

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIK ÇAY EKSTRAKTINDA ÜRETİLEN
ASPERGİLLUS NİGER KÜF MİSELLERİNDEN ELDE
EDİLEN KİTOSANIN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rukiye AVCI

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU

Ocak 2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATIK ÇAY EKSTRAKTINDA ÜRETİLEN
ASPERGİLLUS NİGER KÜF MİSELLERİNDEN ELDE
EDİLEN KİTOSANIN ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rukiye AVCI

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 18.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

İmza (Bu satır çıktı almadan önce silinecektir.)

Rukiye AVCI

18.01.2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Arzu ÇAĞRI MEHMETOĞLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2021-7-24-41) teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca her daim yanımda olan, maddi ve manevi her türlü destek veren çok kıymetli eşim Metin AVCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLOLAR LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kitin ve Kitosan	3
2.1.1. Kitin ve kitosanın özellikleri	5
2.1.2. Kitin ve kitosanın uygulama alanları	9
2.2. Kitin ve Kitosan Kaynakları	12
2.3. Mikroorganizmalardan Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu	13
2.4. Kitinden Kitosan Üretim Yöntemleri	14
2.4.1. Kimyasal yöntem	16
2.4.2. Enzimatik yöntem	18
2.5. Kitosan Verimini Etkileyen Faktörler	18
2.5.1. Besiyerinin kompozisyonu	19
2.5.2. Sıcaklık	21
2.5.3. pH	22

2.5.4. Ekstraksiyon yöntemi	23
2.6. Atık Maddelerin Küf Misellerinden Kitosan Üretimi İçin Besiyeri Olarak Kullanımı	24
2.6.1. Çay	25
2.7. <i>Aspergillus Niger</i> 'in Genel Özellikleri	26
2.8 <i>Aspergillus Niger</i> 'den Kitosan Üretimi	27

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Kimyasallar	30
3.1.2. Kullanılan araç-gereçler	30
3.1.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Atık çay ve çay ekstraktının hazırlanması	32
3.2.2. Kullanılan mikroorganizmalar	33
3.2.3. <i>Aspergillus niger</i> küfünden kitin ve kitosan eldesi	33
3.3. Analizler	37
3.3.1. Fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) ölçümü	37
3.3.2. Vizkozite	37
3.3.3. Alan emülsiyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ölçümü	37
3.3.4. İnhibisyon testi	38
3.3.5. Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi	40
3.3.6. NMR analizi	40
3.3.7. İstatistiksel analizler	40

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Kitosan Verimi	41
4.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Ölçümü	44
4.3. Fungal Kitosanın Antimikrobiyal Özellikleri	47

4.4. Deasetilasyon Derecesinin Sonuçları	49
4.5. Alan Emülsiyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) Sonuçları	50
4.6. NMR Sonuçları	53
4.7. Vizkozite Sonuçları	56
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ASPN	: <i>Aspergillus niger</i> 'den elde edilen kitosan
cm	: Santimetre
Da	: Dalton
FT-IR	: Fourier transform infrared spektroskopisi
mg	: Miligram
ml	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
PDA	: Potato dextrose agar
µL	: Mikrolitre
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
TCK	: Ticari kitosan
TSA	: Tyriptic soy agar
TSAYE	: Tyriptic soy agar + yeast extract
TSB	: Tyriptic soy broth
TSBYE	: Tyriptic boy broth + yeast extract

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kitosanın fonksiyonel grupları	4
Şekil 2.2 Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.3. Asya ülkelerindeki kitin ve kitosan üretimi	15
Şekil 2.4. Kitinin kimyasal dönüşümü sonucu kitosan oluşması	16
Şekil 3.1. Kitosan üretimi için kullanılan siyah çay	32
Şekil 3.2. Süzölmüş çayda geliştirilen <i>A. niger</i>	33
Şekil 3.3. İki farklı ortamda geliştirilen <i>A. niger</i>	34
Şekil 3.4. Besiyeri ortamlarında gelişen <i>A. niger</i> biyokütleleri	34
Şekil 3.5. Küf biyokütlelerinin tartıldıktan sonra NaOH ile karıştırılması	35
Şekil 3.6. Nötürlenerek alınan küf peletlerinin asetik asit çözeltisi ile karıştırılarak 35 su banyosunda ekstraksiyona alınması	
Şekil 3.7. Kitosanın elde edilmesi için uygulanan adımlar	36
Şekil 3.8. Liyofilizasyon ile elde edilen kitosanlar	37
Şekil 3.9. İnhibisyon testi için hazırlanan petriler	38
Şekil 3.10. Ependorf tüplerine steril olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarda 39 hazırlanan kitosanlar	
Şekil 4.1. Farklı yoğunluktaki çay ekstraktının küf gelişimi ve kitosan verimine 42 etkisi	
Şekil 4.2. Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları ve tepe değerleri	44
Şekil 4.3. <i>A. niger</i> fungusundan elde edilen kitosanın FT-IR analizi	46
Şekil 4.4. <i>S. aureus</i> 'un inhibisyon testinin görüntüsü	49
Şekil 4.5. <i>A. niger</i> 'den üretilen kitosanın SEM görüntüleri (a) ve ticari kitosandan 51 elde edilen SEM görüntüleri (b)	
Şekil 4.6. Kitosanların mineral dağılım spektrumları	52
Şekil 4.7. Kitosanın H-NMR Spektrumu	54
Şekil 4.8. 65 °C'de D ₂ O içinde kitosanın H-NMR spektrumu	55

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Kitin ve kitosanın çözünürlük profilleri	4
Tablo 2.2. Kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünebilirlik durumu	6
Tablo 2.3. Kitosanın özellikleri	7
Tablo 2.4. Yapısal parametreler ve özellikleri arasındaki ilişki	8
Tablo 2.5. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri	8
Tablo 2.6. Kitosanın bazı kullanım alanları ve uygulamaları	11
Tablo 2.7. Kitin ve kitosanın biyosferdeki bazı kaynakları	12
Tablo 2.8. Mantar ve küflerin kitin ve kitosan içerikleri	13
Tablo 2.9. Depolimerizasyon derecesinin değiştirdiği özellikler	15
Tablo 2.10. Kuru siyah çayın mineral bileşimi	25
Tablo 3.1. İnoküle edilmek için hazırlanan konsantrasyonlar	38
Tablo 3.2. Disk difüzyon testi için inkübasyon şartları	39
Tablo 4.1. Farklı yoğunluktaki çay ekstraktının küf gelişimi ve kitosan verimine etkisi	41
Tablo 4.2. Farklı mikroorganizmalardan üretilen kitosan miktarı	43
Tablo 4.3. Fungal kitosanların konsantrasyonlarına göre antimikrobiyal aktiviteleri	47
Tablo 4.4. Ticari kitosanın konsantrasyonlarına göre antimikrobiyal aktiviteleri ...	47
Tablo 4.5. Kitosan çeşitlerinin deasetilasyon sonuçları	49
Tablo 4.6. Kitosanların viskozite değerleri	56

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Aspergillus niger*, kitosan, atık çay

Bu çalışmada, atık çayda üretilen *Aspergillus niger*'den, kimyasal yöntemlerle kitosan üretilerek, üretilen kitosanın belirli özellikleri araştırılmıştır. Üretilen fungal kitosanın özellikleri ticari kitosan ile kıyaslanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında atık çaylar kurutulmuş %5, %10 ve %20 konsantrasyonlarda sterilize edilmiş çay-su karışımları elde edilmiştir. Diğer aşamalarda, *A. niger* küfü Tryptic Soy Broth ve 0,6 yeast extract besiyerinde aktifleştirildikten sonra 5 gün 25°C'de geliştirilmiştir. Elde edilen biyokütleden kimyasal yöntem kullanılarak kitosan ekstraksiyon edilmiştir. Elde edilen kitosanın yapısal özellikleri FT-IR, FESEM ve NMR ile belirlenmiştir. FESEM görüntüleri 500x, 1000x, 5000x ve 10000x büyütme oranlarıyla görüntülenmiştir. NMR analizi D₂O ve D₆ çözücüsü kullanılarak yapılmıştır. Üretilen kitosanın antimikrobiyal özellikleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, mayalara ve küflere karşı disk difüzyon testi kullanılarak analiz edilmiştir. Bunun yanı sıra üretilen kitosanın, deasetilasyon derecesi titrasyon yöntemi ile viskozitesi ise vizkozimetre kullanılarak belirlenmiştir. Üç farklı konsantrasyona sahip besiyeri ortamındaki kitosanların verimi %20'lik çay ekstraktından %17,5, %10'luk çay ekstraktından %15,7 ve %5'lik çay ekstraktından %13,9 olarak bulunmuştur (p<0,05). Elde edilen FT-IR spektrumlarının diğer *A. niger* kitosanı ve ticari kitosan ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. cerevisiae*'ye karşı, en az antimikrobiyal aktiviteyi ise *A. sydowii*'ye karşı göstermiştir. Ticari kitosan, fungal kitosana göre test edilen mikroorganizmalara karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Fungal kitosanın deasetilasyon derecesi en yüksek %92, ticari kitosanın deasetilasyon derecesi yakın olarak %89 bulunmuştur. Fungal kitosanın porlu ve fiber yapıda olduğu, ticari kitosanın fiber yapıda olduğu gözlenmiştir. Ticari kitosanın element içeriğini gösteren spektrumda, karbon değeri daha yüksek olduğu için ticari kitosanın daha uzun zincire sahip olduğu, fungal kitosanın sodyum miktarının ticari kitosandan daha fazla olduğu görülmüştür. NMR sonuçlarından elde edilen spektrumlarda üretilen kitosanın N-asetil glikozamin miktarının yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir. Fungal kitosanın viskozitesi 0,5-0,8 centipoises (cP) ve ticari kitosanın viskozitesi 4,0-4,3 centipoises (cP) olarak bulunmuştur. Araştırmada elde edilen bulgulara göre, çevre açısından önem kazanan atık maddelerin değerlendirilmesi amacıyla atık çaylarda geliştirilen *A. niger* küfünden kitosan üretimi ilk defa gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma bu konudaki araştırmalar için yol gösterici olabileceği sonucuna varılmıştır.

THE DETERMINATION OF PROPERTIES OF CHITOSAN OBTAINED FROM *ASPERGILLUS NIGER* MOLD MICELLS GROWN IN WASTE TEA EXTRACT

SUMMARY

Keywords: *Aspergillus niger*, chitosan, waste tea

This study investigated specific properties of chitosan produced by chemical methods from *Aspergillus niger* produced in tea waste. The properties of the produced fungal chitosan were compared with commercial chitosan. In the first stage of the study, tea waste was dried, and sterilized tea-water mixtures were obtained at 5%, 10%, and 20% concentrations. In other stages, *A. niger* mold was grown at 25°C for five days after activating Tryptic Soy Broth and 0,6 yeast extract medium. Chitosan was extracted from the obtained biomass using a chemical method. FT-IR, FESEM, and NMR determined the structural properties of the obtained chitosan. FESEM images were viewed with magnifications of 500x, 1000x, 5000x and 10000x. NMR analysis was performed using D₂O and D₆ solvent. In addition, its antimicrobial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and molds were analyzed using the disk diffusion test. In addition, the deacetylation degree of the produced chitosan was determined by the titration method, and its viscosity was determined using a viscometer. The yield of chitosans in the nutrient medium with three different concentrations was found to be 17,5% from 20% tea extract, 15,7% from 10% tea extract and 13,9% from 5% tea extract (p<0,05). It was observed that the obtained FT-IR spectra were compatible with other *A. niger* chitosan and commercial chitosan. It showed the highest antimicrobial activity against *S. cerevisiae* and the least antimicrobial activity against *A. sydowii*. Commercial chitosan showed more antimicrobial activity against the tested microorganisms than fungal chitosan. The deacetylation degree of fungal chitosan was found to be the highest at 92%, while the deacetylation degree of commercial chitosan was close to 89%. It has been observed that fungal chitosan has a porous and fiber structure, while commercial chitosan has a fiber structure. In the spectrum showing the elemental content of commercial chitosan, it was seen that commercial chitosan had a longer chain because the carbon value was higher, and the sodium amount of fungal chitosan was higher than commercial chitosan. The spectra obtained from the NMR results determined that the amount of N-acetyl glucosamine produced in chitosan was concentrated. The viscosity of fungal chitosan was found to be 0.5-0.8 centipoises, and the viscosity of commercial chitosan was 4.0-4.3 centipoises. The findings obtained in the study, the production of chitosan from *A. niger* mold developed in tea waste was carried out for the first time in order to evaluate the waste materials that have gained importance in terms of the environment, and it was concluded that this study could be a guide for research on this subject.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Kitin, N-asetil-D-glukozamin birimlerine sahip bir yapı oluşturmaktadır. Sulu çözücülerde ve organik çözücülerde çözünmemesi nedeniyle endüstriyel kullanımı çok azdır. Selülozdan sonra doğada çok yaygın bulunan, yenilenebilir ve elde edilmesi kolay bir biyopolimerdir (Bartnicki-Garcia, 1968).

Bazı funguslarda, suda yaşayan kabuklu canlılarda, ve böceklerde bulunmaktadır. Kitinin en önemli türevlerinden biri olan kitosan molekül zincirindeki N-asetil-D-glukozamin birimlerinin, D-glukozamin birimlerine dönüştürülmesi yani deasetilasyon işlemiyle elde edilmektedir. Deasetilasyon derecesi en az %60 olan kitine, kitosan denmektedir ve kitosanı kitinden ayıran temel parametre, deasetilasyon derecesidir (Aiba, 1992).

Kitosan doğadaki en önemli ve en fonksiyonel doğal polimerlerdendir. Kullanım alanının geniş olması ve türevlenebilir olması onu daha cezbedici bir hale getirmektedir. Kitosanın; doğal bir kaynak olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve çevre kirliliğine sebep olmaması, bitkisel ve hayvansal dokular için uyumlu olması ve toksik bir etkisinin olmaması, biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olması, molekül yapısının değiştirilebilir olması nedeniyle endüstriyel alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanım alanına sahiptir (Tharanathan ve Kittur, 2003; Dutta ve ark., 2004; Aranaz ve ark., 2009).

Günümüzde ticari olarak kitosanın üretimi, genellikle kabuklu atıklardan ekstraksiyon işlemi ile elde edilen kitinden elde edilmektedir. Fakat bu kitin kaynağının elde edilmesinde kabukluların yapılarındaki proteinlerden kaynaklı alerji risklerinin olması, mevsimsel şartların sınırlandırması gibi bazı dezavantajları vardır (Nwe ve Stevens, 2002).

Bu gibi dezavantajların olmaması için, fermantasyon teknolojisiyle mikroorganizmaların büyük ölçekli çoğaltılmasıyla, hücre duvarında kitin ve kitosan bulunan fungal canlıların ek kaynak olarak kullanılması için çalışmalar uygulanmaya başlamıştır. Küfler, ilkel besleyici ortamlarda kolaylıkla üreyebilme ve çoğalma özellikleri sayesinde ucuz ve sınırsız bir kaynak olması, az miktarda mineral içermeleri sebebiyle, ekstraksiyon işleminde kabuklu canlılarda yapılan demineralizasyona gerek duyulmaması gibi olumlu yönleri sahiptir (Teng ve ark., 2001; Wu ve ark., 2005).

Ayrıca kitosanın; fermantasyon şartlarında fizikokimyasal özellikleriyle (deasetilasyon, molekül ağırlığı, viskozite gibi) bazı değişikliklerin yapılmasıyla kontrol edilebilmektedir (Nwe ve Stevens., 2002).

Kitosan birçok sanayi dalında kullanılan antimikrobiyal ve antioksidant özelliklere sahip bir polisakkarittir. Kitosan endüstride deniz ürünlerinin kabuklarından ekstrakte edilerek üretilir. Bu yöntem mevsimsel sınırlamaları olan ve çevreye zarar veren bir yöntem olduğu için araştırmacılar alternatif bir yöntem olan küf misellerinden üretimi üzerine çalışmalara yönelmiştir. Bu projede de atık çay otları küf üretiminde besiyeri olarak kullanılarak kitosan üretim maliyetinin düşürülmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda projemizin amacı atık çayda üretilen *Aspergillus niger*'den, kimyasal yöntemlerle kitosan üretmek ve üretilen kitosanın belirli özelliklerini belirlemektir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

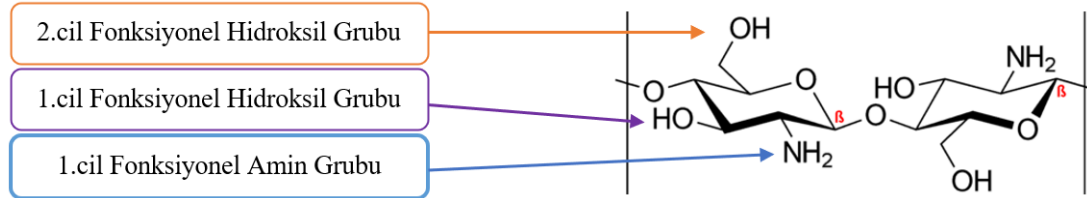
2.1. Kitin ve Kitosan

Selüloz birinci olmak üzere, yeryüzündeki en yaygın bulunan diğer polimer kitindir. Kitin bazı omurgasız ve kabuklu canlıların iskeletinde olmakla birlikte fungusların hücre duvarındaki, koruyucu ve destekleyici göreve sahip temel bir bileşendir (Rinaudo, 2006).

Kitin katı formunda molekül içinde ve moleküller arasında hidrojen bağlarının varlığı sayesinde kimyasal olarak kararlı bir polimerdir. Kitosan hemen hemen doğada bulunan tek katyonik polisakkarit olma özelliğine sahiptir. Kimyasal modifikasyonu ile birlikte farklı fonksiyonel grupların eklenmesi; hidrofobik, katyonik ve anyonik özelliklerinin kontrolünü sağlamaktadır (Mourya ve Inamdar, 2008).

Kitosanın çözünürlüğü önemli bir parametredir ve bu maddenin üretimi amacıyla; kullanılacak olan kitin kaynaklarına, moleküler ağırlıklarına, ortamdaki metal-iyonlarının olup olmamasına, çözgen amaçlı kullanılacak asitlerin karakterine, konsantrasyon seviyesine göre farklılık gösterir. Moleküler ağırlığının artması ile polimerik zincirinin metal ile ters bağ sayısı arttıkça çözünürlükleri de azalır. Kitosanın su içerisinde, inorganik olmayan çözücüler içerisinde, nötr ve yüksek pH seviyelerinde çözünemediği görülmüştür. Güçlü olmayan organik asit karışımlarında (asetik asit gibi) pH'nın 6 seviyesinin altında çözünmektedir (Kumar, 2000; Kurita, 2006). Fakat düşük molekül ağırlığa sahip kitosan oligosakkaritleri su içerisinde çözünebilmektedir. pH-7'nin altındaki koşullar altında çözünebilen kitosan, amino grupları ile protonu bağlayarak pozitif yük almaktadır.

Depolimerizasyon derecesi etkilenmeden kitosan kimyasal olarak türevlenebilir. Bunun nedeniyse kitosanın fonksiyonel gruplarıdır. Bu gruplar; birincil amino fonksiyonel ve birincil, ikincil hidroksil fonksiyonel gruplarıdır. Şekilde 2.1.'de bahsedilen fonksiyonel gruplar görülmektedir (Mourya ve Inamdar, 2008).



Şekil 2.1. Kitosanın fonksiyonel grupları

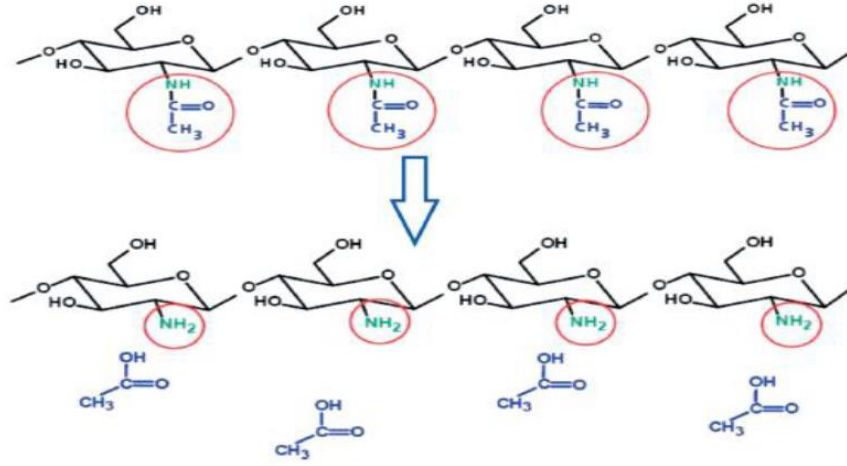
İki polimerin de reaktif hidroksil ve amino grupları bulunmaktadır. Ancak kitin daha çok kristalize yapıya sahiptir. Kitosanın daha az kristalize özelliğe sahip olmasından dolayı reaktiflere daha açık haldedir. Bundan dolayı türevlenebilmesi de daha kolaydır. Aralarındaki en büyük fark ise çözünürlükleridir; kitini çözebilen çok düşük sayıda solvent mevcuttur. Fakat kitosan hemen hemen tüm asit solüsyonlarında çözünür. En yaygın kullanılanları ise formik asit ve asetik asit solüsyonlarıdır. Kitosanın zincirindeki amino grupları, asit etkisiyle protonasyona uğrar, böylece çoklu katyonik alanlar oluşur. Bunun sonucu da polarizasyonu ve elektrostatik itme derecesini arttırdığından dolayı çözünürlüğü de artar. Tablo 2.1.'de kitin ve kitosanın çözünürlük profilleri görülmektedir (Mourya ve Inamdar, 2008).

Tablo 2.1. Kitin ve kitosanın çözünürlük profilleri

KİTİN	KİTOSAN
- Dimetilasetamid, dietilasetamid'de %5 Lityum klorür - N-metil-2-pirolidon'da lityum klorür - CaCl₂.2H₂O ile doyurulmuş metanol - Hekzafüloraseto seskohidrat - 1,2-dikloroetan ve trikloroasetik asit karışımı (35:65) - Taze doyurulmuş lityum tiosiyanat solüsyonu	- Seyreltik organik ve mineral asit çözeltileri pH<6,5 dimentilsülfoksit - p-Toluensülfanik asit - 10-Komporsülfonik asit

Kitosan ile kitinin aralarındaki en önemli fark, kitinin C-2 pozisyonunda olan (2. C atomu) asetamido (-NHCOCH₃) grubunun yerine, kitosandaki amin (-NH₂) grubuna sahip olmasıdır (Şekil 2.2.). Kitosan, C-6, C-3 ve C-2 olan 3 reaktif gruba sahiptir. 3

grup kolayca kimyasal modifikasyona uğrayarak fiziki özellikleriyle çözünürlüğü etkilemektedir (Demir ve Seventekin, 2009).



