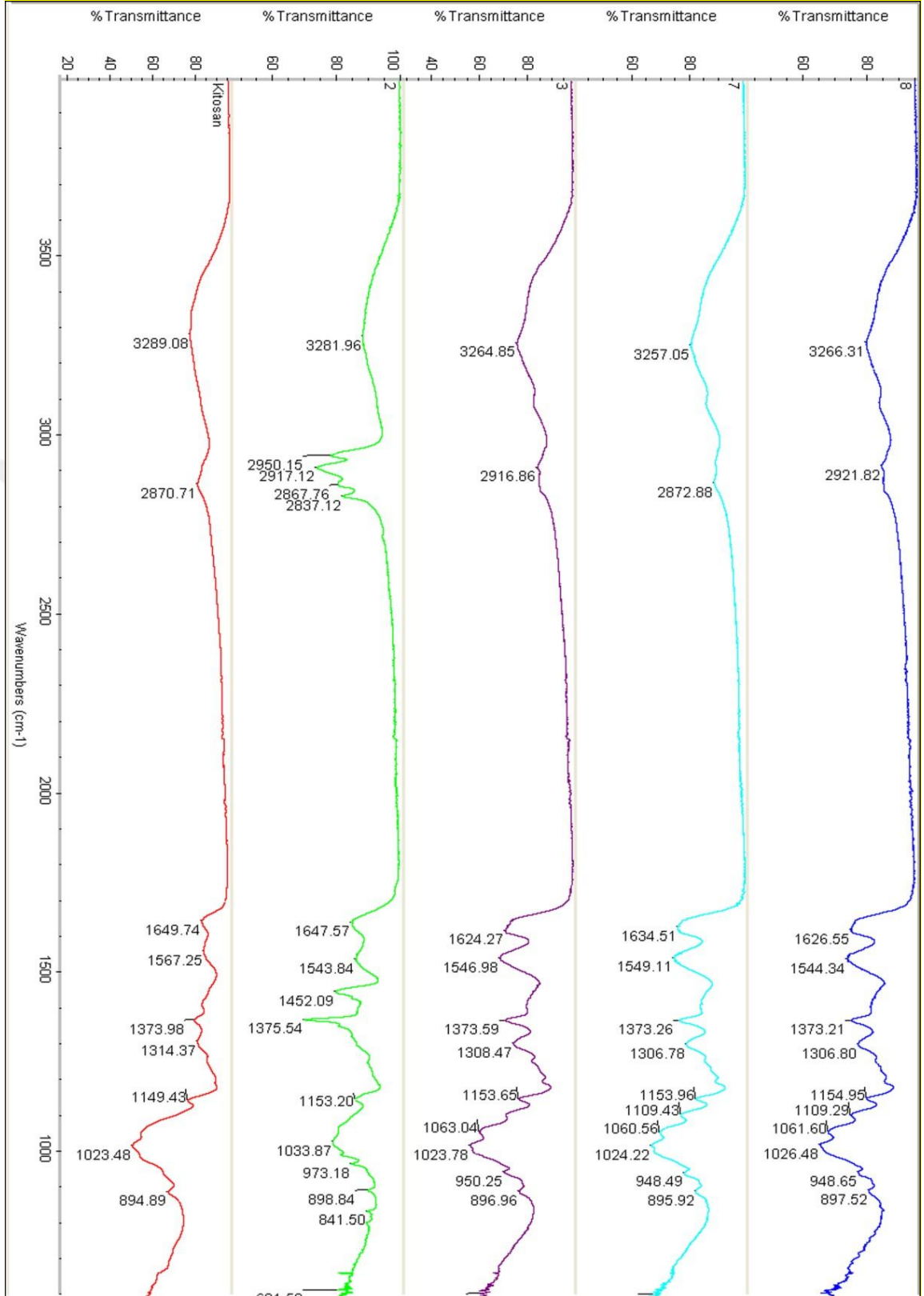
Kitosan örneklerinin deasetilasyon derecelerinin belirlenmesi için N-asetil grup içeriğinin bir ölçüsü olarak 1655 cm^{-1} absorbanstaki amid-I bandı ve toz halindeki kitosan örneklerindeki farklılıkları doğrulamak için bir iç standart olarak 3450 cm^{-1} absorbanstaki hidroksil bandı referans olarak değerlendirilmiştir. Kitosan örneklerine ait FT-IR spektrumları Şekil 3.28'de gösterilmiştir.

FT-IR sonuçlarının değerlendirilmesinde elimizdeki saf (ticari) kitosanın ölçümleri temel alınmıştır. Buna göre 3289.08 cm^{-1} 'deki geniş bant NH_2 , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmesinden, 2870.71 cm^{-1} 'deki pikin piranoz halkasındaki $-\text{CH}_2$ geriliminden, 1649.74 cm^{-1} ve 1567.25 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla $-\text{C}=\text{O}$ (amid I) ve NH (amid II) geriliminden kaynaklanmaktadır. 1149.43 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı C-O-C geriliminden, 1023.48 cm^{-1} 'deki ise yapıda bulunan C-O geriliminden meydana gelmektedir.

Standart kitosan ve kısmi olarak saflaştırılmış örneklerimizin FT-IR sonuçlarında 1655 cm^{-1} ve 3450 cm^{-1} absorbanstaki piklerde kaymalar gözlenmiştir. Örneklerimizdeki söz konusu piklere kıyasla gözlenen kaymalar preparat içerisindeki safsızlıklar ile açıklanabilmektedir. 2 nolu kitosan preparatı için 1647.57 cm^{-1} ve 3281.96 cm^{-1} ; 3 nolu preparat için 1624.27 cm^{-1} ve 3264.85 cm^{-1} ; 7 nolu preparat için 1634.51 cm^{-1} ve 3257.05 cm^{-1} ; 8 nolu preparat için ise 1626.55 cm^{-1} ve 3266.31 cm^{-1} absorbanstaki pik

alanları dikkate alınarak deasetilasyon dereceleri belirlenmiştir. Bu alanlara göre söz konusu preparatlardaki hesaplanan deasetilasyon dereceleri ilk formül esas alınarak sırasıyla %80.54; 86.07; 88.86 ve 87.24 olarak hesaplanmıştır. İkinci formül esas alındığında ise deasetilasyon dereceleri sırasıyla %70.23; 78.96; 82.96 ve 80.48 olarak saptanmıştır.





Şekil 3.28. 4000-575 cm^{-1} spektral bölgede kitosan örneklerine ait FT-IR spektrumu (Kitosan olarak ifade edilen örnek kontroldür)

3.10. Viskozimetre ve Moleküler Ağırlık Ölçümleri

Besi ortamından kısmi saflaştırılmış kitosan preparatlarının ortalama moleküler ağırlıkları (M_v) iç viskozimetre değerleri $[\eta]$ kullanılarak Mark-Houwink eşitliğine göre hesaplanmıştır. Zamani ve Taherzadeh (2010) göre belirtilen söz konusu eşitlikte,

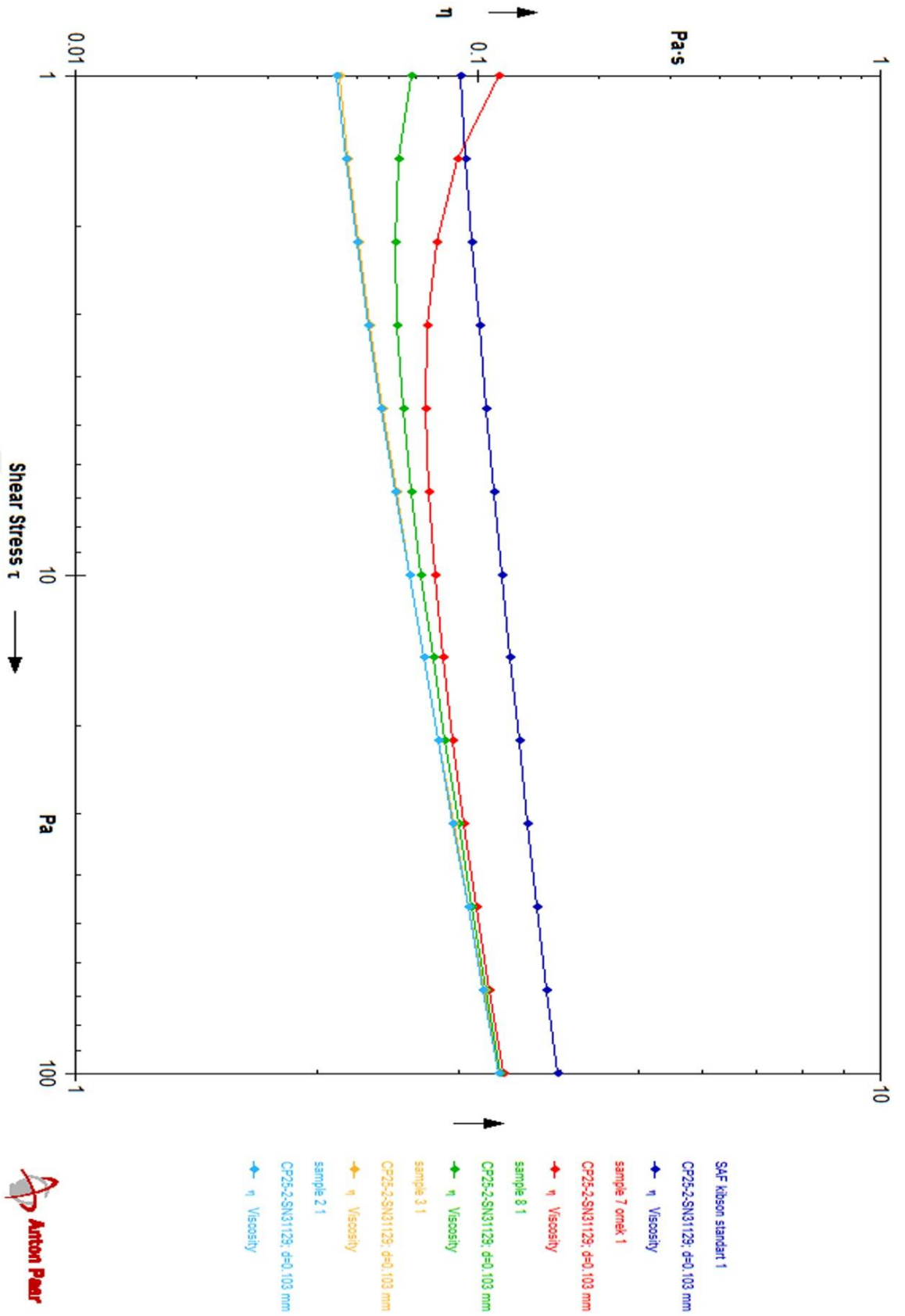
$$[\eta] = KM_v^\alpha$$
$$\log M_v = (\log[\eta] - \log K) / \alpha$$

K değeri $0.119 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; α değeri ise 0.59 olarak kabul edilmiştir.

Şekil 3.29'da kitosan preparatlarının kayma gerilimine karşı (shear stress: Pa) viskoziteleri (Pa s) verilmiştir. Bu grafiğe göre örneklerin 0.681 ve 100 arasında 14 farklı kayma geriliminde belirlenen viskozitelerinin ortalamaları formülize edilerek hesaplanmıştır. Çizelge 3.15'te kitosan preparatlarının ortalama moleküler ağırlıkları verilmiştir.

Çizelge 3.15. Ortalama moleküler ağırlık

Preparat	$\log[\eta]$ (viskozite)	$\log K$	α	Moleküler ağırlık (g/mol)
2	1.6837	-0.9244	0.59	48.272
3	1.6854	-0.9244	0.59	48.461
7	1.7277	-0.9244	0.59	53.419
8	1.7006	-0.9244	0.59	50.188



Şekil 3.29. Kitosan örneklerine ait viskozimetre sonuçları

4. TARTIŞMA

4.1. Tanımlanmış *Bacillus* sp. Suşlarının Besi Yeri Optimizasyonu

CDA üreticisi olduğu belirlenen *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* suşlarından en yüksek aktivitede kitosan preparatlarının eldesi için üretim ortamı optimize edilmiştir.

4.1.1. Fermantasyon ortamının karbon kaynağı optimizasyonu

Bacillus cereus için Şekil 3.7’de belirtilen sonuçlar doğrultusunda grafize edilen karbon kaynağı optimizasyon çalışmalarında, kullanılan her üç karbon kaynağının varlığında ilk 4. saatin sonuna kadar hücresel gelişimin zamana bağlı olarak logaritmik bir artış gösterdiği gözlenmiştir. İlk 2. saatin sonunda karbon kaynakları eklenen besiyerinde kaydedilen gelişimin (OD_{600} 1.254; 1.216; 1.384), optimize edilmemiş fermantasyon ortamında belirlenen gelişime göre (OD_{600} 0.672) yaklaşık iki kat kadar arttığı saptanmıştır. Ancak laktoz içeren besi ortamında bakteriyel gelişimin, 8. saatin sonuna kadar bir stabilite ve 48. saatin sonuna kadar da azalma gösterdiği belirlenmiştir. Glukoz içeren ortamda ise 6. saatin sonuna kadar süren hızlı hücresel gelişimin, bu süreyi takiben inkübasyonun sonuna kadar azaldığı gözlenmiştir. %2 sükröz içeren ortamda bakterinin ilk 2. saatin sonunda gelişimini yaklaşık 3.5 katına çıkararak logaritmik faza girdiği ve bu fazın 10. saatin sonuna kadar doğrusal bir artışla sürdüğü belirlenmiştir. Bu süreyi takiben gelişimin azaldığı ancak grafiksel olarak en iyi gelişimin bu ortamda kaydedildiği ortaya konmuştur.

Bacillus thuringiensis için Şekil 3.12’de gözlenen karbon kaynağına yönelik besi ortamının optimizasyon sonuçları incelendiğinde, her üç karbon kaynağı içeren besi ortamında inkübasyonun ilk 2. saatini takiben bakteriyel gelişimin arttığı gözlenmektedir. Bu sürede optimize edilmemiş besi ortamında elde edilen sonuçlara (Şekil 3.6) göre %2 glukoz ve laktoz eklenerek optimize edilmiş ortamlarda bakteriyel gelişimin 2 katına; %2 sükröz içeren ortamda ise yaklaşık 2.5 katına kadar arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, suşun optimizasyon çalışmalarında ortama eklenen tüm şekerleri besin kaynağı olarak kullanabildiğini göstermektedir. %2 glukoz içeren ortamda 6. saatin sonuna kadar artan gelişimi, 12. saatin sonuna kadar azalma takip etmiş ve en yüksek optik yoğunluğa (OD_{600} 1.802) ancak 24. saatin sonunda ulaşmıştır. %2 laktoz içeren besi ortamında ise, 8. saatin sonuna kadar süren

gelişimdeki artışla birlikte bu süredeki en yüksek optik yoğunluk OD₆₀₀ 1.785 olarak kaydedilmiştir. %2 süzkroz içeren ortamda elde edilen karbon kaynağı optimizasyon verileri 4. saatin sonunda optimize edilmemiş ortamdaki optik yoğunluğa göre yaklaşık 2 katlık bir artışa işaret etmektedir. Bu suş için logaritmik fazın sürdüğü 8. saatin sonunda en yüksek hücresel gelişim OD₆₀₀ 1.849 olarak saptanmıştır.

