T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARİDES ATIKLARINDAN ELDE EDİLEN KİTOSAN İLE TİCARİ KİTOSANIN MOLEKÜLER YAPI, KİMYASAL ÖZELLİKLER VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN TEST VE ANALİZLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

BUKET HAMZAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UYGULAMALI BİLİMLER VE TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nilgün BECENEN

EDİRNE-2023

Buket HAMZAOĞLU'nun hazırladığı **"KARİDES ATIKLARNDAN ELDE EDİLEN KİTOSAN İLE TİCARİ KİTOSANIN MOLEKÜLER YAPI, KİMYASAL ÖZELLİKLER VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN TEST VE ANALİZLERLE KARŞILAŞTIRILMASI"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Doç. Dr. Nilgün BECENEN	……
Doç. Dr. Gühergül ULUÇAM	……
Dr. Öğr. Üyesi Berkay BARIŞ	……

Tez Savunma Tarihi: 19/01/2023

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Nilgün BECENEN
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……
(Ünvan, Ad, Soyad)
Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
UYGULAMALI BİLİMLER VE TEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

19/ 01 / 2023
Buket HAMZAOĞLU
İmza

Yüksek Lisans Tezi

Karides Atıklarından Elde Edilen Kitosan ile Ticari Kitosanın Moleküler Yapı, Kimyasal Özellikler ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Test ve Analizlerle Karşılaştırılması

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Çevreyi ve insan sağlığını korumak için yeşil ve ekolojik üretime yöneliş oluşmuştur. Bilinçli tüketiciler daha çevreci ürünleri satın almaktadırlar. Firmalar sürdürülebilir, ekolojik etiketli ürünlerini pazara sunmaktadır. Bu nedenle son dönemdeki arayışlar doğal, modifiye edilebilir ve kullanışlı bir biyomalzeme olan kitin ve kitosan üzerine yoğunlaşmıştır. Doğada bulunan doğal polimerlerin en önemlilerinden ve en fonksiyonellerinden olan kitosan, krustase organizmalar, bazı yumuşakçalar, böcekler ve mantar gibi çok çeşitli canlı organizmalarda koruyucu ve destekleyici bir yapı olarak bulunan kitinden elde edilmektedir. Kitosan ve türevleri, biyobozunurluk, biyouyumluluk, toksik olmama, yenilenebilirlik, atıklarda bol miktarda bulunabilirlik, düşük fiyatları ve sürdürülebilir olmaları gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedirler. Kitosandan elde edilecek fonksiyonel özellikler, kitin kaynağına ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Kitosandan beklenen fonksiyonel özellikler, kullanılan kitosanın karakteristik özelliklerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu yüzden kullanılacak kitosanın karakteristik özelliklerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, diğer çalışmalardan farklı olarak karides atık kabuklarından laboratuvar şartlarında üretilen ve ticari olarak satılan kitosanların karekterikslik özellikleri ölçülerek, birbiri ile karşılaştırılmıştır. Farklı iki kitosan kullanılarak, yapılan test ve analizler ile kitosan kaynağının, üretim yönteminin karakteristik ve fonksiyonel özelliklere etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, kitosan numunelerinin yüzey morfolojileri FEİ-QUANTA FEG 250 taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Kitosanlarındaki karbon, hidrojen ve nitrojen

içeriklerini FEİ-QUANTA FEG 250 Elemental Analyzer cihazı ile ölçülmüştür. Termal bozunmalarındaki TG ve DTG eğrileri, DTA-TG NETZSCH STA 449 F3 ile ölçülmüştür. Kitosan çözeltilerinin 6 farklı mikroorganizmaya (Gram (-) *E. coli* ATCC 25922, Gram (+) *S. aureus* ATCC 25923, Gram (+) *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. typhi* ATCC 14028 bakterilerine ve maya mantarı *Candida albicans* ATCC 10231 karşı antimikrobiyal etkinliği CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) mikrobroth distülüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Kitosan kaplanmış beyaz patska kumaş numunelerinin AATC 100 metodu ile Gram (+) S. aureus ATCC 25923 bakterisine karşı antibakteriyel etki araştırılmıştır. Test sonuçları ile kitosanın eczacılık, gıda, kozmetik, tekstil gibi alanlarda fonksiyonel kullanılması için önemli olan üretim standardizasyonuna fayda sağlayacak bilgi kaynaklarının oluşturulması hedeflenmektedir.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 119

Anahtar Kelimeler : Kitosan, Kitin, Biyopolimer, Biyomalzeme, Karakteristik özellik

Master Thesis

Comparison of Molecular Structure, Chemical Properties and Antimicrobial Activities of Chitosan from Shrimp Waste and Commercial Chitosan with Tests and Analysis

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Applied Sciences and Technology

ABSTRACT

In order to protect the environment and human health, there has been a tendency towards green and ecological production. Conscious consumers buy more environmentally friendly products. Firms offer sustainable, ecologically labeled products to the market. For this reason, recent searches have focused on chitin and chitosan, which are natural, modifiable and useful biomaterials. Chitosan, which is one of the most important and most functional natural polymers in nature, is obtained from chitin, which is found as a protective and supportive structure in a wide variety of living organisms such as crustacean organisms, some mollusks, insects and fungi. Chitosan and its derivatives are preferred because of their advantages such as biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, renewability, abundant availability in waste, low prices and sustainability. The functional properties to be obtained from chitosan vary depending on the source of the chitin and the extraction method. The functional properties expected from chitosan may differ according to the characteristics of the chitosan used. Therefore, it is of great importance to know the characteristics of the chitosan to be used. In this thesis study, unlike other studies, the characteristics of chitosans produced under laboratory conditions from shrimp waste shells and sold commercially were measured and compared with each other. It was aimed to determine the effect of the chitosan source and production method on the characteristic and functional properties with the tests and analyzes performed using two different chitosans. For this purpose, surface morphologies of chitosan samples were visualized with FEI-QUANTA FEG 250 scanning electron microscope. The carbon, hydrogen and nitrogen contents of chitosans were measured

with the FEI-QUANTA FEG 250 Elemental Analyzer. The TG and DTG curves in their thermal decomposition were measured with DTA-TG NETZSCH STA 449 F3. Antimicrobial activity of chitosan solutions against 6 different microorganisms (Gram (-) *E. coli* ATCC 25922, Gram (+) *S. aureus* ATCC 25923, Gram (+) *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 19115, S. typhi ATCC 14028 bacteria and yeast fungus *Candida albicans* ATCC 10231) was investigated by CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) microbroth distillation method. The antibacterial effect of chitosan coated white patska fabric samples against Gram (+) *S. aureus* ATCC 25923 bacteria was investigated by AATC 100 method. With the test results, it is aimed to create information resources that will benefit the production standardization, which is important for the functional use of chitosan in fields such as pharmacy, food, cosmetics and textiles.

Year : 2023

Number of Pages : 119

Keywords : Chitosan, Chitin, Biopolymer, Biomaterial, Characteristic feature

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimde her türlü desteğini esirgemeyen, yol gösterici olan, olumlu tavır ve yaklaşımlarıyla beni motive eden, yüreklendiren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum ve duyacağım kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Nilgün BECENEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecimde destekleyici, cesaretlendirici söz ve tavırlarıyla beni motive eden Değerli Hocam Dr. Öğr. Üyesi Kenan KARAÇAVUŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı gerçekleştirirken zorlandığım anlarda bana fikirler sunarak yol gösteren, sıkılmadan sürekli dinleyen ve yardımcı olmaya çalışan, sözleriyle motive etmeye çalışan ve bana farkındalık yaratmaya yardımcı olan, aynı zamanda iş arkadaşlarım Sevgili Nurgül ÇAKAL ve Almıla BOZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda gerekli analizlerin yapılmasında desteklerini esirgemeyen ve gerekli ekipmanların kullanılmasında kolaylıklar sağlayan, okul hayatımı destekleyen DEVA HOLDİNG'e teşekkürü borç bilirim.

Her zaman diğer ailem diye bahsettiğim, yanımda olduğunu hissettiğim, maddi ve manevi her zaman destekçilerim olduğunu bildiğim Sevgili Halam Elif KÖKSOY ve Sevgili Eniştem Mevlüt KÖKSOY'a sonsuz teşekkür ederim.

Hep yanımda olduğunu hissettiğim, yaptığım her işi hakkıyla yapmam konusunda bana öğretilerde bulunan, sadece bu çalışma sürecinde değil hayatımın her anında hayata olumlu bakmamı sağlayan ve pozitif enerjiler veren Sevgili Annem Zehra KÖKSOY'a, her zaman maddi ve manevi yanımda olduğunu bildiğim ve hissettiğim, hayatın tüm zorluklarına beni layıkıyla hazırlayan Sevgili Babam Nurettin KÖKSOY'a, varlığıyla bile beni mutlu eden, her zaman her halükarda yanımda olan, küçüğüm, Sevgili Kardeşim Şeyma KÖKSOY'a teşekkürlerim sonsuzdur.

Sadece tez çalışmamda değil hayatımın her alanında beni destekleyen, her daim yanımda olduğunu bildiğim, zorlandığım anlarda motivasyonu mu arttırmaya yönelik davranışlarıyla beni hep mutlu eden, yoluma ışık tutmaya çalışan Sevgili Eşim Furkan HAMZAOĞLU'na teşekkürlerim sonsuzdur.

İÇİNDEKİLER

ÖZET....iv
ABSTRACT....vi
TEŞEKKÜR....viii
İÇİNDEKİLER....x
KISALTMALAR DİZİNİ....xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ....xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ....xviii
BÖLÜM 1....1
GİRİŞ....1
1.1. Genel Bilgiler....1
BÖLÜM 2....4
GENEL BİLGİLER....4
2.1. Kitin ve Kitosan....4
2.2. Kitinin ve Kitosanın Tarihçesi....7
2.3. Kitinin Etimolojisi....7
2.4. Kitin ve Kitosanın Fiziksel/Kimyasal Özellikleri....8
2.4.1. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler....12
2.5. Önceki Çalışmalar....16
BÖLÜM 3....20
KİTİN KAYNAKLARI....20
3.1. Deniz Kabuklularından Elde Edilen Kitin ve Türevleri....22
3.2. Mantardan Kitin Eldesi....23
3.3. Böcekler ve Yumuşakçalardan Kitin Eldesi....25
3.4. Diğer Kitin Kaynakları....26
BÖLÜM 4....28
KİTİN ÇIKARMA....28
4.1. Kimyasal Çıkarma....29
4.1.1. Kimyasal Deproteinizasyon....29

4.1.2. Kimyasal Demineralizasyon 29
4.2. Biyolojik Çıkarma 32
4.2.1. Enzimatik Deproteinizasyon 33
4.2.2. Fermantasyon 34
BÖLÜM 5 36
KİTİN VE KİTOSANIN KULLANIM ALANLARI 36
5.1. Gıda Endüstrisi 36
5.2. İlaç Endüstrisi 37
5.2.1. Kozmetik 37
5.2.2. İlaç Taşınımı 38
5.3. Biyoteknoloji 38
5.4. Antimikrobiyal Maddeler 39
5.5. Tıbbi Uygulamalar 40
5.5.1. Gen İletimi 40
5.5.2. Yara İyileşmesi 41
5.5.3. Hemostatik Ajan 41
5.5.4. Doku Mühendisliği 42
5.6. Tekstil Uygulamaları 42
5.7 Kağıt Endüstrisi 43
5.8. Tarım 43
5.9. Çevre Koruma 43
5.9.1. Atık Su Arıtma 44
5.9.2. Şelatlama 44
5.9.3. Yeşil Kimya 45
BÖLÜM 6 46
MATERYAL VE METOT 46
6.1. Materyal 46
6.1.1. Kitosan 46
6.1.2. Kumaş 46
6.1.2.1. Kitosan Numunelerinin Beyaz Patiska Kumaşa Kaplanması 46
6.1.3. Kimyasallar 47
6.2. Yöntemler 47
6.2.1. Karides Kabuklarından Kitin İzolasyonu ve Kitosan Eldesi 47
6.2.2. Kitosanın Karakterizasyonu 47
6.2.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi 47