Şekil 2.2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları

2.1.1. Kitin ve kitosanın özellikleri

Çok miktarda biyolojik aktiviteye sahip olan kitosanlar, biyolojik olarak parçalanabilir bir polimerlerdir. Deasetillenmiş amino grupları daha reaktif olan, film oluşturabilen, şelatlayabilen, adsorbsiyon kapasitesi yüksek olan, yüksek biyolojik uyumluluğa sahip bir polimer olması ve diğer fizikokimyasal özellikleri sayesinde pek çok önemli alanda kullanıma sahiptir. En önemli özelliklerinden bir tanesi antibakteriyel özelliğidir. Bu özellik bakterinin türü, kitosanın konsantrasyonu, ortamın pH'sı, kitosan için kullanılan çözücünün türü, kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine göre farklılıklar göstermektedir. Genellikle depolimerizasyon derecesi %14'e yakın kitosan türlerinde polikasyonik doğal yapıdan kaynaklanan daha etkili sonuçlar bulunmuştur. Buna ek olarak; düşük molekül ağırlıklı kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, orta ya da yüksek ağırlıklı olanlara göre daha fazladır. Kitosanın konsantrasyonu yükseldikçe inhibisyon derecesi de artmaktadır (Kumar ve ark., 2007).

Kitosanın moleküler ağırlığı, doğadaki haliyle ve yapay olan polimerler ile kullanılması açısından çok önemlidir. Kitin ve kitosanın moleküler ağırlıkları;

deasetilasyon koşullarına ve elde edilen kaynağa göre değişkenlik göstermektedir. Ortamdaki çözünmüş oksijen veya yüksek sıcaklıklar sebebiyle kitosanın parçalanması ile molekül ağırlığı da azalmaktadır. Kitosan, 280°C ve üzeri sıcaklıklarda parçalanmaya başlar ve polimer zinciri koparak molekül ağırlığı azalmaktadır (Agboh ve Qin, 1997; Cardoso ve ark., 2012).

Sıcaklık, viskozite, deasetilasyon gibi değişkenler kitosanı etkilemektedir (Knittel ve Schollmeyer, 1998; Stamford ve ark., 2013).

Tablo 2.2.'de kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünürlük durumu gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünürlük durumu (Berger ve ark., 2004).

Asitler	Kitosan Konsantrasyonu				
	%1	%5	%10	%50	>%50
Asetik	+	+	+		
Sitrik	-	+	+		
Formik	+	+	+	+	+
Laktik	+	+	+		
Malik	+	+	+		
Malonik	+	+	+		
Tartarik	-	-	+		

(+): çözünür, (-) çözünmez

Kitosan asidik ortamlarda NH_2 grubu $-\text{NH}_3^+$ şeklinde bulunmaktadır (Tablo 2.3.). Ortamda bulunan anyonik gruplar ile elektrostatik olarak etkileşim haline gelmektedir. Proton haline gelmiş olan pozitif çoklu elektrolit davranışında bulunmakta, birçok viskozik çözelti oluşturarak negatif yüke sahip moleküller yüzeyler ile reaksiyona girmektedir. Kitosan; çözünürlük, fizikokimyasal değişkenlikler veya filme dönüştürülmesi gibi uygulama alanlarında çok önemli bir parametredir (Knittel ve Schollmeyer, 1998; Cardoso ve ark., 2012; Stamford ve ark., 2013).

Tablo 2.3. Kitosanın özellikleri (Sandford, 1989).

Kitosan	
Katyonik Özellikleri	-Doğrusal Polielektrolit, -Yüksek yük yoğunluğu, -Mükemmel topaklaştırma, -Metal iyonlarını şelatlama: Demir (Fe), Bakır (Cu), Toksik metaller (Cd, Hg, Pb, Cr, Ni), -Radyonüklitler (Pu, U).
Biyolojik Özellikleri	-Biyouyumlu: Toksik olmayan, geri dönüştürülebilir, doğal polimer, -Biyoaktivite: Hızlı yara iyileştirmek, kan kolesterol seviyelerini düşürmek, bağışıklık sistemi destekleyici.
Kimyasal Özellikleri	-Doğrusal poliamin (poly-D-gluc.), -Reaktif amino gruplar, -Reaktif hidroksil gruplar (C3-OH, C6-OH).
Çözünme Özellikleri	-Serbest amin (NH_3), -Asit solüsyonlarında çözünme: $\text{pH} > 6,5$'de çözünmeme, H_2SO_4'te çözünmeme, H_3PO_4'te sınırlı çözünme, çoğu organik çözücüde çözünmeme, -Katyonik amin ($-\text{NH}_2$): $\text{pH} < 6,5$'te çözünme, vizkoz çözelti, oluşturabilme, solüsyonları keserek seyreltme, bazı su-alkon karışımlarında çözünür kalabilme.

Kitin ve kitosanın yapılarında yüksek oranda azot bulunması sebebiyle, diğer biyopolimerlere kıyasla ticari olarak daha fazla öneme sahiptir. Kitinde bulunan azotun miktarları, Deasetilasyon derecesine göre %5 ile %8 arasında olmaktadır. Kitosanda ise %6 civarındadır. Kitosanda bulunan azotun miktarı çoğu zaman birincil-alifatik-amino grup olarak bulunmaktadır. Bu gruplar, kitosanın kimyasal değişimi için daha uyumlu duruma getirmektedir. Kitosanın bahsedilen özelliği, amin bileşikleriyle özel reaksiyon gerçekleştirmektedir (Kumar, 2000).

Kitosanın fizikokimyasal özellikleri; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite ve çözünürlüktür. Deasetilasyon derecesi, kitosan için çok önemli bir

parametredir. Biyobozunurluğunu ve bağışıklığı destekleyici aktivitesini etkilemektedir (Tolaimate ve ark., 2000), (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4. Yapısal parametreler ve özellikleri arasındaki ilişki

Özellik	Yapısal Parametre	Kaynak
Çözünürlük	↑ DD	(Cho ve ark., 2000; Chatelet ve ark., 2001)
Kristalinite	↓ DD	(Aranaz, 2009)
Biyobozunurluk	↓ DD ↓ MA	(Kurita ve ark., 2000; Kofuji ve ark., 2005)
Viskozite	↑ DD	(Kofuji ve ark., 2005)
Biyouyumluluk	↑ DD	(Aranaz, 2009)
Antimikrobiyal	↑ DD ↑ MA	(Liu ve ark., 2001)

- ↑ Özelliği doğru yönde etkiler; ↓ Özelliği ters yönde etkiler.

- DD: Deasetilasyon derecesi; MA: Molekül ağırlığı

Kitosanın viskozitesi; konstantrasyona, sıcaklığa ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişmektedir. Viskozite ve deasetilasyon derecesi ile doğru orantılı, sıcaklık ile ters orantılı artmaktadır. Demineralizasyon süresinin artması viskozitenin düşmesine neden olmaktadır. Moleküler ağırlığı ve linear dallanmamış yapısı sebebiyle asidik ortamlarda ideal bir kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Chen ve Tsaih, 1998; Stamford ve ark., 2013), (Tablo 2.5.). Kitosan çözeltisinin 4°C civarlarında depolanması, kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi dayanıklılığı sağladığı görülmüştür.

Tablo 2.5. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri (Sezer, 2007).

Kitosan Türleri	Deasetilasyon Derecesi (DD) %	Viskozite (cps)
HMw	81.60	2040
MMw	81.40	286
LMw	80.60	115

2.1.2. Kitin ve kitosanın uygulama alanları

Kitosanın birçok ülkede kullanım oranı yüksek olmasına rağmen ülkemizde bu oran daha düşüktür. Günümüzde kitosan çok fazla geniş alanlarda kullanılabilmektedir (tıp, gıda, kozmetik, eczacılık, tekstil vb.) (Demir ve Seventekin, 2009). Kitosan türevleriyle devam eden geniş çaplı çalışmalar yapılmakta, farklı kullanım alanları ve değişkenleri elde etmek temel hedef haline gelmiştir (Elibol, 2008; Stamford ve ark., 2013).

Kitosan, organik bileşiklerle olduğu gibi birçok anyonik ve noniyonik polimerler ile de geçimlidir. Çok değerlikli anyonik yapılar ile çapraz bağ oluşturarak jel ve çökelti oluşturmaktadır. Cıva, kadmiyum, çinko, nikel, bakır, mangan, altın ve platin gibi metal iyonlara karşı yüksek eğilim göstermekte ve kompleks oluşturmaktadır (Skaugrud, 1989; Bhatia ve Ravi, 2003). Bu özellikleri sayesinde kirletilmiş suların cıva ve kurşun gibi ağır metallerin arındırılmasında kullanılmaktadır (Oshita ve ark., 2002; Luis ve ark., 2003; Cardoso ve ark., 2012).

Kitosan sağlık endüstrisinde, taşıyıcı temel yardımcı malzeme amaçlı; tablet, hidrojel ve mikropartiküler sistemin yapılmasında kullanılabilmektedir (Illum, 1998; Ofori ve Fell, 2003; Lúcia ve ark., 2014).

Bu anlamda, biyokimyasal özellikleri iyi bilinen kitin ve kitosan türevleri kullanılarak, polimerizasyon, iyonotropik jelleşme gibi yöntemler ile oluşturulmuş olan nano-mikroküre, nano-mikrokapsül ve boncuklar, ilaç taşıma amaçlı sistem olarak yüksek potansiyele sahiptir (Junginger ve Verhoef, 1998; Kaş, 2002).

Bazı çalışmalarda kitosanın; kolesterolü düşürücü, kansere karşı etkili, antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip olduğu görülmüştür (Rinaudo, 2006).

Kitosan, bağırsaklarda yağ emilimini azaltır. Plazma kolesterolü ve trigliserit seviyesini düşürebilmektedir. Aynı zamanda toksik özelliğe sahip olmaması, vücutta kolayca parçalanabilmesi, maliyetinin çok düşük olması gibi özellikleri gıdalarda

kullanımını arttırmaktadır. Kitosanın hipokolesterolemik etkisi üzerine bir araştırma yapılmış olup bu çalışmada sağlıklı erkeklerin belirli sürelerde diyetlerine kitosan eklenmiş ve ölçümler yapılmıştır. Sonrasında ise, erkek bireylerden alınan kanların toplam serum kolesterol seviyelerine bakıldığında büyük ölçüde azalmalar görülmüştür. Kitosan, aynı zamanda HDL kolesterol seviyesini arttırmaktadır. Bu yönüyle de kolesterol hastaları için kullanılan ilaçlarda kitosanın kullanımı alternatif bir kaynak olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Maezaki ve ark., 1993; Berger ve ark., 2004).

Kitin, kitosan ve türevlerinin gıdalarda ne gibi kullanım alanlarının olduğuna bakıldığında; kitosan daha çözünür özellikte olmasıyla birlikte polikasyonik özelliğe de sahiptir. Yüksek adsorbsiyon kapasitesi, jel oluşturabilme ve çelat oluşturabilme özellikleri de vardır (Kurt ve Zorba, 2005), (Tablo 2.6.).

Gıdaların paketlenmesi için biyobozunur polimerlerin kullanılması çevresel ve fonksiyonel katkılarından dolayı gittikçe artmaktadır. Bu amaçla kitosan yaklaşık %2 asetik asit veya formik asit içerisinde çözünür ve düz bir zemin üzerine dökülerek film oluşumu sağlanır. Kitosandan hazırlanan filmlerin önemli bir özelliği oksijen geçirgenliğidir. Bu nedenle özellikle yara iyileştirme tedavisi gibi çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılabilmektedir. Ayrıca kitosan yenilebilir olmasından dolayı üretilen gıdalara, kapsülleme malzemelerine veya paketlenme materyallerine rahatça uygulanabilir (Gagne, 1993).

Kitosan meyve suyu endüstrisinde de kullanım alanı bulmuştur. Meyve sularının durultulması işlemlerinde bulanıklık etkeni olan partiküllerin kitosan veya tuzları olan maddeler ile çökmesi sağlanabilmektedir. Bu işlemlerde kitosan pozitif yüke sahipken, meyve suyundaki partiküller de negatif yüke sahiptir. Birleşince çökme işlemi meydana gelmektedir (İmeri ve Knoor, 1998).

Tablo 2.6. Kitosanın bazı kullanım alanları ve uygulamaları (Rinaudo, 2006).

Kullanım Alanı	Uygulamaları	Kaynak
Gıda	-Doğal kıvamlaştırıcı -Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi -Filtreleme ve temizleme -Boyar maddenin uzaklaştırılması	(Hirano, 1996; Shahidi ve ark., 1999)
Medikal	-Yara bandı -İlaç salım sistemleri -Diş uygulamaları -Pıhtılaşma etkeni -Cerrahi uygulamalar	(Dodane ve Vilivalam, 1998; Jayakumar ve ark., 2010)
Biyoteknoloji	-Enzim immobilizasyonu -Hücre geri kazanımı -Kromatografi -Protein saflaştırma	(Hirano, 1996; Spagna ve ark., 2001)
Kozmetik	-Nemlendirici -Saç ve cilt bakımı -Banyo losyonu	(Hirano, 1996; Harish Prashanth ve Tharanathan, 2007)
Atık su arıtımı	-Metal iyonların, radyoaktif bileşiklerin ve boyaların uzaklaştırılması -Koagülasyon ve flokülasyon	(Hirano, 1996; No ve ark., 1996; Arthur Felse ve Panda, 1999; Rinaudo, 2006)
Ziraat	-Bitki tohumu kaplanması -Gübre yapımı -Fungusit	(Hirano, 1996; Wu ve ark., 2005; Harish Prashanth ve Tharanathan, 2007)

Kitosanın suda çözünbilme özelliği ile yaraların iyileşmesinde olumlu etkiye sahip olduğu görülmüştür (Jayakumar ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada suda çözünbilme özelliğine sahip olan kitosanı, araştırmada kullandığı yaralı tavşanların sırtlarına yapıştırarak yaranın hızlıca iyileştiği gözlemlenmiştir (Cho ve ark., 1999).

Şimdilerde ise kitosan tabanlı bandajlar medikal alanlarda çok ilgi görmüştür. Bu kitosan tabanlı bandajlar Irak körfez savaşlarında da kullanılmıştır. Ölümcül hastalıkların yaklaşık %70'inin tedavisinde başarılı olduğu raporlanmıştır.

Muzarelli ve arkadaşları (1982) yaptığı başka çalışma sonucunda yeni bir kitosan olarak adlandırılan 5-metilpirolidinon kitosanı keşfedilmiştir. Yaralar üzerine sürüldüğünde lizozim enziminin etkisi ile üretilen oligomerin yapıya geçişi gözlemlenmiştir. Kitinle alakalı yapılan çalışmaların sonucunda Beschitin® (Unitika) isminde yara bandı üretilmiştir. Bu bant kitin içerikli ve nonwovendan yapılmıştır. Japonya'da ise satışa sunulmaktadır (Muzzarelli ve ark., 1982).

2.2. Kitin ve Kitosan Kaynakları

Kitin ve kitosan; biyosferde su canlılarında, böceklerde ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Tablo 2.7.). Kitin mikrofibrillerinin alfa, beta ve gamma olmak üzere üç farklı yapısı vardır. Alfa yapısı doğada en fazla bulunan formudur ve antiparalel zincir yapısına sahiptir. Kabuklu su canlılarının kabuklarında, küflerin hücre duvarlarında, mayalarda ve böceklerde bulunmaktadır. Beta formu paralel zincir yapısına sahiptir ve doğada daha az görülmekte olup mürekkep balığının kollarında bulunur. Gamma formu ise paralel ve antiparalel yapıların karışımı olarak böceklerin kozalarında görülür (Zhang ve ark., 2000).

Tablo 2.7. Kitin ve kitosanın biyosferdeki bazı kaynakları (Mathur ve Narang, 1990).

Su Canlıları	Böcekler	Mikroorganizmalar
Halkalı solucanlar	Akrepler	Yeşil alg
Yumuşakçalar	Örümcekler	Kahverengi alg
Deniz Omurgasızları	Karıncalar	Maya
Kabuklular:	Kolsu Ayaklılar	Küf
-Yengeç,	Hamam Böceği	Penicillium miselleri
-Karides,	Arılar	Ascomydes
-İstakoz,		
-Kerevit		

Kitin ve kitosanın kullanılmasının büyük avantajları vardır. Mikroorganizmaların endüstriyel alanda çok geniş bir yere sahip olması ve yüksek hızda çoğalabilmeleri nedeniyle mikrobiyal kitin ve kitosan kolayca elde edilebilmektedir. Özellikle küf misellerinin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Mikroorganizmaların yetiştirme koşullarında lag fazı 1-3 saat arasında olmaktadır (Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

2.3. Mikroorganizmalardan Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu

Genellikle, azot içeriği %7'den fazla olduğunda ve deasetilasyon derecesi %60'ın üstüne çıktığında, kitin yerine “kitosan” terimi kullanılmaktadır (Peter ve ark., 1986). Kitini kabuklulardan elde etmedeki asıl problem, bunların belirli sezonlarda elde edilmesidir. Bu polimerlerin kullanım alanlarındaki talebin artmasıyla, üretilmeleri için sürdürülebilirliğin gerçekleşmesi amacıyla ekstra kaynak gereksinimi oluşmaktadır. Funguslar, hücre duvarlarında hem kitin hem de kitosan içermesi sayesinde uygun kaynaklar olarak görülmektedir. Avantaj olarak, fungus miselyumlarından bu polimerlerin ekstraksiyon işleminde daha seyreltik yoğunluklara sahip çözeltilerin kullanılabilmesi mümkün olmaktadır. Bu özelliğiyle çevreye zararı olmayan yararlı kaynak olmaktadır. Ek olarak, küf ve mayaların organik olmayan bileşenlerinin az olması sebebiyle demineralizasyona da gereksinim duyulmamaktadır; böylece kabuklu canlılara kıyasla maliyetinin de az olduğu görülmektedir (Teng ve ark., 2001; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

Tablo 2.8. Mantar ve küflerin kitin ve kitosan içerikleri

Mikroorganizma adı	Kitin Miktarı (%)	Kitosan Miktarı (%)	Kaynaklar
<i>Mucor rouxii</i>		%8.9–35	(Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003)
<i>Aspergillus niger</i>	%42	%11	(Pochanavanich ve Suntornsuk, 2002; Maghsoodi ve ark., 2008)
<i>Basidiomycetes</i> (<i>Lentinula</i> , <i>Agaricus</i> , vb.) ve <i>Ascomycetes</i> (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , vb.)	%8.5-19.6	%1	(Cherif ve ark., 1993; Di Mario ve ark., 2008)

Fungusların biyokütlesinden elde edilen kitosanın verimi, seçilen fungusun türüne, bu mikroorganizmaların besiyerinde üretilme yöntemine ve sıcaklığı, pH'sı, inkübasyonun zamanı gibi prosesteki parametrelere göre değişebilmektedir (Tablo 2.8.). Verimini arttırmak için biyokütlenin miktarını veya hücrenin duvarında bulunan kitosanın miktarını çoğaltmak gerekmektedir (Jaworska ve Konieczna, 2001).

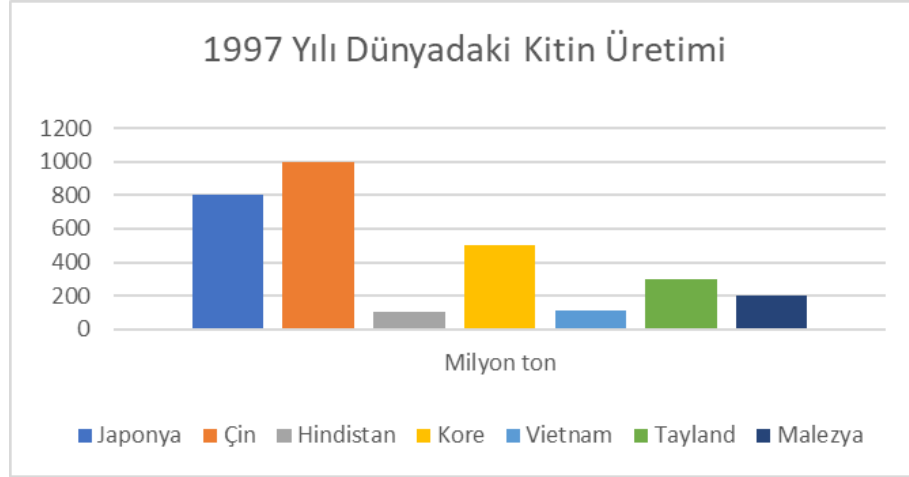
Küflerin hücre duvarından direk elde edilmiş olan kitosan kabuklulardan elde edilen kitosana göre bazı avantajlara sahiptir:

1. Kabukluların proteininden kaynaklı alerji tehlikesi bulunmamaktadır;
2. Moleküler ağırlıkları ve deasetilasyon dereceleri fermentasyonun koşullarını değiştirmekte ve kontrol edilebilmektedir (Arcidiacono ve Kaplan, 1992; Stevens ve ark., 1997).
3. Ayrıca, mikroorganizmalardan elde edilen kitosan, kabuklu canlılardan üretilen kitosana göre daha biyoaktiftir; medikal uygulamalarda daha fazla tercih edilir (Jaworska ve Konieczna, 2001).

Kabuklu canlılardan üretilen kitosanlar, yüksek moleküler ağırlığa ($1,5 \times 10^6$ Da civarına) sahiptir. Mikrobiyal kitosanın molekül ağırlığı ise ($1-12 \times 10^4$ Da) daha düşüktür. Yüksek moleküler ağırlığa sahip kitosan; nötral pH'da, fazla yoğunlukta, su içeren çözeltide çözünübilirliği düşüktür. Bu özelliği de gıdada, medikallerde kullanımını sınırlandırmaktadır (Wibowo ve ark., 2007). Mikrobiyal kitosanın, yağ emiliminde partikül şeklinde medikallerde lif ve zar olarak kullanılmaktadır (Nwe ve Stevens, 2002).