Bacillus megaterium için Şekil 3.17'de verilen bakteriyel gelişimin, her üç karbon kaynağının varlığında ilk 2. saatin sonuna kadar 3 kat kadar artış gösterdiği belirlenmiştir. Optimizasyon sonuçlarına göre, kullanılan karbon kaynaklarının bu suşun gelişimini stimüle ettiği ortaya konmuştur. *Bacillus megaterium* için fermantasyon ortamında takip edilen 24 saatlik gelişim sürecine bakıldığında, süre sonundaki en yüksek gelişim OD₆₀₀ 1.316'dır. Optimizasyon sonunda ise bu değere 2. saatin sonunda ulaşılmıştır. İnkübasyon süresini takiben her üç karbon kaynağı için gelişimin 6. saatin sonuna kadar arttığı ve bu süreçteki en yüksek gelişim %2 süzkroz içeren ortamda OD₆₀₀ 1.861 olarak kaydedilmiştir. Ancak süzkroz içeren besi ortamında gelişimin 8. saatten itibaren 10. saatin sonuna kadar azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu süreçteki azalmaya karşın kaydedilen en yüksek gelişim yine süzkroz içeren ortamda belirlenmiştir (8 ve 10. saat sırasıyla OD₆₀₀ 1.78 ve 1.572). Bu süreçte %2 glukoz ve laktoz içerikli fermantasyon ortamında ise gelişim 8. saatin sonuna kadar artmış ancak takiben 12. saatin sonuna kadar azalma saptanmıştır. %2 süzkroz içeren ortamda ise 10. saatteki azalmayı 12. saatteki artış (OD₆₀₀ 2.244) ve 24. saatteki azalış (OD₆₀₀ 1.999) takip etmiştir. Bu suş için yapılan karbon kaynağı optimizasyon çalışmalarında en yüksek gelişim 12. saatin sonunda %2 süzkroz içeren ortamda OD₆₀₀ 2.244 olarak gözlenmiştir.

Bacillus subtilis'te karbon kaynakları eklenen fermantasyon ortamında benzer bir üreme davranışı göstermiştir (Şekil 3.22). Her üç karbon kaynağı içeren besi ortamında da bakteriyel gelişimin indüklendiği tespit edilmiştir. Optimize edilmemiş besi ortamında ilk 2. saatin sonunda OD₆₀₀ 0.742 olarak kaydedilen gelişimin %2 glukoz, laktoz ve süzkroz içeren ortamlarda sırasıyla OD₆₀₀ 1.275; 1.231; 1.342'ye kadar yükseldiği saptanmıştır. Bu gelişim değerlerinin 8. saatin sonuna kadar logaritmik bir artış gösterdiği belirlenmiş olup ancak %2 glukoz içeren ortamda 4. saatin sonunda durağan faza geçiş gözlenmiştir. Bu besi ortamında 12. saatin sonuna kadar gelişimde azalma kaydedilmesine karşın 24 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek gelişime

(OD₆₀₀ 1.823) ulaşılmıştır. %2 laktoz ve sükroz içeren fermantasyon ortamlarında ise en yüksek gelişim 8. saatin sonunda belirlenmiştir (sırasıyla OD₆₀₀ 1.755 ve 2.117).

Söz konusu *Bacillus* suşları için %2 sükrozun eklendiği fermantasyon ortamına azot kaynakları eklenerek optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

4.1.2. Fermantasyon ortamının azot kaynağı optimizasyonu

Bacillus cereus için organik ve inorganik azot kaynaklarının bakteriyel gelişimi arttırdığı belirlenmiştir. Ancak inorganik azot kaynakları ile sürdürülen optimizasyon çalışmalarında, karbon kaynaklarında ilk 2. saatin sonunda kaydedilen hücresel gelişime ulaşamadığı ortaya konmuştur (Şekil 3.8). 4. saatin sonunda ise NaNO₃ ve (NH₄)₂SO₄ içeren ortamlarda hücresel gelişimin yaklaşık 4 katına çıktığı saptanmıştır. Organik azot kaynaklarının bakteriyel gelişim sürecine etkisi incelendiğinde ise, inkübasyonun 2. saatinin sonunda kazein peptonu, et peptonu ve et özütündeki gelişimin, %2 sükroz içeren ortamdaki gelişiminden daha az olduğu belirlenmiştir. Maya özütü içerikli besi ortamında ise gelişimin ilk 2. saatin sonunda yaklaşık 4.7 katına kadar çıktığı ve 10. saatin sonuna kadar süren logaritmik faz sürecindeki gelişimin (OD₆₀₀ 2.2), sükrozda aynı sürede belirlenen gelişime (OD₆₀₀ 1.863) göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus thuringiensis için inorganik azot kaynakları incelendiğinde, %2 sükroz ile optimizasyonu takiben 2. saatin sonunda elde edilen gelişime (OD₆₀₀ 1.415) kıyasla, optik yoğunluğun NaNO₃ ve (NH₄)₂SO₄ içeren ortamlarda sırasıyla OD₆₀₀ 0.945 ve 1.231'e kadar azaldığı belirlenmiştir. Besi ortamında bulunan (NH₄)₂SO₄'ın konsantrasyonun artmasına bağlı olarak gelişimin baskılandığı saptanmıştır. Organik azot kaynakları içeren besi ortamlarında ise, 48 saatlik inkübasyon boyunca suş %1 et peptonu ve et özütü içeren ortamlarda hemen hemen benzer bir üreme davranışı göstermiştir. Her iki ortamda da 6. saatin sonuna kadar doğrusal bir artışla seyreden logaritmik faz söz konusudur. Bu sürede et özütü için en yüksek gelişim kaydedilirken (OD₆₀₀ 2.047); et peptonu içeren ortamda ise bu süreden itibaren 48. saatin sonuna kadar bakteriyel gelişimde stabilite ve durağan faza geçiş gözlenmiştir. Kazein peptonu içeren ortamda gelişimin diğer organik azot kaynaklarına göre daha az olması, bakterinin bu besin kaynağını gelişim sürecinde kullanmadığını göstermektedir. Çünkü et özütü içeren ortamda 6. saatin sonunda ulaşılan en yüksek gelişime (OD₆₀₀ 2.047),

kazein peptonu içeren ortamda 48. saatin sonunda ulaşılabilmıştır. %2 sükröz içeren ortamda 8. saatin sonunda elde edilen gelişim değerine %1 maya özütü eklenmesiyle 6. saatin sonunda ulaşılmıştır (OD₆₀₀ 2.147). Diğer azot kaynaklarına göre, 4. saatin sonunda %2 sükröz içeren ortama kıyasla gelişimin ortalama 1.5 kat arttığı saptanmıştır.

Organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına kıyasla *Bacillus megaterium*'un gelişimini daha hızlı stimüle ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.18). 0.4 g (NH₄)₂SO₄ içeren fermantasyon ortamında bu inorganik azot kaynağının konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak ilk 2. saatte gelişimin yaklaşık 1.5 kat arttığı saptanmıştır. Aynı şekilde NaNO₃ içeren ortamda da gelişimin arttığı ancak %2 sükröz içeren ortamda 2. saatin sonunda kaydedilen gelişime (OD₆₀₀ 1.371) kıyasla bakteriyel gelişimin azaldığı (OD₆₀₀ 1.136) gözlenmiştir. Dolayısıyla bu bakterinin gelişim sürecini hızlandırmada inorganik azot kaynakları uygun besin kaynakları değildir. Organik azot kaynağı içeren ortamlarda ilk 2. saatin sonundaki hücresel gelişimler %2 sükröz içeren ortamdaki (OD₆₀₀ 1.371) daha yüksektir (sırasıyla maya özütü, et peptonu, et özütü ve kazein peptonu için OD₆₀₀ 1.539; 1.441; 1.444 ve 1.442). İnkübasyon süresinin ilerlemesiyle birlikte ilk 4. saatin sonunda et peptonu içeren ortamda gelişimin azaldığı (OD₆₀₀ 1.078) ancak diğer organik azot kaynakları içeren ortamlarda ise gelişimlerin hızla arttığı (sırasıyla OD₆₀₀ 1.99; 1.776; 1.688) saptanmıştır. Fakat bu sürede sükröz içerikli ortamdaki kaydedilen artış (OD₆₀₀ 1.85) ile kıyaslandığında %1 maya özütü içeren ortamda gelişimin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. %2 sükröz içeren besin ortamında 12. saatin sonunda kaydedilen en yüksek gelişime (OD₆₀₀ 2.244), besin ortamına maya özütü eklendiğinde 6. saatin sonunda (OD₆₀₀ 2.342) ulaşılmıştır. İnkübasyon süresine bağlı olarak besin ortamındaki besinlerin azalması ve biyokimyasal aktiviteler sonucu biriken ürünlerin toksik etkileri sebebiyle, inkübasyon süresini takiben hücresel gelişimde azalma gözlenmiştir.

Diğer suşlara benzer bir şekilde *Bacillus subtilis* için de organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına göre bakteriyel gelişimi daha çok stimüle ettiği Şekil 3.23'te gözlenmektedir. %1 inorganik azot kaynağı olarak (NH₄)₂SO₄ ve NaNO₃ eklendiğinde, başlangıç optik yoğunluğa (OD₆₀₀ 0.4) göre kaydedilen hücresel gelişimde sırasıyla OD₆₀₀ 0.983 ve 1.043 artış gözlenmiştir. Ancak bu artış %2 sükröz içeren ortamda 2. saatin sonunda belirlenen optik yoğunluktan (OD₆₀₀ 1.342) düşüktür.

Ve 24. saatin sonunda inorganik azot kaynakları içeren ortamlarda kaydedilen en yüksek gelişimin (OD_{600} 1.902; 1.929), %2 süzkroz içeren ortamda 8. saatin sonundaki en yüksek optik yoğunluktan (OD_{600} 2.117) az olması sebebiyle, bu suşun gelişimi için en uygun azot kaynaklarının organik azot kaynakları arasından seçilmesi uygun görülmüştür. %1 organik azot kaynakları içeren ortamlarda ise, 4. saatin sonuna kadar en yüksek hücresel gelişimler saptanmıştır. %1 kazein peptonu içeren ortamda bu süreçte kaydedilen optik yoğunluk OD_{600} 1.512 olup, %2 süzkroz içeren ortamın gerisinde kalan bir hücresel gelişim söz konusudur. 6. saatin sonuna kadar süren gelişim bu süreçten sonra durağan faza geçmiş ve en yüksek hücresel gelişim 48. saatin sonunda OD_{600} 2.045 olarak belirlenmiştir. %1 et peptonu ve et özütü içeren besi ortamlarında suş hemen hemen aynı üreme davranışı göstermiştir. Et peptonu içeren besi ortamında en yüksek gelişime (OD_{600} 2.028) ulaşıldığı 6. saatten sonra üremenin durağan faza geçişi söz konusudur. Et özütü içeren ortamda ise bakteriyel gelişimin 10. saatin sonuna kadar doğrusal bir şekilde arttığı ve en yüksek gelişime (OD_{600} 2.042) ancak 24. saatin sonunda varıldığı tespit edilmiştir. %2 süzkroz içeren fermantasyon ortamında 8. saatin sonunda OD_{600} 2.117 olarak belirlenen en yüksek gelişime, maya özütünün eklendiği ortamda 4. saatin sonunda (OD_{600} 2.218) ulaşılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında farklı parametrelerce incelenen gelişimin bir önceki gelişim sürecini arttırması gerekmektedir. Bu sebeple, bu suş için %2 süzkroz içeren ortamda gözlenen gelişim süreci %1 maya özütü eklenmesiyle arttırılmıştır.

Bu suşların kitosan üretim ortamlarına %2 karbon kaynağı olarak süzkroz eklenmesinin yanı sıra gelişimsel süreçlerinde artışa neden olan azot kaynağı olarak da %1 maya özütü ilave edilerek optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

4.1.3. Fermantasyon ortamının metal iyonları optimizasyonu

%2 süzkroz ve %1 maya özütü eklenen besi ortamında metal iyonlarının bakteriyel gelişime etkisine yönelik veriler doğrultusunda, metal iyonlarının *Bacillus cereus* suşunun gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 3.9). En yüksek bakteriyel gelişim %0.04 $MgSO_4$ içeren besi ortamında 10. saatin sonunda OD_{600} 1.524 olarak kaydedilmiştir. Karbon ve azot kaynağı eklenerek optimize edilmiş besi ortamında aynı suş için bakteriyel gelişim OD_{600} 2.2 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra optimize edilmemiş besiyerinde bu suş için takip edilen gelişimde, 6. saatin sonuna kadar

kaydedilen hücresel gelişimin (OD_{600} 1.1) oldukça gerisinde kaldığı ortaya konmuştur. Bu sebeplerden dolayı bu suş için optimize çalışmalarında metal iyonlarının inhibisyonu söz konusudur.

Şekil 3.14'teki verilere dayanarak *Bacillus thuringiensis* için metal iyonlarının bakteriyel gelişimi baskılayıcı yönde etki ettiği söylenebilmektedir. Bir önceki optimizasyon ortamında 6. saatin sonunda elde edilen en yüksek optik yoğunluğa (OD_{600} 2.147), metal iyonu içeren ortamların hiçbirinde rastlanmamıştır.

Başlangıç optik yoğunluk (OD_{600} 0.4) referans olarak alındığında *Bacillus megaterium* için metal iyonlarının bakteriyel gelişimi arttırdığı söylenebilmektedir. Ancak incelenen metal iyonlarının, %2 sükröz ve %1 maya özütü ilave edilen fermantasyon ortamında kaydedilen bakteriyel gelişimi stimüle edici etkisi olmadığı saptanmıştır.

Şekil 3.24'te belirtilen metal iyonlarının *Bacillus subtilis*'in gelişimine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda diğer üç suşta karşılaşıldığı gibi besi ortamına eklenen metal iyonlarının, başlangıç optik yoğunluğa kıyasla hücresel gelişimi arttırdığı ancak %2 sükröz ve %1 maya özütü içeren ortamda kaydedilen değerleri azalttığı saptanmıştır. Besi ortamına %0.04 konsantrasyonda metal iyonlarının eklenmesinin suşların gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Metal iyonlarının çalkalamalı koşullarda diğer besin kaynaklarıyla kimyasal reaksiyona girmesi sonucu şelat oluşturma özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, böyle bir sonuçla karşılaşılması şaşırtıcı değildir. Bu bilgiler ışığında, suşlar için optimizasyon çalışmalarında metal iyonları dikkate alınmamıştır.

4.1.4. Fermantasyon ortamının pH optimizasyonu

Bakteriyel kültürlerin gelişim sürecindeki en önemli parametrelerinden biri pH değeridir. pH hücre gelişimini destekleyen başlangıç bileşiklerin hücre membranına transportundan, enzimatik prosesler ile gerçekleştirilen biyokimyasal aktivitelere kadar geniş bir çerçevede bakteriyel gelişimi etkilemektedir. Kitinden kitosanın biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz enziminin en yüksek verimde sentezlenmesi ancak bakterinin en yüksek hücresel gelişimi ile mümkün olacaktır.