6.2.2.2. Deasetilasyon Derecesi (DD) 47
6.2.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 48
6.2.2.4. Kuru Madde Tayini 48
6.2.2.5. Termogravimetriği (TGA) Analizi 49
6.2.2.6. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi 49
6.2.2.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 49
6.2.2.8. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (SEM-EDX) Analizi 50
6.2.2.9. Antimikrobiyal Aktivite 50
6.2.2.10. Kitosanlar ile Kaplanmış Kumaşların Antimikrobiyal Aktivite Analizleri 51
BÖLÜM 7 53
SONUÇLAR 53
7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi 53
7.2. Deasetilasyon Derecesi 55
7.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 55
7.4. Kuru Madde Tayini 58
7.5. Termogravimetri (TGA) Analizi 59
7.6. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi 60
7.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 63
7.8. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (SEM-EDX) Analizi 69
7.9. Antimikrobiyal Aktivite Analizi 77
7.10. Kitosan Numunelerinin Beyaz Patiska Kumaşa Kaplanması 82
BÖLÜM 8 83
TARTIŞMA VE ÖNERİLER 83
KAYNAKLAR 86
ÖZGEÇMİŞ 101

KISALTMALAR DİZİNİ

Bacillus:	*Bacillus cereus* bakterisi
$CaCL_2$:	Kalsiyum Klorür
$CaCO_3$:	Kalsiyum Karbonat
$CaHSO_3$:	Kalsiyum Bisülfit
Candida:	*Candida albicans* mayası
$Ca(OH)_2$:	Kalsiyum Hidroksit
cm:	Santimetre
CO_2:	Karbondioksit
cP:	Centipoise (Viskozite birimi)
CH_3COOH:	Asetik Asit
DSC:	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DD:	Deasetilasyon Derecesi
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
E.coli:	*Escherichia coli* bakterisi
FDA:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
g:	gram
GFC:	Jel Filtrasyon Kromatografisi
GPC:	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HCL:	Hidroklorik Asit

HCOOH:	Formik Asit
Hg^{2+}:	Cıva (II) İyonu
HNO_3:	Nitrik Asit
H_2O:	Su
H_2SO_4:	Sülfürik Asit
IR:	Refraktif İndeks
kDa:	Kilodalton
KOH:	Potasyum Hidroksit
K_2CO_3:	Potasyum Karbonat
L:	Litre
Listeria:	*Listeria monocytogenes* bakterisi
LPT:	Lineer Potansiyometrik Titrasyon
M:	Molar
MALLS:	Çok Açılı Lazer Işığı Saçılımı
mg:	Miligram
mmol:	Milimol
$NaHCO_3$:	Sodyum Bikarbonat
$NaHSO_3$:	Sodyum Bisülfit
NaOH:	Sodyum Hidroksit
Na_2CO_3:	Sodyum Karbonat
Na_2S:	Sodyum Sülfür
Na_2SO_3:	Sodyum Sülfit
Na_3PO_4:	Trisodyum Fosfat
$NHCOCH_3$:	N-asetil
NH_2:	Amin

NH_3^+:	Amonyumil (Asidik ortamda NH_2)
Ni^{2+}:	Nikel (II) İyonu
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
OH:	Hidroksil
pH:	Potansiyel Hidrojen
ppm:	Milyonda bir birim
RNA:	Ribonükleik asid
Salmonella:	*Salmonella tphymirium* bakterisi
SEC:	Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
SEM-EDX:	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
S.aureus:	*Staphylococcus aureus* bakterisi
TGA:	Termogravimetri
UV:	Ultraviyole
XRD:	X-Işını Kırınımı
α:	Alfa
β:	Beta
γ:	Gama
$(C_8H_{13}O_5N)_n$:	Kitin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selüloz, kitin ve kitosan kimyasal yapıları 2
Şekil 2.1. Kitinin α – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri 10
Şekil 2.2. Kitinin β – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri..... 10
Şekil 2.3. Kitinin γ – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri..... 11
Şekil 3.1. Deniz kabuğundan kitin ve kitosan eldesi 23
Şekil 3.2. Mantar hücre duvarı bileşenleri 24
Şekil 3.3. Mantarlardan kimyasal yöntemlerle kitin eldesi..... 24
Şekil 3.4. Kelebek kanatlarında görülen kitin nano yapısının temsili..... 26
Şekil 3.5. (a) Kril ve (b) kalamar 26
Şekil 6.1. Kurutma kaybı için vezin kapları..... 48
Şekil 6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)..... 49
Şekil 6.3. AATCC 100 Metodu İle Bakteri Sayımı 52
Şekil 7.1. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için FTIR Spektrumu 54
Şekil 7.2. Literatürde Bulunan Kitosan için FTIR Spektrumu..... 54
Şekil 7.3. Ticari Kitosan ve Sentez İçin DSC Analiz Sonucu 57
Şekil 7.4. Kitosan İçin DSC Analiz Sonucu 58
Şekil 7.5. Ticari Kitosana ait TGA Kromatogramı (üstte) ve Sentez Kitosana ait TGA Kromatogramı (altta)..... 59
Şekil 7.6. Ticari Kitosana ve Sentez Kitosana Ait XRD Analiz Sonuç Grafiği 61
Şekil 7.8. Farklı koşullarda hazırlanan Kitosan için XRD Spektrumu 63
Şekil 7.9. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 250x Yaklaştırma-400 µm Boyutta SEM Görüntüsü..... 64
Şekil 7.10. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 500x Yaklaştırma-200 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 65
Şekil 7.11. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 1000x Yaklaştırma-100 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 66
Şekil 7.12. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 2000x Yaklaştırma-50 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 66
Şekil 7.13. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 4000x Yaklaştırma-20 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 67
Şekil 7.14. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 8000x Yaklaştırma-10 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 67
Şekil 7.15. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 15000x Yaklaştırma-5 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 68
Şekil 7.16. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 30000x Yaklaştırma-3 µm Boyutta SEM Görüntüleri..... 68
Şekil 7.17. Ticari Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonucu 70
Şekil 7.18. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-1 72
Şekil 7.19. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-2 73
Şekil 7.20. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-3 74
Şekil 7.21. Kitosanın SEM-EDX Element Bileşimi Analiz Sonucu..... 76

Şekil 7.22. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 24 Saat Antimikrobiyal Aktivite Grafiği 79
Şekil 7.23. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 48 Saat Antimikrobiyal Aktivite Grafiği 81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kitosanın fiziko-kimyasal özellikleri 12
Çizelge 2.2. Kitosanın bazı özellikleri üzerine molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkisi 14
Çizelge 2.3. Kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak çözgenler 15
Çizelge 3.1. Farklı organizmalarda bulunan ağırlıkça saf kitin yüzdesi 21
Çizelge 4.1. Kitin üretim koşullarının literatüre göre karşılaştırılması 31
Çizelge 7.1. Ticari Kitosana ait SEM-EDX Analiz Sonucu 71
Çizelge 7.2. Sentez Kitosana ait SEM-EDX Analiz Sonuçlarının Ortalaması 75
Çizelge 7.3. Ticari Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği 77
Çizelge 7.4. Sentez Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği 78
Çizelge 7.5. Ticari Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 48 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği 80
Çizelge 7.6. Sentez Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 48 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği 80
Çizelge 7.7. Kumaş Numunelerin S.Aureus'a Karşı Antibakteriyel Aktiviteleri 82

BÖLÜM 1

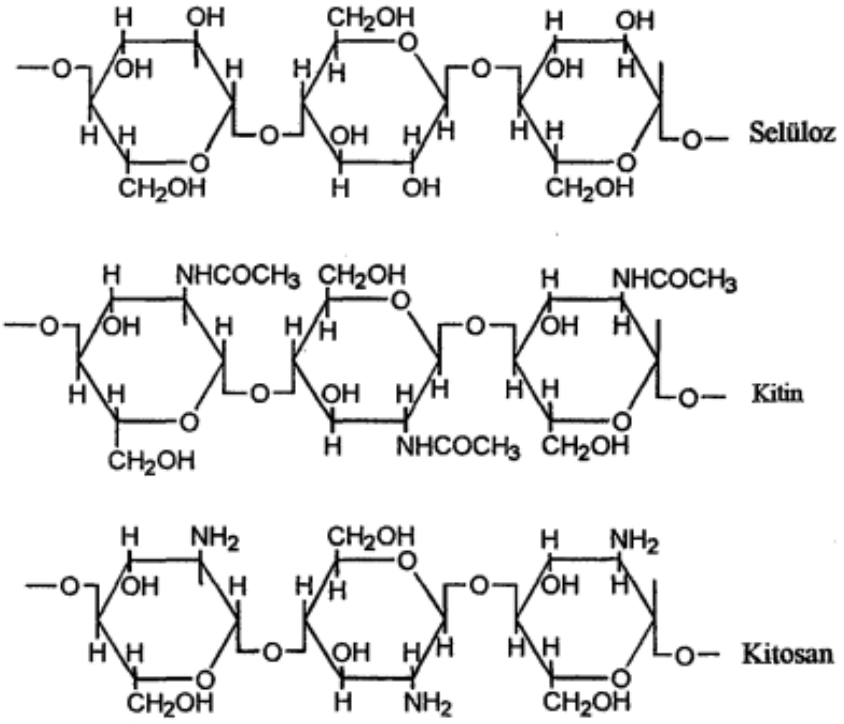
GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Kitin ve kitosan; doğal ve toksik etkisi bulunmayan bir biyopolimer olup, çoğunlukla yengeç ve karides kabuklarından elde edilmektedir. Ayrıca kitin, böceklerin, kaplumbağaların dış iskeletleri ve bazı mantarların hücre duvarında temel bileşen olarak bulunmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmasına rağmen, en önemlisi kitosan olarak nitelendirilmektedir. Kitosan, kitinin deasetilasyon yöntemi olarak bilinen kimyasal işlem yapılmasının ardından elde edilen bir polisakkarittir (Oktav Bulut ve Elibüyük, 2017).

Kitin ve kitosan ilk defa 1811 yılında Fransız botanikçi ve kimyacı olan Henri Braconnot tarafından tanımlanmıştır. Bracannot, mantarlarda var olan kitini sülfirik asit ile çözmeyi denemiş ancak başarılı olamamıştır. 1894 yılında Hoppe-Seyler, kitini 180°C sıcaklıkta Potasyum Hidroksit kullanarak işleme almış (deasetilasyon) ve asetil içeriği azalmış olan kitosan elde edilmiştir. Kitin ve kitosan ile ilgili ilk kapsamlı yayın Muzarelli tarafından 1977 yılında yapılmıştır ve ilerleyen zamanlarda bu konu hakkında çeşitli sempozyum ve araştırmalar yapılmaya devam edilmiştir (Usman vd., 2016).

Kitin ve kitosan kimyasal olarak selüloza benzerlik göstermektedir. Sadece genel karbonhidrat yapısında bulunan 2 numaralı karbona bağlı R grubu için farklılık olduğu belirtilmiştir. R grubu için kitosanda amin ($-NH_2$), kitinde N-asetil ($-NHCOCH_3$) ve selülozda ise hidroksil (-OH) grubu olduğu görülmektedir (Özcan, 2002). Şekil 1.1'de selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları görülmektedir.



Şekil 1.1. Selüloz, kitin ve kitosan kimyasal yapıları (Özcan, 2002)

Günümüzde kitin ve kitosan birçok alanda oldukça ilgi görmektedir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Bu alanların başında ilaç endüstrisi, eczacılık, gıda mühendisliği, tekstil üretimi, atık su arıtımı vb. alanlar gelmektedir. Kitosanın biyouyumlu olması, biyolojik açıdan bozunabilirliği, antimikrobiyal özelliği ve toksik etkiye sahip olmaması çok çeşitli uygulamalarda tercih edilmesinin ana nedenleri arasında yer almaktadır. Tüm bu özelliklere sahip olması nedeni ile kitosanın insan vücudu için kullanılan cerrahi ürünlerin üretiminde tercih edilebilirliği günden güne artmaktadır. Özellikle son yıllarda, kitin bazlı hidrojeller hazırlanarak biyomedikal alanında ilaç dağıtımı üzerinde etkin bir rol oynadığı görülmektedir.

Biyomalzeme biliminde biyolojik sistemlerde etkileşimde bulunacak malzemeler için uyum sağlaması ve yeni malzemenin geliştirilmesi için çaba sarfedilmektedir. Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların fonksiyonlarını yerine getirmek amacıyla kullanılan doğal veya doğal malzemelerden elde edilen malzemelerdir. Biyomalzemeler, devamlı olarak veya belli bir süre vücut içerisinde akışkanlar ile temas etmektedirler. Vücudun bu biyomalzemelere karşı verdiği tepkiler farklı olabilmektedir. Örneğin; 1880 yılında fildişi protezler vücuda yerleştirilmiş ve ilk protez, 1938'de

vitalyum (krom, kobalt ve molibden alaşımı) üretilmiştir. Bu protezler 1960 yıllarına kadar kullanılmıştır fakat metaller korozyona uğrayabilme potansiyellerinden dolayı tehlikeli durumlara sebep olmuştur (Gökçe, 2008). 1972 yılında Alümina ve zirkonya isimli iki seramik yapı da denenmiştir ve bu durum biyolojik olarak bir olumsuzluk yaratmamıştır. Ancak bu seramikler inert yapıdadırlar ve bu yapılar dokuya bağlanamadıkları sebebi ile çok çabuk zayıflamışlardır. Aynı dönemlerde Hench biyoaktif seramikleri geliştirmiştir ve yaşanan protez problemleri çözülmüştür (Gökçe, 2008).