2.4. Kitinden Kitosan Üretim Yöntemleri

1997 yılında toplam dünya kitin üretiminin kabaca 20.000 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir. Asya ülkelerinde kitin ve kitosan üretiminin yaklaşık 3.000 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.3.), (Chen, 2000).



Şekil 2.3. Asya ülkelerindeki kitin ve kitosan üretimi (Chen, 2000).

Kitinden kitosan üretebilmek için; kitindeki $\text{CH}_3\text{COO}-$ grubunun bir kısmının ya da tamamının ayrılması gerekmektedir. Bu reaksiyon esnasında yine önlenemez şekilde depolimerizasyon olayı gerçekleşmektedir. Asetil gruplarının kopması için reaksiyonda bazik çözeltiler veya enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Ek olarak kitinin deasetilasyonu ile de kitosan elde edilebilmektedir (Şekil 2.4.). Deasetilasyon işlemi homojen veya heterojen olarak; yüksek sıcaklıkta, alkali çözelti kullanılarak yapılmaktadır. Bu reaksiyon sırasında aynı şekilde önlenemez bir şekilde depolimerizasyon olayı da gerçekleşmektedir (Tsigos ve ark., 2000; Mourya ve Inamdar, 2008).

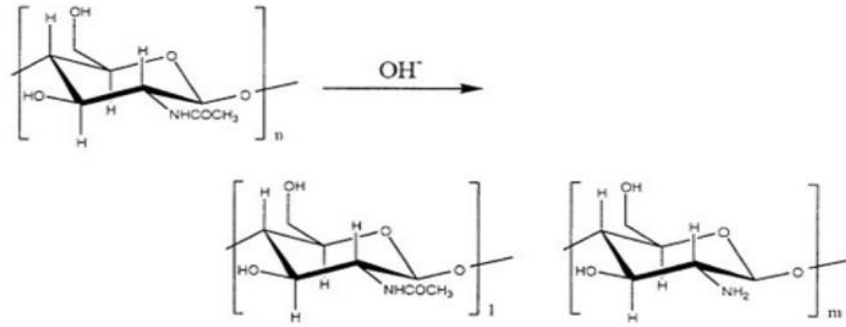
Depolimerizasyon derecesi, kitosanın birçok özelliğini değiştirmektedir, Tablo 2.9.'da değişen özellikler listelenmektedir.

Tablo 2.9. Depolimerizasyon derecesinin değiştirdiği özellikler (Tsai ve Chen, 2003)

Depolimerizasyon derecesinin değiştirdiği özellikler:
Kitosanın reolojik özelliklerini,
Aksiyal oranını, zincir esnekliğini,
Mekanik özelliklerini,
Membranlar ve mikro kapsüller için gözenek boyutunu,
Kozmetik ürünler için su tutma kapasitesini,
Antimikrobiyal aktivitesi,
Kolesterol ve trigliserol kapasitesini,

Tablo 2.9. (Devamı)

Kan koagülasyon kapasitesini,
Yara iyileştirme aktivitesini, jel oluşturabilme yeteneğini,
Ozmotik basınç düzenleme özelliğini,
Viskozitesini arttırabilme kapasitesini,
Lif oluşturma yeteneğini



Şekil 2.4. Kitinin kimyasal dönüşümü sonucu kitosan oluşması (Tolaimate ve ark.,2000)

2.4.1. Kimyasal yöntem

Kitin ve kitosan 2 aşamalı uygulama ile elde edilebilmektedir. Birinci aşamada protein yağ ve alkalide çözünebilen şekerler %2-4 (w/v) NaOH veya KOH çözeltisinde, 90-121 °C arasında, 15-120 dakika arasında çözünebilmektedir. İkinci kısım ise bazik ortamda çözünemeyen kısım olmaktadır. Bu kısım genellikle %2-10 (v/v) asetik asit çözeltisinde, 25-95 °C arasında, 1-24 saat süre içinde işleme alınabilmektedir. Çözünmüş olan kısmın pH'sı 9-10'a ayarlanarak santrifüje edilerek çöktürülmektedir. Çöktürülen kısım aseton ve etanol gibi maddelerle yıkanmaktadır. Asetik asit ile muamele sonucunda çözünmeyen kısım ile kitosan elde edilmektedir (Tan ve ark., 1996; Synowiecki ve Al-Khateeb, 1997; Chatterjee ve ark., 2005).

Yine bir diğer araştırmadaysa, yüksek basınçlarda ve yüksek sıcaklıklarda (15 psi/ 121°C) başka yöntemlerden daha az zamanda (yarım saat içerisinde) yüksek deasetilasyon derecelerinde kitosan üretilmiştir (No ve ark., 2000).

Kitinin deasetilasyonu işlemi esnasında ortamdaki oksijen, polisakkarit zincirin bozulmasına neden olmaktadır. Reaksiyonun sonucu olarak üretilen kitosanın moleküler ağırlığı ve vizkozitesi de azalmaktadır. Deasetilasyon işlemi, oksijen bulunan ortamda absorbe edici olarak tio-fenol kullanılmasıyla veya N (azot) içeren ortamlarda uygulanabilmektedir (Dung ve ark., 1994).

Deasetilasyon işleminde reaksiyonun düzenli olarak ilerlemesi için uygun şekilde karıştırmak gerekir. Uygun karıştırma amacıyla elde edilen karışımın, uygun olan akışkan ortamdan alınması gerekmektedir. Kitin ve bazın çözelti oranı çok önemlidir (Muzarelli ve Peter, 1977).

Kimyasal yöntemin daha hızlı, etkin ve pratik olarak uygulanıyor olması büyük bir avantajdır. Ama kitine uygulanan kimyasal-deasetilasyon işlemi, daha çeşitli moleküler ağırlıklı bir kitosanın elde edilmesine ayrıca deasetilasyon olayının polisakkaritlerin molekülü içerisinde homojen olmayan dağılımına sebebiyet vermektedir. Prosesin koşullarıyla beraber değişmekte olan kitosanın deasetilasyon derecesinin ve molekül ağırlığının, çözünürlük, viskozite ve biyolojik aktivite özelliğine etkisi olmaktadır (Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003). Aynı zamanda, büyük hacimde derişik sodyum-hidroksit çözeltisinin kullanılması ile bu işlemin sonucu olarak farklı N (azot) içeren atık oluşumu çevrenin kirlenmesine sebep olması da bu işlemin diğer bir dezavantajdır (Wu ve ark., 2005).

Bir çalışmada, *Aspergillus niger*'in sitrik asit üretiminden sonra kalan atık biyokütlesini fungal kitosan ekstraksiyon kaynağı olarak kullanmışlardır. Üretilmiş olan kitosan yaklaşık olarak %89,6 deasetilasyon göstermiştir. 25 Kda moleküler ağırlığa sahip, %1'lik asetik asit çözeltisinde %97 oranında çözünürlüğe sahip olduğu tespit edilmiştir ve 30 karidesten elde edilen standart bir kitosan ile FT-IR mikroskopi tekniğiyle karşılaştırılabilir olduğu belirlenmiştir. Fungal kitosan, pamuklu bir kumaşın parçasına emdirildikten sonra kurutularak üzerine birçok test uygulanmıştır. Yapılan testlerden sonra pamuklu kumaş parçasının *E. coli* ve *Candida albicans*'a karşı yüksek derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Sonuç itibariyle, fungal kitosan ile muamele edilen kumaşlar pek çok

tıbbi ve hijyenik uygulamada kullanılabilir, uygun bir materyal olarak önerilebilirler (Tayel ve ark., 2011).

2.4.2. Enzimatik yöntem

Kitosanı enzimlerden elde etme yöntemi, funguslar ile elde edilmiş olan kitinin deasetilaz enzimiyle gerçekleştirilebilmektedir. Kimyasallarla elde edilmesi daha çok kontrolü sağlanabilen yöntemdir. Böylelikle heterojen olmayan bir ürün oluşmaktadır. Aynı zamanda da çevre açısından daha güvenilirdir. Enzimatik yöntem bu yönüyle kimyasal metodun birçok dezavantajını ortadan kaldırmaktadır (Martinou ve ark., 1995).

Enzimatik yöntemde kitin deasetilaz enzimi kullanılmaktadır. Kitin deasetilaz enzimi çözünme özelliğine sahip değildir ve kitine etkisi daha az olmaktadır. Deasetilasyon işlemi gerçekleştirilirken, enzimlerin $\text{CH}_3\text{CO}-$ (asetil) gruplara olan etkisini arttırmak amacıyla; kitine ısıtma işlemi, sonik işlemi ve öğütme vb. çeşitli yöntemler uygulanarak ön işlem uygulanmaktadır (Win ve Stevens, 2001).

Enzimlerden kitosan elde etme yönteminde; glikoller, kitinler ve kitin oligomeri kullanılması ürünün oluşmasında katkısı fazla olmaktadır. Bunlar, suda çözünebilen katı bir yapıya sahiptir. Kitin, deasetilaz enzimlerini kolay bir şekilde deasetile edebilmektedir. Bununla birlikte, funguslardan elde edilen kitin ve kitosanlar da enzimlerin deasetilasyonu sonucunda ürün olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmada, *A. niger* küfünden üretilen kitinlerin, kitin deasetilasyon enzimleri açısından zengin substrat kaynağı olabildiğini bulmuşlardır (Cai ve ark., 2006).

2.5. Kitosan Verimini Etkileyen Faktörler

Bir fungal biyokütlesinden elde edilen kitosan verimi, büyük ölçüde; kullanılan fungusların türü, daldırılmış çalkalanmış kültür, kesikli kültür, sürekli kültür, katı hal kültürü ve yüzey kültürü gibi yetiştirme yöntemleri ve pH, sıcaklık, karıştırma hızı, kuluçka süresi, parçacık boyutu ve et suyu reolojisi gibi çeşitli proses

parametrelerine bağlıdır. Kitosan veriminde bir artış ya biyokütle verimini artırarak ya da kitosanın hücre duvarı içeriğindeki bir artışla elde edilebilmektedir (Jaworska ve Konieczna, 2001).

Biyokütle üretimi için fungusların kültürlenmesine yönelik SSF (katı hal fermentasyonu) yöntemi, üretilen daha yüksek miktarlarda misel nedeniyle daha yüksek kitosan verimi (mg/kg misel) gibi SmF (batık fermentasyon) 'ye göre avantajlar sunmaktadır. İncelenen çeşitli mikroorganizma grupları arasında, filamentli funguslar, SS (katı substrat) üzerinde büyüme yetenekleri nedeniyle en çok kullanılanlardır (Nwe ve ark., 2002c, 2004). Bununla beraber, SmF'nin, fermentasyon ortamında pH, sıcaklık ve besin konsantrasyonu gibi fermentasyon parametrelerinin daha kolay kontrolünü sağladığı için SSF'ye göre belirli avantajları vardır (Durand ve ark., 1996).

2.5.1. Besiyerinin kompozisyonu

Kitosan nitrojen içeren bir biyopolimer olduğundan, fungus hücre duvarları için kitin/kitosan üretmek için besin olarak inorganik veya organik bir nitrojen kaynağına ihtiyaç duyar. Funguslar, amonyum iyonlarını doğrudan nitrojen kaynağı olarak kullanır. Diğer inorganik nitrojen formları ise önce amonyumun redoks seviyesine indirgenir (Moore-Landecker, 1996). Azot kaynağı, mantarlar tarafından kitosan üretimi için önemli faktörlerden biri olarak kabul edilir. Çeşitli nitrojen kaynakları arasında, SSF tarafından fungal kitosan üretimi için ürenin en iyi nitrojen kaynağı olduğu bulunmuştur (Nwe ve ark., 2002c).

Nwe ve Stewens (2004), sterilize ve nemlendirilmiş hava beslemesi altında 26°C'de 7 gün boyunca farklı miktarlarda üre ile sağlanan tatlı patates parçaları üzerinde yetiştirilen *Gongronella butleri* USDB 0201 mantarı tarafından kitosan üretimini araştırmışlardır. Sonuçlar, başlangıç pH değerinin ve üre miktarının fungus misel ve kitosan verimini etkilediğini göstermiştir. 7,2 g üre ile sağlanan 40 g/kg'a kadar tatlı patateste daha yüksek bir misel verimi gözlenmiştir. Ürede daha fazla artış miselyum üretiminde bir düşüşe neden olmuş ve 15 g üre/kg'ın üzerinde SS (katı substrat),

zayıf büyüme ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, sırasıyla 7,2 veya 14,3 g üre ile takviye edilmiş 1 kg SS'den elde edilen toplam kitosan miktarları, $3,59 \pm 0,29$ ve $4,31 \pm 0,65$ g arasında önemli bir fark görülmemiştir. Araştırmacılar ayrıca *G. butleri*'de kitosan molekül ağırlığı 'sinin SSF (katı hal fermantasyonu) ortamına sağlanan artan miktarda ürenin de beraber arttığını ortaya koymuşlardır. Sayısal ortalama molekül ağırlığı (Mn) ve ayrıca polidispersite (Mw/Mn) tarafından da ifade edilen Mw (molekül ağırlığı) arasındaki büyük fark, kitosan polimerlerinin boyut olarak homojen olduğunu ve önemli ölçüde daha yüksek molekül ağırlığı kitosan fraksiyonunun mevcut olduğunu göstermektedir. Arcidiacono ve Kaplan (1992), SmF ortamında daha fazla N-kaynağı (pepton) kullanılarak kitosanın molekül ağırlığının artırılabilirliğini göstermiştir.

Mikrobiyolojik fermantasyon araştırmaları çoğunlukla sterilize edilmiş besiyerlerinde ve steril koşullarda gerçekleştirilmektedir. Buna ilaveten, araştırmacılar uygun kültürler seçildiğinde steril olmayan besiyerlerinde ve kültür koşulları altında da gerçekleştirebileceğini raporlamışlardır. Besiyerlerinin steril olmaması sayesinde enerji ve zaman tasarrufu elde edilmektedir. Endüstriyel olarak üretimin uygulandığı besiyerlerinin hacminin fazla olması nedeniyle sterilize edilmesi için daha fazla elektrik enerjisine ihtiyaç duyulmaktadır. Besiyerlerinin sterilize edilmemesi üretimde büyük miktarda maliyeti azaltmaktadır. Sterilize edilmeyen besiyerlerinde başta bakteriler olmak üzere istenmeyen mikroorganizmaların da bulunabileceği bilinmektedir. Bununla birlikte istenen hedef mikroorganizmanın da resesif kalabileceği ya da hiç gelişemeyeceği de bilinmektedir. Sonuç olarak, kültürde üretilmesi istenen ürünün veriminin düşeceği açıklanmaktadır (Saghafian, 2013; Taşkın ve ark., 2013).

Araştırmacılar izole edilen mikroorganizmalardan en üretken olanını seçerken tarama isminde bir prosedürü uygulamaktadır. Bu prosedürde izole edilen fazla sayıda mikroorganizma aynı kültür koşulları altında sıvı ya da katı kültürde geliştirilebilmekte ve belirli inkübasyon süresinin sonunda kültür ortamından alınan örneklerin analizleri yapılmaktadır. Analiz sonunda hedef ürünü en iyi verimle üreten mikroorganizma seçilir ve devam eden aşamalarda kullanılmaktadır. Uygulama

sayesinde de iş yükü azaltılmaktadır. Fungal kitosan üretiminin verimli olabilmesi için doğru mikroorganizma seçilmesinden sonra üretilmesi için de optimum şartların ve ortamın iyi seçilmiş olması gerekir. En uygun besiyeri ortamı ile yüksek sayıda mikroorganizma elde edilmektedir (Erdal ve Taşkın, 2010; Taşkın ve Erdal, 2011; Alnahdi, 2012; Bizuye ve ark., 2013).

2.5.2. Sıcaklık

Yapılan bir araştırmada, mikroorganizmanın iyi geliştiği ve istenen ürün olan kitosanın elde edilme oranının fazla olduğu inokulum değerinin belirlenmesi için, kullanılan faktör inokulum miktarı olmaktadır. Kitosan üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda inokulum miktarları çok farklılık göstermektedir. Fermentasyon sırasındaki sıcaklık değeri inokulum miktarına etki etmektedir. Bazı araştırmalarda kullanılan fermentasyon sıcaklık aralığı 25-30°C’lerde uygulanmıştır. Bilindiği gibi mezofilik sıcaklıklarda birçok mikroorganizma yaşayabilmektedir. Bu sebeple de genel olarak, sporulasyon olayı mezofilik sıcaklıklarda daha çabuk olmaktadır. Yine başka bir araştırmada 30°C sıcaklıkta 3 günde Potato Dextrose Agar (PDA) plaklarında gelişen *Mucor rouxii* MTCC 386 suşu ile kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan inokulum materyali 5 mm çaplı disk açıcısı ile yaklaşık olarak $6,4 \times 10^6$ spor/disk olarak görülmüştür (Chatterjee ve ark., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada, steril olmayan besiyeri ve kültür koşulları altında kitosan üretimini gerçekleştirmek istenen test küfünün soğuk şartlarda ve düşük pH altında gelişme yeteneğinden yararlanılmıştır. Alınan sonuçlar test küfünün en yüksek biyomas ve kitosan içeriğine 15°C’de ulaştığını göstermiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise, aşamalı olarak küf gelişiminin düştüğü izlenmiştir. 20°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hücre büyümesinin ve küf biyomasının azaldığı görülmüştür. Yine aynı test küfünün katı besiyerinde de 4°C’de ve sıvı kültürde 5°C’de geliştiği görülmüştür. Bahsedilen sonuçlarda kullanılan test küfünün psikrotolerant özelliğini göstermektedir. Çünkü literatürlerde psikrofilik organizmaların gelişim sıcaklık üst sınırının 20°C olduğunu ve bu değer üzerinde yaşayamadıklarını ama psikrotolerant olanların 20°C’den daha yüksek sıcaklıkları tolere edebildiği belirtilmektedir. Düşük

sıcaklıkta bu mikroorganizmaların 0-5°C civarında yaşayabildiği ve bazı psikrofilik olanların 0°C'nin altında bile gelişebildiği belirtilmektedir. Öte yandan, alınan sonuçlar 15°C'nin üzerindeki sıcaklıkların hem biyokütle içeriğini, hem de kitosan miktarını kayda değer ölçüde düşürdüğünü göstermiştir. Aynı zamanda kitosan içeriği de artan sıcaklıkla beraber olumsuz bir etki göstermiştir. Sıcaklık denemeleri esnasında kültür ortamının pH 5'e ayarlandığında 5° ve 10°C'lik sıcaklıklarda kontaminasyon görülmemiştir. Yine pH 5'te, 15°C'de çok az kontaminasyon gerçekleşirken, 20°C'de orta seviyede ve daha yüksek sıcaklıklarda da fazla kontaminasyon gerçekleşmektedir. Böylece başka deneyler için, elde edilen en yüksek verim 15°C'lik sıcaklık seçilmiştir. (Kasana ve ark., 2008; Satyanarayana ve Kunze, 2009).

2.5.3. pH

Küf biyokütlesinden üretilen kitosanın verimi; küfün türüne, kültivasyon yöntemlerine ve pH değerlerine, sıcaklık, inkübasyon süresi gibi prosesin parametrelerine bağlı olarak değişebilmektedir. Örnek verilecek olursa, kitosan veriminin artması için pH değerini optimum düzeye getirmek gerekir (Jaworska ve Konieczna, 2001).

SSF (katı hal fermantasyonu) ortamının başlangıç pH'ı, mantar büyümesinin hızını ve derecesini güçlü bir şekilde etkilemektedir (Barbosa ve ark., 1995). Beyaz çürükçül fungusların çoğu, 4 ila 5 arasındaki hafif asidik pH değerlerinde iyi büyümektedir (Dube, 1990). Nwe ve Stewens (2004), kitosanın ağırlık ortalamalı molekül ağırlığı ve polidispersitesinin, SSF'de pH 3,77 ve 4,92'de daha düşük ve pH yaklaşık 5,5'te daha yüksek olduğunu göstermiştir. Arcidiacono ve Kaplan (1992), *Mucor rouxii* ve kitosan molekül ağırlığının biyokütlesinin pH 3'te azaldığını ve molekül ağırlığının SmF (batık fermantasyon)'de pH 6'da hafifçe arttığını gözlemlemiştir.

Birçok çalışmada küften kitosan üretilirken pH'nın 4,5 olmasının verimi arttırdığı görülmüştür. Örneğin, *R. oryzae* küfünden kitosan üretilmek istenmiş ve ortamın pH

değerleri dikkate alınarak elde edilen biyokütle miktarları kıyaslanmıştır. Bunun için *R. oryzae* 'nin uygun büyüme ortamında ve optimum sıcaklık ve pH değerini elde etmek için klasik OVAT metodolojisi kullanılmıştır. İlk olarak ortamın sıcaklığı 5 ile 35°C arasında değişen farklı değerlerde taranmıştır. İkinci aşamada, ortamın optimum pH'sını elde etmek için *R. oryzae* pH değerleri 3 ile 8 arasında değişen farklı ortamlarda büyütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, *R. oryzae*'nin pH'nın 5'ten 4,5'a düşürülmesinin maksimum büyüme ve kitosan üretimine sahip olduğunu göstermiştir (Taşar ve ark., 2016). Ek olarak fungal kitosan üretilirken ortam pH değerinin düşük olması ile antimikrobiyal etkisi artmakta ve küfün üreme yeteneğinde engellenmesi önlenmektedir (Tayela ve ark., 2010).