Metal iyonlarının bakteriyel gelişimi inhibe etmesi üzerine optimizasyon çalışmalarına %2 sükröz ve %1 maya özütü eklenen fermantasyon ortamı kullanılarak aynı koşullar altında pH'nın gelişime etkisi incelenmiştir. *Bacillus cereus* için pH 5'te bakteriyel

gelişimin ilk 6. saatin sonuna kadar stabilitesini koruduğu ve 8. saati takiben yaklaşık 4 katına çıkan gelişimin 48. saatin sonuna kadar arttığı belirlenmiştir. pH 4.5'teki gelişimin inkübasyon süresini takiben arttığı ve ilk 6. saatin sonuna kadarki artışın başlangıç optik yoğunluğunun ancak 2 katına kadar çıkabildiği gözlenmiştir. pH'sı 6 ve 6.5 olan fermantasyon ortamlarında hücrel gelişimin ilk 4. saatin sonunda ortalama 2 katına kadar çıkabildiği saptanmıştır. pH'sı 7 ve 7.5'e ayarlanmış besi ortamında ise gelişimin ilk 2. saatin sonuna kadar yaklaşık 3 katına kadar arttığı ancak aynı sürede pH'sı 8 olan ortamda belirlenen optik yoğunluğa 12. saatin sonuna kadar ulaşamadığı ortaya konmuştur.

Bacillus thuringiensis'e ait pH optimizasyon sonuçlarının ifade edildiği Şekil 3.15'te gözlendiği gibi, en yüksek gelişim başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış fermantasyon ortamında belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı 5 ve 4.5'e ayarlanmış besi ortamlarında inkübasyonun ilk 2. saatinin sonunda kaydedilen gelişimin (sırasıyla OD₆₀₀ 0.521; 0.575) optimize edilmemiş ortamdaki gelişimden (OD₆₀₀ 0.621) bile az olduğu saptanmıştır. Optimizasyon çalışmalarının amacı organizmanın gelişim sürecini değişken parametreler ile arttırmaktır. Bu sebeple söz konusu pH düzeylerinde her ne kadar başlangıç optik yoğunluğunun inkübasyonu takiben zamana bağlı arttığı gözlenirse de, %2 süzkroz ve %1 maya özütü eklenerek üreme davranışı arttırılmış bu suş için bu pH değerlerinin uygun olmadığı ortaya konmaktadır. Başlangıç pH'sı 6 ve 6.5'e ayarlanmış besi ortamlarında ise, ortamın iyon dengesinin baziğe doğru ilerlemesi sebebiyle hücrel gelişimin arttığı ancak kaydedilen en yüksek optik yoğunluğun (sırasıyla OD₆₀₀ 1.431; 1.534) karbon ve azot kaynağı ile optimizasyon sonucu elde edilen gelişimden (OD₆₀₀ 2.147) düşük olduğu belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı 7 ve 7.5'e ayarlanmış besi ortamlarında bakteriyel gelişimin kaydedeğer bir şekilde ilerlediği ancak en yüksek hücrel gelişimin inkübasyonun 6. saatinin sonunda (OD₆₀₀ 2.147) pH'sı 8'e ayarlanmış kültürlerde gözlenmesi üzerine; en uygun pH değeri 8 olarak tespit edilmiştir.

%2 süzkroz ve %1 maya özütü ilave edilerek optimize edilmiş fermantasyon ortamının pH'sı Şekil 3.20'de belirtilen değerlerde incelenerek en yüksek gelişime ulaşılmaya çalışılmıştır. *Bacillus megaterium* için farklı pH'lardaki gelişimler incelendiğinde, pH'sı 7, 7.5 ve 8'e ayarlanmış besi ortamlarında bakteriyel gelişimin asidik pH'dakilere göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu pH'lardaki gelişimin başlangıç optik

yoğunluğa kıyasla 2. saatin sonunda yaklaşık 3 katına kadar yükseldiği belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı 8 olan besi ortamında inkübasyonun ilk 2. saatini takiben başlayan logaritmik faz sürecinin 6. saatin sonuna kadar sürdürdüğü ve bu sürede en yüksek hücresel gelişime (OD_{600} 2.342) ulaşıldığı saptanmıştır. Bu süreyi takiben gelişimin yavaşladığı ve durağan faza doğru geçişin söz konusu olduğu gözlenmiştir. pH'sı 7.5 olan besi ortamında ise, bu suşun gelişiminin hızlandığı ancak pH'sı 8 olan fermantasyon ortamındaki kaydedilen hücresel gelişimden daha az olduğu tespit edilmiştir. pH'sı 7'ye ayarlanmış besiyerinde suşun logaritmik bir artışla 4. saatin sonuna kadar hızlanan gelişiminin bu süreden sonra azalmaya başladığı ve en yüksek hücresel gelişimin (OD_{600} 1.622) ancak 48. saatin sonunda kaydedilebildiği belirlenmiştir.

B. subtilis için başlangıç pH'ları 5, 4.5, 6 ve 6.5'e ayarlanmış besi ortamlarındaki gelişimin, %2 sükröz ve %1 maya özütü ile optimize edilmiş ortamlardaki üreme davranışına kıyasla yavaşladığı gözlenmiştir. Başlangıç pH'sı 7 ve 7.5'teki kültürlerde belirlenen bakteriyel gelişim sonuçları, bu suş için biyokimyasal süreçleri açısından en uygun pH düzeylerinin nötrala yakın pH'lar olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak en yüksek bakteriyel gelişim Şekil 3.25'te gözlenen verilere dayanarak, başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış besi ortamında 4. saatin sonunda OD_{600} 2.218 olarak belirlenmiştir.

Grafik veri değerlerinden de anlaşılacağı gibi bu suşlar için en yüksek bakteriyel gelişim başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış fermantasyon ortamlarında kaydedilmiştir.

4.1.5. Fermantasyon ortamının sıcaklık optimizasyonu

B. cereus'a ait gelişime sıcaklığın etkisi incelenmiş ve 25°C'de sürdürülen optimizasyon çalışmalarına göre sıcaklığın 35 ve 37°C'ye artırılmasıyla hücresel gelişimin hızlandığı belirlenmiştir (Şekil 3.11). Her iki sıcaklık değerinde inkübasyon süresini takiben 8. saatin sonuna kadar gelişimin arttığı bu süreden sonra optik yoğunluğun doğrusal bir şekilde azaldığı saptanmıştır. 40, 43 ve 45°C sıcaklıklarda gelişimin hızlandığı ancak saptanan değerlerin 37°C'de belirlenenlere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. 37°C'de kaydedilen bakteriyel gelişimin 4. saatin sonunda 5 katına çıktığı saptanmış olup bu sıcaklıkta ölçülen en yüksek gelişim 6. saatin sonunda OD_{600} 2.856 olarak ortaya konmuştur. Aynı bakteri için optimize edilmemiş besi ortamına kıyasla bakteriyel gelişimin yaklaşık 2.5 kat arttığı belirlenmiştir.

Bacillus thuringiensis'e ait ve Şekil 3.16'da grafize edilmiş veriler doğrultusunda %2 sükröz ve %1 maya özütü eklenerek optimize edilmiş ve başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış besi ortamında 25°C'de çalkalamalı koşullarda sürdürülen 48 saatlik inkübasyon sürecinde ilk 6. saatin sonunda kaydedilen en yüksek optik yoğunluk OD₆₀₀ 2.147 olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 35 ve 37°C'ye yükseltilmesi ile bakteri mezofilik karakterine uygun bir üreme davranışı göstererek gelişim sürecini hızlandırmıştır. 35°C'de sürdürülen inkübasyonda en yüksek hücresel gelişim 4. saatin sonunda OD₆₀₀ 2.563 olarak belirlenmiştir. 37°C'de belirlenen değerlerin pH optimizasyonu sonucu 2. ve 4. saatin sonunda elde edilen değerlere göre (OD₆₀₀ 1.655; 2.041) bakteriyel gelişimin yaklaşık 1.5 kat kadar arttığı saptanmıştır. İnkübasyon sıcaklığının 40 ve 43°C'ye artışıyla birlikte bakteriyel gelişimin azaldığı ve özellikle 45°C sıcaklığın gelişimi olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir.

Bacillus megaterium için inkübasyon sıcaklığı 35 ve 37°C'ye arttıkça bakteriyel gelişimin de hızlandığı belirlenmiştir (Şekil 3.21). 35°C'de sürdürülen bakteriyel gelişimin ilk 4. saatin sonuna kadar 5 kat arttığı (OD₆₀₀ 2.366) ve bu süreden sonra 48. saatin sonuna kadar hücresel gelişimde azalma (OD₆₀₀ 2.1026) saptanmıştır. 37°C'deki gelişim süreci incelendiğinde, 25°C'de 6. saatin sonunda tespit edilen en yüksek bakteriyel gelişime (OD₆₀₀ 2.342), 37°C'de 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda (OD₆₀₀ 2.647) ulaşılmıştır. Sıcaklığın 40, 43 ve 45°C'ye yükselmesi ile bakteriyel gelişimin yavaşladığı belirlenmiş olup bu sıcaklıklarda kaydedilen en yüksek gelişimler sırasıyla 10. saatin sonunda OD₆₀₀ 2.132; 24. saatin sonunda OD₆₀₀ 1.460; 48. saatin sonunda OD₆₀₀ 2.163 olarak tespit edilmiştir.

25°C'de gerçekleşen *Bacillus subtilis* optimizasyon çalışmalarında Şekil 3.26'da gözlemlendiği gibi 37°C sıcaklıkta üremenin arttığı belirlenmiştir. 35°C'de inkübasyonu takiben 2. saatin sonunda OD₆₀₀ 1.756 olarak kaydedilen bakteriyel gelişimin, 25°C'dekine göre (OD₆₀₀ 1.439) daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup 4. saatin sonunda her iki sıcaklık için en yüksek gelişim değerleri sırasıyla OD₆₀₀ 2.218 ve 2.518 olarak saptanmıştır. Bu iki sıcaklık parametresinin yanı sıra aynı sürede inkübasyon sıcaklığı 37°C olan ortamdaki en yüksek hücresel gelişim OD₆₀₀ 2.914 olarak gözlenmiştir. Başlangıç yoğunluğa kıyasla hücresel gelişimin 2. saatin sonunda yaklaşık 5 kat arttığı, 4. saatin sonunda yaklaşık 7.5 kat kadar arttığı belirlenmiştir. Ve bu sıcaklıktaki inkübasyon süresince biyokimyasal aktiviteler sonucu başlangıç pH

değerinin değişmesi ve besin kıtlığı gibi nedenlerden dolayı, bakteriyel gelişimde azalma görülmesine karşın ölçülen optik yoğunluk değeri diğer ortamlarda ölçülenlerden daha yüksektir. Sıcaklık 40°C, 43°C ve 45°C'ye yükseldikçe bakteriyel gelişimde azalma kaydedilmiştir. Sırasıyla 40°C için en yüksek gelişim 8. saatin sonunda OD₆₀₀ 2.084; 43°C için 10. saatin sonunda OD₆₀₀ 1.985; 45°C için ise 48. saatin sonunda OD₆₀₀.613 olarak saptanmıştır.

Kitosan üretimi için seçilen suşların optimizasyon analizlerinde benzer sonuçlar ile karşılaşılmıştır. Karbon ve azot kaynağı olarak %2 süzkroz ve %1 maya özütü eklenerek optimize edilen fermantasyon ortamlarında tüm suşların en kısa sürede en yüksek gelişime ulaştığı belirlenmiştir. Ancak metal iyonlarının analiz edilen besi ortamı için suşların gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. Başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmış besi ortamında 37°C'de 48 saatlik inkübasyon süresince en yüksek gelişim değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar suşların mezofilik karakterde üreme davranışı gösterdiklerini de ortaya koymaktadır. Optimizasyon sonuçları bize aynı tip bakteriye ait farklı suşların benzer üreme davranışları gösterebildiklerini de ifade etmektedir.

4.2. Preparatlardaki Biyopolimerlerin Varlığı

2, 3, 7 ve 8 nolu kitosan süspansiyonlarının kalitatif analizleri standart kitin ve kitosan örnekleri ile optimize edilmiş prosedüre göre sürdürülmüştür. Standart kitinin varlığında sarı-kahverengi; kitosanın varlığında ise koyu pembe renk oluşumunun referans alındığı bu analizde, 2 ve 3 nolu örnekte pembe; 7 ve 8 nolu örnekte ise sarı kahverengi renk oluşumu gözlenmiştir. 2, 3, 7 ve 8 nolu örneklerdeki karbohidrat varlığı Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. En yüksek karbohidrat varlığı 0.393 mg/mL ile 2 nolu örnekte gözlenmiştir. Söz konusu renk oluşumlarının ve preparatlardaki karbohidrat içeriklerinin örneklerdeki kitin, kitosan ve/veya biyodönüşüm sonucunda farklı bir ara ürünün varlığına işaret ettiğini ifade etmek oldukça güçtür. Bu sebeple antimikrobiyal aktivite analizlerine dört kitosan preparatı ile devam edilmiştir.

4.3. Kitosan Preparatlarının Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

Çizelge 3.4'te gözlemlendiği gibi standart kitosan süspansiyonlarının etkisi çözücü olarak kullanılan %0.1'lik glasiyel asetik asit çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Buna göre %0.1'lik glasiyel asetik asit çözeltisinin test bakterileri üzerinde herhangi bir inhibisyon

etkisinin gözlenmemesi, standart kitosanların olası inhibisyon etkisinin çözücü kaynaklı olmadığına da işaret etmektedir. Çizelge 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8'deki sonuçların karşılaştırılması için kloramfenikol süspansiyonu kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

2 mg/mL konsantrasyondaki kloramfenikol antibiyotiğinin Metisilin-dirençli *S. aureus*, Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE), *S. epidermidis*, *E. cloacae* ve *L. monocytogenes* hariç tüm test bakterileri üzerinde %40'tan fazla inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmektedir. *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp ve *E. faecalis* üzerindeki inhibisyon etkisi sırasıyla %53, 99, 45, 55, 75, 83, 89 ve 42 olarak belirlenmiştir. Bu antibiyotiğe yönelik en yüksek inhibisyon etki *Bacillus subtilis* suşuna karşı tespit edilmiştir.