Kitosan; şampuan, saç spreylerinde, saç boyalarında, saç toniklerinde ve saç şekillendirici losyonlarda kullanılabilmektedir. Kullanılabilmesine sebep olan özelliği ise kitosanın pozitif yüklü olması nedeni ile negatif yüklü olan saça bağlanması ve keratine benzeyen yapısı sayesinde saçı onarmasıdır (Vaca-Cornejo, Reyes, Jiménez, Velázquez & Jiménez, 2017).

Tarım sektörü için kitin uygulanmış tohumlar (buğday) büyümeyi hızlandırıcı ve büyümeyi artırıcı etkiler göstermiştir. Toprağa kitinin eklenmesi, kök düğümü solucan istilası ve mantar patojenleri tarafından baskılanmasını azaltmıştır (Koşkun, Berber, Çakır, Tarhan & Sesal, 2014; Pokhrel, Yadav & Adhikari, 2016).

Biyobozunurluğu, biyolojik uyumluluğu, antimikrobiyal, antioksidan aktivitesi yüksek güvenliği ve atıkların değerlendirilmesine katkıları nedeniyle kitosan farklı uygulamada kullanılabilen bir malzemedir. Lifler, jeller, filmler, süngerler, nanoparçacıklar ve boncuklar gibi birçok biçimde bulunabilir. Kitosan ve ürünlerinin kullanım alanlarının genişletmek için kapsamlı bir şekilde özellikleri araştırılmalıdır. Bu tez çalışmasının amacı da kaynak olarak karides kabuklarından farklı yöntemlerle üretilen kitosanların özelliklerini uluslararası standartlara uygun olarak ölçmek, ticari ürün olarak satılan karides kitosanı ile laboratuvar koşullarında üretilen karides kitosanın ölçülen özelliklerini birbiri ile karşılaştırarak yorumlamak ve elde edilen veriler ile kitosan elde etme yönteminin özellikler üzerine etkisini belirlemektir. Kitosanın endüstriyel üretimlerde kullanımı için önemli olan bilgi kaynaklarının oluşturulmasına olumlu katkı sağlanması planlanmıştır.

BÖLÜM 2

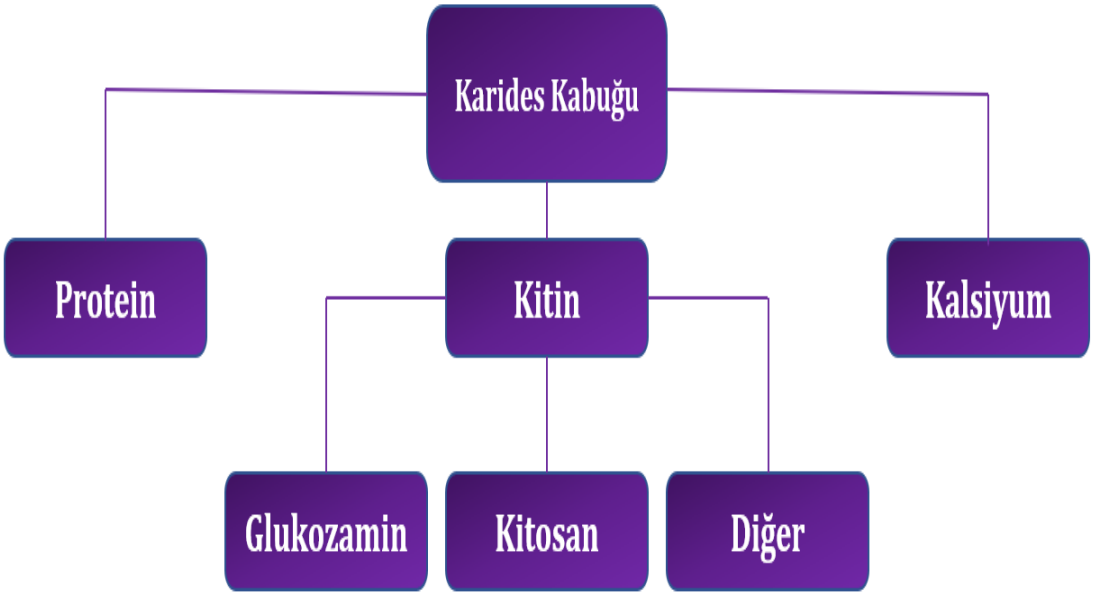
GENEL BİLGİLER

2.1. Kitin ve Kitosan

Istakoz, yengeç, karides vs. kabukluların, mantar hücre duvarının, karıncalar ve kelebeklerin dahil olduğu böcekler gibi eklem bacaklıların dış iskeletinin, mürekkep balığı ve ahtapotun dahil olduğu kafadan bacaklıların ağız kısmının ve yumuşakçaların dişli dillerinin (radulaların) ana bileşini kitindir (Campbell, 1996).

Selülozdan sonra dünyada en fazla bulunan ikinci doğal polimer kitindir. Kitin ayrıca aminoasit şekerler içeren ve doğal olarak bulunan polisakkaritler içerisinde de en bol bulunanıdır. Kitin bir protein olan keratin ve bir polisakkarid olan selülozla benzerlikler gösteren biyolojik bir maddedir. Bir karbonhidrat olan kitin, keratin ile benzer yapısal özellikler göstermektedir. Uzun bir zincir yapısı gösteren kitin molekülü beta 1,4 bağıyla bağlanan iki adet N-asetilglikozamin biriminin tekrarlanması ile oluşmaktadır (İmamoğlu, 2011).

Doğal olarak pek çok yerde bulunan kitin $(C_8H_{13}O_5N)_n$, bir glikoz türevi olan asetilglikozaminin uzun zincirli polimeridir (Campbell, 1996; Martín-Gil vd.,1992). Şekil 2.1'de karides kabuğunda bulunan kitosan ve diğer bileşenlerin şematik bir gösterimi yer almaktadır.



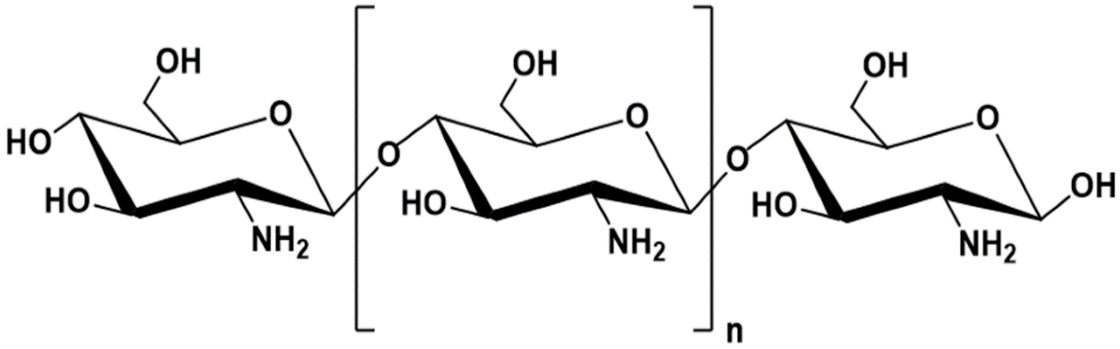
Şekil 2.1. Karides kabuğunda bulunan kitosan ve diğer bileşenler

Kitinin yapısı selüloza benzer fakat 2-asetamide-2-deoksi-β-Dglukoz (NAG) monomer birimleri barındırmaktadır. Asetil grupları nedeniyle kitinin uygulama alanları sınırlıdır. Ancak deasetilasyon yöntemiyle kitosana dönüştürülebilir. Kitinde bulunan asetil grubu deasetilasyon işleminin ardından kitosanda hidroksil (OH) ve amino (NH_2) gruplarına dönüştürülür (Furusaki, 1996). Barındırdığı reaktif fonksiyonel grupların modifikasyonu sayesinde kitosan birçok alanda geniş uygulama alanlarına sahiptir. Çeşitli kimyasal yöntemlerle kitosanın yapısal modifikasyonu sağlanabilir (Thomas, Pius & Gopi, 2020).

Kitosan kitinin en önemli ürünüdür ve bazik ortamda kitinin deasettilenmesi yöntemi ile elde edilebilmektedir. Kitosan, 1859 yılında kitinin, derişik KOH çözeltisinde kaynama noktasına kadar ısıtılmasıyla meydana gelen bir ürün olarak Rouget tarafından bulunmuştur. Kitosan bazı mantar türlerinde de doğal olarak bulunabilmekte fakat miktar bazında kitin ile karşılaştırıldığında oldukça düşük kalmaktadır.

Kitosan ve kitin terimleri, D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinin tekrarlandığı bir kopolimer olarak tanımlanabilir (Furusaki, 1996). Kitin yapısı önemli ölçüde farklılıklar barındırmaktadır. Kitinin bir türevi olan kitosanda da bu farklılıklar görülmektedir. Kitosan düzensiz yapı, primer, kristal veya yarı kristal gibi farklı şekillerde bulunabilmektedir. Kitosanın elde edildiği kaynağa bağlı olarak aktifliği de

farklı olabilmektedir. Örneğin; deniz kabuklularından elde edilen kitosan, mürekkep balığından elde edilen kitosana kıyasla daha düşük aktiviteye sahiptir. Özellikle çevre kirliliği sorunu gibi farklı gerekçeler kitin ve kitosanı çok ilgi çekici bir hale getirmiştir (Sorlier, Denuzière, Viton & Domard, 2001). Bu polimerler sahip oldukları tek tip yapılarından dolayı, biyolojik fonsiyonelleşmek, biyolojik bozunulabilirlik ve biyolojik yenilenebilir gibi yüksek mekanik ve biyolojik özellikler barındırmaktadırlar (Hirano & Zhang, 2000). Şekil 2.2'de kitosanın yapısını gösteren bir görsel yer almaktadır.



Şekil 2.2. Kitosanın yapısı (Şahin, 2007)

Kitosanında çözünürlüğü ve kullanılabilirliği kitin gibi sınırlıdır fakat heterojen katalizin kullanımı ve üretiminde fazla önem taşımamaktadır (Şahin, 2007). Kitosanın diğer çözücülerde çözünmemesine karşın etanolde az miktarda şişmesi ve seyreltik asit çözeltisinde çözünmesi önemli bir avantajdır (Şahin, 2007). Asit çözeltileri bazik çözelti içerisine püskürtülerek boncuklar şeklinde çöktürülebilir veya filmlere ve fiberlere dönüşebilir (Şahin, 2007).

2.2. Kitinin ve Kitosanın Tarihçesi

Kitinin keşfi ilk olarak 1811 yılında Fransa'da Prof. Henri Braconnot tarafından mantarlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kitin adı, böceklerden izole edildiği 1830 yılına dayanmaktadır. Kitosanın keşfi ise 1859 yılında Prof. C. Rouget tarafından gerçekleştirilmiştir. 1930'lu ve 1940'lı yıllarda polimerler ile ilgili çalışmalar büyük ilgi görmekteydi. Bu yıllarda yayınlanan yaklaşık 50 adet patent de bu durumu ortaya koymaktadır. Fakat bu yıllarda dünyada ki üretim tesislerinin yeterli olmaması ve sentetik polimerlerin ticari olarak daha rekabetçi olması nedeniyle kitin ve kitosanın ticari olarak gelişmesi mümkün olmamıştır (Oktav Bulut, 2017).

1970'li yıllar ile kitin ve kitosana dünya üzerindeki ilgi tekrar canlanmıştır. Bu ilgi kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarından daha fazla yararlanma ihtiyacını teşvik etmiştir. 2000'li yıllardan itibaren ise kitin ve kitosan ticari olarak dünya çapında birçok ülke ve uygulamada popüler hale gelmiş ve kendine yer edinmiştir. Yapılan global endüstri analizlerine göre kitin ve türevlerinin günümüzde 2000'den fazla uygulama alanı bulunmaktadır (Demir & Seventekin, 2009).