2.5.4. Ekstraksiyon yöntemi

Kabuklu canlılardan kitin üretmenin en önemli sorunlarından bir tanesi, kabukluların belirli sezonlarda bulunmasıdır. Kitosan ve kitinin kullanım yerlerinin artması, üretilmelerinde devamlılık olması amacıyla ek kaynağın temini gereksinimi oluşmuştur. Fungusların hücrelerinin duvarında kitosanın ve kitinin bulunması nedeniyle istenilen özellikte kaynaklardır. İlaveten fungusların başka avantajlı yönleri de vardır. Küf misellerinden bu polimerlerin ekstraksiyon işlemi yapılması için çok az yoğunlukta baz ve asit özellikteki çözelti kullanılabilir. Bahsedilen özelliğiyle çevreye de uygun, güvenilir bir üründür. Küflerin organik olmayan maddelerin içeriğinin az olması nedeniyle demineralizasyona gereksinimi olmamaktadır. Böylece diğer kaynaklara göre daha tasarruflu ürün olmaktadır (Teng ve ark., 2001; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

Fungus hücre duvarından kitosan elde etmek için ekstraksiyon işlemi, kabuklu canlılardan kitosan elde etmek için kullanılan kimyasal işlemde daha kolay, daha pratik ve daha az atık madde üretir. Fungus kitosan içeriğinin araştırılmasıyla ilgili çoğu çalışma tipik olarak miselleri sabit bir kuluçka döneminde elde eder. Bunun nedeni, kitosanın aktif büyüme aşamalarından sonra mikroorganizmalardan ekstrakte edilmesinin daha güç olmasıdır. Ek olarak, bu, farklı mikroorganizmaların büyüme oranındaki farklılıkları göz ardı edilmektedir (Tan ve ark., 1996).

Funguslardan üretilen kitosanın verimi, elde edilen fungusun türüne, yetiştirme şartlarına ve sıcaklık, inkübasyon süresi gibi üretim süreci parametrelerine göre değişmektedir. Kitosan veriminin artışı ya biyokütle miktarının artmasıyla ya da hücre duvarında bulunan kitosan içeriğinin artmasıyla gerçekleşmektedir (Jaworska ve Konieczna, 2001).

2.6. Atık Maddelerin Küf Misellerinden Kitosan Üretimi İçin Besiyeri Olarak Kullanımı

Kitosan, *Zygomycetes*'e (*Mucor*, *Rhizopus*, *Gongronella* gibi) ait mantarların hücre duvarında bulunan doğal bir bileşendir. Mantarların hücre duvarından bu bileşen ekstraksiyon işlemiyle üretilmektedir. Bu sebeple, *Zygomycetous* alternatif olarak doğal bir kitosan kaynağıdır. Balıkçılıktaki kitin üretiminden farklı olarak kimyasal deasetilasyona bir alternatif sağlayabilir. Ek olarak, bu mantarların kitosan üretiminde kullanılması birçok yarar sağlamaktadır. Bunlardan en başta gelen ise, *Zygomycetous* mantarlarının hücre duvarında çok miktarda kitosan olmasıdır. Bu kitosanın fizikokimyasal özelliklerinin fermantasyon parametrelerini kontrol ederek manipüle edilebildiği ve belli bir standart sağlayabilmesidir. Örnek verilecek olursa, farklı molekül ağırlıklarına sahip kitosanlar, farklı pH ve içeriğe sahip ortamların yüzeyinde geliştirildiklerinde bu mantarlar tarafından üretilirler. Aynı zamanda mantarlar, diğerlerine kıyasla daha basit besinler kullanılarak kolaylıkla kültürlenmektedir. Sonuç olarak, kitosan yıllarca kontrollü bir şekilde mevcut ortamda üretilmekte ve mevsimsel kabuklu deniz ürünleri endüstrisinden bağımsız olabilmektedir (Tan ve ark., 1996; Jaworska ve Konieczna, 2001).

Son zamanlarda, mantar miselinden ekstraksiyon ile elde edilen kitin büyük önem taşımaktadır. Fungal miseller, yıllar içinde hızlı, kolay adapte olabilen ve modern ekolojik gereksinime uyacak şekilde kapalı veya yarı kapalı bir teknolojik üretim prosesinde ayarlanabilen fermantasyon ile birlikte geliştirilebilmektedir. İlaveten, mantar miselleri bileşimde daha karardır ve inorganik malzemelerle bağlantılı değildir. Bu yüzden de mantarda bulunan kitini yeniden elde etmek amacıyla demineralizasyon işlemine ihtiyaç duyulmaz (Teng ve ark., 2001).

2.6.1. Çay

Çay bitkisi taze sürgünlerin farklı yöntemler kullanılarak elde edilmektedir. Çay, botanikte “Angiospermea” çiçek açanlar kısmının, “Dicotyledonea” sınıfının ve “Camellia” familyasına aittir. Çayın üretimi tropik ve subtropik iklim şartlarında yapılmaktadır. Yıllık toplam yağış 500 mm’ nin üstündeki ılıman bölgelerde yetişmektedir. Besin maddelerince zengin, geçirgen ve asidik reaksiyona sahip topraklarda yetişebilmektedir. Kalsiyumu az bulunan, pH aralığı 4,5-6 olan topraklar çay yetiştiriciliği için uygundur. Taze çay yapraklarından elde edilmiş olan sulu özütü içecek olarak kullanılamaz. Çay yaprakları bazı işlemlerden geçtikten sonra içilebilir hale gelir. Taze yeşil çay yaprakları siyah çaya dönüştürülürken bir dizi kimyasal değişikliğe uğramaktadır. Flavonoid yapısında değişiklikler gerçekleşir, karotenoidler gibi bazı bileşenleri parçalanarak uçucu aroma bileşenlerine dönüşürler. Serbest amino asitler de bir yandan proteinlerin parçalanması ile oluşurken diğer taraftan da kompleks oksidasyon ürünlerin yapısına katılırlar. Yeşil çaydan siyah çaya geçişte organik maddeler tamamen yok olmaz bazı kısımlar aroma bileşenlerine dönüşür. Siyah çayda organik maddelerin yanında anorganik maddeler de bulunmaktadır ve anorganik madde bileşimi Tablo 2.10.’da verilmiştir.

Tablo 2.10. Kuru siyah çayın mineral bileşimi

Bileşen	Miktarı (ppm)	Bileşen	Miktarı (ppm)
Na	19-667	Mn	155-1533
K	9000-14000	Fe	56-333
Mg	1200-3400	Ni	3-15
Ca	1400-10000	Cu	12-70
Sr	12-43	Zn	20-36
B	11-50	Al	200-1100
Si	200-600	N	33000-73000
P	2600-6500	S	800-3700
Se	116	F	3,2-260
Cl	200-1000	Ti, V, Cr, Co, Mo, Cd, Sn, Pb, Bi	<10

Çayın içerdiği anorganik maddelerin büyük bir bölümü bitkilerde bulunan temel maddelerdir. Fakat diğerleri ise çayın yaşı ve genetik bileşenlerine göre değişiklikler göstermektedir. Çayda bulunmakta olan bu minerallerin küçük bir kısmı demleme esnasında sıvı kısma geçmektedir (Tüfekçi, 1989).

Çay, sudan sonra dünyada en çok içilen ve içme alışkanlığı gittikçe artan bir bitkidir. 5000 yıllık bir geçmişi vardır. Türkiye'nin çayla buluşması 1787'de, Japonya'dan gelen çay tohumlarının ekilmesiyle başlamıştır. Türkiye'de yıllık kişi başına düşen çay tüketimi, dünyadaki diğer ülkelere kıyasla 4. sırada bulunmaktadır. Çay da salep, boza gibi Türk milletinin milli içecekleri arasında bulunmaktadır. Yurt içi yıllık tüketim miktarı 140 bin tonun üzerindedir (Akova, 2005).

Çayda bulunan kafein sebebiyle, yorgunluk gideren ve canlılık veren bir etkisi bulunmaktadır. Çayın demlenmesi esnasında kafeinin büyük bir kısmı ve polifenoller dem kısmına geçmektedir (Öl, 1981).

Atık çayda da polifenoller, kafein, amino asitler, şekerler, organik asitler, yağlar, mineraller, pigmentler, proteinler bulunmaktadır (Menon ve ark., 1993). Atık çayda bulunan bahsedilen kimyasal içerik mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Selvakumar ve ark., 1998).

2.7. *Aspergillus Niger*'in Genel Özellikleri

Organik maddelerin üstünde oksijenli solunum yaparak gelişebilen, siyah sporları üreten filamentli yapıda küf olan *A. niger*; genelde doğal ortamda, topraklarda, bitki türevi atıkların üstünde bulunmaktadır. *Aspergillus* suşları, birincil ve ikincil metabolitlerin üretimi sebebiyle ticari olarak çok büyük önem taşıyan küf türü sayılabilmektedir. *A. niger*'in ilk ve en önemli endüstriyel ölçekli uygulaması, 1919 yılında sitrik asit üretiminde kullanımıyla gerçekleşmiştir. Yıllardan beri gıda sanayisinde ve sitrik asit üretiminde, *A. niger*'in hücre dışı enzimlerinden faydalanılmaktadır ve bu üretilen maddeler Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Yönetimi tarafından belirlenmiş olan güvenilir maddeler içerisinde bulunmaktadır. *A. niger*,

çeşitli özelliklere sahip olması ile biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizmalardandır. Bu küfün ek olarak, kendisinin ve diğer mikroorganizmaların enzimlerinin üretilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (örneğin, glukoz oksidaz enzimi). Bu kullanımlarda kültür katı yüzeyde değil, sıvı ortamda, biyoreaktörde çoğaltılmaktadır. Bütün bu özelliklere ilaveten, *A. niger* biyotransformasyonda ve atıkların değerlendirilmesinde kullanılabilir. Son yıllarda bu küfün, proteinlerin üretiminde ve salgılanmasında çok büyük rolü olmaktadır. Bunun için birçok çalışma yapılmıştır (Schuster ve ark., 2002).

Çevrede yaygın bulunan *A. niger* daha çok sitrik asit üretimindeki rolüyle bilinir. Toprakta yaşamı olan bu mikroorganizma, yeryüzünde karbon çevriminde önemli role sahiptir. *A. niger* hidrolitik ve oksidatif enzimleri salgılaması ile topraktaki bitkilerin lignin ve selüloz yapılarını bozarak ayrıştırır, çürütür. Bu özelliği sayesinde, endüstriyel biyoteknoloji alanında önemli bir kullanım alanı bulmuştur (Baker, 2006).

Aspergillus; biyosentetik dönüşümlerde ve enzim üretiminde geniş alana sahip olmakla beraber mikotoksinleri oluşturma özelliğiyle, sanayide, özellikle gıdalarda, büyük bir öneme sahip olması sebebiyle ekonomik olarak da önemli olan bir küf olmaktadır (Pitt ve Hocking, 2009; Samapundo ve ark. 2007). Ekstrem koşullara çok dayanıklı olan *A. niger* kısa sürede adaptasyon sağlayabilmeleri ve gelişebilmeleri küfün suşlarının her alanda çok fazla bulunabilmesinin nedenidir (Pitt ve Hocking., 2009).

2.8. *Aspergillus Niger*'den Kitosan Üretimi

Aspergillus niger; kolay adapte olması, hızlı gelişmesi, hücre duvarındaki kitosan miktarının fazla olması (hücre duvarının bileşenlerinde kitin içeriği %42) ve kolay bulunabilir olması gibi özellikleri sayesinde kitosan üretimi için en iyi kaynaklardan birisidir. Kitosan miktarı; mantar suşları, misel yaşı, yetiştirme ortamı ve durumuna göre değişmektedir. Kitosan miktarı ayrıca ekstraksiyon yöntemlerine de bağlıdır. (White ve ark., 1979). *A. niger* küfünün araştırılan diğer küflere (*Rhizopus oryzae*,

Lentinus edodes, *Pleurotus sajocajou*) göre kitosan veriminin (107 mg/g) yüksek olduğu Pochanavanich ve Suntornsuk (2002) tarafından kanıtlanmıştır.

A. niger'in kitosan verimi kullanılan besiyerine, sıcaklığa, inkübasyon süresine ve çalkalama devrine bağlıdır (Kumaresapillai ve ark., 2010). Bir çalışmada, besiyerine eklenen D-glukoz, L-asparagin ve tiamin gibi besinler farklı konsantrasyonda biyokütle miktarını artırmıştır fakat kitosan üretimi L-Asparagin ve D-Glukoz ilavesinden çok fazla etkilenmediği görülmüştür (Kumaresapillai ve ark., 2010). Aynı çalışmada, *A. niger*'in kitosan veriminin 30°C'de 120 saat inkübasyonda ve 180 rpm devirde maksimuma ulaştığı görülmüştür.

A. niger tarafından üretilen fungal kitosan suda ve alkalide çözünmezken organik asitte (%5 asetik asitte %99,8) ve kısmen inorganik asitlerde (seyreltilmiş hidroklorik asit ve nitrik asit) çözünbileceği raporlanmıştır (Kumaresapillai ve ark., 2010). Üretilen fungal kitosanın kül içeriği yüzdesi %0,89 bulunmuştur. Deasetilasyon derecesi %85 bulunmuştur. Üretilen kitosanın *Salmonella typhi* (26 mm), *S. paratyphi-A* (30 mm), *E. coli* (20 mm), *Proteus vulgaris* (25 mm) ve *Pseudomonas aeruginosa* (30 mm) bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu aynı çalışma tarafından doğrulanmıştır.

Fermantasyon teknolojisindeki son gelişmeler ile iplikli mantarlardan çok fazla, katı substrat üzerinde büyüme yetenekleri sayesinde yararlanılabilmektedir. Maghsoodi ve Yaghmaei'nin (2010) çalışmalarının amacı katı hal fermantasyon ortamında, *A. niger*'den kitosan üretilmesini görmektir. Aynı zamanda farklı katı ortamlar için inkübasyon süresi, azot ve nem içeriğinin etkisini de gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada katı hal fermentasyonunda, aşırı ısınma prosesin performansını ciddi şekilde bozabileceğinden, katı yatak sıcaklığı kontrolünün önemi ortaya çıkmıştır. Herhangi bir mikroorganizma, büyümesi sırasında enerji (metabolik ısı) ürettiğinden, istenmeyen katı yatak sıcaklığı koşullarını önlemek için bu ısının dağıtılması gerekir. Dolayısıyla bu çalışmada katı yatak bu sorunu çözecek kadar incedir. Katı yatağın uygun sıcaklık ve su içeriği, koşulların optimize edilmesinde önemli faktörler olmuştur.

Bu çalışmada *A. niger* BBRC 20004, soya fasulyesi kalıntısı ve Sabouraud Dextrose Broth ortamı (%2 glikoz) üzerinde üretilmiştir. %37 nem içeriğindeki ve %8,4 $\pm$ %0,26 nitrojen içeriğindeki soya fasulyesi kalıntısı, 12 gün sonra en yüksek miktarda kitosan, 17,053 $\pm$ 0,95 g/kg kuru substratı elde edilmiştir. Ayrıca 0,8455 g/l kitosan daldırılmış fermantasyonda (12 günlük yetiştirmeden sonra) Sabouraud Dextrose Broth ortamında *A. niger*'den ekstrakte edilmiştir. Fungal kitosan ekstraksiyonundan sonra, izole edilen kitosan verimi, batık fermentasyondan yaklaşık 15-20 kat daha fazla olmuştur (Maghsoodi ve Yaghmaei, 2010).

Aspergillus niger, kitosan üretimi için birçok çalışmada kullanılan bir küftür. İlkel besleyici ortamlarda kolay şekilde üreyebilme ve çoğalma özellikleri sayesinde ucuz ve sınırsız bir kaynak olması, hücre duvarında çok yüksek miktarda kitosan bulunması, ekstraksiyon işleminde kabuklu canlılarda yapılan demineralizasyona gerek duyulmaması gibi olumlu yönleri ile kitosan üretimi için çok uygun bir kaynaktır. Üretim koşullarının iyi ayarlanması ile kitosan verimi çok daha yüksek değerlere ulaşabilmektedir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

- Tryptone Soya Broth-HiMedia
- Yeast Extract-Biolife
- Tryptone Soy Agar-Merck
- Sodyum Hidroksit Payet Teknik-Merck Ekstra Saf
- Asetik Asit-Tekkim Asetik Asit %99,0-100,0 (Gıda Tip) (Buzlu) Ekstra Saf
- Hidroklorik Asit 0,1 M-
- 0.01 M NaOH-Tekkim
- Gliserol-Merck %85 Ekstra Saf
- 2-Mercaptoethanol-Merck
- Bromocresol Green-Sigma Aldrich
- D₂O-Merck (%99,9 0,6 mL)
- D₆-Merck (%99,9 0,6 mL)

3.1.2. Kullanılan araç-gereçler

Çalışmada kullanılan başlıca ekipmanlar,

- 10 mL'lik deney tüpü, IsoLab
- Kitosan, Mitosan
- Etüv, Microtest min
- İnkübatör, BINDER KB 115
- pH metre, WTW inoLab pH730
- Manyetik ısıtıcı, Mtops MS300HS
- 50 mL'lik Santrifüj tüpleri, IsoLab

- Filtre kâğıdı, Wattman no 1,3
- Homojenizatör mikser, Braun MQ5220
- Mikropipet, Eppendorf Research Plus
- Hassas terazi, Radwag balances and scales WTB2000
- Santrifüj cihazı, Hettich Universal, 320R
- Kurutma Cihazı Liyofilizatör, Labconco -50°C, 6 lt
- FT-IR Cihazı, Shimadzu IR, Prestige 21 (200 VCE)
- FESEM Cihazı, Jeol JSM 6060 LV
- NMR Cihazı, Oxford 300 MHz
- Viskozimetre, Fungilab Ubbelohde (100-13.000.000 cP ölçüm ve 0,3-100 rpm hız)
- Su Banyosu, WiseBath WSB-30
- Otoklav, Hirayama
- Vorteks, Velp Scientifica ZX3 Advanced Vortex Mixer
- Hassas Terazi, Ohaus Explorer
- Steril kabin, Tezsan
- Erlen, IsoLab

3.1.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır;

- 1 N NaOH: 1 litre karışım için; 40 gram NaOH tartılır ve balon jojede 1 litreye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.
- 2 N NaOH: 1 litre karışım için; 80 gram NaOH tartılır ve balon jojede 1 litreye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.
- 0,01 M NaOH: 1000 mL karışım için; 0,4 gram NaOH tartılır ve balon jojede 1000mL'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.
- 0,01 M HCl: 1000 mL karışım için; 0,3647 mL HCl alınır ve balon jojede 1000 mL'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.
- %2 Asetik Asit: 1 litre karışım için; 20 mL ekstra saf Asetik asit, hava kabininde balon jojeye koyulduktan sonra 1 litreye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.
- %1 Asetik Asit: 1 litre karışım için; 10 mL ekstra saf Asetik asit, hava kabininde balon jojeye koyulduktan sonra 1 litreye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

-Bromocresol Green Karışımı: 0,04 g Bromocresol green 50 mL saf suda çözündürülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Atık çay ve çay ekstraktının hazırlanması

Kitosan üretimi için kullanılan demlenmiş çaylar İstanbul, Sultanbeyli'deki Mazili Cafe restoranından temin edilmiştir. Alınan demlenmiş çaylar Ofçay markasına ait 900 gram (30 poşet x 30 gram) siyah çaydır (Şekil 3.1.). Demlenmiş atık çaylar, kısmi olarak süzölmüş ve kurutma işlemine alınmıştır. Etüvde 180°C'de 4 saat kurutulduktan sonra gerektiğinde kullanılmak üzere poşetlenerek buzlukta, -20°C'de bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Kitosan üretimi için kullanılan siyah çay (Ofçay)

Kurutulan çaylar saf su ile içerisinde %5, 10 ve 20 (wt/v) oranında karışım hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra steril çaylar oda sıcaklığına soğutulduktan sonra Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak steril şartlarda filtre edilmiştir. Süzölmüş çay 4 paralelli olarak 150 mL'lik erlenlere 100 mL olacak şekilde bölünmüştür.

3.2.2. Kullanılan mikroorganizmalar

Aspergillus niger, *Penicillium expansum*, *A. sydowii*, *Aspergillus wentii*, *A. japonicus*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *Williopsis saturnus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enterica*, *Salmonella Typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* saf kültürleri Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Saf kültür %15 gliserol içeren Tryptic Soy Broth içinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

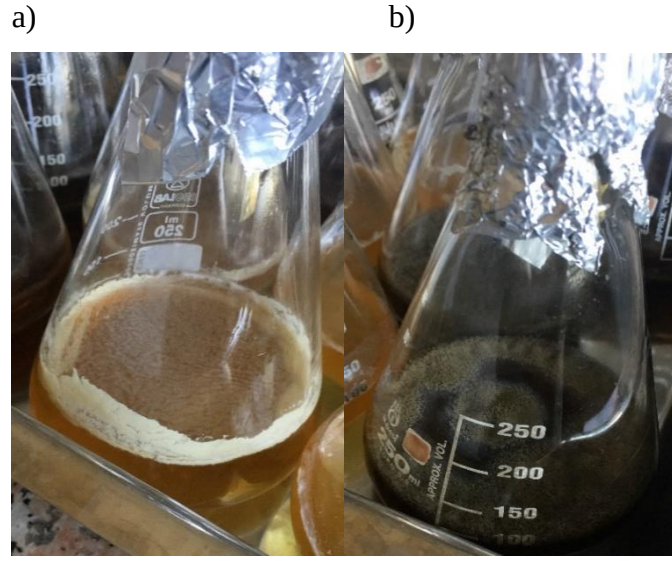
A. niger küfü TSB + 0,6 yeast extract besiyerinde aktifleştirildikten sonra 5 gün 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.2.’de çayda gelişmiş olan *A. niger* küfü görülmektedir. Geliştirilmiş olan *A. niger* kültüründen 100 µL 100 mL süzülen çaylara ve kontrol olarak kullanılan 100 mL TSBYE’ye inoküle edilmiştir. Ekilmiş olan ürünler, 25°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.



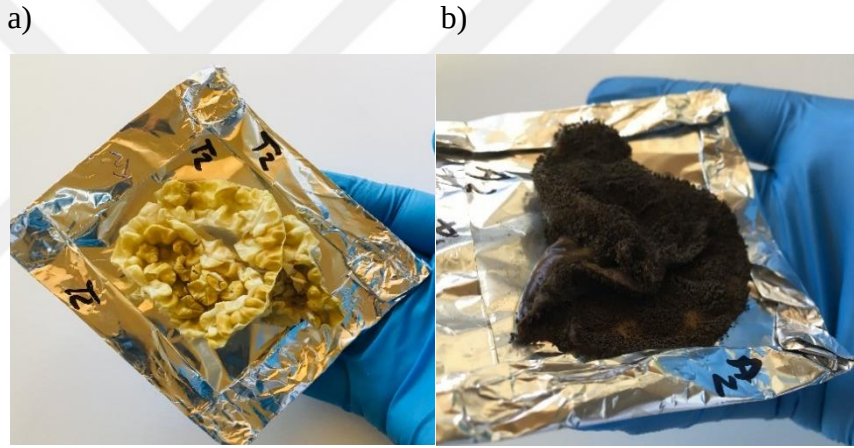
Şekil 3.2. Süzölmüş çayda geliştirilen *A. niger*

3.2.3. *Aspergillus niger* küfönden kitin ve kitosan eldesi

A. niger küfönden kitin ve kitosan elde etmek için, süzülen çay ortamında ve kontrol grubu olarak TSBYE ortamında çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). 25 °C’de, 7 gün inkübasyona bırakılan *A. niger* biyokötleleri besiyerinden No.1 Whatman filtre kağıdı kullanılarak filtre edilip daha sonra da saf su ile yıkanmıştır.