Aynı konsantrasyonda sürdürülen analizlerde düşük moleküler ağırlıktaki standart kitosan süspansiyonunun da Metisilin-dirençli *S. aureus*, Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) ve *E. faecalis* hariç tüm test bakterileri üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bu standardın *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *S. epidermidis*, *E. cloacae* ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibisyon etkisi sırasıyla %35, 92, 100, 97, 80, 97, 84, 29, 82 ve 100 olarak belirlenmiştir. Standardın en yüksek inhibisyon etkisi PCA'larda üreme gözlenmemesi üzerine %100 ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *L. monocytogenes*'e karşı tespit edilirken, en düşük inhibisyon etki %29 ile *S. epidermidis* üzerinde belirlenmiştir. Diğer kontrol gruplarında gözlendiği gibi orta moleküler ağırlıktaki kitosan çözeltilisinin de Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus*, Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE), *S. epidermidis* ve *E. faecalis* üzerinde herhangi bir inhibisyon etki saptanmamıştır. Bu standardın *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. cloacae* ve *L. monocytogenes* üzerindeki inhibisyon etkisi sırasıyla %61, 96, 99, 99, 98, 99, 68, 57 ve 44 olarak hesaplanmıştır. En yüksek inhibisyon etki *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp ve *Salmonella* spp'ye karşı gözlenmiştir.

Bacillus cereus'e karşı gözlenen en yüksek inhibisyon etki (%61) orta moleküler ağırlıktaki standart kitosan çözeltilisinde belirlenmiştir. Ancak *Bacillus subtilis* için ise farklı bir durum gözlenerek söz konusu antibiyotiğin (%99) inhibisyon etkisi, düşük ve orta moleküler ağırlıktaki standart kitosan çözeltilerinden daha yüksektir. Bunun yanı sıra kullanılan tüm kontrol grupların canlı hücrelerin %90'ından fazlasını inhibe ettiği gözlenmiştir. Kontrol gruplarının en etkin olduğu suş ise *B. subtilis*'tir.

PCA’larda üreme gözlenmemesi üzerine en yüksek inhibisyon aktivite *Pseudomonas aeruginosa* ve *L. monocytogenes* suşları üzerinde düşük moleküler ağırlıktaki standart kitosan süspansiyonunda tespit edilmiştir. Dolayısıyla genel bir ifadeyle incelenen test bakterileri üzerinde kloramfenikol antibiyotigine göre düşük moleküler ağırlıktaki kitosan çözeltisinin daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği söylenebilmektedir.

Düşük moleküler ağırlıklı kitosan çözeltilerinin, orta moleküler ağırlıklı kitosan çözeltilerine göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermelerine yönelik literatür bilgileri; standart kitosanlar ile yapılan antimikrobiyal aktivite analiz sonuçlarımız ile benzerlik göstermemektedir. Bu durum biyopolimerin antimikrobiyal aktivitesi için tek parametrenin moleküler ağırlık olamayacağını ifade etmektedir.

Söz konusu test bakterileri üzerinde mikrobiyal biyodönüşümle elde edilen kitosan preparatlarının antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 3.4’te verilen % inhibisyon değerleri ile karşılaştırarak anlam kazanmıştır.

B. cereus’tan elde edilen 2 nolu kitosan süspansiyonun % inhibisyon etkisi Çizelge 3.5’te gösterilmiştir. Kontrol gruplarındaki analiz sonuçlarına benzer bir şekilde bu süspansiyonun Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisine rastlanmamıştır. Bu süspansiyonun en yüksek inhibisyon etkisi *P. aeruginosa* ve *Shigella* spp’ye karşı %41; en düşük antimikrobiyal etki ise %17 ile *B. subtilis*’e karşı hesaplanmıştır. Bu analiz sonucunda *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden *Klebsiella* spp ve *Salmonella* spp üzerinde kontrol gruplarının aksine inhibisyon gözlenmemiştir. Standart kitosan süspansiyonlarına benzer şekilde bu preparatın da Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisine rastlanmamıştır. *Escherichia coli* için ise %36’lık inhibisyon ile standart kitosan süspansiyonlarının aksine (%80 ve 98) antimikrobiyal aktivitede azalma saptanmıştır. *Bacillus* suşları için antimikrobiyal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, *B. cereus* için inhibisyon etki %23; *B. subtilis* için ise %17 olarak tespit edilmiştir. Her iki suş içinde belirlenen bu değerlerin kontrol gruplarından oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. *S. epidermis*’e karşı standartlarda gözlenen antimikrobiyal aktivite %29 iken, 2 nolu preparat uygulamalarında ise %34 olarak tespit edilmiş ve %5 artış gözlenmiştir. *Shigella* spp, *E. cloacae* ve *L. monocytogenes* bakterileri üzerinde standart kitosan süspansiyonlarının ortalama antimikrobiyal aktiviteleri %50’nin üzerinde iken bu preparatta azalma (%41, 25 ve 19) belirlenmiştir.

Standartların etki gösteremediği *E. faecalis* suşuna karşı ise %32'lik bir antimikrobiyal aktivite 2 nolu preparat için kaydedilmiştir.

B. thuringiensis'ten kısmi olarak saflaştırılmış 3 nolu kitosan süspansiyonun % inhibisyon etkisi Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Kontrol grupları ve 2 nolu kitosan süspansiyonun sonuçlarına paralel şekilde bu süspansiyon da Metisilin-dirençli *S. aureus* ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) üzerinde inhibitör etki gösterememiştir. 2 nolu süspansiyonda gözleendiği gibi 3 nolu süspansiyonun analiz sonuçlarında da *Klebsiella* spp ve *Salmonella* spp üzerinde kontrol gruplarının aksine herhangi bir inhibisyona rastlanmamıştır. Kontrol gruplarına benzer şekilde ise *E. faecalis* suşuna karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır. Bu süspansiyonun en yüksek inhibisyon etkisi %49 ile *Pseudomonas aeruginosa*; en düşük antimikrobiyal etki ise %6 ile *Escherichia coli* üzerinde hesaplanmıştır. *Bacillus* sp suşlarına karşı kontrol gruplarında gözlenen belirgin inhibisyon etkiye rağmen bu süspansiyonun *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı inhibitör etkisi sırasıyla %10 ve %16'dır. Standart kitosanların *S. epidermidis* üzerindeki inhibisyon etkisi %29 olarak belirlenmişken bu preparat ile kaydedilen antimikrobiyal etki %33'tür. 2 nolu süspansiyona benzer şekilde, bu preparatın *Shigella* spp, *E. cloacae* ve *L. monocytogenes* karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitede standartlara kıyasla azalma tespit edilmiştir.

Bacillus megaterium suşundan elde edilen 7 nolu kitosan preparatı için, 2 ve 3 nolu örneklerin *B. cereus* ve *B. subtilis* üzerinde gösterdiği inhibitör etkiye rastlanmamıştır. Bu preparatın test bakterilerinin ancak üçüne karşı inhibisyon etkisi saptanmıştır. *P. aeruginosa* üzerinde %9; *S. epidermidis* üzerinde %14; *E. coli* üzerinde ise %3'lük bir inhibisyon etki hesaplanmıştır. Kontrol gruplarının kullanıldığı analizde *P. aeruginosa* için canlı hücre sayısının %40'ından; *S. epidermidis* için ise %29'undan; *Escherichia coli* için ise %70'inden fazlasının inhibe olması sebebiyle bu örneğin inhibitör etkisinin kontrol gruplarının etkisine kıyasla oldukça düşük olduğu ortaya konmaktadır. 2 ve 3 nolu örnekler ile kıyaslandığında ise, sırasıyla *Pseudomonas aeruginosa* için %41 ve 49; *Escherichia coli* için ise %36 ve 6; *S. epidermis* için ise %34 ve 33 olarak belirlenen inhibitör etkilerden oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus subtilis'ten kısmi olarak saflaştırılan 8 nolu kitosan süspansiyonuna yönelik antimikrobiyal analiz sonuçları Çizelge 3.8'de verilmiştir. 7 nolu kitosan

süspansiyonuna benzer bir şekilde, bu süspansiyonun da Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* spp, Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE), *Shigella* spp, *E. cloacae*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* ve *Salmonella* spp üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. 7 nolu kitosana kıyasla bu preparatın *Escherichia coli* üzerinde herhangi bir aktiviteye sahip olmadığı ortaya konmuştur. Ancak canlı hücre sayısının %40'ından fazlasının inhibisyonu gözlenen kontrol gruplarındaki çalışmalara göre oldukça düşük kalan %11'lik bir inhibitör etki *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı saptanmıştır. Kaydedilen bu etkinin, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı 2 ve 3 nolu örneklerde belirlenen %41 ve 49 inhibisyon etkiden düşük ancak 7 nolu örnekte %9 olarak belirlenen bu etkiden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *S. epidermis* için 7 nolu preparatta gözlenen %14'lük inhibitör etki bu preparatta %19, *B. subtilis* üzerinde ise %7'lik bir inhibisyon etki saptanmıştır.

7 ve 8 nolu örnekler için kalitatif analizlerde renk değişimi belirlenmemiştir. Bu sebeple bu örneklerdeki söz konusu inhibisyonun kitosana ait olmadığı söylenebilmektedir. Kesin bir yargıya varılamamış olup antimikrobiyal aktivitenin kitin kaynaklı olabileceğide ifade edilebilmektedir.

Ancak süspansiyonlar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, belirgin inhibisyon etki 2 nolu süspansiyonda gözlenmiştir. Test bakterilerinin farklılıkları, belirlenen inhibisyon mekanizmasını ve bununla birlikte inhibisyon derecesini de etkilemektedir.

4.4. Kitosan Preparatlarının Deasetilasyon Derecesi

Literatür de belirtildiği gibi kitosan örneklerin deasetilasyon derecesi elde edilen kaynağa ve hazırlanma metotlarına göre değişiklik göstermekle birlikte ticari olarak kullanılan kitosanların deasetilasyon dereceleri %70-95 arasındadır. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi pek çok içsel ve dışsal etkene bağlı olup, deasetilasyon derecesi toksisiteyi etkileyen en önemli içsel faktördür. Ancak kitin ve kitosan arasında deasetilasyon derecesine dayalı kesin bir adlandırma sınırı tanımlanamamıştır.

Bu genel bilgiler ışığında her iki formülde de hesaplanan deasetilasyon dereceleri %70-95 arasındaki değerlerdedir. 2 nolu örnek için %80.54 ve 70.23; 3 nolu örnek için %86.07 ve 78.96; 7 nolu örnek için %88.86 ve 82.96; 8 nolu örnek için ise %87.24 ve 80.48 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler bu preparatlarda kitosanın varlığına yönelik kesin bir yargıya varılabileceğini göstermemektedir.

Kısmi olarak saflaştırılmış örneklerin 13 test bakterisi üzerinde denenen antimikrobiyal aktivite analizlerinde, 2 nolu preparatın 9 bakteriye karşı en düşük %17; en yüksek ise %41 inhibitör aktivite göstermesi diğer preparatlara kıyasla deasetilasyon derecesinin daha düşük olmasıyla açıklanabilmektedir. 3 nolu preparat için ise antimikrobiyal etki gösterdiği 7 bakteri üzerinde en düşük %8; en yüksek ise %49 olarak hesaplanmış inhibisyon, deasetilasyon derecesinin düşük olması ile açıklanabilmektedir. 7 ve 8 nolu preparatlar ise sadece 3 bakteri üzerinde inhibisyon etki göstermiş olup sırasıyla en düşük antimikrobiyal aktivite %3 ve 7; en yüksek antimikrobiyal aktivite ise %14 ve 19 olarak saptanmıştır. Aktivitelerdeki bu benzerlik deasetilasyon derecelerindeki yakınlık ile bağlantılı olabilmektedir. Ayrıca bu preparatların deasetilasyon derecelerinin yüksek olması 2 ve 3 nolu preparatlara kıyasla daha düşük antimikrobiyal aktiviteye işaret etmektedir.

4.5. Kitosan Preparatlarının Moleküler Ağırlığı

Kitosan biyopolimerlerinin antimikrobiyal aktivitesini etkileyen diğer önemli parametre ise moleküler ağırlıktır. Biyopolimerin moleküler ağırlığı da deasetilasyon derecesi gibi kaynağa, ürünün elde edilme yöntemlerine ve saflığa göre farklılık göstermektedir. Çizelge 3.15'te verilen sonuçlara göre test edilen preparatların ortalama moleküler ağırlıkları birbirine oldukça yakın olmakla birlikte 48.272 ile 53.419 g/mol arasında bulunmuştur. Kitosan preparatları arasında en düşük moleküler ağırlık (48.272 g/mol) 2 nolu preparat için belirlenmiş olup, en yüksek moleküler ağırlık ise (53.419 g/mol) 7 nolu preparatta hesaplanmıştır.

Süspansiyonlarda enzimatik reaksiyon ile üretilen kitosan, parçalanamayan kitin ve hatta kitin ve/veya kitosanın metabolizme edilmesi sonucu oluşan yan ürünlerin varlığı sebebiyle hesaplanan bu moleküler ağırlıkların kitosana ait olduğu yargısına varılamaz. Moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi elde edilen kitosan içerikli ürünün antimikrobiyal aktivitesine yönelik endüstriyel kullanımı belirleyen öncelikli içsel özelliklerdir.

Buna göre en düşük deasetilasyon dereceli 2 nolu preparatın ortalama moleküler ağırlığı da diğer preparatlara göre düşüktür. Antimikrobiyal aktivite açısından bu özellikler değerlendirildiğinde, bu preparat için en yüksek inhibisyon *P. aeruginosa*'ya karşı %41 olarak bulunmuştur. Deasetilasyon derecesi 2 nolu preparattan yüksek 3 nolu

preparatın ortalama moleküler ağırlığı ise hemen hemen 2 nolu süspansiyon ile aynıdır. Ancak aynı suşa karşı %49 inhibisyon ile en yüksek antimikrobiyal aktivite 3 nolu preparatta gözlenmiştir. Deasetilasyon sonuçlarına benzer şekilde, 7 ve 8 nolu kitosan preparatlarının ortalama moleküler ağırlıkları da diğer iki örneğe göre daha yüksek bulunmuştur. 8 nolu preparatın moleküler ağırlığı (50.188 g/mol) 7 nolu preparattan daha düşük (53.419 g/mol) olup deasetilasyon dereceleri ise birbirine çok yakındır. Söz konusu preparatlar da belirlenen en yüksek inhibisyon *S. epidermis*'e karşı sırasıyla %14 ve 19 olarak saptanmıştır. Ancak buna karşın 7 nolu preparat *E.coli* üzerinde antimikrobiyal bir aktivite gösterirken, 8 nolu örnekte böyle bir davranış gözlenmemiştir. Diğer bir örnekle 8 nolu preparat *B. subtilis*'e karşı inhibitör etki gösterirken, 7 nolu preparatta ise herhangi bir antimikrobiyal aktivite belirlenmemiştir. Literatürü destekler nitelikteki bu sonuçlarımız, kitosan biyopolimerinin toksisitesi üzerinde etkili içsel parametrelerin sadece moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi olmadığına ve antimikrobiyal aktivitenin test edilen mikroorganizma türü gibi dışsal niteliklere (sıcaklık, pH, metal iyonları vb) göre de değişkenlik gösterdiğine işaret etmektedir.