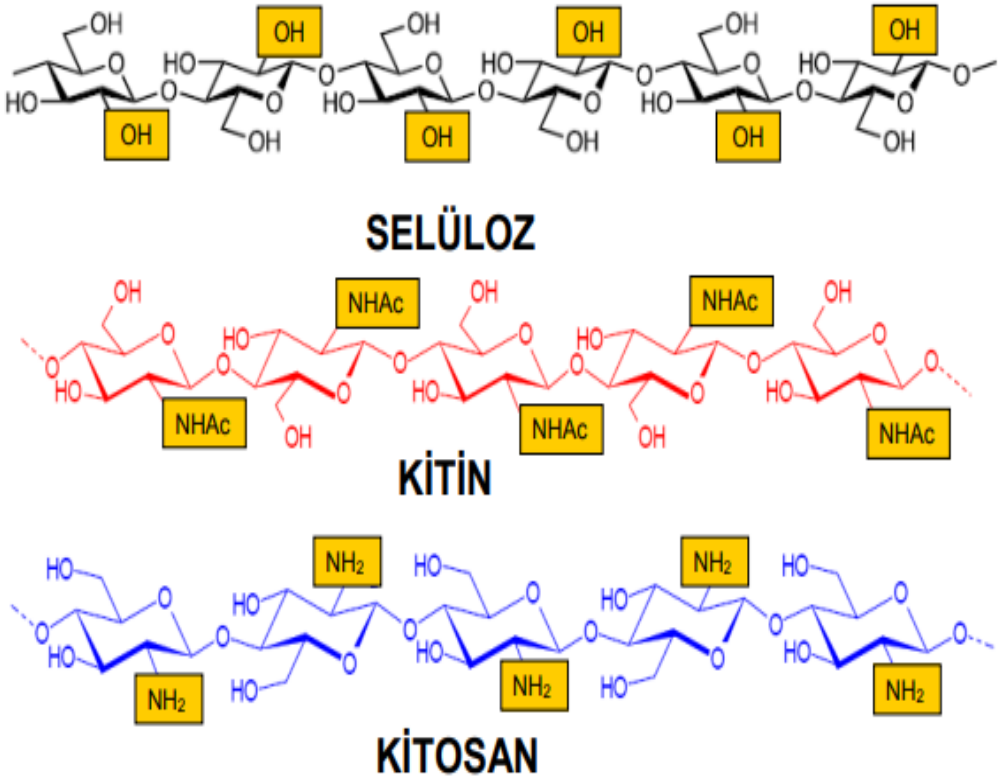
2.3. Kitinin Etimolojisi

Kitin kelimesi ilk olarak Fransızcada 1836 yılında ortaya "chitine" olarak ortaya çıkmıştır. İngilizcede ki "chitin" kelimesi de buradan türemiştir. Bu kelimelerin kökeni ise Latincedeki "chitōn" kelimesine dayanmaktadır. Latincedeki "chitōn" kelimesinin anlamı "yumuşakça"dır. Bu kelimede Merkez Semitik dilindeki "kittan", Greekçe "kılıf" ya da "gömlek" anlamındaki "khitōn" kelimesi, Akad dilindeki keten anlamındaki "kitû" ya da "kita'um" ve Sümerce "gada" ya da "gida" kelimesi ile ilgilidir veya bu dillerden etkilenmiştir ("Kitin", 2020).

2.4. Kitin ve Kitosanın Fiziksel/Kimyasal Özellikleri

Kitin, poli-[β-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-Dglukopiranoz] yapısına sahip ve az miktarda 2-amino-2-deoksi-β-glukopiranoz monomerlerini barındıran bir biyopolimerdir. Kimyasal olarak selüloz ile benzerlik gösteren kitin ve kitosan polisakkaridleri, fonksiyonel gruplardan kaynaklanan farklılıklara sahiptir. Selülozda, ikinci karbon atomuna hidroksil (-OH) grubu bağlıyken, kitosanda amin ($-NH_2$) grubu, kitinde ise asetamid ($-NHCOCH_3$), bağlanmaktadır (Lim, 2002).

Şekil 2.3'de selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapılarını gösteren bir görsel yer almaktadır.

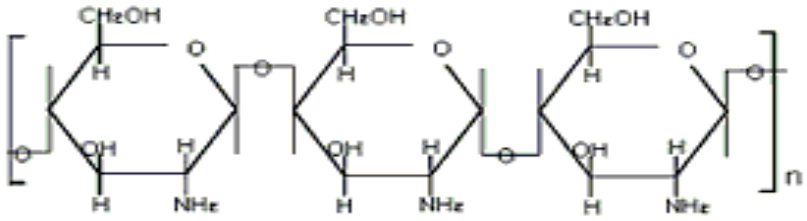


Şekil 2.3. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları (Gökçe, 2008)

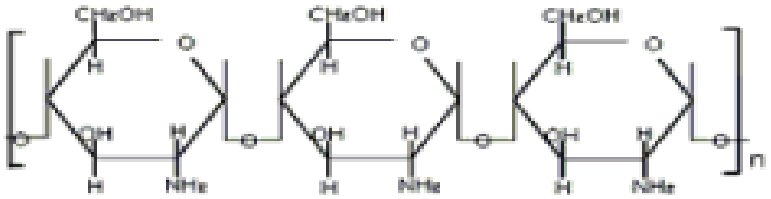
Kitin mikrofibrillerinin farklı yapıları, kitinin mevcut alfa, beta ve gama formlarıdır. Kitinin en sık rastlanan formu α-kitindir ve α-kitinin antiparalel zincir yapısı vardır (Zhang, Haga, Sekiguchi & Hirano 2000). α-kitin, Karides kabuklarında, ıstakoz

ve yengeç kabukları ve tendonlarında, böceklerin kütikula tabakalarında, mantar ve maya hücre duvarlarında bulunur (Rinaudo, 2006). α-kitin ayrıca deniz yosunlarında ve denizde yaşayan çeşitli canlı organizmalarda da bulunur (Atkins & Dlugosz, 1979; Chretiennot-Dinet vd., 1997). In-vitro biyosentez veya enzimatik polimerizasyon yoluyla doğal kitine ek olarak kitin elde edilebilmektedir (Bartnickigarcia, Persson & Chanzy, 1994; Sakamoto vd., 2000). β-kitin paralel zincir yapısına sahiptir ve doğada α-kitine oranla daha nadir bulunmaktadır. β-kitin bazı deniz yosunlarının veya protozoaların dış kabuğunda, mürekkep balığının kollarında ve bazı solucanlarda bulunmaktadır (Blackwell, Parker & Rudall, 1965; Gaill, Persson, Sugiyama, Vuong & Chanzy, 1992; Herth, Kuppel & Schnepf, 1977; Gooday, Jeuniaux & Muzzarelli, 2011) In-vitrobiyosentezi ile bugüne kadar β-kitin elde edilememiştir. Paralel ve antiparalel yapıların karışımı olan böceklerin kozalarında ise γ-kitin görülmektedir (Çarıkçı, 2015; Zhang, 2000).

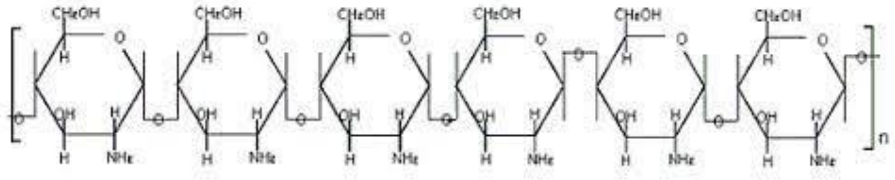
Şekil 2.4'te kitinin α – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri, Şekil 2-5'de Kitinin β – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri ve Şekil 2-6'da Kitinin γ – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri görülmektedir.

Polimerik Gösterimi	
Özellikleri	En stabil olan formdur. Doğada en fazla bu formda bulunur. Diğer kristal yapılara göre daha serttir.

Şekil 2.1. Kitinin α – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri (Üçgül, Aras & Özdemir Küçükçapraz, 2016)

Polimerik Gösterimi	
Özellikleri	α kitine göre daha az kararlıdır. Çözülme ve şişme halinde β kitin α kitine dönüşür. Esnekliğin ve yumuşaklığın gerektiği bölgelerde bulunur. Fungal hücre duvarlarının temel bileşenidir.

Şekil 2.2. Kitinin β – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri (Üçgül vd., 2016)

Polimerik Gösterimi	
Özellikleri	Daha nadir bulunur. α ve β formlarının bir karışım veya ara formu olduğu düşünülmektedir. Hem paralel hem de anti paralel bir düzene sahiptir.

Şekil 2.3. Kitinin γ – kitin formunda polimerik gösterimi ve özellikleri (Üçgül vd., 2016)

Kitosanlar farklı molekül ağırlıkları (50-2000 kiloDalton), farklı viskoziteler ve farklı deasetilasyon derecelerine (%40-98) sahiptirler. Deasetilasyon derecesi, deasetilasyona uğramış N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin sayısının toplam ünite sayısına göre miktarını ifade eder. Deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığına bağlı olarak kitosanın fiziko-kimyasal özellikleri değişmektedir (Kristl, 1993).

Kitosanın yapısında; her tekrarlayan birimde C-6 primeri, C-3 sekonder hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere üç reaktif gruba sahiptir. Kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilen bu reaktif gruplar, kitosanın fiziksel ve mekanik özellikleri ile çözünürlüğünü de değiştirmektedirler (Demir, 2009). Çizelge 2.1'de kitosanın fiziko-kimyasal özelliklerini gösteren bir görsel yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Kitosanın fiziko-kimyasal özellikleri (Demir, 2009)

Özellik	Değer
Molekül Ağırlığı	50-2000 kDa
Deasetilasyon Derecesi	%40-100
Vizkozite	<2000 cP
Su Bağlama Kapasitesi	%450-1150
Yağ Bağlama Kapasitesi	%314-535
Yığın Yoğunluğu	0.06-0.39 g/cm^3
Renk	Donuk sarı-beyaz
Çözünürlük (suda)	pH<6,5

2.4.1. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler

Deasetilasyon derecesi, viskozite, molekül ağırlığı ve çözünürlük kitosanın özelliklerine etki eden parametreler olarak sıralanabilmektedir (Kurtuluş & Vardar, 2020).

2.4.1.1. Deasetilasyon Derecesi

D-glikozamin ünitelerinin ortalama sayısına deasetilasyon derecesi denir. Deasetilasyon derecesinde her 100 monomer bir yüzde olarak tanımlanmıştır. Çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinden dolayı kitosan pek çok alanda tercih edilmektedir (Kurtuluş, 2009). Uygulama alanlarının pek çoğunda polimerlerin çözünürlüğü gereklidir ve bu da deasetilasyon derecesi tarafından belirlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda, konsantre asetik asit solüsyonları kitosanın depolimerizasyonuna sebep olabilir (Roberts & Domszy, 1982).

Kitosan tuzları doldurulduktan sonra kurutularak, suda nötral ve bazik solüsyonlarda çözünme konusunda avantajlar sağlarlar. Kitosan hidroksil ve reaktif amino gruplarının ikisine de sahiptir. Çözelti halindeki kitosan pH değeri 6.5'ten daha düşük olduğunda yapısında pozitif bir yük taşır. Pek çok biyomedikal uygulama için böylece imkân sağlanır (Kurtuluş, 2009). Negatif dokular ise katyonik özelliği sayesinde kemik, saç ve deri ile bağlanabilir veya etkileşimde bulunabilir. Polimerin nasıl

uygulanacağını da belirlediğinden deasetilasyon derecesi kitosan için çok önemli bir özelliktir (Tan, 1998). Deasetilaston derecesi ayrıca kitosanın kimyasal ve fiziksel özellikleri ile biyolojik aktivitelerini de belirlemektedir (Kurtuluş, 2009).

Deasetilasyon derecesini belirlemek için kullanılabilen pek çok yöntem vardır. Linear Potentiometrik Titrasyon (LPT), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), birinci türevsel UV Spektrofotometri, Spektroskopi, Transform Infrared (FTIR), Fourier ve ninhidrin testi bunlardan başlıcalarıdır. Kitosan numunelerinin deasetilasyon derecelerini tahmin etmek için titrimetrik metotlarda iki yöntem kullanılmaktadır. Asitamit grubunun asidik hidrolizi bu yöntemlerden ilkidir. İkinci yöntem ise amino grubunun asidimetrisidir. Zaman gerektirmesi ve kompleks olmasına karşın bu prosedürlerin doğruluk değerleri yüksektir. Bu yöntemler kitosanın uygun sulu bir solventte çözülmesi halinde kullanılabilirler (Moore & Roberts, 1980). Moore ve Roberts (1980) yapmış oldukları çalışma sonucunda IR spektroskopisini ilk kez kullanmışlar, hızlı olduğunu ve diğer titrimekrik yöntemlerdeki gibi numunenin saflığına gerek olmaması gibi avantajları barındırdığını belirtmişlerdir.