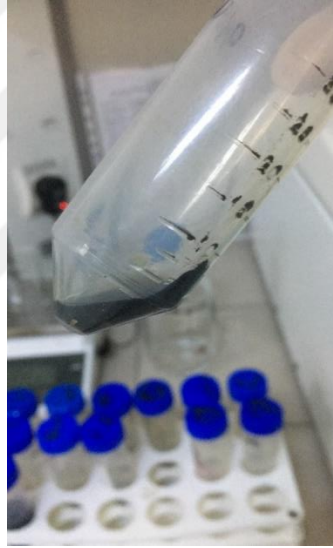
Şekil 3.3. İki farklı ortamda geliştirilen *A. niger* (a) TSBYE ortamında yetişen, b) Atık çay ortamında yetişen)



Şekil 3.4. Besiyeri ortamlarında gelişen *A. niger* biyokütlesi (a) TSBYE ortamında gelişmiş *A. niger* biyokütlesi, b) Atık çay ortamında gelişmiş *A. niger* biyokütlesi)

Kitosan ekstraksiyon için kullanılan metot Pochanavanich ve Suntornsuk'un (2002) çalışmalarında kullandıkları metottur. Bu metoda göre, *A. niger* biyokütlesi kuru ağırlığı belirlemek amacıyla etüvde 60°C'de bir gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan biyokütle (Şekil 3.4.), santrifüj tüplerine tartılarak koyulmuş ve 1:30 ml oranında, 1 N NaOH çözeltisi üzerine eklenmiştir. Biyokütle homojenizatör (Braun MQ5220) yardımı ile parçalandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda ısıtılmıştır (Şekil 3.5.). Örnekler santrifüj işlemine (9000 rpm, 15 dakika, 4 °C'de) tabi tutulduktan sonra pellet kısmı saf su ile yıkanmıştır ve %2'lik asetik asit çözeltisi eklenerek pH'nın 7 olması sağlanmıştır. Örnekler santrifüj (9000 rpm, 15 dakika, 4

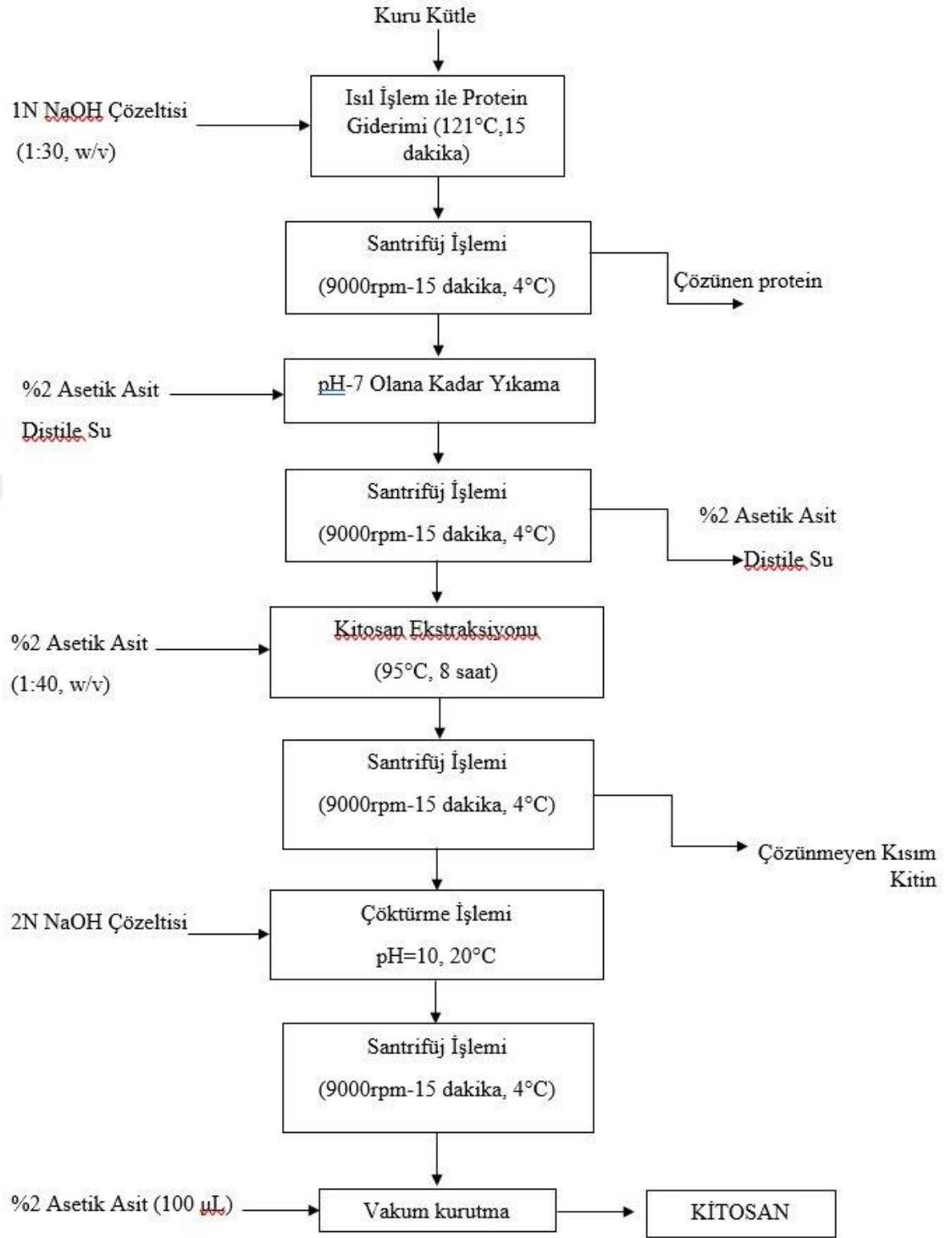
°C’de) edildikten sonra pellete %2’lik asetik asit 1:40 mL oranında ilave edilmiştir. Şekil 3.6.’daki gibi hazırlanarak çalkalamalı su banyosunda, ağzı kapalı olarak 95°C’de 8 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Soğuduktan sonra örneklere tekrar santrifüj işlemi (9000 rpm, 15 dakika, 4 °C’de) uygulanmıştır. Santrifüjlendikten sonra, çözünmeyen kısım (kitin) ayrılıp süpernatant kısmının pH’sı 2 N NaOH çözeltisi kullanılarak 10’a ayarlanmıştır. Tekrar uygulanan santrifüj işlemi (9000 rpm, 15 dakika, 4 °C’de) sonunda pelet kısmı 100 µL, %2’lik asetik asit ve distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen karışıma steril petrilerde liyofilizasyon işlemi uygulanmış, 2 gün -42°C’de kurutulmuş ve ağırlıkları tartılmıştır. Şekil 3.7.’de görüldüğü işlemi sonucunda kitosan elde edilmiştir. Elde edilen kitosan (Şekil 3.8.) - 20 °C sıcaklıkta depolanmıştır.



Şekil 3.5. Küf biyokütlelerinin tartıldıktan sonra NaOH ile karıştırılması



Şekil 3.6. Nötürlenerek alınan küf peletlerinin asetik asit çözeltisi ile karıştırılarak su banyosunda ekstraksiyona alınması



Şekil 3.7. Kitosanın elde edilmesi için uygulanan adımlar



Şekil 3.8. Liyofilizasyon ile elde edilen kitosanlar

3.3. Analizler

3.3.1. Fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) ölçümü

FT-IR analizleri; Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarında bulunan FTIR spektroskopisi Shimadzu IR, Prestige 21 cihazı kullanılmıştır. TCK ve ASPN'nin $400-4000\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için spektrumlar elde edilmiştir.

3.3.2. Vizkozite

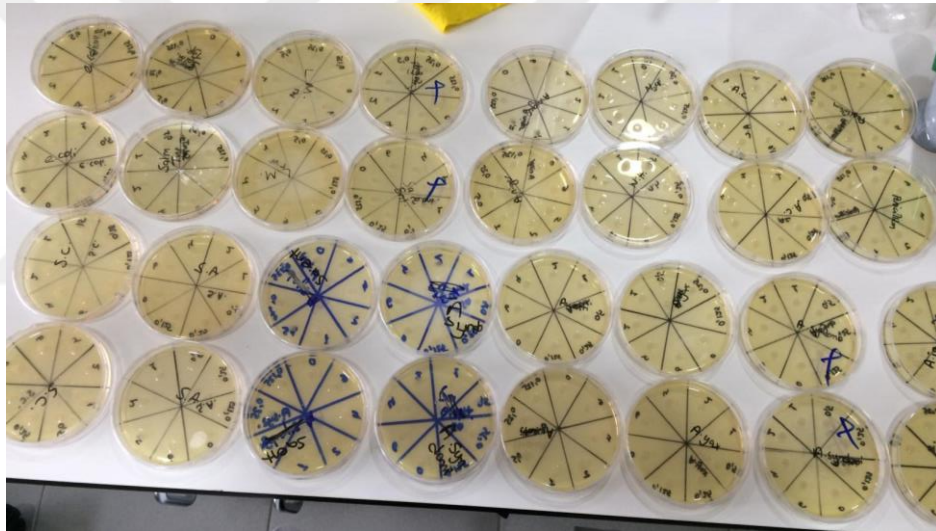
%2'lik Asetik asit (100 mL) ile %1'lik oranda kitosanı (ASPN) (0,1 gram) karıştırılmıştır. Aynı şekilde ASPN yerine kontrol için kullanılan kitosan (TCK) da asetik asit ile karıştırılmıştır. Fungilab Ubbelohde Vizkozimetresi Spin R-5 kullanılmıştır (Pochanavanich ve Suntornsuk, 2002).

3.3.3. Alan emülsiyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ölçümü

ASPN ve TCK yapısının yüzey morfolojisi Jeol JSM 6060 LV (Japonya) taramalı Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM), kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerden daha iyi görüntü alabilmek için çekimden önce altın kaplama cihazı ile örneklerin yüzeyi altınla kaplanmıştır. Örnekler 500x, 1000x, 5000x ve 10000x olmak üzere dört farklı büyütme oranlarında görüntü alınmıştır.

3.3.4. İnhibisyon testi

Kitosanın antimikrobiyal özelliğini test etmek için difüzyon testi kullanılmıştır (Kaya ve ark., 2014). Bu testte kullanılacak kültürler; *P. expansum*, *A. sydowii*, *A. wentii*, *A. japonicus*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *W. saturns*, *S. cerevisiae*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S. Enterica*, *S. Typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* kültürleri 10 mL TSBYE’de mayalar ve küfler için 25 °C 3 gün, bakteriler için ise 35 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiştir. Kitosan solüsyonu (5 mg/mL) 1% (v/v) asetik asit solüsyonunda hazırlanmış ve 121 °C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilmiş olan TSAYE her bir petride 30 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir petriye 300 µL ayrı olarak mikroorganizmalar inoküle edilmiştir.



Şekil 3.9. İnhibisyon testi için hazırlanan petriler

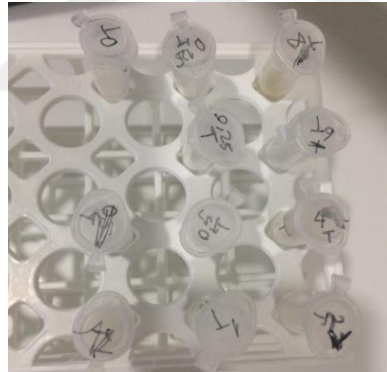
Tablo 3.1. İnoküle edilmek için hazırlanan konsantrasyonlar

Konsantrasyonlar (%)	Kitosan Miktarı (g) (TCK ve ASPN)	%1’lik Asetik Asit Miktarı (µL)
0	0	1000
0,125	0,00125	998,75
0,25	0,0025	997,5
0,5	0,005	995
1	0,01	990

Tablo 3.1. (Devamı)

2	0,02	980
4	0,04	960
6	0,06	940
8	0,08	920

Şekil 3.10.'da görüldüğü gibi ependorf tüplerinde hazırlanan kitosan (kontrol için ticari kitosan ve küf kitosanı için ayrı ayrı konsantrasyonlar Tablo 3.1.'deki gibi hazırlanmıştır) ve %1 Asetik asit 9 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan ve asetik asit solüsyonu steril ortamda vorteks ile homojen hale getirilerek kullanılmıştır. Disk difüzyon tekniği ile inoküle edilmiş petrilere yerleştirilen steril disklerle 10 µl/disc kitosan solüsyonu emdirilerek yapılmıştır (Şekil 3.9.). Negatif kontrol olarak % 1 asetik asit kullanılmıştır. Steril enjektörle alınan kitosan solüsyonları filtrattan geçirildikten sonra diskler tarafından emdirilmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.10. Ependorf tüplerine steril olarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kitosanlar

Daha sonra Tablo 3.2.'de olduğu gibi inkübasyon şartlarında bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda ise zone oluşma durumuna göre (+) ve (-) sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2. Disk difüzyon testi İçin İnkübasyon Şartları

Mikroorganizma Sınıfı	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)
Küfler	25	5
Mayalar	30	3
Bakteriler	35	2

3.3.5. Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi

Kitosan deasetilasyonunun derecesi titrasyon işlemiyle belirlenmiştir (Donald ve Hayes, 1988). Kitosan 20 cm⁻³, 0,01 M HCl asit ve 50 cm⁻³ deiyonize suda çözündürüldükten sonra renklendirici eklenerek 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra kitosan çözeltisi 0,01 M NaOH ile titre edilmiştir. Renk dönüşümü olunca işlem durdurulmuştur. Asetil yüzdesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{asetil} = V \times 0,04305 \div w$$

Burada V, NaOH 'in titrasyonda kullanılan hacmi (ml) ve w, numunenin ağırlığıdır (g). Deasetilasyon derecesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Deasetilasyon Derecesi (\%)} = 100 - \% \text{asetil}$$

3.3.6. NMR analizi

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü NMR araştırmaları laboratuvarında bulunan Varian Mercury 300 MHz H-NMR spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Çözücü olarak 10 mg D₂O (Deteryum Oksit) ve D₆ (DMSO) kullanılmıştır.

3.3.7. İstatistiksel analizler

İstatistik analizler için IBM SPSS 28.0 İstatistik programı kullanılmıştır. Duncan testi kullanılmış olup değerler arası fark, bağımsız değişkenler için p<0,05 anlamlılık düzeyinde 4 paralel örnek incelenmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kitosan Verimi

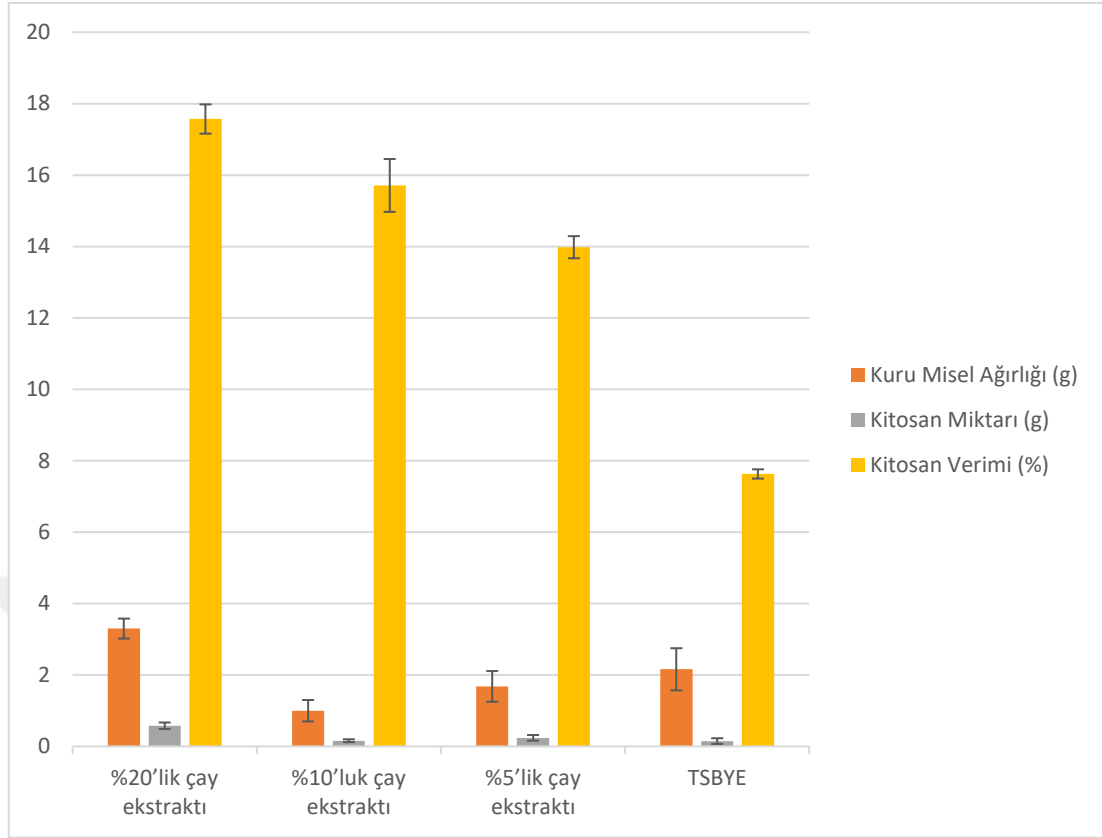
Yapılan çalışmadan alınan sonuçlarda, besiyeri amaçlı kullanılan çay ekstrakt yoğunluğu arttıkça küf misel gelişiminin de önemli derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$), (Tablo 4.1.), (Şekil 4.1.). Örneğin, %20 çay ekstraktı içeren besiyerinde gelişen *A. niger* küfü %5 ekstrakt içeren besiyerinde gelişen küfün kuru misel ağırlığına göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kuru küf misellerinden elde edilen kitosanın verimi ise besiyerindeki çay ekstrakt miktarı %5'ten %20'ye arttığında önemli ölçüde artmıştır ($p<0,05$). Çay ekstraktının %5 ve %10 olduğu besiyerlerinden elde edilen küf misellerinden ekstrakte edilen kitosan verimi arasında önemli fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Çay ekstraktından elde edilen besiyerinde geliştirilen küflerin kitosan verimleri TSBYE besiyerinde gelişen küflere göre de önemli ölçüde fazla bulunmuştur. Buna göre, bu çalışmada besiyerindeki çay ekstrakt miktarının %20 civarında kullanılmasının kitosan içeriği yüksek küf üretimini sağlayabileceği görülmüştür.

Tablo 4.1. Farklı yoğunluktaki çay ekstraktının küf gelişimi ve kitosan verimine etkisi

Besiyeri	Kuru Misel Ağırlığı (g)	Kitosan Miktarı (g)	Kitosan Verimi (%)
%20'lik çay ekstraktı	3,30±0,28 ^a	0,58±0,09 ^a	17,57±0,41 ^b
%10'luk çay ekstraktı	1,00±0,30 ^c	0,16±0,04 ^c	15,71±0,74 ^a
%5'lik çay ekstraktı	1,68±0,43 ^b	0,24±0,08 ^b	13,98±0,31 ^a
TSBYE	2,16±0,59 ^b	0,15±0,08 ^c	7,63±0,13 ^c

*Çay ekstraktı kurutulmuş atık çay otunun su içerisinde 121°C'de 15 dakika ısıtılması ve filtre kağıdından süzülmesi ile elde edilmiştir.

^{a-b-c}: Çizgiyle ayrılmış aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Farklı yoğunluktaki çay ekstraktının küf gelişimi ve kitosan verimine etkisi.

Atık çayda; %20-30 polifenol, %4-5 kafein, %2-4 amino asit, %2-4 şeker, %2,5 organik asit, %4-6 pektik kalıntı, %4-8 yağ, %5 mineral, %0,5 pigment ve %16 protein bulunmaktadır (Menon ve ark., 1993). Atık çayda bulunan besin içeriği, mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Selvakumar ve ark., 1998). *A. niger* de bu ortamda kolaylıkla gelişme imkanı bulmuş ve atık çay ortamı hücre duvarındaki kitosan miktarına da destekleyici etkide bulunmuştur.

Kitosan nitrojen içeren bir biyopolimer olduğundan, fungus hücre duvarları için kitin/kitosan üretmek için besin olarak inorganik veya organik nitrojen kaynağına ihtiyaç duyar (Moore-Landecker, 1996). Çalışmalarda nitrojen kaynağı, funguslar tarafından kitosan üretimi için önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Nwe ve ark., 2002c). Kitosan veriminde bir artış ya biyokütle verimini artırarak ya da kitosanın hücre duvarı içeriğindeki artışıyla elde edilebilmektedir. Besin ortamına bireysel takviye olarak manganez (Mn) ve demir (Fe) iyonlarının, hücre duvarlarındaki kitosan içeriğindeki artıştan ziyade biyokütle üretimindeki artış

yoluyla, kitosan verimini artırdığı gözlenmiştir (Jaworska ve Konieczna, 2001). Rane ve Hoover (1993), besiyerinin *Absidia coerulea*'dan kitosan üretimi üzerindeki etkisini incelemiş ve daha fazla miktarda glikoz ve protein ile takviye edilmiş besiyerinin, kitosan verimi üzerine olumlu etkisini göstermiştir. Besiyeri çay ekstrakt miktarının artmasıyla küf biyokütlesi dolayısıyla kuru misel ağırlığı artmıştır. Yine besiyeri çay ekstrakt miktarının artmasıyla kitosan verimi de artmıştır. Bunun sebebinin; çayda bulunan mineral (manganez, demir, azot), glikoz ve nitrojen kaynaklarının artmasıyla olabileceği düşünülmektedir.