4.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Karakterizasyonu

Sıcaklık, mikroorganizmaların hücresel tüm biyokimyasal aktivitelerinin gerçekleştirilmesi için önemli bir parametredir. Özellikle de test mikroorganizmaların kolonileşmeleri için optimum sıcaklık koşullarında üreme ortamlarının inkübasyonu şarttır. Test bakterilerinin *in vivo* ve *in vitro* gösterdikleri davranışların farklılığı sebebiyle sıcaklık karakterizasyon çalışmalarında incelenmesi gereken ilk parametre olarak değerlendirilmektedir. Bu sebeple sıcaklık parametresi sadece kitosanın antimikrobiyal aktivitesini arttırıcı/azaltıcı etki olarak değil, aynı zamanda suşların üremeleri için gerekli ön koşul olarak da düşünülmelidir. Çünkü üreme karakterini kaybetmiş bir mikroorganizma kitosanın etki edeceği hedef bölge açısından noksan durumdadır. Böyle bir konumda gerçek bir antimikrobiyal aktiviteden bahsedilemez.

Kitosanların antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği karakterizasyon çalışmalarında, test suşların sıcaklık değişimleri sonucu üreme karakterlerinde ortaya çıkabilecek farklılıklar göz önünde bulundurularak iki kontrol grubu kullanılmıştır. Kitosan

içermeyen tüplerde suşların üreme karakterleri kontrol edilmiş ve bu grup negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Her ne kadar 37°C'de 24 saat geliştirilen suşların optik yoğunlukları OD₆₀₀ 3'e ayarlanarak karakterizasyon çalışmaları için besi ortamına inoküle edilse de Çizelge 3.9'daki veriler doğrultusunda tüm test bakterilerinin 4°C'de üreme karakterlerini kaybettikleri gözlenmiştir. PCA plaklarındaki kolonileşmeme davranışı, suşların üremeleri için optimum sıcaklık koşulu sağlanmamasından kaynaklanmaktadır.

Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) suşları için karakterizasyon çalışmaları öncesi elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. İnkübasyon sıcaklığındaki değişimler, kitosan preparatlarının bu suşlar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini etkilememiştir.

Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella* spp için 7 ve 8, *B. subtilis* için 7, *E. coli* için 8, *E. cloacae* ve *E. faecalis* için ise 3, 7 ve 8 nolu kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değişmediği gözlenmiştir. İncelenen tüm sıcaklık değerleri için herhangi bir antimikrobiyal aktivite kaydedilmemiştir.

2 ve 3 nolu kitosan preparatlarında *B. cereus*'a karşı 15, 25, 37 ve 40°C sıcaklık değerleri için antimikrobiyal aktivite kaydedilmiştir. Bakteriye karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite iki preparat için sırasıyla %23 ve 10 inhibisyon ile 37°C'de kaydedilmiştir.

Benzer şekilde 3 ve 8 nolu preparatların *B. subtilis* karşı 15, 25, 37 ve 40°C sıcaklık değerlerinde gözlenen en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri %16 ve 7 ile 37°C'de belirlenmiştir.

İlginç bir sonuç olarak 2 nolu preparatın en yüksek antimikrobiyal aktivitesi 15°C'de %20 olarak saptanmıştır. Ancak sıcaklığın 25, 37 ve 40°C'ye arttırılmasıyla birlikte % inhibisyonun azaldığı (%11, 17 ve 14.6) ortaya konmuştur. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 15°C'de belirlenen inhibisyonun düşük sıcaklığın üreme karakterine yönelik olumsuz etkisi sebebiyle ortalama hücre sayısında bir azalmadan kaynaklandığı belirlenmiştir.

4°C'deki sonuçlara benzer bir şekilde *Pseudomonas aeruginosa*'nın 15°C sıcaklıkta da üreme davranışını kaybettiği gözlenmiştir. 25, 37 ve 40°C sıcaklık denemeleri için, 2, 3

7 ve 8 nolu kitosan preparatların kaydedilen en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri sırasıyla %41, 49, 9 ve 11'dir. Bu % inhibisyon değerleri 37°C'de elde edilmiştir.

E. coli suşuda *P. aeruginosa*'ya benzer şekilde kolonileşme için optimum sıcaklık gereksinimi sebebiyle 15°C sıcaklıktaki inkübasyonu takiben PCA plaklarında üreme gözlenmemiştir. 25, 37 ve 40°C'de sıcaklıkta, 2, 3 ve 7 nolu preparatları için belirlenen en yüksek % inhibisyonlar 37°C'de elde edilmiş olup sırasıyla %36, 6 ve 3'tür.

S. epidermidis suşunda ise incelenen tüm kitosan preparatları için 15 ve 25°C'de herhangi bir inhibisyon etkiye rastlanmamıştır. 37 ve 40°C sıcaklık analizlerinde ise tüm preparatların inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek kitosanların en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri 37°C'de elde edilmiş olup sırasıyla %34, 33, 14 ve 19 olarak kaydedilmiştir.

Shigella spp için antimikrobiyal aktivite 25°C ve üzerindeki sıcaklıklarda incelenebilmiştir. 2 ve 3 nolu preparatlar 25°C'de herhangi bir inhibisyon etki göstermezken, 37°C'de sırasıyla %41 ve 8'lik bir antimikrobiyal aktivite saptanmıştır. 40°C'de 3 nolu preparat bu suş üzerinde etkisiz kalmıştır.

E. cloacae üzerinde inhibisyon etkili 2 nolu preparat, 15 ve 25°C'de bu suş üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterememişken, 37 ve 40°C sıcaklıklarda belirlenen inhibisyon etki sırasıyla %25 ve 22.4'tür.

25, 37 ve 40°C sıcaklıkta *L. monocytogenes* üzerinde inhibisyon etkisinden bahsedilebilen 2 ve 3 nolu kitosan preparatlarının en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri %19 ve 11 olarak 37°C'de ortaya konmuştur. 3 nolu preparat ise 25°C'de suş üzerinde etkisiz kalmıştır.

E. faecalis üzerinde antimikrobiyal etkisi belirlenen 2 nolu kitosan preparatı için en yüksek inhibisyon %32 ile 37°C'de kaydedilmiştir.

İncelenen tüm suşlar için en yüksek inhibisyon aktivite sonuçları 37°C'de elde edildiği için karakterizasyon çalışmalarına söz konusu sıcaklık ile devam edilmiştir.

Sıcaklık parametresinin incelenmesine benzer şekilde pH karakterizasyon çalışmalarında da pozitif ve negatif kontrol grupları kullanılarak uygulamalar sürdürülmüştür. pH parametresinde sıcaklık analizlerinin aksine incelenen pH değerlerinde, test suşlarının ürememesine yönelik bir sonuçla karşılaşılmamıştır.

Genel anlamda Çizelge 3.10'a bakıldığında, besiyerinin başlangıç pH'sı 5'e ayarlanmış inkübasyon koşullarında, kitosan preparatlarının incelenen test bakterileri üzerinde

herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği ortaya konmuştur. Bu durum negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, suşların üreme karakterleri ile ilgili bir durum olmadığı söylenebilmektedir.

Sıcaklık karakterizasyon çalışmalarına benzer şekilde, farklı pH değerlerinde sürdürülen inkübasyon koşullarında kısmi olarak saflaştırılmış kitosan preparatlarının hiçbirisi Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) suşları üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterememiştir. Bu suşlar için inkübasyon süresince sıcaklık ve pH değişimlerinin, kitosan preparatlarının inhibisyon aktivitelerini arttırıcı yönde bir etkiye neden olmadığı ortaya konmaktadır.

Kontrol grupları ve sıcaklık karakterizasyon sonuçları ile karşılaştırılığında, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella* spp. için 7 ve 8 nolu, *B. subtilis* için 7 nolu, *E. coli* için 8 nolu, *E. cloacae* ve *E. faecalis* için 3, 7 ve 8 nolu kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

B. cereus üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 2 ve 3 nolu kitosan süspansiyonlarının pH değişiminde kısmen de olsa aktivitelerini korudukları gözlenmektedir. Özellikle 2 nolu preparat için başlangıç pH'sı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış besiyerlerinde gözlenen inhibisyon etki sırasıyla %19.6, 23, 10.9 ve 8.8 olarak kaydedilmiştir. Ancak 3 nolu preparat pH'sı 6, 7 ve 8'e ayarlanmış ortamlarda suşa karşı %9.93, 10 ve 4.54 inhibisyon gösterirken, 2 nolu preparattan farklı olarak pH'sı 9'a ayarlanmış ortamda aktivite gösterememiştir.

2, 3, ve 8 nolu preparatların geniş bir pH'da *B. subtilis* üzerinde aktivitelerini göstermeye devam ettikleri ortaya konmuştur. Başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış ortamda 2, 3 ve 8 nolu preparatlar için %17, 16 ve 7 olarak belirlenen en yüksek inhibisyonlara, yakın sonuçlar pH'sı 6 olan besiyerinde %14.78, 14.9 ve 4.53 olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon ortamının pH'sı nötralden baziğe doğru ilerledikçe bu suş üzerinde söz konusu preparatların etkisinde azalma belirlenmiştir. pH'sı 8 ve 9'a ayarlanmış besi ortamlarında, 2, 3 ve 8 nolu preparatların aktivitelerinde ortalama olarak sırasıyla %7.42, 4.70 ve 3.84'lük bir azalma saptanmıştır.

P. aeruginosa üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 2, 3, 7 ve 8 nolu preparatların en yüksek inhibisyon etkileri başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besiyerlerinde sırasıyla %41, 49, 9 ve 11 olarak kaydedilmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteye en yakın

değerler başlangıç pH'sı 6'ya ayarlanmış ortamlarda %37.5, 44.45, 6.2 ve 9.72 olarak belirlenmiştir. 7 ve 8 nolu preparatlar için pH'sı 9'a ayarlanmış besiyerlerinde herhangi bir inhibisyona rastlanmamıştır. pH'sı 8 ve 9'a ayarlanmış kültürlerde 2 ve 3 nolu preparatların inhibisyonunda ortalama olarak sırasıyla %22.22 ve 28.38'lik bir azalma ortaya konmuştur.

Diğer test bakterilerine benzer şekilde, 2, 3 ve 7 nolu kitosanların *E. coli* üzerindeki en yüksek inhibisyon aktiviteleri %36, 6 ve 3 olarak başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besiyerlerinde saptanmıştır. Ancak pH'sı 6, 8 ve 9'a ayarlanmış besiyerlerinde 3 ve 7 nolu preparatların suş üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktiviteleri gözlenmemiştir. 2 nolu preparat için pH'sı 6, 8 ve 9'a ayarlanmış besi ortamlarında da antimikrobiyal aktivite gözlenmiş olup ortamın pH'sı bazıya doğru ilerledikçe inhibisyonun %16.99 ve 9.84'e kadar azaldığı belirlenmiştir.

S. epidermis için ise, 2, 3, 7 ve 8 nolu preparatlarının başlangıç pH'sı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış besiyerlerinde antimikrobiyal aktivitelerini gösterdikleri söylenebilmektedir. Bu suş için kaydedilen en yüksek inhibisyon başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besiyerinde %34, 33, 14 ve 19'dur. Başlangıç pH'sı 6'ya ayarlanmış asidik ortamda ise en yüksek inhibisyona yakın sonuçlar sırasıyla %32.04, 24.49, 10 ve 16.20 olarak belirlenmiştir.

Shigella spp üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparat için sadece başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besi ortamında %8 olarak belirlenen inhibisyon, başlangıç pH'sı 6, 8 ve 9'a ayarlanmış inkübasyon koşullarında %0 olarak kaydedilmiştir. Bu suş üzerinde ise, 2 nolu preparatın başlangıç pH'sı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış besiyerlerinde gözlenen antimikrobiyal aktivitesi sırasıyla %23.52, 41, 34.7 ve 12.5'tir.

E. cloacae için antimikrobiyal etki gösteren 2 nolu preparat pH'sı 6, 7 ve 8'e ayarlanmış besiyerlerinde antimikrobiyal aktivitesini korurken, pH 9'a ayarlanmış inkübasyon koşullarında süspansiyonun aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Bu suş için gözlenen en yüksek inhibisyon %25 ile başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besi ortamında kaydedilmiştir. *L. monocytogenes*'e karşı 2 ve 3 nolu preparatların en yüksek inhibisyonları (%19 ve 11) başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besi ortamında ortaya konmuş olup, bu preparatlar pH'sı 9'a ayarlanmış koşullarda etkisiz kalmıştır. Bu suş üzerinde antimikrobiyal etkili kitosan süspansiyonlarının gösterdiği en düşük aktivite ortam pH'sının bazıya kayması ile pH 8'de %9.07 ve 2.63 olarak belirlenmiştir.

E. faecalis üzerinde etkinliğini koruyan 2 nolu preparat için de en yüksek inhibisyon %32 ile başlangıç pH'sı 7'ye ayarlanmış besi ortamında kaydedilmiş olup, pH'sı 6, 8 ve 9'a ayarlanmış inkübasyon koşullarında ise sırasıyla %26.15, 17.16 ve 7.37 olarak hesaplanmıştır.

pH karakterizasyon sonuçları incelendiğinde, başlangıç pH'sı 5'e ayarlanmış besiyerleri için test edilen test suşları üzerinde herhangi bir inhibisyon etki belirlenmemiştir. Test edilen kitosan süspansiyonları arasında 2 nolu preparatın başlangıç pH'sı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış besiyerlerinde genellikle antimikrobiyal aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Test edilen suşlar üzerinde kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerine genel olarak başlangıç pH'sı 6, 7 ve 8'e ayarlanmış besi ortamlarında rastlansa da, en yüksek inhibisyon başlangıç pH'sı 6 ve 7'ye ayarlanmış kültürlerde kaydedilmiştir.

pH 6.0'ın altındaki sulandırılmış asidik solüsyonlarda kitosan biyopolimerinin kolaylıkla çözünmediği fakat pH 7.0'ın üzerinde bu stabilitenin azaldığı yönündeki literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda, sonuçlarımızla belirgin bir çelişki gözlenmektedir. Ancak bu bilgi saf kitosan çözeltilerinin çözünabilirliği için ortaya konmuş genel bir yaklaşımdır. Bakteri kültürlerinden nötralizasyon sonucu elde edilen kitosan preparatlarının kullanımı, bu genel yaklaşımı anlamsız kılmaktadır.

Kitosanların antimikrobiyal aktivitesi çözünürlüğünün yanı sıra bakterinin besi ortamındaki gelişimi ve hedef noktanın etkilenmesi ile de birebir ilişkilidir. Farklı pH'larda hazırlanmış besi ortamlarında hücresel gelişimi takiben biyokimyasal aktiviteler sonucu ortama verilen organik ve inorganik bileşiklerin, pH'sı 5 ve 9'a ayarlanmış kültürlerde kitosan süspansiyonlarının aktivitelerini olumsuz etkilediği söylenebilmektedir. 6 saatlik inkübasyon süresince her test suşunun besi ortamlarının başlangıç pH'sını ne düzeyde değiştirdiği de bilinmemektedir. Bu sebeple kitosan süspansiyonları bazı test suşları için antimikrobiyal etkili olduğu pH'da diğer suş üzerinde inhibitör etkisini kaybedebilmektedir.