2.4.1.2. Molekül Ağırlığı

Polisakkaritlerin fiziko-kimyasal davranışlarındaki sonuçların anlaşılması ve ortalama molekül ağırlıklarının belirlenmesi kimyadaki gerçek değişimleri göstermiştir. Kitin ve türevleri hakkındaki bu tarz bilgiler birçok alanda yapılan araştırmaların ve çalışmaların ilerlemesini sağlamış, endüstriyel uygulamalar için önem kazanmıştır. Kitosanın temel yapısı rastgele asetillenen (1→ 4)-β-D glikozamin omurgasıdır (İmamoğlu, 2011). Fakat kitosan terimi, kristallik, asetilasyon derecesi, safsızlık bileşenleri ve molekül ağırlığı gibi terimlerdeki farklılığı belirleyen deasetillenmiş kitini ifade eder (İmamoğlu, 2011). Kitosanlarda ortaya çıkan bu farklılıklar hammadde kaynakları ve üretim metodlarına bağlıdır. Belirli standartların arandığı durumlarda kitosanın molekül ağırlığının belirlenmesi gerekmektedir. Molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan yöntemler viskozimetrik ölçümlere dayanmaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, sentetik polimerler, biyopolimerler ve doğal polimerlerin molekül ağırlığı dağılımlarında Büyüklükçe Ayırma kromatografisi (SEC), Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ve Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC) kullanılmıştır (Şahin, 2007). Bileşenlerin tutulması, kromatografide sabit faz büyüklüğünün dışında kalan ve daha erken ayrılan büyük moleküllerdeki çözelti hacmine

bağlıdır. Molekül ağırlığı daha küçük olan bileşenler sabit faz gözeneklerinden çıkar ve kromatogramdan daha sonra ayrılır. SEC, kantitatif olarak sayı, ortalama molekül ağırlığı, ağırlık ve polidispersiteyi belirlemek veya iki polimer parçası arasındaki molekül ağırlığı farkını belirlemek için kullanılır. Kullanışlı dedektörler çok açılı lazer ışığı saçılımı (MALLS) ve farklı refraktif indeks (IR) içerir. IR dedektörlerde molekül ağırlığının belirlenmesi için, molekül ağırlığı bilinen polimerlerden elde edilen standart eğrilerden faydalanılır. MALLS dedektörü, molekül ağırlığını doğrudan ışık tarayıcı vasıtası ile belirler (Şahin, 2007).

Çizelge 2.2. Kitosanın bazı özellikleri üzerine molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkisi (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016)

Özellik	**Deasetilasyon Derecesindeki Artışın Etkisi**	**Molekül Ağırlığındaki Artışın Etkisi**
Çözünürlük	Artar	Azalır
Kristalin yapı	Azalır	Artar
Biyolojik parçalanabilme	Azalır	Azalır
Vizkozite	Artar	Artar
Biyolojik uyum	Artar	-
Antimikrobiyal özellik	Artar	Azalır
Antioksidan özellik	Artar	Azalır

2.4.1.3. Vizkozite

pH derecesi, deasetilasyon, vizkozite ve sıcaklık gibi parametreler kitosanın özelliklerine etki etmektedir (Dutta, Tripathi & Dutta, 2011). Kitosanın viskozitesi iyonizasyon derecesinin bir fonksiyonudur. Demineralizasyon süresinin artması ile vizkozite düşmektedir. Vizkozite açısından en iyi stabiliteyi gösteren kitosan çözeltisinin yaklaşık 4°C'de depolanan kitosan çözeltisi olduğu belirtilmiştir (Demir, 2009).

Çözünmüş kitosanın vizkozitesi, sıcaklık, konsantrasyon, iyonik kuvvet, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi tarafından belirlenir (Çarıkçı, 2015). Sıcaklıktaki artış vizkoziteyi azaltır. Hem moleküler ağırlık hem de deasetilasyon derecesi kitosanın vizkozitesini etkiler. Kitosanın vizkozitesi HCL'deki pH'ının azalması ile azalır fakat asetik asitteki vizkozitesi pH'ın azalması ile artar. Kitosanın vizkozitesi, dondurma, otoklavlama, delme, ısıtma, ultrasonifikasyon gibi fiziksel muamelelerin ve ozon muamelesinin etkisi altında değişiklikler göstermektedir. Sıcaklık ve tepkime süresinin artması ile vizkozite de artmaktadır. Vizkozite, moleküler ağırlığın hesaplanmasında da yardımcı olan önemli bir faktördür (Çarıkçı, 2015).

2.4.1.4. Çözünürlük

Kitin, çok miktardaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile yarı kristalin yapıda bir polimerdir. Bu sayede birçok çözgen ve seyreltik asitlerde çözünememektedir (Demir, 2009). Kitosan ise katyonik yapısı sayesinde pH değerinin 6'dan küçük olduğu ortamlarda bazı çözeltilerde kolayca çözünebilmektedir. Ayrıca kitosanın çözünürlüğü inorganik asitler içerisinde oldukça düşüktür. Kitosanın çözünmesi için genellikle laktik asit, formik asit ve asetik asit gibi organik asitler kullanılmaktadır (Gökçe, 2008). Bu çözgenler arasında en çok kullanılan asit asetik asittir. Kitosanın çözünürlüğünü partikül büyüklüğü, çözgen konsantrasyonu ve sıcaklık gibi birçok parametre etkilemektedir. Yapılan bu araştırmalar sonucunda iyi bir çözünürlük için kitosanın en az %75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiği ortaya konmuştur (Gökçe, 2008). NH_2 grubu asidik ortamda $-NH_3^+$ şeklinde bulunmaktadır. Ayrıca protonlamış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları lif veya film oluşumu gibi kullanımları kapsamında oldukça önemli bir parametredir (Demir, 2009). Çizelge 2.3'te kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünebilirlik durumu gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak çözgenler (Yıldırım, 2016)

Asitler	**Kitosan Konsantrasyonu**				
	%1	%5	%10	%50	>%50
Asetik	+	+	+		

Sitrik	-	+	+		
Formik	+	+	+	+	+
Laktik	+	+	+		
Malik	+	+	+		
Malonik	+	+	+		
Tartarik	-	-	+		

(+): çözünebilir, (-) çözünemez

2.4.1.5. Yoğunluk

Yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre karides ve yengeçten elde edilen kitinin yoğunluğu genellikle 0.06 ve 0.17 g/cm^3 değerlerindedir (Shahidi & Synowiecki, 1991). Karides kitininin yengeç kitinine göre daha porlu bir yapıya sahip olması sonucunda böyle bir fark ortaya çıkmıştır. Ayrıca kril kitininin de yengeç kitinine oranla 2.6 kat daha porlu olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Kerevit ve yengeç kitinleri incelendiğinde; yengeç kitininin 0.17-0.18 g/cm^3 hacim yoğumluğu ile en yüksek yoğunluğa sahip olduğu fakat buna karşın başlangıç materyali olarak incelendiğinde kerevit kabuklarının 0.39 g/cm^3 hacim yoğunluğu ile en yüksek değere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Rout & Kumar, 2001). Bu durumun nedeni malzemenin muamele öncesindeki yüksek porluluğundan kaynaklanmaktadır. Kerevit kabukları bir kez deproteinize ve demineralize edildikten sonra üretilen kitin ve kitosanın hacim yoğunlukları arasında çok küçük farklar bulunmaktadır. Ayrıca deasetilasyon derecesindeki artış ile hacim yoğunluğunun ters orantı gösterdiği ve deasetilasyon derecesi arttıkça hacim yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir (Rout, 2001).

2.5. Önceki Çalışmalar

Pochanavanich ve Suntornsuk (2002), çeşitli mantar türleri tarafından üretilen kitosanlar üzerine çalışmışlardır. Dört ipliksi mantar türü olan *Aspergillus niger*, Rhizopus *oryzae*, Lentinus edodes ve *Pleurotus sajo-caju'nun temsilcileri* ve iki maya türü olan *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR5058 ve *Candida albicans* TISTR5239'un karmaşık ortamlarda kitosan üretme yetenekleri araştırılmıştır. Kitosanların karekterizasyonu, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi, viskozite ölçümleri ile

yapılmıştır. Yazarlar, mantarların kitosan içeriğinin mantar suşlarına, misel yaşına, yetiştirme ortamına ve koşullarına bağlı olduğunu, deasetilasyon derecesinin kitosanın fizikokimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametre olduğunu, mantar kitosanının deasetilasyon derecesinin, yengeç kitosanından daha düşük olduğunu, bildirmişlerdir (Pochanavanich & Suntornsuk, 2002).

Abdou, Nagy ve Elsabee (2008), çalışmalarında, Mısır'da kirlilik tehlikesi oluşturan Kerevitin ekonomik bir kitin kaynağı olabileceğini bulunmuştur. Elde edilen kitin, çeşitli konsantrasyonlarda ve uzun süreler boyunca NaOH çözeltilerine daldırılarak daha kullanışlı çözünür kitosana dönüştürülmüştür. Elde edilen kitin ve kitosan, spektral analiz, X-ışını kırınımı ve termogravimetrik analiz ile karakterize edilmiştir (Abdou, Nagy & Elsabee, 2008).

Kaya vd. (2014), Colorado patates böceğinin yetişkin ve larvalarından aynı yöntemle elde edilen kitinlerin ve kitosanların özelliklerinin karşılaştırması üzerine yaptıkları çalışmada; ergin patates böceği, kuru ağırlık kitin içeriği, kitosan verimi ve kitin saflığının larvalardan daha yüksek olması ve antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin larvalara göre daha yüksek olması nedeniyle alternatif bir kitin kaynağı olarak larvadan daha uygun olduğunu ortaya koymuşlardır (Kaya vd., 2014).

El Knidri vd. (2018), yaptıkları çalışmada, kitosan ekstraksiyon yöntemlerini araştırmışlar, farklı yöntemleri karşılaştırmışlardır. Kitosanını işlevselliğini geliştirmek ve bu fizikokimyasal özellikleri daha iyi kontrol etmek için kimyasal modifikasyonlar yapılabileceğini bildirilmişlerdir (El Knidri, Belaabed, Addaou, Laajeb, & Lahsini, 2018).

de Araújo Braz vd. (2018), çalışmalarının amacı, kitosanın antimikrobiyal aktivitesini arttırmaktır. Bu amaçla 1:2, 1:5 ve 1:10 kitosan: anhidrit molar oranları araştırılmış ve elde edilen türevler elemental analiz, FTIR, termal analiz ve XRD ile karakterize edilerek kitosanın kimyasal modifikasyonu kanıtlanabilmiştir. Modifiye edilmiş Kitosan malzemelerin, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı mükemmel antibakteriyel etki sergiledikleri tespit edilmiştir (Braz vd., 2018).

Zeng, Ren, Zhu, ve Gao (2021), nar kabuğu ile birleştirilen kitosan filmler hazırlamışlardır. Hazırlanan bu filmler karakterize edilmiş, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar; nar kabuğu tozu ile birleştirmenin kitosan filmlerin

kalınlığını, suda çözünürlüğünü, su buharı geçirgenliğini, opaklığını, toplam fenolik içeriğini arttırdığını, ancak nem içeriğini ve mekanik özelliğini azalttığını göstermiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi, kitosan filmin mikroyapısal özelliklerinin nar kabuğu ile zenginleştirilerek değiştiğini ortaya koymuştur. Nar kabuğu eklenerek kitosan filmin antioksidan ve antibakteriyel özellikleri geliştirilmiştir (Zeng, Ren, Zhu & Gao, 2021).

Souza, Pires, Rodrigues, Coelhoso ve Fernando (2020); Çalışmalarında, gıda paketleme endüstrisinde kitosan kompozitlerin üretimi ve uygulanmasına yönelik mevcut eğilimleri ve gelecekteki zorlukları araştırmışlardır. Termal, mekanik ve su bariyeri özellikleri açısından performanslarının, düşük maliyetle büyük ölçekte üretilebilmesi için iyileştirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır. Plastikleştirilmiş kitosan filmlerlerin endüstriyel ölçekte üretimine olanak sağlayan gelecek vaat eden bir teknoloji olduğunu bildirmişlerdir (Souza, Pires, Rodrigues, Coelhoso & Fernando, 2020).