Benzer bir çalışmada, patates dekstroz suyunun besiyeri olarak kullanılmasının birçok maya ve küfün kitosan verimlerine etkisi gözlenmiştir (Shimahara ve ark., 1989). Bu çalışmada *Rhizopus oryzae* TISTR3245'in 138 mg/g kuru ağırlıkta (%14 kitosan) maksimum bir kitosan verimi verdiği gösterilmiştir. *L. edodes*'in kitosan verimi %1,4-3,5 (Crestini ve ark. 1996), *R. oryzae*'nin kitosan verimi %13-15 (Hang, 1990) ve *Rhizopus spp.* kitosan verimi %13,8-14,6 olarak raporlanmıştır (Shimahara ve ark., 1989). Bu çalışmada ise, üç ayrı konsantrasyona sahip besiyeri ortamlarından en yüksek kitosan içeriği %20'lik çay karışımından elde edilen %17,57 kitosan ile diğer çalışmalarla kıyaslandığında benzer bir verim alındığı görülmektedir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Farklı mikroorganizmalardan üretilen kitosan miktarı (Pochanavanich ve Suntornsuk, 2002).

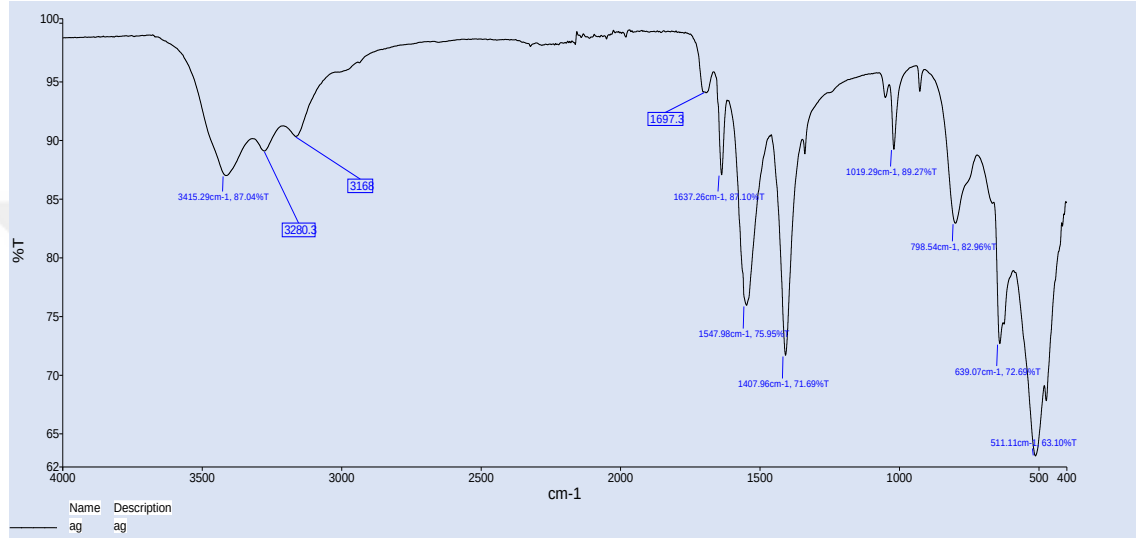
Türler	Kitosan Üretimi (mg/g)	Kitosan Verimi (%)
<i>Aspergillus niger</i>	107	11
<i>Rhizopus oryzae</i>	138	14
<i>Lentinus edodes</i>	33	3,3
<i>Pleurotus sajo-caju</i>	12	1,2
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	36	3,6
<i>Candida albicans</i>	44	4,4

4.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Ölçümü

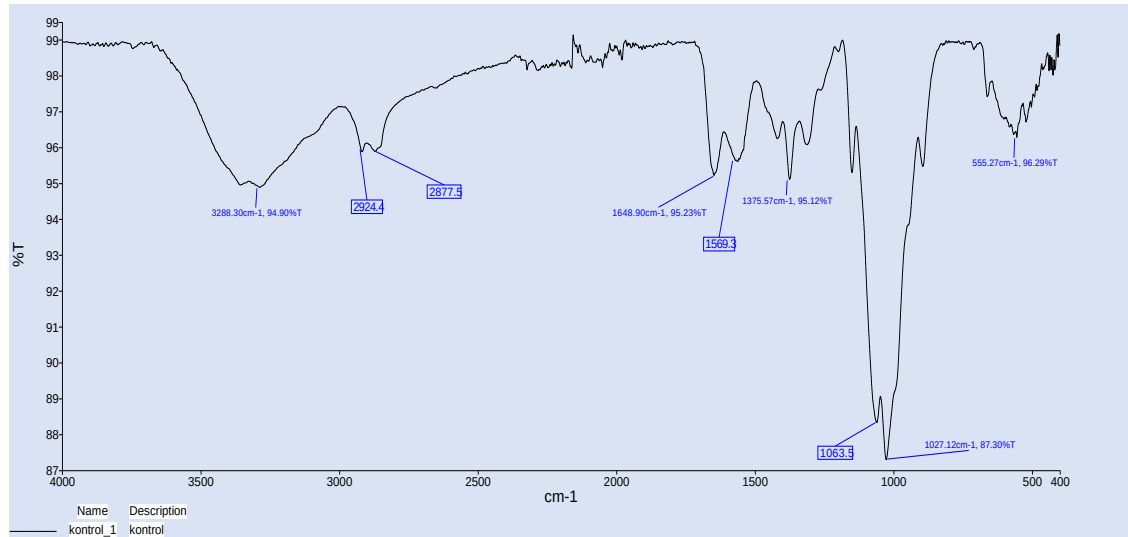
Atık çayda üretilen *A. niger*'den ekstraksiyon yoluyla üretilen kitosandan elde edilen FT-IR pikleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Burada *A. niger*'den üretilen (ASP) (a)'in değerleri; 3415 cm⁻¹, %87,04 T 3280, 3168 ve 1697,3, 1637,26 cm⁻¹, %87,10 T

1547,98 cm^{-1} , %75,95 T, 1407,96 cm^{-1} %71,69 T, 1019,29 cm^{-1} , %89,27 T, 798,54 cm^{-1} , %82,96 T, 511,11 cm^{-1} %63,10 olarak bulunmuştur. Ticari kitosan (TCK) (b) 3288,30 cm^{-1} , %94,90 T, 2924,4 2877,5 1648,90 cm^{-1} , %95,23 T, 1569,3 1375,57 cm^{-1} , %95,12 T, 1063,5 1027,12 cm^{-1} , %87,30 T, 555,27 cm^{-1} , %96,29 T olarak bulunmuştur.

a)



b)



Şekil 4.2. Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları ve tepe değerleri (a) ASPN: *A. niger*'den üretilen kitosan ve b) TCK: Ticari kitosan, T:Transmittance)

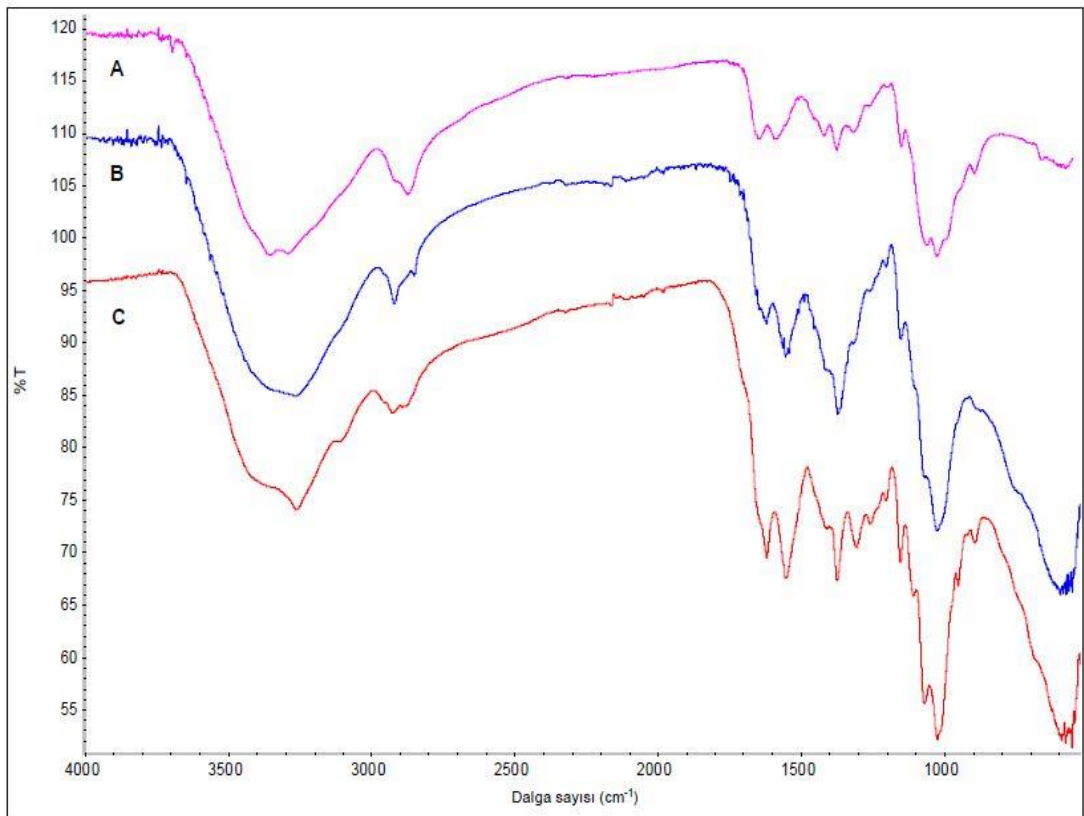
Sırasıyla; *A. niger* misellerinden üretilen kitosanın 3415 cm^{-1} bandı ve ticari kitosanın da 3288 cm^{-1} bandı, $-\text{NH}_2$ ve $-\text{OH}$ grubunun gerilme titreşiminden kaynaklı olduğu söylenebilir (Xu ve Du, 2003; Wang ve ark., 2004).

A. niger'den üretilen kitosanın 1637 cm^{-1} bandı ve ticari kitosanın 1648 cm^{-1} bandı karbonil gerilme $-\text{NH}$ amid bağlantı proteininden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *A. niger*'den üretilen kitosan 1637 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} ve 1547 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} bantlarının karbonil ($\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$) ve amin ($-\text{NH}_2$) grubunun ana karakteristik bantlarına ait olduğu düşünülmektedir (Arof ve Osman, 2003; Salokhe ve ark., 2005).

A. niger kitosanının 1407 cm^{-1} bandı $-\text{NH}$ ikincil aminleri, 1019 cm^{-1} bandı $\text{C}=\text{O}$ germe ve 1407 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} 'deki bantları kitosanın sakkarit yapısına atfedilmektedir (Mincheva ve ark., 2004). Ticari kitosanın 1569 cm^{-1} ve 1375 cm^{-1} bantları yine *A. niger* kitosandan elde edilen spektrumdaki bantları ile benzerdir. *A. niger* kitosanının 798 cm^{-1} 'deki bandı $-\text{NH}$ birincil ve ikincil aminleri, 1637 cm^{-1} , 1547 cm^{-1} ve 1407 cm^{-1} bantları proteinin kitosana bağlandığını göstermektedir. Kitosanın spektrumu, amid (1697 cm^{-1}) ve amino gruplarının karakteristik bantlarını göstermiştir (Han ve ark., 2010). Ancak, bu absorpsiyon bandının amino deformasyon modunun karakteristiği olduğu raporlanmaktadır (Brugnerotto ve ark., 2001). Ticari kitosana ait spektrumda bahsedilen birincil ve ikincil amin bantları görülmemiştir.

Fungal kitosanın 1407 cm^{-1} 'deki keskin piki CH_3 gruplarındaki simetrik eğilmeyi göstermektedir. Şekil 4.2. incelendiğinde *A. niger* kitosanı 3415 cm^{-1} bandı, $87,04\%$ T ve ticari kitosan ile benzer şekilde 3288 cm^{-1} bandı, $87,30\%$ T benzer iki pik görülmektedir. *A. niger* kitosanının daha geniş bir pike dönüştüğü ticari kitosan ile kıyaslandığında $3288,30\text{ cm}^{-1}$ bandı, $94,90\%$ T olduğu, ticari kitosanın spektrumunda ise daha az olduğu görülmektedir. Kitinden kitosana dönüşüm sonrasında, sekonder amid gruplarıyla ilişkili olan 3415 - 3280 - 3168 - 1697 - 1407 ve 1019 cm^{-1} dalga sayılarındaki ve $\text{C}-\text{H}$ bağlarıyla ilgili 1407 cm^{-1} 'de primer amidle ilişkili pik ortaya çıktığı düşünülmektedir (Velde ve Kiekens, 2004).

Elde edilen değerler ticari kitosan ile kıyaslandığında *A. niger*'den alınan kitosan %T değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Ticari kitosan, *A. niger*'den alınan kitosan ile kıyaslandığında; 3288 cm⁻¹, 1648 cm⁻¹, 1569 cm⁻¹, 1027 cm⁻¹ ve 555 cm⁻¹ bantlarının uyumlu olduğu görülmektedir. Ticari kitosanın (b) 500 cm⁻¹ bölgesinde diğerlerine göre farklılık görülmüştür. Bunun sebebinin ticari kitosanın kabuklulardan elde edilmesinden kaynaklı farklılık sebebiyle ve ekstraksiyon işlemindeki kalıntı maddeler olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.3. *A. niger* fungusundan elde edilen kitosanın FT-IR analizi (A: Ticari kitosan; B: 1 M NaOH ile muamele - 121°C, 20 dak; C: 1 M NaOH ile muamele - 90°C, 2 saat) (Koçer, 2015)

A. niger fungusundan elde edilen kitosana ait FT-IR spektrumları Şekil 4.3.'te verilmiştir. Elde edilen spektrumların birbirleri ile ve ticari kitosan ile uyumlu oldukları görülmektedir (Koçer, 2015). Koçer (2015)'in *A. niger*'den üretilen kitosanın FT-IR sonuçları ile kıyaslandığında atık çayda geliştirdiğimiz *A. niger*'den elde edilen kitosanın FT-IR analizi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

4.3. Fungal Kitosanın Antimikrobiyal Özellikleri

Bu çalışmada *A. niger*'den elde edilen kitosanın antibakteriyel ve antifungal aktivitesi *P. expansum*, *A. sydowii*, *A. wentii*, *A. japonicus*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *W. saturns*, *S. cerevisiae*, *E. coli O157:H7*, *S. aureus*, *S. Enterica*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* patojenlerine karşı belirlenmiştir. *A. niger*'den elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi yoğunluklara göre ticari kitosan ile karşılaştırılmıştır. Tablo 4.3.'te görülen örnekteki gibi incelenmiştir:

Tablo 4.3. Fungal kitosanların konsantrasyonlarına göre antimikrobiyal aktiviteleri

Mikroorganizma	Konsantrasyon (%)							
	0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	6
<i>A. japonicus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>A. clavatus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>A. sydowii</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. wentii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. expansum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>W. saturns</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli O157:H7</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. Enterica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

((+) Zone var, (-) Zone yok)

Tablo 4.4. Ticari kitosanın konsantrasyonlarına göre antimikrobiyal aktiviteleri

Mikroorganizma	Konsantrasyon (%)							
	0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	6
<i>A. japonicus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>A. clavatus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>A. sydowii</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>A. wentii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

((+) Zone var, (-) Zone yok)

Tablo 4.4. (Devamı)

<i>P. expansum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>W. saturns</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli O157:H7</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. Enterica</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	+	+	+	+

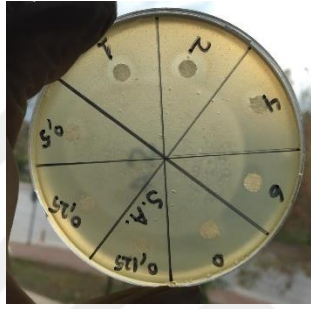
((+) Zone var, (-) Zone yok)

A. niger'den elde edilen kitosanın en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. cerevisiae*'ye karşı, en düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise *A. sydowii*'ye karşı göstermiştir (Tablo 4.3.). Ticari kitosanda ise en yüksek antimikrobiyal aktivite *S. aureus*'a, en düşük antimikrobiyal aktivite ise *P. expansum*'a karşı görülmüştür (Tablo 4.4.). Genel olarak bu çalışmada fungal kitosan küflere, maya ve bakterilerden daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir. Ticari kitosan ise maya ve bakterilere karşı, küflere göre daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte ticari kitosan, fungal kitosana göre test edilen mikroorganizmalara karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği raporlanmıştır.

Bu çalışmada üretilen fungal kitosan hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olup antibakteriyel aktivite gösterdiği bakterilerden bazıları *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*'dur (Şekil 4.4.). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kitosanın bakteriler üzerindeki inhibitör etkisinin daha çok bakteriyostatik olduğu görülmüştür (Goy ve ark., 2009; Kong ve ark., 2010). Kitosanın antifungal aktivite gösterdiği mayalardan bazıları *C. albicans*, *C. lambica*, *S. cerevisiae*'dir (Guo ve ark., 2007; Goy ve ark., 2009; Guo ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmamızda da fungal kitosanın en fazla antimikrobiyal etki gösterdiği mikroorganizma *S. cerevisiae*'dir.

Khalaf (2004) yaptığı bir çalışmada *R. oryzae* tarafından üretilen kitosanın, yengeç kabuklarından elde edilen kitosan ile karşılaştırıldığında, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.* ve *E. coli* gibi çeşitli patojenik bakteri suşlarına karşı daha yüksek

antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur. *A. niger* misellerinden ticari kitosana kıyasla *E. coli* ve *Salmonella spp.*'ye daha az antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Yine benzer bir çalışmada, No ve ark., (2003) farklı vizkoziteye sahip kitosan çözeltilerinin *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* ve *S. aureus*'un gelişimi önemli oranda engellediğini, *E. coli*'nin gelişiminde ise 4-5 log'luk bir azalış sağladığını raporlamışlardır (No ve ark., 2003). Bu çalışmada da benzer olarak kitosan *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli*'nin de gelişmelerini önemli ölçüde engellemiştir.



Şekil 4.4. *S. aureus*'un inhibisyon testinin görüntüsü

4.4. Deasetilasyon Derecesinin Sonuçları

Kitosanların deasetilasyon derecesinin sonuçları Tablo 4.5.'te gösterilmektedir:

Tablo 4.5. Kitosan çeşitlerinin deasetilasyon sonuçları

Cinsi	Kitosan kütlesi (m)	HCl (mL)	NaOH Hacmi (mL)
Ticari kitosan	0,1	10	11
<i>A. niger</i> 'den alınan kitosan	0,04	4	8

A. niger'den alınan kitosanın deasetilasyon derecesi:

$$\% \text{asetil} = V \times 0,04305 \div w = \% 8$$

$$\text{Deasetilasyon Derecesi (\%)} = 100 - \% \text{asetil} = \%92$$

Ticari kitosanın deasetilasyon derecesi:

$$\% \text{asetil} = V \times 0,04305 \div w = \% 11$$

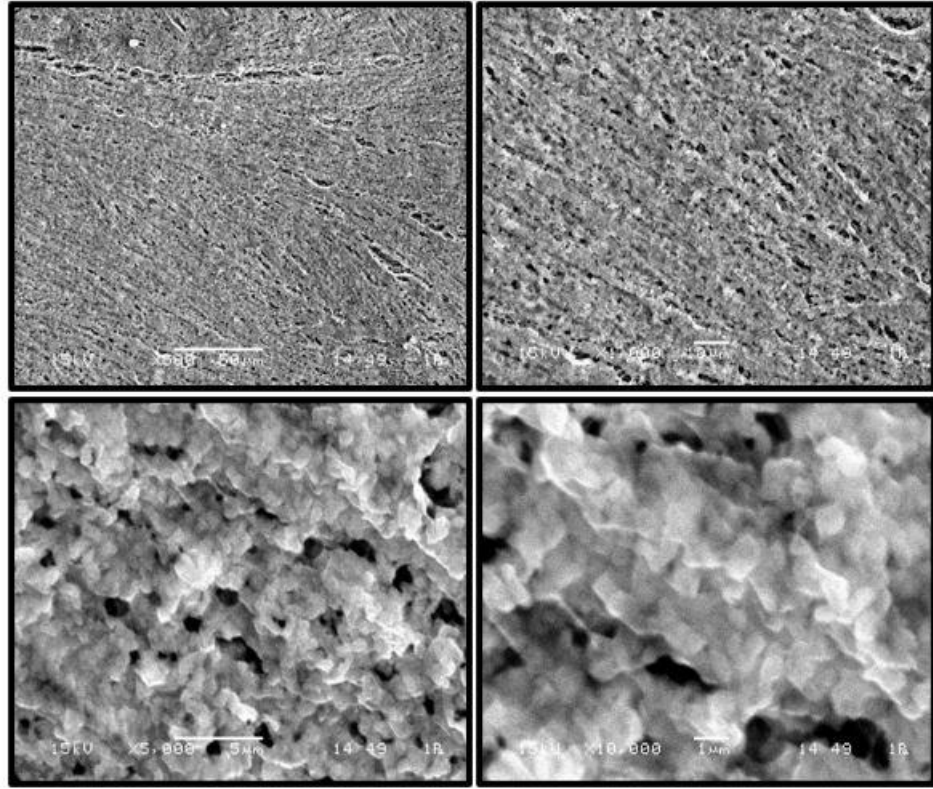
$$\text{Deasetilasyon Derecesi (\%)} = 100 - \% \text{asetil} = \%89$$

Sonuçlara bakıldığında; ticari kitosanın deasetilasyon değeri %89, fungal kitosanın deasetilasyon değeri ise %92 bulunmuştur. *A. niger*'den alınan kitosanın deasetilasyon derecesinin ticari kitosandan yüksek olduğu görülmüştür. Deasetilasyon derecesi kitosanın fizikokimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametredir. Yüksek derecede deasetilasyona sahip kitosan, yüksek pozitif yüklere sahiptir ve pıhtılaştırıcı veya şelatlayıcı ajan, berraklaştırıcı ajan veya antimikrobiyal ajan olarak gıda uygulamaları için daha uygundur (Crestini ve ark., 1996). Pochanavanich ve Suntornsuk'un (2002) yaptıkları çalışmada ticari kitosanın deasetilasyon değeri %98 ve fungal kitosanın deasetilasyon değeri %90 olarak raporlanmıştır. Sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir.