Sıcaklık ve pH karakterizasyon çalışmalarına benzer şekilde, farklı kitosan konsantrasyonlarının besi ortamına eklenmesi ile sürdürülen antimikrobiyal aktivite çalışmalarında da, Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) suşları üzerinde kısmi olarak saflaştırılmış kitosan preparatları için herhangi bir inhibisyona rastlanmamıştır. Bu suşlar için

sıcaklık, pH ve besiyerine eklenen kitosan konsantrasyon farklılığı gibi inkübasyon koşullarındaki değişimlerin kitosan preparatlarına karşı hassasiyete neden olmadığı gözlenmiştir.

Son konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde kitosan preparatları eklenen besi ortamlarında test edilen suşlar üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite söz konusu değildir (Çizelge 3.11).

Besi ortamına farklı konsantrasyonlarda kitosan süspansiyonları eklendiği karakterizasyon çalışmalarında, 7 ve 8 nolu preparatların *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella* spp., 7 nolu preparatın *B. subtilis*, 8 nolu preparatın *E. coli*, 3, 7 ve 8 nolu preparatların ise *E. cloacae* ve *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal davranışlarında herhangi bir değişiklik söz konusu olmamakla birlikte inhibisyon kaydedilmemiştir. Son konsantrasyonu 250 mg/L olacak şekilde besi ortamına eklenen kitosan preparatları için, *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparat için gözlenen %10'luk; *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal etkili 8 nolu preparat için gözlenen %7'lik; *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkili 7 ve 8 nolu preparatlar için gözlenen %9 ve 11'lik; *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etkili 3 ve 7 nolu preparatlar için gözlenen %6 ve 3'lük ve *Shigella* spp üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparat için gözlenen %8'lik; *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparat için gözlenen %11'lik inhibisyon değerleri, 150 mg/L kitosan konsantrasyonu içeren besi ortamlarında %0 olarak belirlenmiştir.

2 nolu kitosan preparatının son konsantrasyonu 250 mg/L olacak şekilde besi ortamında eklendiğinde *B. cereus* üzerindeki inhibisyon etki %23 iken, 150 mg/L konsantrasyonda kitosan içeren kültürlerde bu etki %10.47'dir. Antimikrobiyal akitivitede %12.3 azalma belirlenmiştir. *B. subtilis*'a karşı antimikrobiyal etkili 2 ve 3 nolu preparatların son konsantrasyonu 150 mg/L olacak şekilde besi ortamına eklenmesi sonucu gözlenen inhibisyonlarda sırasıyla %7.91 ve 8.56 azalma saptanmıştır.

P. aeruginosa suşu üzerinde inhibitör etkili 2 ve 3 nolu preparatların besi ortamına eklenen konsantrasyonlarına bağlı olarak, antimikrobiyal aktivitelerinde değişimler gözlenmiştir. Söz konusu preparatlardan son konsantrasyon 250 mg/L olacak şekilde besi ortamına eklendiğinde, suşa karşı gözlenen antimikrobiyal aktiviteler sırasıyla %41 ve 49; son konsantrasyon 150 mg/L iken ise bu aktiviteler %33.33 ve 30.72 olarak belirlenmiştir.

Son konsantrasyonu 150 mg/L olacak şekilde besi ortamına eklenen 2 nolu kitosan preparatının *Escherichia coli*, *S. epidermidis*, *Shigella* spp, *E. cloacae*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis*'e karşı belirlenen antimikrobiyal aktivitesinde sırasıyla %16.4, 12.79, 13.73, 9.62, 14.58 ve 21.48 azalma saptanmıştır.

S. epidermidis üzerinde antimikrobiyal etkili 2 nolu kitosan preparatı dışındaki diğer preparatlarda besi ortamına eklenen ajan konsantrasyonuna bağlı olarak antimikrobiyal aktivitelerde değişimler gözlenmiştir. Son konsantrasyon 250 mg/L olacak şekilde 3, 7 ve 8 nolu süspansiyonları içeren ortamlarda suşa karşı kaydedilen en yüksek inhibisyonlar %33, 14 ve 19 iken; 150 mg/L konsantrasyonda kitosan içeren kültürlerde ise bu aktiviteler sırasıyla %23.07, 8.73 ve 7.39 şeklinde hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kültüre eklenen kitosan konsantrasyonu arttıkça test suşları üzerinde belirlenen antimikrobiyal aktivitenin de arttığı belirlenmiştir. Ancak konsantrasyonun artmasına bağlı olarak suşlar üzerinde ajan etkinliğinin aynı düzeyde olmaması, her suş için söz konusu ajanın antimikrobiyal aktivite göstereceği eşik değerine ulaşmaması ile açıklanabilmektedir.

%0.1 konsantrasyonda SDS, Triton X-100; β -merkaptolanol gibi deterjanlar ve 5 mM EDTA içeren besi ortamlarında kitosan örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 3.12'de verilmiştir. Sıcaklık, pH ve antimikrobiyal ajanın konsantrasyonu gibi parametrelerin incelendiğinde karakterizasyon çalışmalarında kısmi saflaştırılmış kitosan preparatlarının, Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) suşlarına karşı inhibisyon etkileri gözlenmemiştir. Besi yerine eklenen SDS, Triton X-100, β -merkaptolanol ve EDTA gibi ajanların da aynı suşlar üzerinde antimikrobiyal aktiviteye neden olacak herhangi bir etkiye sebep olmadığı gözlenmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, bu suşların besi ortamına eklenen metal ve deterjan konsantrasyonlarına da direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu ajanların besi ortamına eklenmesi ile *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella*'nın 7 ve 8 nolu preparatlara, *B. subtilis*'in 7 nolu preparata, *E. coli*'nin 8 nolu preparata, *E. cloacae* ve *E. faecalis*'in ise 3, 7 ve 8 nolu preparatlara karşı gösterdikleri direnç mekanizmalarında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Bu karakterizasyon çalışmasında ilginç bir sonuç, %0.1 Triton X-100'ün eklendiği besi ortamlarında, *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella* spp'nin hassasiyet gösterdiği 2 ve 3; *B. subtilis*'in hassasiyet gösterdiği 2, 3 ve 8; *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in

hassasiyet gösterdiği 2, 3, 7 ve 8; *E. cloacae* ve *E. faecalis*'in hassasiyet gösterdiği 2; *E. coli*'nin hassasiyet gösterdiği 2, 3 ve 7 nolu kitosan preparatlarına karşı direç göstermesidir. Triton X-100 iyonik olmayan, yüzey aktif bir biyolojik deterjandır. Bu sebeple besi ortamının pH dengesini bozabilecek herhangi bir yapıya sahip olmadığı söylenebilmektedir. Yüzey aktif maddeler suda veya sulu bir çözültide çözündüklerinde yüzey gerilimini azaltan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Sürfaktant olarak da adlandırılan yüzey aktif maddeler çözündüklerinde ara yüzeylerde (kitosan ve hücre duvarı) toplanarak yüzey gerilimi azaltan ve miseller gibi agregat yapılar oluşturan amfifilik bileşiklerdir. Triton X-100'ün kitosan polimeri ve hücre duvarı arasında oluşturduğu kümeleşme sebebiyle kitosanın duvar yüzeyine yapışmasını engellediği ve geçirgenlikte oluşturduğu dejenerasyon sonucu antimikrobiyal aktivitede azalma söz konusu olabilmektedir.

Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in %0.1 SDS içeren besi ortamında üreme karakterlerini kayb ettikleri ortaya konmuştur. Bu iki suşun bu davranışının ortamdaki iyonik değişimden veya SDS'nin duvar yapısını bloke edici özelliğinden kaynaklandığı söylenebilmektedir.

%0.1 SDS içeren besi ortamlarında *B.cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Shigella* spp, *E. cloacae*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* karşı antimikrobiyal aktivitesi gözlenmiş kitosan süspansiyonlarının aktivitelerini kayb ettikleri gözlenmiştir. Bu ilginç sonuç, SDS'nin anyonik karakterde bir deterjan olması sebebiyle kitosanın taşıdığı yüksek pozitif yük ile aralarında gerçekleşecek elektrostatik çekim kuvveti sonucu kitosan preparatlarının bakteri hücre duvarına olan çekim kuvvetini kaybetmesi ile açıklanabilmektedir.

Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında %0.1 β -merkaptöetanol içeren besiyerlerinde kitosan preparatlarının test bakterileri üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktivitede önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 2 ve 3 nolu kitosan preparatları için hesaplanan en yüksek inhibisyonlar %23 ve 10 iken, deterjanın varlığında bu inhibisyonlar %12.82 ve 2.87 olarak kaydedilmiştir. *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal etkili 2, 3 ve 8 nolu kitosan preparatları için %17, 16 ve 7 olarak belirlenen en yüksek inhibisyonların sırasıyla %9.81, 8.82 ve 1.95'e kadar azaldığı ortaya konmuştur.

P. aeruginosa ve *S. epidermidis* üzerinde inhibitör etkili 2, 3, 7 ve 8 nolu kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinde sırasıyla %21.92, 24.72, 9, 4.36 ve %14.5, 14.82, 4.23, 10.57 azalma saptanmıştır. 2 ve 3 nolu kitosan preparatlarının *Shigella* spp ve *L. monocytogenes* üzerinde belirlenen en yüksek inhibisyonları %41, 8 ve %19, 11 iken, β -merkaptotanol içeren ortamda bu inhibisyonların %16.12, 3.48 ve %10.52, 7.05'e kadar azaldığı belirlenmiştir. *E. cloacae* ve *E. faecalis*'e karşı 2 nolu preparatın gösterdiği antimikrobiyal aktivite de %12.87 ve 18.83 azalma kaydedilmiştir. *E. coli* içinde benzer sonuçlar elde edilmiş olup 7 nolu preparat hariç 2 ve 3 nolu preparatların antimikrobiyal aktivitelerini göstermeye devam ettikleri ancak inhibisyonların sırasıyla %23.81 ve 4 azaldığı hesaplanmıştır.

5 mM EDTA içeren besi ortamında ise hemen hemen benzer sonuçlar ile karşılaşmıştır. Kontrol gruplarına kıyasla *E. coli* üzerinde inhibitör etkili 7 nolu preparat hariç diğer kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerini sürdürdüğü saptanmıştır. Besi ortamına eklenen diğer bileşenlere göre en yüksek antimikrobiyal aktivite EDTA'lı besiyerlerinde belirlenmiştir.

β -merkaptotanol ve EDTA'nın kitosan preparatlarının sudaki çözünürlüğüne etki edebilmesinden dolayı antimikrobiyal aktiviteyi azalttığı ileri sürülebilmektedir.

Çizelge 3.13 ve 3.14'te metal tuzların antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre Metisilin-dirençli *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp ve Vankomisin-dirençli *Enterococci* (VRE) suşlarının kitosan preparatlarına karşı gösterdikleri dirençlilikte herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra metal iyonlarının varlığında *B. cereus*, *L. monocytogenes* ve *Shigella* spp için 7 ve 8; *B. subtilis* için 7; *E. coli* için 8; *E. cloacae* ve *E. faecalis* için 3, 7 ve 8 nolu kitosan preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerinde herhangi bir farklılık belirlenmemiştir.

Besi ortamına eklenen tuz konsantrasyonuna bağlı olarak kitosan süspansiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği karakterizasyon çalışmalarında ilginç sonuçlar ile karşılaşmıştır. *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparatın NaCl ve KCl'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında suşa karşı aktivitesini kaybettiği gözlenirken, 10, 20 mM NaCl ve KCl içeren kültür ortamlarında 2 nolu preparatın da aynı suşa karşı inhibisyon etkisini kaybettiği saptanmıştır. *B. subtilis*'e karşı inhibisyon etki gösteren 8 nolu preparatın KCl ve NaCl'nin varlığında aktivitesini kaybettiği ortaya konmuştur. 10, 20 mM NaCl ve KCl varlığında, 2 ve 3 nolu kitosan

süspansiyonlarının aynı suşa karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerini koruyamadığı belirlenmiştir.

NaCl ve KCl'nin test edilen tüm konsantrasyonlarını içeren kültürlerde 7 ve 8 nolu preparatların *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon etkilerini bütünüyle kaybettiği; 2 ve 3 nolu preparatların ise aynı suşa karşı 10 mM NaCl ve KCl içeren besi ortamlarında ise inhibisyonların gözlenmediği ortaya konmuştur. 10, 20 mM NaCl ve KCl içeren besi ortamlarında 2 nolu preparatın *E. coli* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde 3 ve 7 nolu preparatların 10, 20 ve 30 mM NaCl ve KCl içeren ortamlarda *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitelerini kaybettikleri saptanmıştır.

S. epidermis suşu için en ilginç sonuçlar, 7 ve 8 nolu preparatlarda sırasıyla %14 ve 19 olarak kaydedilen en yüksek inhibisyonların, 10, 20 ve 30 mM NaCl ve KCl içeren besi yerlerinde belirlenememesidir. Benzer şekilde 2 nolu preparatın da 10 mM, 20 mM NaCl ve KCl içeren besi ortamında suşa karşı gözlenen inhibisyonunu kaybettiği saptanmıştır. 10, 20 ve 30 mM NaCl; 10 ve 20 mM KCl içeren ortamlarda 3 nolu preparatın da inhibisyon etki gösteremediği belirlenmiştir.

2 nolu preparatın 10, 20 mM NaCl ve KCl varlığında *E. cloacae* suşuna karşı; 2 ve 3 nolu preparatların 10, 20, 30 mM NaCl; 10, 20 mM KCl içeren ortamlarda *L. monocytogenes*'e karşı; 2 nolu preparatın ise 10, 20 mM NaCl ve KCl içeren besi yerlerinde *E. faecalis*'e karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerini kaybettikleri gözlenmiştir.

Shigella spp suşu için de benzer sonuçlar gözlenmiştir. 2 nolu preparatın 10, 20 mM NaCl ve KCl, 3 nolu preparatın ise 10, 20, 30 mM NaCl ve KCl içeren besiyerlerinde suşa karşı inhibisyon etkisini tamamıyla kaybettiği ve suşun gelişimini sürdürdüğü belirlenmiştir.

2 nolu preparatın 30 mM NaCl ve KCl içeren ortamlarda *B. cereus* üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktivite sırasıyla %12.77 ve 12.66 olarak kaydedilmiştir. Bu suşa karşı belirlenen en yüksek inhibisyon %23 iken, aktivitede ortalama %10 düzeyinde bir azalma belirlenmiştir. *B. subtilis*'a karşı inhibitör etki gösteren 2 ve 3 nolu preparatların 30 mM NaCl ve KCl içeren kültürlerde belirlenen antimikrobiyal aktiviteleri sırasıyla %4.24 ve 4.74; %9.03 ve 10.15'tir. Bu suşa karşı söz konusu preparatların gösterdiği en

yüksek antimikrobiyal aktiviteler sırasıyla %17 ve 16 olması sebebiyle inhibitör etkinin azaldığı gözlenmiştir.

2 ve 3 nolu kitosan süspansiyonlarının sırasıyla %41 ve 49 inhibisyon değerleri ile en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri suş *P. aeruginosa*'dır. Ancak metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, 20, 30 mM NaCl ve KCl varlığında 2 nolu preparatın suşa karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite %14.85 ve 22.82; %17.60 ve 28.65 olarak saptanmıştır. Aynı ortam koşullarında 3 nolu preparatın bu suşa karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite %9.32 ve 27.74; %14.80 ve 28.98 olarak belirlenmiştir.