Menazea, Eid ve Ahmed (2020), çalışmalarında, Tigesiklin ile iyileştirilmiş Kitosan kompozit filmleri elde edilmiştir. Hazırlanan bu kompozitlerin yapısal, optik ve morfolojik karakterizasyonları XRD, FT-IR, UV-visible ve FE-SEM kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca antibakteriyel karakterizasyonu da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kompozit 'nin, büyük ölçüde antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle birçok antimikrobiyal uygulamada kullanılabileceğini göstermiştir (Menazea, Eid & Ahmed, 2020).

Ding, Mo, Zhang, Bi ve Kong (2021), çalışmalarında, iyonotropik jelasyon kullanılarak proantosiyanidin yüklü kitosan nanoparçacıkları üretmişlerdir. Proantosiyanidinler kitosan nanoparçacıklarına iyonik jelleşme tekniği ile yüklenmiştir. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların boyutlarının 300 nm'den küçük olduğunu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gözlemlendiği gibi küresel bir şekle, pürüzsüz topografyaya ve homojen morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Yazarlar, gıda ürünlerinin biyoaktivitesini geliştirmek için kitosan nanoparçacıklarının kullanımını desteklemektedirler (Ding, Mo, Zhang, Bi & Kong, 2021b).

Becenen ve Erdoğan (2022) çalışmalarında; kerevitin (Astacus leptodactylus) atık kabuklarından kitosan elde ederek, kumaş yüzeylerine kaplamışlardır. Kumaşların, Termogravimetrik analizi ve dikey yakma testlerinin kitosanın denim kumaşların termal direncini ve alev geciktirme performansını iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, kitosan kaplamanın denim ve patiska kumaşların su ve hava geçirgenliğini azaltarak yarı geçirgen tekstil özellikleri sağladığını tespit etmişlerdir (Becenen & Erdoğan, 2022).

BÖLÜM 3

KİTİN KAYNAKLARI

Kitin genellikle doğada, amip kirpikliler ve kamçılılar gibi tek hücrelilerde, böceklerde, mantarlarda, bakterilerde, eklem bacaklılarda, yumuşakçalarda, selenterelerde ve bazı bitkilerde bulunur. Kitinin en fazla bulunduğu kaynaklar ise kerevit (tatlısu ıstakozu) kabukları, ıstakoz, karides ve yengeçlerdir. Kitin genellikle bazı mantarlar, yumuşakçalar, böcekler ve eklembacaklılardan izole edilerek elde edilir. Çeşitli yapısal seviyeleri ortaya koyan, hiyerarşik olarak organize edilmiş bir biyolojik nanokompozittir (Shamshina, Berton & Rogers, 2019; Zamani, Jeihanipour, Edebo, Niklasson & Taherzadeh, 2008; Islam, Khan & Tanaka, 2004)

Kitinin dünya üzerindeki yıllık üretimi 150000 tondur. En yüksek miktarda kitosan eldesi 56000 ton ile karideslerden gerçekleşmektedir. 39000 ton ile çeşitli deniz kabukluları, 32000 tonu mantarlar ve 23000 tonu istiridyeler karidesin ardından en büyük kitin kaynaklarıdır (Guang, 2002; Demir, 2009).

Ağırlıkça saf kitinin farklı organizmalarda bulunma yüzdeleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı organizmalarda bulunan ağırlıkça saf kitin yüzdesi (Hobel, 2004; Rinaudo, 2006; Arbia, Arbia, Adour & Amrane, 2013)

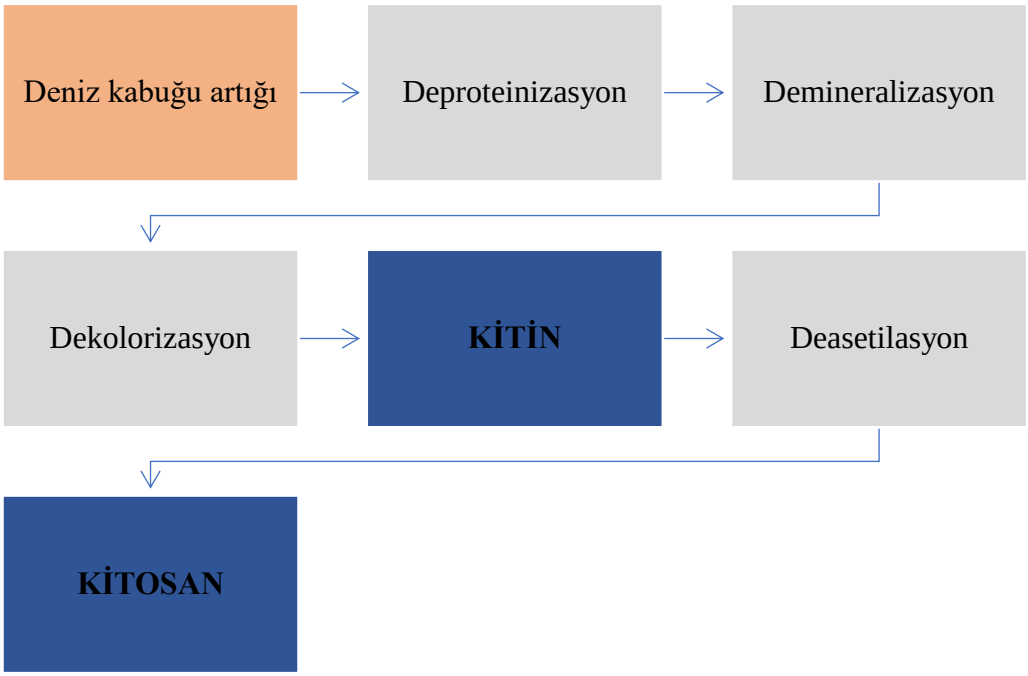
Organizma	**Ağırlıkça kitin (%)**	**Organizma**	**Ağırlıkça kitin (%)**
Kabuklular:		***Haşarat***	
Cancer (yengeç)	72***	*Periplaneta (hamam böceği)*	2.0****
Carcinus (yengeç)	642**	*Blatella (hamam böceği)*	18.4***
Paralithodes (kral yengeç)	350**	*Coleoptera (uğur böceği)*	27-35***
Callinectes (mavi yengeç)	140*	*Diptera (çift kanatlılar)*	54.8***
Crangon and pandalus (karides)	17-40	*Pieris (kelebek)*	64.0***
Alaska shrimp (alaska karides)	28.0****	*Bombyx (ipek böceği)*	44.2***
Nephro (ıstakoz)	69.8***	*Galleria (balmumu solucanı)*	33.7***
Homarus (ıstakoz)	60-75***	***Mantarlar***	
Lepas (yabani kaz)	58.3***	*Aspergillus niger*	42.0*****
Yumuşakçalar:		*Penicillium notatum*	18.5*****
Clam (istiridye)	6.1	*Penicillium chrysogenum*	20.1*****
Shell oysters (kabuk istiridye)	3.6	*Saccharomyces cerevisiae*	2.9*****
Squid pen (kalamar)	41.0	*Mucor rouxii*	44.5
Krill (kabuklar)	40.2	*Lactarius vellereus*	19.0

* Vücut taze kütlesi ile karşılaştırılması, ** Gövdesi kuru kütlesine göre, *** Organik kütikül kütlesine göre, **** Kütikül toplam kütlesine göre, ***** Hücre duvarının kuru kütlesine göre değerlerini gösterir.

3.1. Deniz Kabuklularından Elde Edilen Kitin ve Türevleri

Kitin elde edebilmek için farklı hammaddelerin mineral, protein ve bunlara benzer istenmeyen gruplardan bazı kimyasal veya biyokimyasal yöntemlerle uzaklaştırılması ve kitinin ayrıştırılması gerekmektedir. Özellikle kitin olmak üzere, kabuklu su ürünlerinin atıklarının değerlendirilmesi ve çeşitli ürünler elde edilmesi hem ekonomik açıdan hem de çevre açısından çok büyük avantajlar sağlamaktadır (Ravi Kumar, 2000). Genel ortalamalar göz önüne alındığında ıstakoz, karides ve yengeç gibi deniz hayvanlarının kabuk kısımlarının %30-50 oranında kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat, %30-40 oranında protein ve %20-30 oranında ise kitin içerdiği görülmektedir. Bu oranlar hammadde türleri veya mevsimlere bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Deniz kabuklularının kabuk artıklarından kitin elde edilirken bu artıklarda bulunan protein ve minerallerin uzaklaştırılması için alkali ve asit ile işleme sokulması gerekmektedir. Deniz kabuklularından doğru prosesler ve uygun işleme metotları altında yüksek kalitede kitin eldesi sağlanabilmektedir. Bazı insanlar üzerinde, kabuklu deniz hayvanlarının yapısında yer alan proteinler alerjen etkiler gösterebilmektedir. Bu nedenle bu proteinin tamamen uzaklaştırılması özellikle biyomedikal uygulamalar için çok önemlidir (Guang, 2002).

Şekil 3.1'de deniz kabuğu kaynaklarından kitin ve kitosanın eldesinin basamakları görülmektedir.

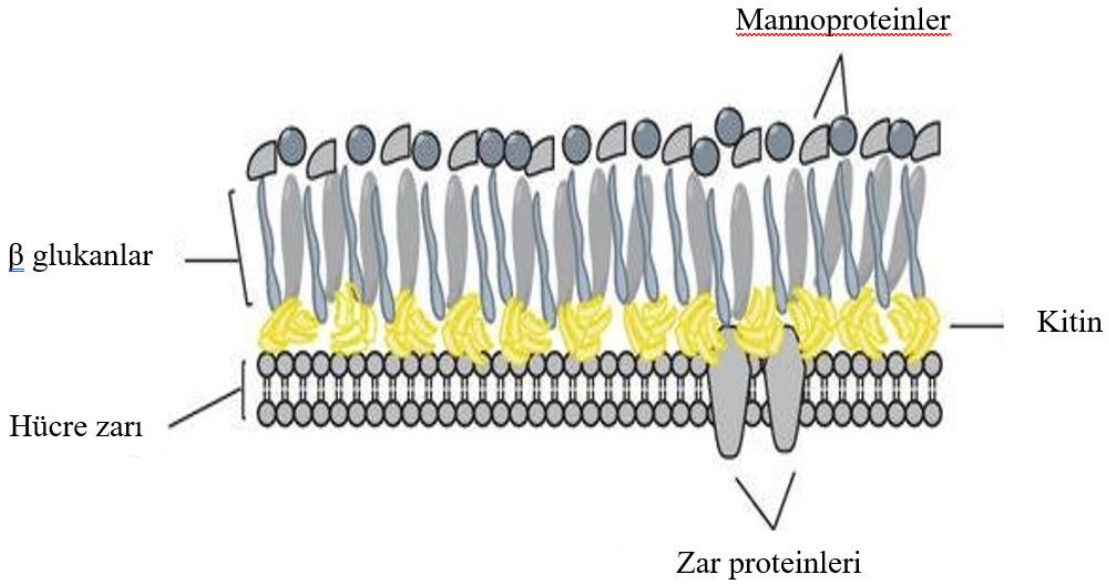


Şekil 3.1. Deniz kabuğundan kitin ve kitosan eldesi (İmamoğlu, 2011; Yıldız ve Yangılar, 2014; Üçgül, 2016)

3.2. Mantardan Kitin Eldesi

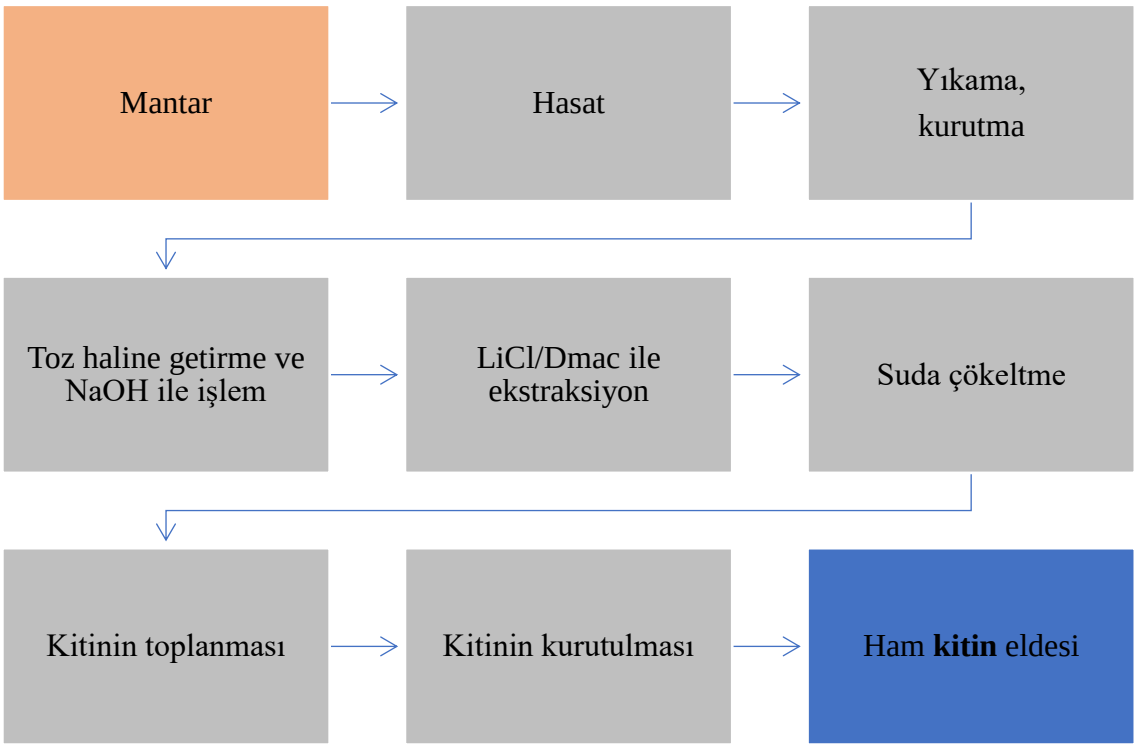
Kitin yalnızca kabuklu deniz canlıları değil, böcekler (akrep, gelinböceği, kelebek, sivrisinek vb.) başta olmak üzere doğada maya, mantar, alg gibi daha birçok organizmada yaşamsal öneme sahip yapılar olarak kendini gösterir. Mantarlar, parazit, saprofit ve simbiyotik olarak yaşayan, kolorofilsiz, heterotrof, ipliksi yapıda, spor oluşturan canlılardır (Adams, 2004).