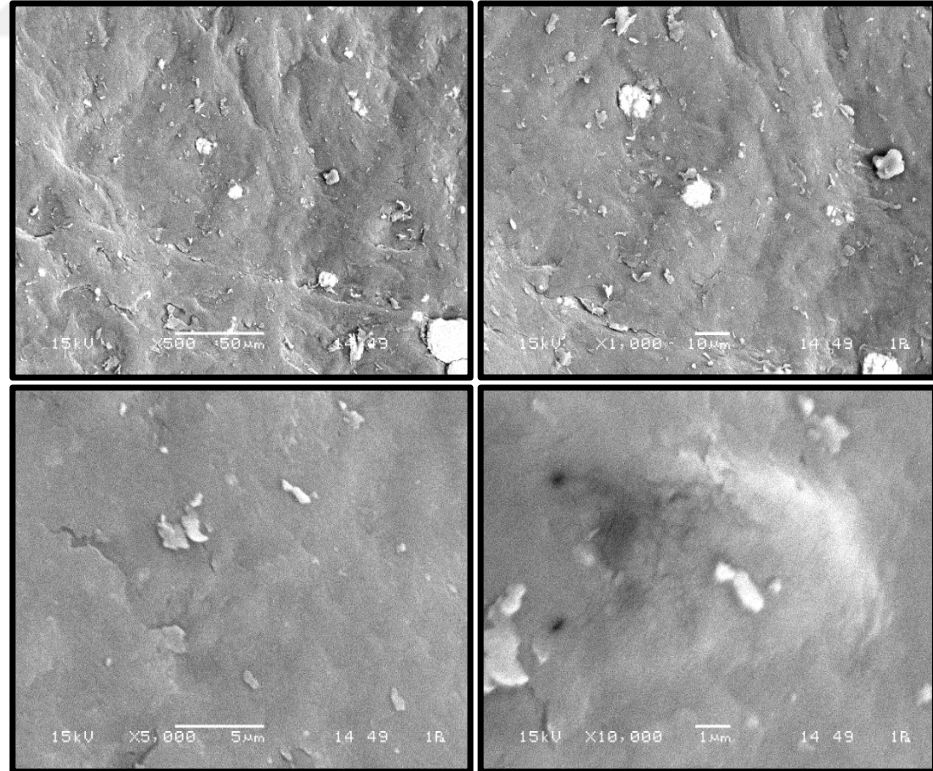
4.5. Alan Emülsiyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) Sonuçları

A. niger'den elde edilen kitosanın (a) yüzey morfolojisi incelendiğinde hem porlu hem de nanofiber yapılarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5.). Ticari kitosanın (b) yüzey morfolojisinin de nanofiber ve kitosanın yüzeyinin ise yine zayıf ve çok net olarak görülemeyen fiberlerden oluştuğu ve mikro porların olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5.). Mevcut çalışmadakine benzer şekilde krill, *Gammarus argaeus* ve pembe karides gibi Crustacea grubuna ait canlılardan elde edilen kitin ve kitosan yapılarının yüzeyleri porlu ve nanofiber yapılardan oluştuğu diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir (Kucukgulmez ve ark., 2011; Kaya ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013). Funguslardan elde edilen bazı kitin ve kitosanların ise porlu ya da nanofiber yapılarının bulunmadığı tespit edilirken (Yen ve Mau, 2007), diğer bazı funguslardan elde edilen kitin ve kitosanın sadece nanofiber yapılardan oluştuğu raporlanmıştır (Cahn ve ark., 2001, Yen ve Mau, 2004, Ifuku ve ark., 2011).

a)



b)

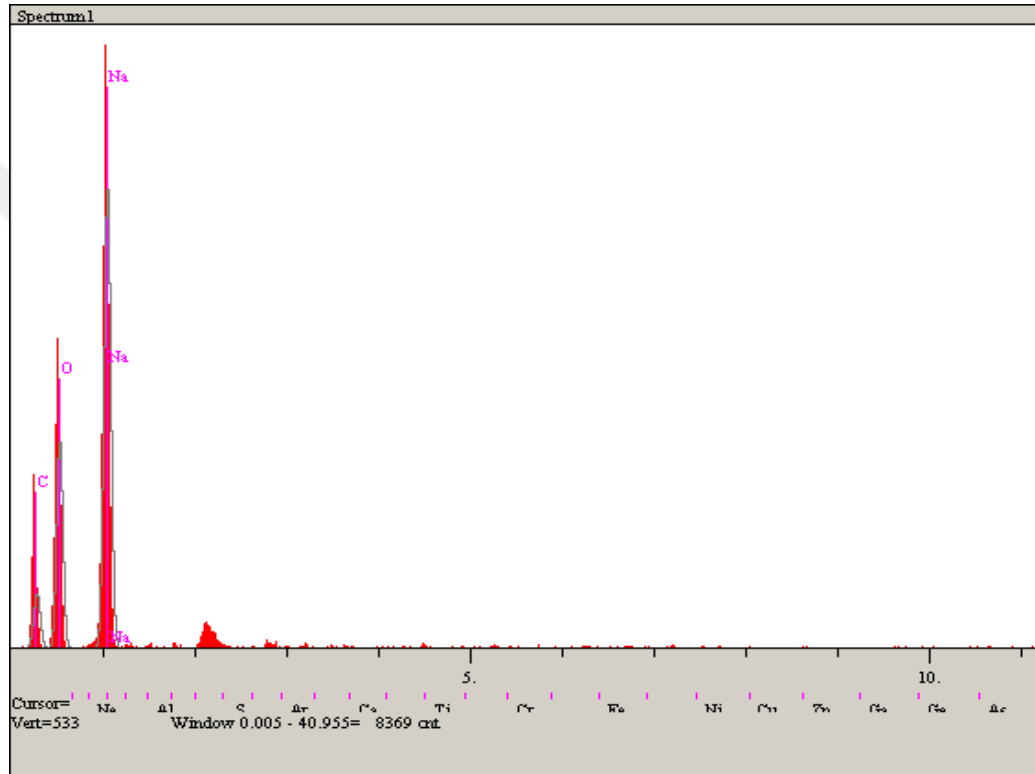


Şekil 4.5. *A. niger*'den üretilen kitosanın SEM görüntüleri (a) ve ticari kitosandan elde edilen SEM görüntüleri

(b)

A. niger'den elde edilen kitosanın mineral yapısını gösteren kompozisyon spektrumunda, ticari kitosana göre karbon (C) değerinin yüksek olduğu dolayısıyla ticari kitosanın *A. niger*'den üretilen kitosandan daha uzun zincire sahip olduğu söylenebilir (Şekil 4.6.). *A. niger*'den üretilen kitosanın sodyum (Na) miktarının ticari kitosandan çok daha fazla olduğu, *A. niger*'den üretilen kitosanda ticari kitosandan farklı olarak kalsiyumun (Ca) olmadığı görülmektedir.

a)



Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc	Units	
C	Ka	43.34	4.164	18.258	wt. %	
O	Ka	152.42	7.808	37.481	wt. %	
Na	Ka	371.24	12.185	44.261	wt. %	
				100.000	wt. %	Total

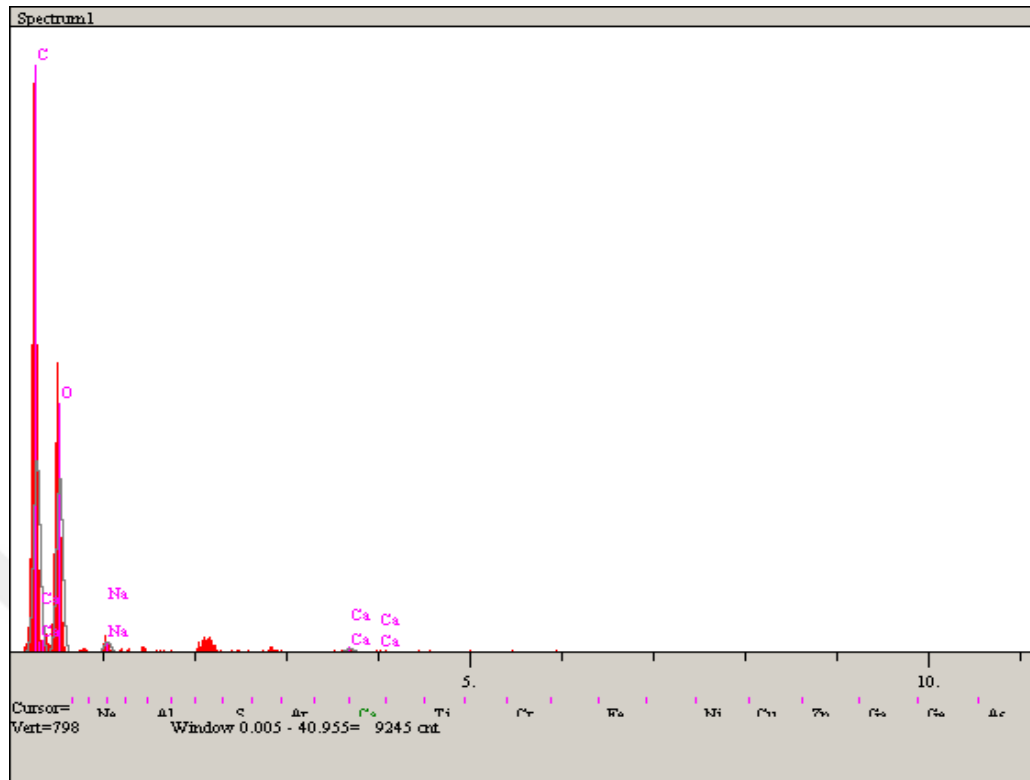
kV 15.0

Takeoff Angle 35.0°

Elapsed Livetime 10.0

Şekil 4.6. Kitosanların mineral dağılım spektrumları a) *A. niger*'den üretilen kitosan spektrumu, b) Ticari kontrol kitosan spektrumu

b)



Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc	Units	
C	Ka	226.82	9.523	39.249	wt. %	
O	Ka	191.45	8.749	58.081	wt. %	
Na	Ka	13.00	2.280	1.888	wt. %	
Ca	Ka	6.02	1.551	0.782	wt. %	
				100.000	wt. %	Total

kV 15.0

Takeoff Angle 35.0°

Elapsed Livetime 10.0

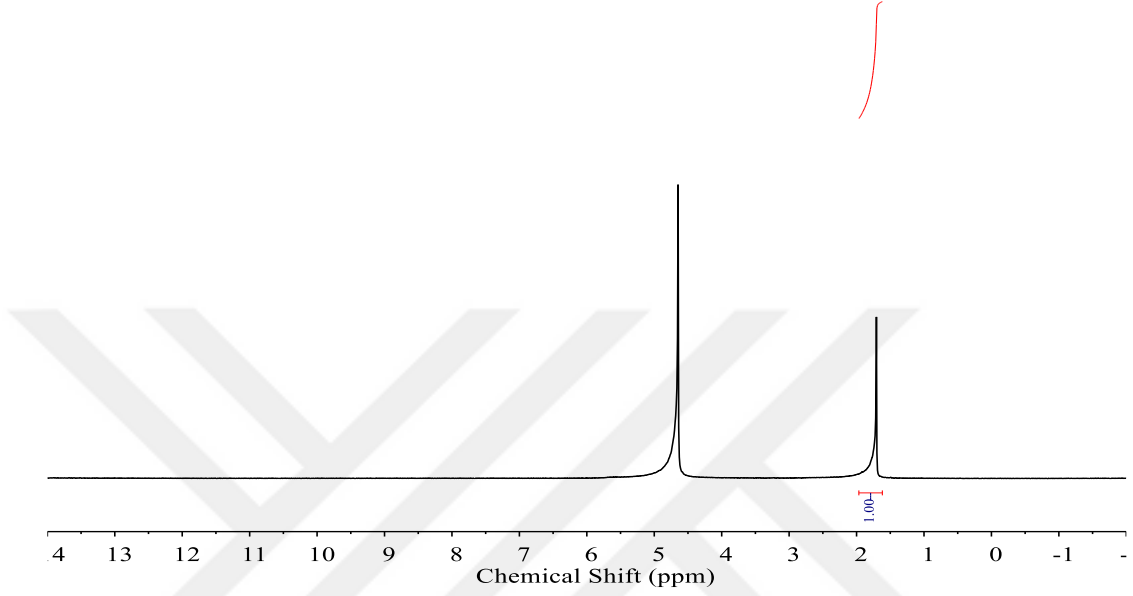
Şekil 4.6. (Devamı)

4.6. NMR Sonuçları

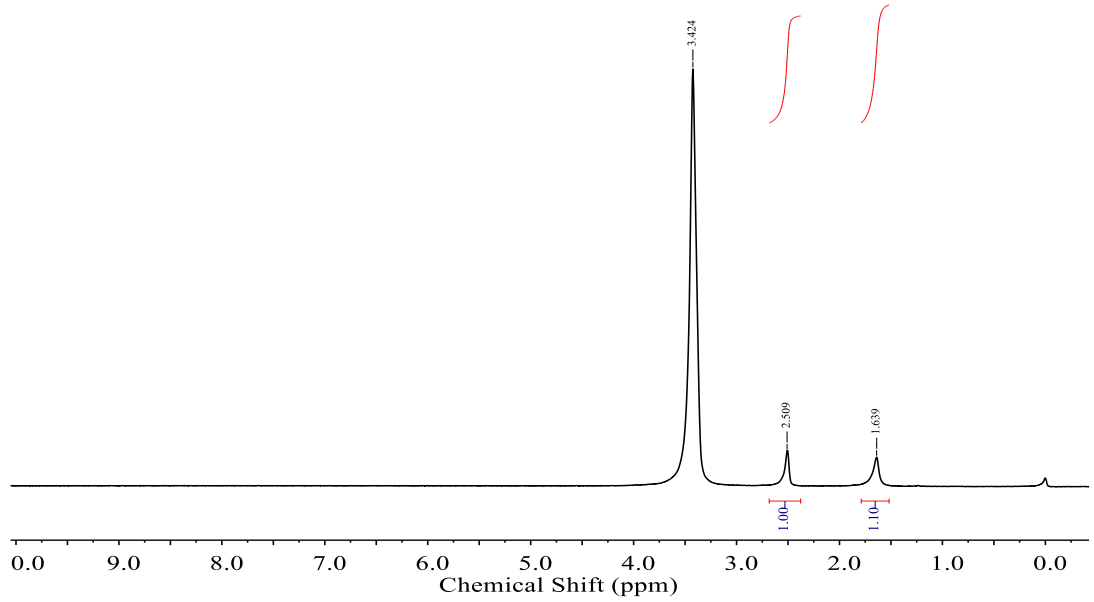
NMR spektrumunda (Şekil 4.7.) (a) D₂O ile çözündürülmüş kitosan spektrumunda iki ürün elde edilmiştir. Elde edilen piklerde; 1,5-2 ppm arasında kitosan numunesi ve 4,5-5 ppm arasında D₂O çözeltisi görüntülenmiştir. (b) D₆ (DMSO) ile çözündürülmüş kitosan spektrumunda dört pik elde edilmiştir. Bunlar; 0,1 ppm

NMR'dan kaynaklı pik, 1,5-2 ppm arası kitosan numunesi, 2,5 ppm H₂O, 3,5 ppm D₆ (DMSO) görüntülenmiştir. Bu sonuç yapı ile uyumludur.

a)

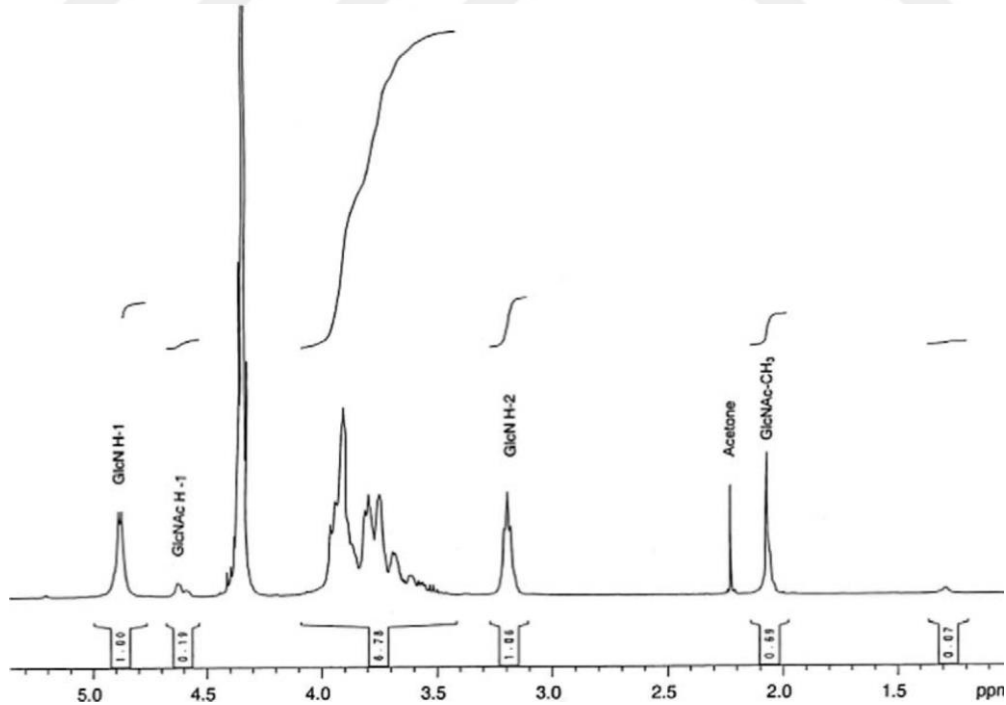


b)



Şekil 4.7. Kitosanın H-NMR Spektrumu (a) D₂O ile çözünmüş kitosan spektrumu, b) D₆ ile çözünmüş kitosan spektrumu)

Kitosanın tipik bir H-NMR spektrumu Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Kitosanın pikleri 2-3-2,4 ppm olarak bulunmuştur (Biskup ve ark., 2012). Polimerin her birim kalıntısında altı karbon ve yedi hidrojen atomu bulunur ve bu atomlar C-H bağları üretir. Ek olarak, polimer kalıntısının her bir birimi, dört oksijen atomu ile bağlanmış ve O-H grupları oluşturan dört hidrojen atomuna sahiptir. Birim kalıntıdaki bu bağların her biri kendi karakteristik ortamına sahiptir ve dolayısıyla kendi kimyasal kaymasına sahiptir. Polimerin H-NMR spektrumu, birbirlerine olan bağlantıları nedeniyle hafifçe değiştirilmiş olan bireysel birim kalıntılarının spektrumlarının üst üste binmesidir. 2,0–2,1 ppm'deki tepe noktası, üç N-asetil glukozamin (GlcNAc) protonunu temsil eder ve 3,1–3,2 ppm'deki tepe, glukozamin (GlcN) kalıntısının H-2 protonunu temsil eder. Molekülün spektrumunda, anomerik olmayan protonların sinyalleri kısmen örtüşür ve spektrumun ortasında geniş bir sinyal zarfı oluşturur. H NMR spektrumunun çeşitli bantları arasında 2,0-2,1 ppm metil protonları en yüksek çözünürlüğe sahiptir. Sonraki protonların sinyalleri, 4,05 ppm'de çözücünün (D_2O/CD_3COOD) HOD sinyalleriyle örtüşür. Çözücülerin kalıntı protonları için kimyasal kaymaların D_2O ($d = 4.7$ ppm) olduğu bildirilmiştir (Kasaai, 2009).



Şekil 4.8. 65 °C'de D_2O içinde kitosanın H-NMR spektrumu (600 MHz). Referans olarak aseton kullanılmıştır (2.2 ppm) (Yang ve Montgomery, 2000).

Moleküler ağırlık dağılımı ve ortalama moleküler ağırlığın yanı sıra içsel viskozite de önemli bir rol oynamaktadır. Kitosan çözeltisi agregat içermemelidir, bu nedenle kitosan için çözücü dikkatli seçilmelidir (Rinaudo, 2006).

Yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında elde ettiğimiz sonuç değerlere yakın bulunmuştur. Kitosanın pikinin biraz düşük olmasının nedeninin elde edilen kitosanın viskozitesinin düşük olmasına bağlanabilir.

4.7. Viskozite Sonuçları

Fungal kitosanın viskozitesi 0,5-0,8 centipoises (cP) ve ticari kitosanın viskozitesi 4,0-4,3 centipoises (cP) olarak bulunmuştur. Pochanavanich ve Suntornsuk yaptığı çalışmada fungal kitosanın viskozitesi 3,1–6,2 centipoises (cP) olup, yengeç kitosanının viskozitesinden oldukça düşüktür (Tablo 4.6.). Fungal kitosanın ve ticari kitosanın viskozitesi Pochanavanich ve Suntornsuk (2002) tarafından bildirilenlerden düşük çıkmıştır.

Tablo 4.6. Kitosanların viskozite değerleri

Sıcaklık (°C)	TCK (rpm)	Viskozite (cP)	ASPN (rpm)	Viskozite (cP)
20 °C	3,1	4,0	0,4	0,5
25 °C	3,5	4,3	0,6	0,8

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, projemizin amacı atık çay otundan elde edilen besiyerinde üretilen *A. niger*'den, klasik kitin kaynağına ve üretim metoduna alternatif olarak kimyasal yöntemlerle kitosan üretmek ve üretilen kitosanın belirli özelliklerini belirlemektir.

Besiyeri amaçlı kullanılan %20'lik çay ekstraktından %17,57, %10'luk çay ekstraktından %15,71 ve %5'lik çay ekstraktından %13,98 oranında kitosan verimi elde edilmiştir. Kitosan verimi çay ekstrakt miktarının artmasıyla artmıştır. Elde edilen kitosan miktarı literatürde yer alan çalışmalarda *A. niger* fungusundan elde edilen değerlerin üzerinde olduğu görülmektedir (Wu ve ark., 2005).

Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları ticari kitosan ile uyumlu olmakla birlikte, ticari kitosanda 3100 cm^{-1} 'de kaybolan absorbans bandı fungal kitosanların spektrumları ile kıyaslandığında farklılık göstermektedir. Ancak *A. niger* küfünden elde edilen kitosanın diğer benzer çalışmalarda FT-IR spektrumları ile uyumlu olduğu görülmüştür (Koçer, 2015). İlave olarak, Paulino ve arkadaşları (2006) ve Di Mario ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmalarda, kabuklulardan elde edilen kitosanların FT-IR spektrumlarında da aynı pik gözlemlenmektedir; bu da elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kitosan, tüm mikroorganizma türlerine karşı düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu aktivite, artan kitosan konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artmakla birlikte artış oranı bakteri, maya ve küf türüne göre farklılık göstermektedir. *A. niger* küfünden elde edilen kitosan en yüksek antimikrobiyal aktivite *S. cerevisiae*'ye karşı, en düşük antimikrobiyal aktiviteyi *A. sydowii*'ye karşı göstermiştir. Fungal kitosan küflere karşı, maya ve bakterilere karşı gösterdiğinden daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir. Ticari kitosan ise maya ve bakterilere

karşı, küflere göre daha fazla etki göstermiştir. Antimikrobiyal aktivitedeki bu farklılık kullanılan yöntem, mikroorganizma suşu ve elde edilen kitosanın fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanmış olabilir.

A. niger küfünün hücre duvarından elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi %92 olarak bulunmuştur. Ticari kitosanın %89 olarak bulunmuş deasetilasyon derecesi literatürde raporlanmış değerlerle kıyaslandığında yüksek olduğu görülmüştür.

Elde edilen kitosanların deasetilasyon derecesi kullanılan metoda ve serbest amino grupları ile kitosanların karakteristiğinde neden olunan değişikliklere bağlı olarak %30-95 arasında değişmektedir. Amino grupları aktif fonksiyonel gruplar olup antibakteriyel aktivite için gereklidir (Chung ve Chen, 2008). Daha önce yapılan birçok çalışmada yüksek deasetilasyon derecesi sahip olan kitosanların düşük olanlara nazaran daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Park ve ark., 2004).

A. niger'den elde edilen kitosanın yüzey morfolojisi incelendiğinde hem porlu hem de nanofiber yapılarının olduğu gözlenmiştir. Ticari kitosandan elde edilen kitosanın yüzey morfolojisinin de nanofiber ve kitosanın yüzeyinin ise yine zayıf ve çok net olarak görülemeyen fiberlerden oluştuğu ve mikro porların olduğu gözlenmiştir.

A. niger'den elde edilen spektrumda, ticari kitosana göre karbon (C) değerinin düşük olduğu dolayısıyla ticari kitosanın *A. niger*'den üretilen kitosandan daha uzun zincire sahip olduğu raporlanmıştır. *A. niger*'den üretilen kitosanın sodyum (Na) miktarının ticari kitosandan çok fazla olduğu, *A. niger*'den üretilen kitosanda ticari kitosandan farklı olarak kalsiyumun (Ca) olmadığı görülmüştür.

Fungal kitosanın (0,5-0,8 cP) ve ticari kitosanın (4,0-4,3 cP) viskozitesi literatürde verilen değerlere göre düşük çıkmıştır. Viskozite, kitosan molekül ağırlığının belirlenmesinde ve dolayısıyla endüstriyel uygulamalarının belirlenmesinde önemli bir parametredir. Daha yüksek molekül ağırlık içeren kitosan, genellikle endüstriyel uygulamalar için arzu edilmeyen yüksek viskoziteli çözümler sunar. Bu bakımdan

daha düşük viskoziteli kitosanlar tercih edilir. Kitosanın çözelti viskozitesi, moleküler boyutuna, katyonik karakterine ve konsantrasyonunun yanı sıra çözücünün pH ve iyonik gücüne de bağlıdır (Rinaudo, 2006).

Atık maddeler kullanılarak yüksek miktarlarda üretilebilen küften elde edilen kitosan biyopolimeri, çevre ve canlıya karşı nontoksik özelliğinin olması, biyolojik olarak bozunabilir olması, yüksek biyouyumluluğu, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından diğer polimerlere kıyasla daha avantajlı olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı farklı disiplinlerde geniş kullanım alanlarına sahip olabilecektir. *A. niger*'in dünya genelinde yaygın olarak bulunması, kolay kültüre edilebilir olması nedeniyle iyi bir alternatif kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. İlave olarak bu çalışma, Türkiye'de çok fazla tüketilen çay atığına da değerlendirilebilecek bir alan kazandırmış olup bu konudaki araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Agboh, O.C., Qin, Y. 1997. Chitin and Chitosan Fibers, *Polymers for Advanced Technologies*, 8, 355-365.
- Aiba, S. 1992. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially n-acetylated chitosans, *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 225-228.
- Akova, Y. 2005. İhracatı Geliştirme Etüt Merkezi.
- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 71-74.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3, 203-230.
- Arcidiacono, S., Kaplan, D.L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 281-286.
- Arof, A.K., Osman, Z. 2003. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes, *Electrochim. Acta* 48, 993-999.
- Arthur Felse, P., Panda, T. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives, *Bioprocess Engineering*, 20, 505-512.
- Baker, S.E. 2006. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future, *Medical Mycology* September, Washington USA, 44:17-21.
- Barbosa, M. C. S., Soccol, C. R., Marin, B., Todeschini, M. L., Tonial, T., Flores, V. 1995. Prospect for production of *Pleurotus sajorcaju* from cassava fibrous waste. In: Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G, eds. *Advances in Solid State Fermentation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 513-525.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi, *Annual Review of Microbiology*, 22, 87-108.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Fel, O., Peppas, N.A., Gurny, R. 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 19-34.
- Bhatia, S.C., Ravi N. 2003. A Mossbauer Study of the interaction of chitosan and dglucosamine with iron and relevance to other metalloenzymes. *Biomacromolecules*, 4, 723-727.

- Biskup, R. C., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., Rosiak, J. M. 2012. Determination Of Degree Of Deacetylation Of Chitosan-Comparison Of Methods, Institute of Applied Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, ul. Wróblewskiego 15, 93-590.
- Bizuye, A., Moges, F., Andualem, B. 2013. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3, 375-381.
- Brugnerotto, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42:3569–3580.
- Cahn, H.Y., Chen, M.H., Yuan, G.F. 2001. Fungal chitosan. *Fungal Science*, 16 (1,2), 39–52.
- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., Kennedy, J.F. 2006. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*, *Carbohydrate Polymers*, 65, 211-217.
- Cardoso, A., Lins, C.I.M., Santos, E.R., Silva, M.C.F., Campos, T.G.M. 2012. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. *Molecules*, 17, 4904-4914.
- Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. 2001. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22, 261-268.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P. 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, 40, 395-400
- Chen, R.H., Tsaih M.L. 1998. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution. *Int. Journal of Biol. Macromol.*, 23: 135- 141.
- Chen, R.H. 2000. Progress and perspective of chitin and chitosan science and industry in Asia, In *chitin and chitosan in life science*, T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo, eds., Kodansha, 487-496.
- Cherif, M., Benhamou, N., Belanger R.R. 1993. Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum*- a comparative study with other plant pathogenic fungi, *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 213-22.
- Cho, Y.W., Chung, S.H., Yoo, G., Ko, S. W. 1999. Water soluble chitin as a wound healing accelerator, *Biomaterials*, Vol. 20, p. 2139-2145.
- Cho, Y.W., Jang, J., Park, C.R., Ko, S.W. 2000. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins, *Biomacromolecules*, 1, 609-614.
- Chung, Y. C., Chen, C. Y., 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technol*; 99: 2806-14.
- Crestini, C., Kovac, B., Giovannozzi-Sermanni, G. 1996. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering* 50, 207–210.

- Demir, A., Seventekin N. 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3, 92-103.
- Di Mario, F., Rapan, P., Tomati, U., Galli, E. 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes, International Journal of Biological Macromolecules, 43, 8-12.
- Dodane, V., Vilivalam, V.D. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan, Pharmaceutical Science & Technology Today, 1, 246-253.
- Donald, H.D., Hayes, E.R. 1988. Determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. Methods in Enzymology 161, 442-446.
- Dube, H. C. 1990. Nutrition of fungi. In: An introduction to fungi. 2nd ed. India: Vikas Publishing House Pvt. Ltd., 481-499.
- Dung, P.I., Milas, M., Rinaudo, M., Desbrières, J. 1994. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan, Carbohydrate Polymers, 24, 209-214.
- Durand, A., Renaud, R., Maratray, J., Almanza, S., Diez, M. 1996. INRA-Dijon reactors for solid state fermentation: Designs and applications. J Sci Ind Res 55: 317-332.
- Dutta, P.K. Dutta, J., Tripathi, V. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, Journal of Scientific and Industrial Research 63, 20-31.
- Elibol, M., 2008. Kabuklu Katı deniz ürünleri artıklarından kitin, kitosan ve türevlerinin üretimi, TÜBİTAK Proje No: 106M241, İzmir.
- Erdal, S., Taşkın, M. 2010. Production of alpha-amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. Romanian Biotechnology Letters, 15, 5342-5350.
- Gagne, N. 1993. Production of Chitin and Chitosan from Crustacean Waste and Their Use as A Food Processing Aid, PhD Tezi, McGill University, Canada.
- Goy, R.C., De Britto, D., Assis, O.B.G. 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, Polímeros: Ciência e Tecnologia, 19, 241-247.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wanga, L., LI, P. 2007. Antifungal Properties of Schiff Bases of Chitosan, N-Substituted Chitosan and Quaternized Chitosan, Carbohydr. Res., 342, 1329-1332.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., LI, P. 2008. The Influence of Molecular Weight of Quaternized Chitosan on Antifungal Activity, Carbohydr. Polym., 71, 694-697.
- Han, J., Zhou, Z., Yin, R., Yang, D., Nie, J. 2010. Alginate-chitosan/hydroxyapatitepolyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 199-205.
- Hang, Y.D. 1990. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. Biotechnology Letters 12, 911-912.

- Harish Prashanth, K.V., Tharanathan, R.N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117-131.
- Hirano, S. 1996. Chitin Biotechnology Applications, *Biotechnology Annual Review*, (eds: El-Gewely, M.R.), Elsevier, 237-258.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., Saimoto, H. 2011. Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms. *Materials*, 4: 1417-1425.
- Illum, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *International Journal of Pharm. Res.*, 15, 1326-1331.
- Imeri, A.G., Knoor, D. 1998. Effects of chitosan on yield and compositional data carrot and apple juice. *Journal of Food Science*, 53: 1707-1709.
- Jaworska, M.M., Konieczna, E. 2001. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 220-224.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tamura, H. 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 28, 142-150.
- Junginger, H.E., Verhoef, J.C. 1998. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs a fiction. *Journal of PSTT*, 1, 370-376.
- Kasaai, M. R. 2009. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review, *Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural and Natural Resources University, Carbohydrate Polymers* 79, 801–810.
- Kasana, R.C., Kaur, B., Yadav, S.K. 2008. Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 207-212.
- Kaş, H.S. 2002. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. Ed: Gürsoy, A. Z, *Kontrollu Salım Sistemleri*. 65-102, Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul.
- Kaya, M., Tozak, K.Ö., Baran, T., Sezen, G., Sargin, I. 2013. Natural porous and nano fiber Chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea). *Excli Journal* 12: 503-510.
- Kaya, M., Cakmak, Y. S., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Menten, A., Tozak, K. O. 2014. New Chitin, Chitosan, and O-Carboxymethyl Chitosan Sources from Resting Eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with Physicochemical Characterization, and Antimicrobial and Antioxidant Activities *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19: 58-69.
- Khalaf, S.A. 2004. Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *Int J Agri Biol* 6: 1033–1036.
- Knittel, D., Schollmeyer, E. 1998. Chitosan und seine Derivate für die Textilveredlung Teil 1: Ausgangsposition, *Textilveredlung*, 33, Nr.3-4.

- Koçer, İ., 2015. Farklı yöntemlerle kitosan eldesi ve karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Kofuji, K., Qian, C.-J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., Kawashima, S. 2005. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan, *European Polymer Journal*, 41, 2784-2791.
- 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, *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 51-63.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat H., Kadak, A.E. 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*. 126, 1144-1148.
- Kumar, M.N.V.R. 2000. A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kumar A., Varadaraj M., Gowda L., Tharanathan R. 2007. Low molecular weight chitosans-preparation with the aid of pronase, characterisation and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica Acta*. 1770,495-505.
- Kumaresapillai, N., Bash, R. Ameer, Sathish R. 2010. Production and Evaluation of Chitosan from *Aspergillus Niger* MTCC Strains, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Ultra College of Pharmacy, Madurai, Tamil Nadu, India. Department of Pharmacology, 553-558.
- Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., Nishiyama Y. 2000. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation, *Carbohydrate Polymers*, 42, 19-21.
- Kurita, K. 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Marine Biotechnol.*, 8, 203-226.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Kitin (chitin), kitosan (chitosan) ve türevlerinin gıdalarda kullanım olanakları. *Gıda*, 30(6): 371-378.
- Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., De Yao, K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335.
- Lucia, R.B., Thayza C.M.S., Thatiana M.S., Sergio, R.C., Antonio, C., Adamares, M., Aline, E., Galba M. 2014. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains, *Journal of Mol. Sci*,15, 9082-9102.
- Luis, C.M., Carmen, A.M., De L.G.M. 2003. Removal of heavy metals by using adsorption on alumina or chitosan. *Journal of Anal Bioanal Chem*, 375,820-825.
- Maezaki, Y., K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto, T. Tsugita, W. Takekawa, A. Terada, H. Hara ve T. Mitsuoka. 1993. Hypocholesterolemic effect of Chitosan In Adult Males. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1439-1444.

- Maghsoodi, V., Yaghmaei, S., Beigi, S.M. 2008. Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition*, 27, 47-52.
- Maghsoodi, V., Yaghmaei, S. 2010. Comparison of Solid Substrate and Submerged Fermentation for Chitosan Production by *Aspergillus niger*, *Chemistry and Chemical Engineering Vol. 17, No. 2*, pp. 153-157, Sharif University of Technology.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes, *Carbohydrate Research*, 273, 235-242.
- Mathur, N.K., Narang, C.K. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942.
- Menon, K.K.G., Mulky, M.J., Sharma, V.S. 1993. The tea industry in India: how to redesign a native tea culture, processing and marketing, Oxford and IBH, New Delhi, pp. 3-10.
- Mincheva, R., Manolova, N., Sabov, R., Kjurkchiev, G., Rashkov, L. 2004. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials, *e-Polymers* 058, 1-11.
- Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. 4th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 251-278.
- Mourya V.K., Inamdar N.N. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore: *Reactive & Functional Polymers* 68, 1013-1051.
- Muzarelli, R.A.A., Peter, M.G. 1977. *Chitin Handbook*, Atec, Grottammare.
- Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F., Emanuelli, M., Mariotti, S.N. 1982. (Carboxy methylidene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydr. Res.* 107, p.199 – 214.
- No, H.K., Cho, Y.I., Meyers, S.P. 1996. Dye binding capacity of commercial chitin products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1939-1942.
- No, H.K., Cho, Y.I., Kim, H.R. 2000. Meyers, S.P., Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 psi/121 °C, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2625-2627.
- No, H.K., Lee, S.H., Park, N.Y., Meyers, S.P. 2003. Comparison of Physicochemical, Binding, and Antibacterial Properties of Chitosans Prepared Without and with Deproteinization Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7659-7663.
- Nwe, N., Stevens, W. 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction, *Biotechnology Letters*, 24, 131-134.

- Nwe, N., Chandrkrachang, S., Stevens, W.F., Maw, T., Tan, T.K., Khor, E., Wong, S.M., 2002c. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation, *Carbohydrate Polymers*, 49, 235-237.
- Nwe, N., Stevens, W.F. 2004. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Proc Biochem*, 39: 1639–1647.
- Nwe, N., Chandrkrachang, S., Stevens, W.F. 2004. Application of chitosan in Myanmar's agriculture sector. *Proceedings of the Sixth Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium*, May 23–26, The National University of Singapore.
- Ofori-Kwakye, K., Fell J.T. 2003. Biphasic drug release from film-coated tablets. *Journal of Pharm.*, 250,431-440.
- Oshita, K., Oshima, M., Gao, Y.H., Lee, K.H. and Motomizu S., 2002. Adsorption behavior of mercury and precious metals on cross-linked chitosan and the removal of ultratrace amounts of mercury in concentrated hydrochloric acid by a column treatment with cross-linked chitosan. *Journal of Anal. Sci.*, 18,1121-1125.
- Öl, G. 1981. Çayın Besin değeri ve Yararlı Etkileri, A.Ü.Z.F. Yayınları, 771.
- Park, P. J., Je, J. Y., Byun, H. G., Moon, S. H., Kim, S. K. 2004. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *J Microbiol Biotechnol* 14: 317–323.
- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J. 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 98-103.
- Peter, M.G., Kegel, G., Keller, R. 1986. Structural studies on sclerotized insect cuticle. In: Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW (eds) *Chitin in nature and technology*. Plenum Press, New York, pp 21–28.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition, Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York.
- Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization, Department of Microbiology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand, 35, 17–21.
- Rane, KD, Hoover, DG. 1993. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Proc Biochem* 28: 115–118.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Saghafian, A., 2013. Steril olmayan koşullar altında psikrotolerant mayalarla peynir altı suyundan biyolipitlerin üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Salokhe, V.M., Rakshit, S.K., Pranoto, Y. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, *Lebensm.-Wiss. und Technol.* 38, 859–865.

- Samapundo, S., Devliegherea, F., Geeraerd, A.H., De Meulenaerb, B., Van Impec, J.F., Debeverea, J. 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn, *Food Microbiology*, 24, 517–529.
- Sandford, P.A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications, G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford, eds., Elsevier, N.Y., 51-69.
- Satyanarayana, T., Kunze, G. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Atlantic Pub. & Distr. (P) Ltd., XXI, New Delhi, India, 744.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., Van Dijck, P.W.M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *App. Microbiol biotechnol.* 59: 426- 435.
- Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A. 1998. Biosynthesis of glucoamylase from *Apergillus Niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate, *Bioresource Technol.* 65:83-85.
- Sezer, E., 2007. Investigation of Parameters Effecting Drug Release From Chitosan Microspheres, MMS. Thesis, Ankara University.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K., Sannan, T. 1989. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In *Chitin and Chitosan* ed. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sanford, P. pp. 171–178. London: Elsevier Applied Science.
- Skaugrud, A., 1989. Chitosan makes the grade. *Journal of Manuf. Chemist*, 31-35.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Casarini, D., Pifferi, P.G. 2001. A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 427-4381.
- Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O. and Campos-Takaki GM. 2013. Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. In *Practical Applications in Biomedical Engineering*, 1st ed.; Andrade, AO. Pereira, AA. Naves, ELM. Soares, AB. Eds. 9, 229–244, InTech: Rijeka, Croatia.
- Stevens, W.F., Win, N.N., Ng, C.H., Pichyangkura, C., Chandkrachang, S. 1997. Towards technical biocatalytic deacetylation of chitin, *Advances in chitin science*, (eds: Domard A., Roberts, G.A.F.), Jacques Andre, 40-47.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A.A.Q. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan, *Food Chemistry*, 60, 605-610.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 145-171.
- Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.K., Khor E. 1996. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time, *Carbohydrate Polymers*, 30, 239-242.

- Taşar, C. O., Erdal, S., Taşkın, M. 2016. Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier-Ataturk University, 89, 428–433.
- Taşkın, M., Erdal, S. 2011. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. *Journal of Science Food Agriculture*, 91, 1440-1445.
- Taşkın, M., Ortucu, S., Unver, Y., Arslan, N.P., Algur, O.F, Saghafian, A. 2013. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* MBG-10 using starch-rich waste loquat kernels as substrate. *Starch*, 65 (3-4), 322-329.
- Tayel, A. A., Shaaban, M., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., Hartfiel A. N. 2010. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute, Menoufiya University, Egypt, Elsevier, International Journal of Biological Macromolecules* 47, 10–14.
- Tayel, A.A., Moussa, S.H., El-Tras, W.F., Elguindy, N.M., Opwis, K. 2011. Antimicrobial textile treated with chitosan from *Aspergillus niger* mycelial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 241-245.
- Teng, W.L., Khor, E., Tan, T.K., Lim, L.Y., Tan, S.C. 2001. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi, *Carbohydrate Research*, 332, 305-316.
- Tharanathan, R.N., Kittur, F.S. 2003. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43 ,61–87.
- Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A., Vincendon M., Vottero P. 2000. On the influence of deacetylation process On the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin: *Polymer*. 41, 2463-2469.
- Tsaih, L. M. ve Chen, R. H. 2003. The Effect of Reaction Time and Temperature During Heterogeneous Alkali Deacetylation on Degree of Deacetylation and Molecular Weight of Resulting Chitosan: *Journal of applied polymer science*. 88, 917-2923.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tool in biotechnology: *Tibtech*. 18, 305-312.
- Tüfekçi, M. 1989. *Türk Çaylarında Bazı Toksik Metallerin (Kurşun, Kadmiyum, Civa) Araştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon*, 1-173.
- Velde, V., Kiekens, K. P. 2004. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR, *Carbohydrate Polymers*, 58, 409-416.
- Wang, X., Du, Y., Liu, H. 2004. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Zn complex, *Carbohydr. Polym.* 56, 21–26.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C. 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydr. Polym.* 92: 90–97.

- White, S.A., Farina, P.R., Fulton, I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*, *Applied and Environment Microbiology*, 38, 323-328.
- Wibowo, S., Velazquez, G., Savant, V., Torres, J.A. 2007. Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan–alginate complexes, *Bioresource Technology*, 98, 539-545.
- Win, N.N., Stevens, W.F. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 334-341.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S., Sams, C.E. 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3888-3894.
- Xu, Y., Du, Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 250, 215–226.
- Yang, B. Y., Montgomery, R. 2000. Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 323, 156–162.
- Yen, M.T., Mau, J.L. 2004. Physicochemical properties of chitin from shiitake stipes and crab shells. *Annual Tainan Woman's Coll. Arts Technol.* 23: 229– 240.
- Yen M.T., Mau J.L. 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shii take stipes, *LWT, FoodSci. Technol.* 40: 472-479.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano, S. 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx Mori*) pupa exuvia, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rukiye AVCI

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Gıda Mühendisliği	Devam ediyor
Lisans	Bayburt Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Gıda Mühendisliği	2016
Lise	Tuzla Halil Türkkan Anadolu İmam-Hatip Lisesi	2012

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2020-2021	Sistem Eğitim ve Belgelendirme Ltd. Şti.	Gıda Mühendisi
2018-2020	Mazili Cafe	Müdür

YABANCI DİL

İngilizce

Arapça