30 mM NaCl ve KCl içeren kültürlerde 2 nolu preparatın *E. coli*, *S. epidermis*, *Shigella* spp, *E. cloacae* ve *E. faecalis* suşları üzerinde gösterdiği inhibisyonlar sırasıyla %24.29 ve 29.12; %28.31 ve 28.9; %27.13 ve 27.65; %10.49 ve 14.04; %21.59 ve 27.43 olarak belirlenmiştir. 30 mM KCl içeren ortamda 2 ve 3 nolu kitosan preparatlarının *L. monocytogenes* üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktiviteler %8.54 ve 8.08'dir. 3 nolu preparatın *S. epidermis*'e karşı belirlenen antimikrobiyal aktivitesinde %4.87 azalma saptanmıştır.

10 ve 20 mM konsantrasyonlarda CaCl₂ içeren besi ortamlarında test edilen kitosan preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir. 30 mM CaCl₂ içeren besiyerlerinde 2 nolu kitosan preparatının *B.cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermis*, *Shigella* spp, *E. cloacae*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis*'e karşı gösterdiği inhibisyonlar sırasıyla %13.1; 29.8; 20; 20.4; 24.7; 17.2; 11.9 ve 24.6 olarak kaydedilmiştir. *B.cereus*'e karşı antimikrobiyal etkili 3 nolu preparatın; *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkili 2 ve 3 nolu preparatların; *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkili 8 nolu preparatın; *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkili 3 ve 7 nolu preparatların; *Shigella* spp ve *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkili 3 nolu preparatın inhibisyon etkilerini 30 mM CaCl₂ varlığında kaybettikleri belirlenmiştir. 2, 3, 7 ve 8 nolu kitosan preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerini sadece 30 mM CaCl₂ varlığında *S. epidermis*'e karşı sürdürdükleri saptanmıştır. Söz konusu inhibisyonlar %20.4; 23.8; 10 ve 13.4 olarak hesaplanmıştır.

Kitosan süspansiyonlarını içermeyen kontrol gruplarında NaCl, KCl ve CaCl₂ gibi metal iyonlarının suşların gelişimini arttırıcı etki gösterdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte gelişim süreci içerisinde ajanın suşa karşı daha az antimikrobiyal etkili/etkisiz hale geldiği ifade edilebilmektedir.

Antimikrobiyal aktivite mekanizmasında ajanın inhibisyon etkisinin değişiminde metal iyonlarının etkisi tartışılmazdır. Ancak suşlar özellikle *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda gösterdiği farklı üreme davranışı ile metal iyonlarının bulunduğu ortamda konsantrasyona bağlı kolonileşme etkinliklerini arttırarak, inhibitör ajana karşı dirençlilik gösterebilmektedirler. Suşlar tolere edebildikleri konsantrasyondaki metal tuzlarını hücre sel gelişimini hızlandırmak için kullanarak hızlı üreme fazına (log fazı) daha kısa sürede geçebilmekte ve böylelikle inhibitör ajanın antimikrobiyal aktivitesinden etkilenmemektedirler.

Bakteriyel gelişimin artması hücredeki biyokimyasal faaliyetlerin artışını da beraberinde getirmektedir. Dolayısıyla suşların kısmi saflaştırılmış kitosan preparatlarını daha az toksik/toksik olmayan ara metabolitlere dönüştürcek enzimatik faaliyetleri de söz konusu olabilmektedir. İnhibitörlerin ve yardımcı ajanların etkisi konsantrasyona ve muamele süresine bağlı olarak değişmektedir. İleriki çalışmalarımızda, kitosan konsantrasyonlarının ve inkübasyon süresinin arttırılması ile daha yüksek antimikrobiyal aktivite sonuçlarına ulaşılması mümkün olabilecektir.

10 mM MgCl₂ varlığında suşlar üzerinde antimikrobiyal etkili kitosan preparatlarının inhibitör karakterlerini kaybettiği gözlenmiştir. 20 ve 30 mM MgCl₂ içeren besi ortamlarında 2 ve 3 nolu preparatların *B. cereus* üzerinde gösterdiği inhibisyonlar sırasıyla %18.7 ve 23.8; %9.76 ve 10.0 olarak belirlenmiştir. 2 nolu preparat için söz konusu suş üzerindeki inhibitör etkinin %0.8 arttırıldığı gözlenmiştir. 30 mM MgCl₂ varlığında 2, 3 ve 8 nolu preparatların *B. subtilis*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitelerde sırasıyla %0.6, 0.1 ve 0.4 artma kaydedilmiştir.

20 ve 30 mM MgCl₂ içeren besi ortamlarında *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkili 2, 3, 7 ve 8 nolu preparatların aktivitelerini korudukları belirlenmiştir. 30 mM MgCl₂ varlığında 2, 7 ve 8 nolu preparatların inhibitör etkilerini sırasıyla %2.9, 3.8 ve 0.5 arttırdıkları kaydedilmiştir. 30 mM MgCl₂ içeren kültürlerde 3 ve 7 nolu preparatların *E. coli* üzerindeki inhibitör etkilerinde %0.2 ve 0.24; 8 nolu preparatın *S. epidermis*'e karşı antimikrobiyal etkisinde ise %0.7 artma saptanmıştır. 3 nolu preparatın *Shigella* spp. ve *L. monocytogenes*'e karşı gösterdiği inhibitör etkisinde sırasıyla %1.3 ve 0.6 artma hesaplanmıştır. 2 nolu preparatın *E. cloacae* ve *L. monocytogenes*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite ise sırasıyla %2.1 ve 1.8 artmıştır. Bu sonuçlara göre genel olarak 30 mM MgCl₂ içeren besi ortamlarında

antimikrobiyal aktivitenin arttığı gözlenmiş olup, en yüksek aktivite artışı 7 nolu preparatın *P. aeruginosa* karşı gösterdiği inhibitör etkide ortaya konmuştur.

Test edilen BaCl₂ konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kitosan preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerini koruduğu gözlenmiştir. 30 mM BaCl₂ içeren besi ortamında 2 nolu preparatın *B. cereus*'a karşı gösterdiği antimikrobiyal etki %3.7; 20 ve 30 mM BaCl₂ varlığında 3 nolu preparatın aynı suşa karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin ise sırasıyla %0.3 ve 1.1 arttığı saptanmıştır. 30 mM BaCl₂ içeren ortamlarda 2 ve 3 nolu preparatların *B. subtilis*'e karşı gösterdikleri inhibitör etkilerin %0.5 ve 0.7 arttığı hesaplanmıştır. 20 ve 30 mM BaCl₂ varlığında 8 nolu preparatın söz konusu suş üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi %0.34 ve 0.77 artmıştır.

20 ve 30 mM BaCl₂ içeren ortamlarda 2, 7 ve 8 nolu preparatların *P. aeruginosa*'ya karşı gösterdikleri inhibitör etkilerin sırasıyla %0.3 ve 0.73; %1.11 ve 1.25; %0.37 ve 1.5 arttığı gözlenmiştir. 10, 20 ve 30 mM BaCl₂ içeren ortamlarda 2 nolu preparatta *E. coli*'ye karşı gözlenen antimikrobiyal aktivite sırasıyla %0.3; 1.8 ve 2.09 artmıştır. Aynı koşullarda geliştirilen *S. epidermis* üzerinde antimikrobiyal etkili 8 nolu preparatın aktivitesinde %0.2; 0.7 ve 1.7 artma kaydedilmiştir. 30 mM BaCl₂ içeren ortamlarda gelişim sonucu 3 ve 7 nolu preparatların *S. epidermis* üzerindeki inhibisyon etkilerinin sırasıyla %2.73 ve 0.6 arttığı saptanmıştır. 20 ve 30 mM BaCl₂ varlığında 2 nolu preparat aynı suş üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini %0.8 ve 2.2 arttırmıştır.

2 ve 3 nolu preparatların *Shigella* spp üzerinde gözlenen inhibitör etkisi, BaCl₂'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Bu preparatlar için konsantrasyona bağlı olarak antimikrobiyal aktivitedeki artışlar sırasıyla %1.2, 1.4 ve 2.51; %1.36, 2.43 ve 2.77'dir. *E. cloacae* karşı 2 nolu preparatta gözlenen en yüksek antimikrobiyal aktivite %25'tir. 20 ve 30 mM BaCl₂ ile inkübasyonu takiben inhibisyonda sırasıyla %0.2 ve 1.81 artma belirlenmiştir.

30 mM BaCl₂ varlığında 3 nolu preparatta *L. monocytogenes*'e karşı gözlenen antimikrobiyal aktivitede %2.04 artma saptanmıştır. Aynı inkübasyon koşullarında *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkili 2 nolu preparatın aktivitesinde %0.8 artma gözlenmiştir. BaCl₂ içeren ortamlarda belirlenen en yüksek inhibitör etki *B. cereus*'a karşı 2 nolu preparatta %26.7 olarak kaydedilmiştir.

B. cereus ve *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal etkili 2 ve 3 nolu kitosan preparatlarının ve *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkili 2 nolu preparatın aktiviteleri

BaCl₂ varlığında artmıştır. Yine aynı metal iyonu varlığında *S. epidermis* üzerinde antimikrobiyal etkili 2, 3, 7 ve 8 nolu preparatların inhibitör etkilerinde artma gözlenmiş olup en yüksek antimikrobiyal etki 2 nolu preparatı içeren kültürlerde saptanmıştır. 2 nolu preparatın *L. monocytogenes* ve *E. cloacae* karşı en yüksek inhibitör etkisini MgCl₂ varlığında gösterdiği ortaya konmuştur. *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etkili 3 nolu preparatın BaCl₂ varlığında stimüle olması, 2 nolu preparattan farklı bir davranış gösterdiğini ortaya koymaktadır. 2 ve 3 nolu preparatların *Shigella* spp'ye karşı gösterdikleri en yüksek antimikrobiyal aktiviteleri BaCl₂ ve MgCl₂ içeren kültürlerde kaydedilmiştir. 2 ve 7 nolu preparatların *P. aeruginosa*'ya karşı gösterdikleri en yüksek antimikrobiyal aktiviteler MgCl₂; 8 nolu preparat için ise BaCl₂ varlığında saptanmıştır. Aynı farklılıklara *E. coli* için yapılan analizlerde de rastlanmıştır.

5. SONUÇ ve YORUM

Kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz enzim üretici *Bacillus* suşlarının izolasyonu, suşların kültüre edildiği sıvı fermentasyon ortamından orta-düşük moleküler ağırlıkta ve düşük deasetilasyon derecesinde kitosan biyopolimerlerinin kısmi saflaştırılması, üretilen kitosan preparatlarının kültür koleksiyonumuzda muhafaza edilen mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi ve söz konusu aktivitenin karakterizasyonu ile endüstriyel ve ticari öneme sahip ürünlerin eldesi çalışmamızın temel hedefleridir.

Bu hedefler doğrultusunda yönlendirilen çalışmamızda, gereç ve yöntemler kısmında belirtilen besiyerleri kullanılarak Mersin Susanoğlu Yapraklı Koy, Silifke Boğsak Koyu ve Adana Karataş liman bölgesinden alınan topraklardan, kitin deasetilaz (CDA) üreticisi dört adet *Bacillus* suşu izole edilmiştir. Suşlar *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır. CDA üreticisi olduğu belirlenen bu suşlardan en yüksek verimde kitosan preparatlarının elde edilebilmesi için kültüre edildikleri sıvı femantasyon ortamı optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda suşların en kısa sürede en yüksek hücresel gelişimlerini, %1 maya özütü, 0.4 g (NH₄)₂SO₄, 0.15 g KH₂PO₄ ve %2 sükroz (pH 8) içeren besi ortamında 37°C'de 48 saatlik inkübasyon süresince gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sıvı fermantasyon içeriğine %1 kolloidal kitin eklenerek enzimatik biyodönüşümle kitosan biyopolimerlerinin üretimi hedeflenmiştir. Kitin/kitosan ve yan ürünlerini içermesi olası kitosan preparatlar, alkali ve asidik proseslerin uygulanması ile fermantasyon ortamından kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Elde edilen preparatlardaki kitin ve kitosan polimerlerinin varlığı kalitatif analizler ile belirlenmiş olup, *Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* bakterilerinin kültür ortamlarından saflaştırılan 2 ve 3 nolu preparatlarda kitosan varlığına işaret eden pembe renk oluşumu gözlenmiştir. *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* kültürlerinden elde edilen 7 ve 8 nolu preparatlardaki sarı-kahverengi renk oluşumu ise, kitin varlığını göstermiştir.

Kalitatif analizlerde ürünün miktarına yönelik artma ve/veya azalma renk oluşumunu etkilediği için, dört preparatlarda antimikrobiyal aktivite analizlerine devam edilmiştir. Kitosan süspansiyonlarının suşlar üzerindeki inhibisyon etkileri canlı hücre sayımı ile analiz edilmiş ve % inhibisyon cinsinden hesaplanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları

ile belirlenen antimikrobiyal aktivite sonuçları, orta ve düşük moleküler ağırlıktaki standart kitosan çözeltilerinin ve kloramfenikol antibiyotiğinin suşlar üzerindeki antimikrobiyal etki mekanizmaları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Standartlar ve kısmi saflaştırılmış kitosan preparatları Metisilin dirençli *S. aureus* ve Vankomisin dirençli *Enterococci*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterememiştir. Ancak kitosan çözeltilerinin inhibisyon etki gösteremediği *Salmonella* spp üzerindeki en yüksek antimikrobiyal aktivite %99 ile orta moleküler ağırlıktaki standart kitosan çözeltisinde kaydedilmiştir.

Kitosan preparatlarında *B. cereus*'a karşı gözlenen en yüksek inhibisyon %26.7'dir. Bu inhibisyon orta moleküler ağırlıktaki standart kitosanın aynı suşa karşı gösterdiği %61'lik antimikrobiyal aktiviteden oldukça düşüktür. Benzer şekilde *B. subtilis* için en yüksek antimikrobiyal aktivite %99 ile kloramfenikol antibiyotiğinde saptanmıştır. Kitosan preparatlarında ise aynı suşa karşı hesaplanan en yüksek inhibisyon %17.6'dır. 3 nolu kitosan preparatının *P. aeruginosa*'ya karşı gösterdiği %49'luk inhibisyon, kloramfenikol antibiyotiği ile muamele sonucu belirlenen antimikrobiyal aktiviteye (%45) oldukça yakındır. Ancak bu inhibisyon standart kitosan çözeltileri kullanılan çalışmalara göre oldukça düşüktür.

Kitosan çözeltileri *Klebsiella* spp'ye karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite gösterememişken, %99 inhibisyon orta moleküler ağırlıktaki standart kitosan çözeltisinde kaydedilmiştir. Preparatların *E. coli*'ye karşı gösterdikleri en yüksek inhibisyon %38.09 olarak belirlenmiştir. Aynı suşa karşı gözlenen %98'lik antimikrobiyal aktiviteye orta moleküler ağırlıktaki standart çözeltide rastlanmıştır.