Mantarlar hücre duvarlarına sahip canlılardır ve bu hücre duvarlarında glukan, kitini kitosan gibi maddeler yoğun bir şekilde yer almaktadır. Özellikle, Basidiomycetes, Ascomyceteslerdeve Chytridiomycetesler mantarlarında kitin, Zygomyceteslerde mantarlarında hem kitin hem de kitosan olmak üzere birçok mantar türünde belli yoğunluklarda bulunur. Mantar türüne göre farklılıklar göstermekle birlikte, hücre duvarları genel olarak %22-44 oranında kitin içermektedir.



Şekil 3.2. Mantar hücre duvarı bileşenleri (Vega, & Kalkum, 2012)

Kimyasal yöntemlerden yararlanılarak mantarlardan kitin eldesini gösteren bir şematik resim Şekil 3.3'de yer almaktadır.

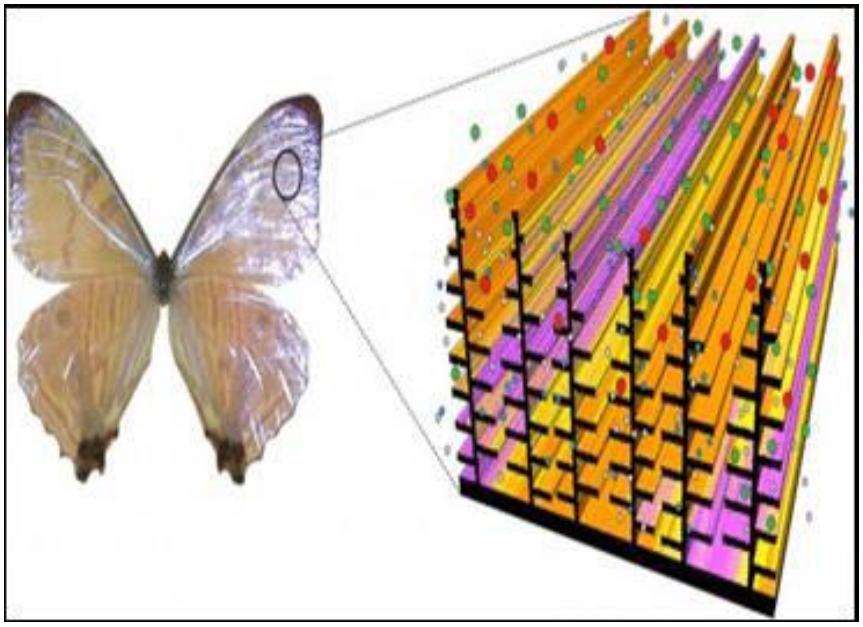


Şekil 3.3. Mantarlardan kimyasal yöntemlerle kitin eldesi (Demir, 2009)

Bilindiği gibi birçok mantar türü insan sağlığı açısından tehdit oluşturan zehirli içeriklere sahiptirler. Fakat mantarlardan elde edilen kitin ve türevleri hammadde kaynaklarının aksine aynı zehirli içeriği yapılarında barındırmamaktadırlar. Fakat yine de mantarlar için bilinen zehir riskinin, kitinin birincil kaynağı olarak mantarın tercih edilmemesindeki etkenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bunun dışında kullanılan kabuklu deniz ürünlerinin atıklarının değerlendirilmesi de mantarın birincil derecede tercih edilmemesi hususunda önemli bir etkendir.

3.3. Böcekler ve Yumuşakçalardan Kitin Eldesi

Dünya çapında 2 milyar insanın beslenmek için böcek yediği bilinmektedir. Bu nedenle böcekler uzun zamandır güvenilir bir besin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Kitinin ve kitosanın tarihçesi kısmında da bahsedildiği üzere kitosanın keşfedilişi, Fransa'da bir botanik bahçesi müdürü olarak görev alan Profesör Henri Braconnot'un 1811 yılı içerisinde mantar hücre duvarlarından fungin adını verdiği kısmı izole etmesine dayanmaktadır.1823 yılında, selülozun izolasyonundan 30 yıl önce, Odier böcekler üzerinde bir çalışma yapmış ve bu çalışma ile bitkilerin yapılarında olduğu gibi böceklerde de aynı yapının olduğunu görmüştür. Ardından Odier fungine 'kitin' adını vermiştir. Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarda kelebek gibi bazı böceklerde organik kütikül kütlesine bağlı olarak %64 oranına kadar ağırlıkça saf kitin bulunduğu belirlenmiştir. Aşağıda bulunan Şekil 3.4'de kelebek kanatlarında bulunan kitinin nano yapısının temsili bir görseli yer almaktadır.



Şekil 3.4. Kelebek kanatlarında görülen kitin nano yapısının temsili (Potyrailo vd., 2007)

İstiridye, kabuk istiridye, kalamar ve kril gibi yumuşakçalarda da kitin bulunmaktadır. Antartika'da balinaların çevresinde dolaşan bir çeşit deniz canlısı olan krilde %40'ın üzerinde, kalamarda ise %41 oranında ağırlıkça saf kitin yer almaktadır.



Şekil 3.5. (a) Kril ve (b) kalamar

3.4. Diğer Kitin Kaynakları

Deniz kabukluları, mantarlar, böcekler ve yumuşakçalar dışında bazı mikroalg türleri de hücre duvarlarında kitin ve hatta kitosan içermektedirler. Yeşil mikroalgler, maya hücre duvarları, deniz diatomları, koralin algleri ve yumuşakçaları güçlü asitler ve

bazlar altında gerçekleştirilen bazı çalışmalarda kitin ve kitosan eldesi için olumlu sonuçlar vermiştir. Hatta bu kitin ve kitosan kaynakları, kabuklu kitin ve kitosandan daha iyi bir performans ortaya koymuşlardır. Fakat bu çalışmalarda kullanılan alg kaynakları üzerinde, kitin ve kitosan ekstraksiyonundaki kimyasal işlemler dışında farklı yöntemler denenmemiştir (Chung vd., 2004; Leuba & Stossel, 1986; Rinaudo, Auzely, Vallin & Mullagaliev, 2005; Tsaih & Chen, 2003; Hackman & Goldberg, 1974)

Balık pulları da yapılan bazı çalışmalar ile kitin ve kitosanın olası bir kaynağı olarak değerlendirilmiş ve kabul görmüştür (Leuba, 1985). Fakat kitin ve kitosan hakkında yapılan derlemeler ve araştırmalar incelendiğinde balık pullarının kitin ve kitosanın gelişimi için yeterince ilgi görmemiş bir alan olduğu gözlemlenmiştir. Çeşitli balık pullaro içeren çok miktarda atık, ticari kitin kaynakları olarak kullanılabilir. Fakat kitin ve kitosan için hangi balık türlerinin ve pullarının en iyi kaynaklar olduğunun belirlenmesi gerekmektedir (Younes, 2015).

BÖLÜM 4

KİTİN ÇIKARMA

Özellikle yengeç ve karidesler olmak üzere çeşitli kabuklu canlıların kütikülleri kitin üretimi için ana hammadde kaynaklarıdır. Kabuklu deniz hayvanlarında sert bir kabuğu oluşturabilmek için kitin, kalsiyum karbonatın biriktiği proteinlerle birlikte kompleks bir yapının bileşeni olarak yer almaktadır. Kitin protein ile çok yakın bir etkileşim içerisindedir. Buna bağlı olarak kitinin polisakkarit-protein kompleksinde bulunan bir protein fraksiyonu da mevcuttur.

Kabuklu deniz hayvanlarından kitin elde edilebilmesi için kabuğun her iki ana bileşeni olan proteinlerin ve inorganik kalsiyum karbonatın çıkarılması gerekmektedir. Proteinlerin deproteinizasyon yoluyla, inorganik kalsiyum karbonatın ise demineralizasyon yoluyla çıkarılması sırasında genellikle küçük miktarlarda pigmentler ve lipidlerde bu işlemlerle çıkmaktadırlar. Buna bağlı olarak bazı durumlarda bu artık pigmentleri bertaraf edebilmek adına ekstra bir renk giderme prosesi de uygulanmaktadır.

Saf kitin elde edebilmek için çok uzun yıllardır birçok yöntemin önerilmesi ve denenmesine karşılık herhangi standart bir yöntem henüz benimsenmiş değildir.

Kitin elde edebilmek için kullanılan deproteinizasyon yöntemi de mineralizasyon prosesleri de hem kimyasal hem de enzimatik işlemler vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir.

Yukarıda bahsedilen iki prosesin sırası değiştirildiğinde özellikle enzimatik tedaviler için bir miktar fayda sağlamaktadır.

Ayrıca kitin çıkarma işlemi için mikrobiyal fermantasyon da kullanılabilmektedir. Mikrobiyal fermantasyon uygulamasında deproteinizasyon ve demineralizasyon prosesleri aynı anda gerçekleştirilmektedir.

4.1. Kimyasal Çıkarma

4.1.1. Kimyasal Deproteinizasyon

Proteinler ve kitin arasında yer alan kimyasal bağların bozulması nedeniyle deproteinizasyon aşaması zordur. Kimyasal deproteinizasyon işleminin gerçekleştirilmesi için biyopolimerleri de depolimerize eden kimyasallar kullanılmaktadır. Bu şekilde heterojen bir şekilde proses gerçekleşmektedir.

Dünya üzerindeki insan popülasyonunun yüzde birinin kabuklu deniz hayvanlarına karşı alerjisi vardır ve bu alerjinin en büyük etkeni protein bileşenidir. Bu nedenle proteinin tamamen uzaklaştırılabilmesi özellikle biyomedikal uygulamalar için çok önemlidir.

Deproteinizasyon için ilk yaklaşım olarak kullanılan yöntemler kimyasal işlemlerdir. Bu uygulamalarda NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$, Na_2SO_3, $NaHSO_3$, $CaHSO_3$, Na_3PO_4 ve Na_2S gibi birçok kimyasal çeşiti birçok uygulamada deproteinizasyon reaktifi olarak denenmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde reaksiyon koşullarının her çalışmada önemli ölçüde değiştiği görülmüştür. Genellikle NaOH reaktifi tercih edilmekte ve 0,125 ile 5 M arasında değişen konsantrasyonlarda, farklı kür sürelerinde (birkaç dakika ile birkaç gün arasında) ve farklı sıcaklıklarda (160°C'ye kadar) uygulanmaktadır. NaOH kullanımı her uygulamada, kitinin kısmi deasetilasyonu ve biyopolimerin hidrolizinin moleküler ağırlığının azalması ile sonuçlanmaktadır.

4.1.2. Kimyasal Demineralizasyon

Demineralizasyon sırasında öncelikle kalsiyum karbonat olmak üzere minerallerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır.

Demineralizasyon işlemi sırasında genellikle HCL, HNO_3, H_2SO_4, CH_3COOH ve HCOOH kullanılmakta ve asitle muamele edilerek gerçekleştirilmektedir (No & Hur, 1998).