Düşük moleküler ağırlıkta standart kitosan çözeltisinde *S. epidermis* suşuna karşı %29 inhibisyon gözlenmiştir. Aynı suşa karşı kitosan preparatlarında hesaplanan en yüksek antimikrobiyal aktivite %36.2'dir. Bu inhibisyon 2 nolu preparatta belirlenmiş olup, saflaştırılan preparatlar sadece bu suşa karşı kitosan standartlarından daha yüksek aktivite göstermiştir. Kloramfenikol antibiyotiğinin de bu suşa karşı antimikrobiyal aktivite gösterememesi, bu suşa karşı sürdürülen klinik uygulamalarda 2 nolu kitosan preparatının inhibitör etkisinin artırılarak kullanılabilceği ileri sürülebilmektedir. Standartların etki gösteremediği *E. faecalis* suşuna karşı ise %32'lik bir antimikrobiyal aktivitenin 2 nolu preparat için kaydedilmesi de bu preparatı klinik uygulamalarda önemli kılmaktadır.

Shigella spp ve *E. faecalis* için kitosan süspansiyonlarının gösterdiği en yüksek inhibisyon sırasıyla %43.51 ve 32.8'dir. Kloramfenikol antibiyotiği ile yapılan çalışmalarda ise bu inhibisyonlar %89 ve 42 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde *E. cloacae* ve *L. monocytogenes*'e karşı belirlenen en yüksek inhibisyon düşük moleküler ağırlıktaki kitosan çözeltisinde gözlenmiştir.

Saflaştırılan kitosan preparatlarının suşlar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin artırılması için uygulanan karakterizasyon çalışmalarında, sadece 30 mM MgCl₂ ve BaCl₂ varlığında inhibitör etkinin arttığı gözlenmiştir. BaCl₂ ve MgCl₂ gibi metal iyonlarının ve kitosan preparatlarının konsantrasyonunun artması ile inhibitör etkinin de arttığı gözlenmiştir. Bu sebeple ileriki çalışmalar, kitosan preparatlarının ve MgCl₂/BaCl₂ gibi metal iyonlarının ortamdaki konsantrasyonunun artması ile aktivitelerin güçlendirilmesi yönünde devam etmelidir. İncelenen antimikrobiyal aktivite doğrudan saf kitosan biyopolimerine yönelik olmamakla birlikte, kitosanın enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan farklı karakterdeki ara metabolitlerden de kaynaklanabilmektedir. Bu durum test edilen preparatların ve suşların farklı davranışlarını da açıklayabilmektedir. Farklı *Bacillus* suşlarından kısmi saflaştırılan kitosan preparatlarındaki ara metabolitlerin de farklılıkları göz önünde bulundurulduğunda ileriki çalışmalar antimikrobiyal aktivitenin artırılmasının yanı sıra analitik analizlere de yön vermelidir.

Kitosan preparatları antimikrobiyal aktivitesini etkileyen deasetilasyon dereceleri ve molekül ağırlıkları belirlenerek de karakterize edilmiştir. Polimerlerin deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı fourier dönüşümlü kızılötesi raman spektroskopisi (FT-IR) ve viskozimetre ile belirlenmiştir. 2, 3, 7 ve 8 nolu preparatların deasetilasyon dereceleri sırasıyla %70.23, 78.96, 82.96 ve 80.48; moleküler ağırlıkları ise 48.272, 48.461, 53.419 ve 50.188 g/mol olarak hesaplanmıştır. Ticari olarak kullanılan kitosanların deasetilasyon dereceleri %70-95 arasında değişmektedir. Kısmi olarak saflaştırılan ürünlerimizin deasetilasyon derecelerinin söz konusu değer aralığında olması, bu ürünlerin ticari olarak önem arz ettiğini göstermektedir. 2 nolu preparatın diğer preparatlara göre düşük moleküler ağırlıkta ve düşük deasetilasyon derecesinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum preparatın test edilen 13 test bakterisinden 9'una karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite perspektifini açıklayabilmektedir.

Bacillus sp suşları kullanılarak sıvı fermantasyon ortamında kitinin kitosan biyodönüşümü gerçekleştirilmiş ve tıbbi açıdan önemli sayılabilecek antimikrobiyal aktiviteye sahip kitosan preparatlarının saflaştırılmasına yönelik elde edilen sonuçlarımız çalışmamızın hedefine ulaşıldığını göstermektedir. Ancak elde edilen bu ürünlerin antimikrobiyal ajanlara alternatif olarak değil de, inhibitör etkiyi artırıcı yardımcı ürün olarak endüstriyel alanlarda kullanımı söz konusu olabilecektir. Bu sebeple ileriki çalışmalarımızda, test edilen kloramfenikol ve kitosan preparatlarının karışımını içeren süspansiyonlarda antimikrobiyal aktivite incelenecektir. Böylelikle her iki ajanın olası sinerjik ve antagonistik etkileri test edilecektir.

Sağlık, kozmetik, gıda, tıp ve özellikle biyoteknolojik artım gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılan kitosan içerikli ürünler, deniz kabuklularının kabuk artıklarından kimyasal prosesler ile elde edilmektedir. Çalışmamız kapsamında bu geleneksel yöntemlere kıyasla maliyeti düşük biyolojik proseslere ile daha kısa sürede prototip kitosan eldesi, bilimsel ve endüstriyel uygulanabilirlik açısından sonuçlarımızı önemli kılmaktadır.

Kitosanın biyoparçalanabilirliği ve film oluşturma özelliği, gıda koruyucu olarak taze meyve/sebze, paketlenmiş balık ve işlenmiş et ürünlerindeki patojen bakterilerin ve mantarların inaktive edilmesi için kullanılmaktadır. Bu sebeple ileriki çalışmalarımızda kitosan preparatlarının maya ve küflere karşı antifungal etkisi de incelenecektir.

Yanık ve deri hasarlarında gram pozitif bakterilerin kolonileşmesini, ilk birkaç hafta içerisinde patojen gram negatif bakteriler ve anaerobların kolonizasyonu takip etmektedir. Bu sebeple çalışmamızda elde edilen kitosan süspansiyonlarının sağlık alanında kullanımının ifade edilebilmesi için obligat anaerob patojenlere (*C. tetani*, *C. perfringens*, *C. botulinum*) karşı da antimikrobiyal aktivitesi test edilecektir.

Sonraki çalışmalarımızda *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* suşlarından kitin içeren besi ortamında enzimatik biyodönüşümle elde edilen kitosan preparatlarının, bu *Bacillus* sp'ler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri de incelenecektir. Böylelikle biyodönüşüm sürecinde gerçekleşebilecek olası bir antibakteriyel aktivite ile kitosan preparatlarının düşük ve/veya yüksek aktivitesi üzerindeki dışsal nedenler açıklanabilecektir.

P. aeruginosa'da mutasyon sonucu sentezlenen dış membran proteini (OprH), polikationik antibiyotikler ve EDTA gibi ajanların bakterisidal etkisini bloke

etmektedir. Bu ajanlar dış membran ve divalent katyonların etkileşimini bozarak, membran geçirgenliğini arttırmakta ve patojen üzerinde bakterisidal etkiye sebep olmaktadır. Ancak negatif yüklü dış membrandaki divalent katyonlar ile OprH'nin yer değiştirmesi sonucu ajanlara karşı direnç gelişimi söz konusudur. Bu direnç sebebiyle hastane enfeksiyonlarının önemli etkeni olan, *P. aeruginosa*'ya karşı 2 nolu kitosan preparatının gösterdiği antimikrobiyal aktivite önem teşkil etmektedir. Bu sebeple ileriki çalışmamızda, 2 nolu kitosan preparatının patojenin biyofilm oluşturma ve dış membran proteinleri ile kazandığı direnç mekanizması üzerindeki etkisi de incelenecektir.



6. KAYNAKLAR

- Ak Kalut, S., 2008. Enhancement of degree of deacetylation of chitin in chitosan production. Bachelor Thesis, Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources University Malaysia Pahang, 1-34.
- Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Arbia, W., Arbia L., Adour, L., Amrane, A., 2012. Chitin extraction from crustacean shells by biological methods – A review. *Biogeb*, 1-37.
- Baba, Y., Noma, H., Nakayama, R., Matsushita, Y., 2002. Preparation of chitosan derivatives containing methylthiocarbamoyl and phenylthiocarbamoyl groups and their selective adsorption of copper (II) over ion (III). *Analytical Science*, 18(3), 359-361.
- Chung, Y. C., Yeh J. Y., Tsai C. F., 2011. Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the maillard reaction. *Molecules*, 16, 8504-8514.
- De Britto, D., Goy R. C., Filho S. P. C., Assis O. B. G., 2011. Quaternary salts of chitosan: history, antimicrobial features, and prospects. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-12.
- Demir, A., Seventekin N., 2009. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2), 92-103.
- Dutta, P. K., Dutta, J., Tripathi, V. S., 2004. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Endustrial Research*, 63, 20-31.
- Fang, W. F., Quiang, L. G., Yan, Z., Hao, H. Y., Ying Z. G., 2010. Screening and identification of A4 starin for producing chitin deacetylase. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 9.
- Gagne, N., 1993. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Master Thesis, Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University, Montreal, 1-121.
- George, T. S., Guru, K. S. S., Vasanthi, N. S., Kannan, K. P., 2011. Extraction, purification and characterization of chitosan from endophytic fungi isolated from medicinal plants. *World Journal of Science and Technology*, 1(4), 43-8.
- Goy, R. C., Britto, D., Assis, O. B. G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Ciência e Tecnologia*, 19, 241-47.
- İmamoğlu, Ö., 2011. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. *Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 215-22.

Jiang, L., 2011. Comparison of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosans. Ms Thesis, Louisiana State University China, 1-58.

Jia, Z., Shen, D., Xu, W., 2001. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. Carbohydrate Research, 333(1), 1-6.

Kauri K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., Bhardwaj, U., 2012. Isolation and characterization of chitosan-producing bacteria from Beaches of Chennai, India. Enzyme Research, 2012, 1-6

Khan, T. A., Peh, K. K., Ch'ng, H. S., 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 5(3), 205-212.

Knezevic-Jugovic, Z., Petronijevic, Z., Smelcerovic, A., 2010. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications. Editor: Sekwon, K. USA: CRC Press.

Koç, B. E., Özkan, M., 2011. Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. GIDA, 36(3), 161-168.

Kumar, M. N. V. R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46(1), 1-27.

Kumar, M. N., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemistry Research, 104, 6017-6084.

Kumar, A. B. V., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., Tharanathan, R. N., 2004. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. Biochemical Journal, 391, 167-174.

Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thoming, J., Stepnowski, P. 2011. "Biomedical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecularweight and degree of *N*-Acetylation", Polymers, 3, 1875-1901.

Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. International Journal of Food Microbiology, 144, 51-63.

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

Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., Yao, K. D., 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of Applied Polymer Science, 79, 1324-1334.

No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.

Ortega-Ortiz, H., Guti rre-Rodr guez, B., Cadenas-Pliego, G., Jimenez, L. I. 2010. Antibacterial activity of chitosan and the interpolyelectrolyte complexes of poly(acrylic acid)-chitosan. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 623-8.

Pagnoncello M. G. B., De Araujo N. K., De Silva P. N. M., De Assis C. F., Rodrigues S., De Macedo G. R., 2010. Chitosanase production by *Paenibacillus ehimensis* and its application for chitosan hydrolysis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 1461-68.

Peter, M. G., 2004. Chitin and chitosan in fungi, biopolymers. Editor: Steinb chel C. A. Germany: Wiley Online Library.

Prabu, K., Nataraja, E., 2012. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of chitosan isolated from *Podophthalmus vigil*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 75-82.

Raafat, D., von Bargaen, K., Haas, A., Sahl, H. G., 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764-3773.

Raafat, D., Sahl, H. G., 2009. Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2, 186-201.

Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M., Ng P. K. W., 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5814-5822.

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C., Smaggehe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1464.

Roberts, G. A. E., 2009. Thirty years of progress in chitin and chitosan, progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. Editor: Struszczyk, H. Poland: Polish Chitin Soc.

Shahidi, F., Arachchi J. K. V., Jeon Y. J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51.

Songa, R., Xuea, R., Hea, L. H., Liua, Y., Xiaob, Q. L., 2008. The structure and properties of chitosan/polyethylene glycol/silica ternary hybrid organic-inorganic films. *Chinese Journal of Polymer Science*, 26(5), 621-630.

Sun, L., Du, Y.; Fan, L.; Chen, X., Yang, J., 2006. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp cap. *Polymer*, 47, 1796-1804.

Tsai, G. J., Su W. H., 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *E.coli*. *Journal of Food Protection*, 62, 239-243.

Toharisman, A., Suhartono, M. T., 2008. Partial purification and characterization of chitin deacetylase produced by *Bacillus thermoleovorans* Lw-4-11. Scientific Repository, IPB Bogor Agricultural University, 1-10.

Varesano, A., Vineis, C., Aluigi, A., Rombaldoni, F., 2011. Antimicrobial polymers for textile products, science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Editor: Mendez-Vilas, A. Spain: Formatex Research Center.

Wang, X., Du Y., Liu, H., 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56, 21-6.

Wang, Y., Li, L., Li, B., Wu, G., Tang, Q., Ibrahim, M., Li, H., Xie, G., Sun, G., 2012. Action of chitosan against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Molecules*, 17, 7028-7041.

Wangtueai, S., Worawattanamateekul, W., Sangjindavong, M., Naranong, N., Sirisansaneeyakul, S., 2006. Isolation and screening of chitosanase producing microorganisms. *Kasetsart Journal : Natural Science*, 40, 944-948.

Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng, C. Y., Li, Y. K., 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 213-219.

Xiao-Fang, L., Xiao-Qiang, F., Sheng Y. A., 2010. Mechanism of antibacterial activity of chitosan against gram-negative bacteria. *Journal of Food Science*, 31(13), 148-153.

Xie, H., 2011. Preparation of low molecular weight chitosan by complex enzymes hydrolysis. *International Journal of Chemistry*, 3, 180-186.

Zamani, A., Taherzadeh, M. J., 2010. Production of low molecular weight chitosan by hot dilute sulfuric acid. *BioResources*, 5(3), 1554-1564.

Zhao, Y., Park, R. D., Muzzarelli, A. A. R., 2010. Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine Drugs*, 8, 24-46.

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

Zivanovic, S., Basurto, C. C., Chi, S., Davidson, P. M., Weiss, J., 2004. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. *Journal of Food Protection*, 67, 952-959.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İbrahim Halil ÇELİK

Doğum Yeri: NİZİP/GAZİANTEP

Doğum Tarihi: 08.06.1987

E posta: celikibrahim87@hotmail.com

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Okul, başlama ve mezuniyet yılı, şehir) :

Orta Öğretim: Yahya Altınbaş Lisesi, 2006, Nizip/GAZİANTEP

Lisans: Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2012, KARS

Yüksek Lisans: Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis (Devam ediyor).