Reaktif seyreltik hidroklorik asit bu uygulamalarda genellikle tercih edilen asittir. Bu sayede aşağıdaki denklemde de görüldüğü gibi demineralizasyon, kalsiyum karbonatın karbondioksit salımıyla suda çözünmesi ve bu sırada kalsiyum tuzlarına ayrışmasını içerdiğinden kolayca gerçekleşmektedir:

$$2HCL + CaCO_3 \rightarrow CaCL_2 + H_2O + CO_2 \uparrow \quad (4.1)$$

Kabuklu deniz hayvanlarının kütikülünde bulunan diğer minerallerin birçoğu da yukarıdaki reaksiyona benzer bir şekilde reaksiyona girmekte ve asit varlığında çözünerek tuz vermektedir.

Her bir kabuk için ekstraksiyon süresi, mineralizasyon derecesi, sıcaklık, asit konsantrasyonu, parçacık boyutu ve çözünen/çözücü oranı gibi etkenler değişmektedir. Bu nedenle demineralizasyon işlemi genellikle ampiriktir. Ayrıca bu işlem asit konsantrasyonuna da bağlıdır. Çünkü kalsiyum karbonat molekülünü kalsiyum klorüre dönüştürmek için iki HCL molekülüne ihtiyaç vardır. Reaksiyonun tam olarak gerçekleştirebilmek için asit girdisinin stokiyometrik mineral miktarına eşit düzeyde veya daha fazla olması gerekmektedir (Shahidi, 1991).

Katı maddenin heterojenliğinden kaynaklı olarak bütün mineralleri uzaklaştırmak zor olduğundan daha konstantre ve daha büyük hacimli asit çözeltileri kullanılmaktadır. Demineralizasyon işlemini asidimetrik titrasyon işlemi takip edebilir. pH'ın nötraliteye doğru dönüşümü asit tüketimine karşılık gelmektedir fakat ortamdaki asitliğin devam etmesi reaksiyonun sonunu göstermektedir (Tolaimate, Desbrieres, Rhazi & Alagui, 2003).

Çeşitli reaksiyon koşullarını içeren birkaç farklı demineralizasyon işlemi önceki çalışmalarda kullanılmıştır. Konvansiyonel demineralizasyon işlemi oda sıcaklığında farklı konsantrasyon (%10 a/h'ye kadar) ve farklı inkübasyon sürelerinde seyreltik hidroklorik asit kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Kitin üretim koşullarının literatüre göre karşılaştırılması (Younes ve Rinaudo, 2015)

Numara	Hammadde Kaynağı	Deproteinizasyon				Demineralizasyon		
		NaOH Konsantrasyonu*	Sıcaklık (°C)	Banyo Sayısı	Süre (h)	HCL Konsantrasyonu*	Sıcaklık (°C)	Süre (h)
1	12 kabuklu ve kafadan bacaklı türü	0.3 M	80–85	2-7	Her banyo için 1 saat	0.55 M	Oda Sıcaklığı	2-5 tekrar banyo ile 15-60 dakika
2	Karides	0.125 M	100	1	0.5	1.25 M	Oda Sıcaklığı	1
		0.75 M	100	1	-			
3	Karides	1.25 M	100	1	0.5	1.57 M	20–22	1–3
4	Yengeç	0.5 M	65	1	2	1.57 M	Oda Sıcaklığı	5
5	Yengeç	1 M	80	1	3	1 M	Oda Sıcaklığı	12
6	Yengeç	1 M	100	1	36	2 M	Oda Sıcaklığı	48
7	Yengeç	1 M	100	3	72	1 M	Oda Sıcaklığı	-
8	Yengeç	1.25 M	85–90	3	24	1.37 M	Oda Sıcaklığı	24
9	Yengeç / Istakoz	2.5 M	Oda Sıcaklığı	3	72	11 M	−20	4
10	Kril	0.875 M	90–95	1	2	0.6 M	Oda Sıcaklığı	2
11	Istakoz	1 M	100	5	12	2 M	Oda Sıcaklığı	5
12	Kalamar	2 M 2 M	Oda Sıcaklığı 100	2	Bir Gece 4		Oda Sıcaklığı	18
13	Istakoz	10%	100	1	2.5	10% HCL 90% Formik	Oda Sıcaklığı	Bir gece
14	Kril	3.5%	25	1	2	3.5%	20	1.5
15	Istakoz	5%	80–85	2	0.5	5%	70	4
16	Kerevides	3.5%	65	1	2	1 M	Oda Sıcaklığı	0.5
17	Yengeç	1 M	50	1	6	1 M	20	3
18	Karides	1%	65	1	1	0.5 M	Oda Sıcaklığı	-
19	Karides	3%	100	1	1	1 M	Oda Sıcaklığı	0.5
20	Karides	4%	100	1	1	5%	Oda Sıcaklığı	-

* Reaktan konsantrasyonları molarite veya % a/h olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.1'de alıntılanan çalışmalar içerisinde doğal kitinin yapısında bozulma değişikliklere ve bozulmalara engel olabilmek için farklı yöntemler denenmiştir. Bazı çalışmalarda bozulmayı en aza indirgemek için zayıf asitler kullanılmıştır. (Austin, 1981) Bazı çalışmalarda kükürtlü asit içeren prosesler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. (U.S. Patent No. 4,066,735. 1996) Fakat bu prosesler sonucunda elde edilen kitinler yüksek kalıntı kül içeriğine sahip olmuştur. Karıştırma prosesi altında demineralizasyon, HCL kullanılarak genellikle 2 ile 3 saat aralığında gerçekleştirilebilir. Hazırlama yöntemlerine bağlı olarak reaksiyon süresi ise 15 dakika ile 48 saat arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Daha uzun demineralizasyon sürelerine ulaşıldığında kül içeriğinde bir miktar düşüşler gözlemlenmesine karşın polimer bozulmaları da meydana gelmektedir.

Ek olarak yüksek sıcaklık uygulamalarının, çözücünün kitin matrisine nüfuz etmesini teşvik ederek demineralizasyon reaksiyonunu hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Partikül boyutunun da çözücünün kitin matrisine nüfuz etmesindeki etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Fakat yüksek sıcaklıklar, yüksek asit konsantrasyonları, daha uzun inkübasyonların ve granülometrinin elde edilen kitinin son fiziksel ve kimyasal özelliklerine etkileri olduğu bilinmektedir. Demineralizasyondaki belirleyici faktör çözücü ve kitin matrisi arasındaki toplam temas alanı ile ilgilidir. Minerallerin giderilmesi için literatürde birçok deneysel çalışma ve koşul yer almasına karşın moleküler ağırlık ve asetilasyon derecesi üzerindeki etkilerden kaçınılamamıştır.

4.2. Biyolojik Çıkarma

Kimyasal ekstraksiyon uygulamaları bazı dezavantajlar barındırmaktadır. Bunlardan başlıcaları aşağıda sıralanmıştır.

- Kitinin fiziko-kimyasal özelliklerine zarar vermektedir,
- Saflaştırılmış kitinin içsel özelliklerini olumsuz yönde etkileten MW ve DA düşüşlerine yol açmaktadır,
- Bazı kimyasallar içeren atık su çıkışlarına etki eder,
- Kitin saflaştırma işlemlerinin maliyetini arttırır.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda 'yeşil kimya' kavramına dayalı yeşil ekstraksiyon teknikleri geliştirilmektedir. Bu çalışmalar kitin ekstraksiyonu için mikroorganizmaların ve enzimlerin uygulanmasını desteklemekte ve giderek daha fazla

ilgi görmektedir. Yapılan karşılaştırma çalışmalarında; mikroorganizmaları kullanan biyolojik yöntemlerin karides kabuklarından kitinin çıkarılması sırasında kitinin yapısını koruma konusunda kimyasal yöntemlerden daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir (Khanafari, 2008). Ayrıca karides kabuklarının bazı proteolitik mikroorganizmalarla deproteinizasyonuyla elde edilen kitinin moleküler ağırlığı, kimyasal yöntemlerle kabuklu deniz ürünlerinden elde edilen kitine kıyasla daha fazladır (Bustos, 1994).

Biyolojik ekstraksiyon yöntemleri sayesinde kitin daha kısa sürelerde yeniden üretilebilirlik, daha az solvent tüketimi, daha az bozulma ve enerji tüketimlerinin azalması gibi avantajlar elde edilmektedir. Fakat bununla birlikte, kitin için biyolojik ekstraksiyon çalışmaları hala laboratuvar ölçekli çalışmalarla sınırlıdır (Younes, 2015).

4.2.1. Enzimatik Deproteinizasyon

Kitin ekstraksiyonu sırasında proteazların kullanılması gerekmektedir. Proteolitik enzimler, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilir. Proteinleri kabuklu kabuklarından uzaklaştırmak için kullanılan, pepsin, devolvaz, papain, alkalaz, pankreatin ve tripsin gibi birçok proteaz aynı zamanda kitin izolasyonu sırasında depolimerizasyon ve deasetilasyonu en aza indirgemektedir. Bu proses, reaktanların erişilebilirliğini değiştiren katı malzemenin demineralizasyon aşamasından daha önce veya daha sonra gerçekleştirilebilir.

Deproteinizasyon adımında hem ham olarak ekstre edilmiş proteazlar hem de saflaştırılmış proteazlar kullanılabilir. Ham proteazlar, ticari olarak saflaştırılmış enzimlere oranla daha ucuzdur. Ayrıca ham proteazlar yalnızca ucuz olmakla kalmayıp, aynı zamanda bir arada bulunan proteazların varlığından kaynaklı olarak daha verimlidir. Balık iç organları ve bakteriler ham proteazların elde edildiği başlıca kaynaklardır. Deniz hayvanları, hayvan dokularında bulunan ve hem kararlı hem de aktif formlarda geri kazanılabilen aynı fonksiyonel enzim sınıflarına sahiptir. Yan ürünler, balık ürünleri üreten başlıca ülkelerin birçoğunda deniz ürünleri hasadının yaklaşık olarak %50'sini oluşturmaktadır (Rao, 1998). Bu ürünler genellikle yeterli ölçüde kullanılamaz ve atık olarak bertaraf edilir. Dolayısı ile bu ürünlerin kitin ekstraksiyon işlemlerinde uygulanması aynı zamanda çevrenin korunmasına katkı sağlamaktadır. Maliyetlerin düşürülmesine yardımcı olan bu uygulamanın aynı zamanda çevreye katkıları da uygulamayı çok daha anlamlı kılmaktadır.

Enzimatik yöntemlerdeki etkinliğin, izole kitine oranla hala genellikle %5-10 artık protein içerdiği için daha düşük olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durumda nihai olarak izole edilmiş kitin, saflığını arttırmak ve kitinin yapısını korumak adına daha sonra ek bir NaOH işlemine tabi tutularak daha yumuşak koşullar altında ve kısa bir süre için işlenebilir. Alkali muamelesi ile elde edilen kitindeki kalıntı protein içeriğinin enzimatik deproteinizasyon ile elde edilene oranla önemli miktarda (%6'ya kıyasla %10) daha düşük olduğunu gösteren çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Manni, 2010).

Ekstraksiyon işlemi kimyasal yöntemlerle gerçekleştirildiği taktirde deproteinizasyon ve demineralizasyon işlemlerinin sıralamasının kitinin verimi ve kalitesi üzerinde önemli bir etkisi olmamaktadır (Kaur, 2015). Buna karşın, ilk olarak deproteinizasyon işleminin uygulanması durumunda, kütiküllerde sunulan mineraller proteazların erişebilirliğini azaltabilir. Bu da karides kabuklarının deproteinizasyon etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilir.

4.2.2. Fermantasyon

Endojen mikroorganizmaların oto-fermantasyonu yardımı veya mikroorganizmaların seçilmiş suşlarının eklenmesiyle elde edilebilen fermantasyon işlemi ile deproteinizasyon işlemi yapılarak enzim kullanım maliyetleri düşürülebilir. Bu durum, tek aşamalı, iki aşamalı, birlikte veya ardışık fermantasyon ile ortaya çıkar. Fermantasyon yöntemleri laktik asit fermantasyonu ve laktik asit dışı fermantasyon olarak iki ana kategoriye ayrılabilir.

4.2.2.1. Laktik Asit Fermantasyonu

Proteazlar ve laktik asit üreten inokulum olarak seçilen Lactobacillus sp. suşu ile kabuklu kabuklarının fermantasyonu gerçekleştirilebilir. Glikozun dönüştürülmesi ile elde edilen laktik asit, silajın daha düşük pH koşuluyla, bozulmaya neden olan mikroorganizmaların büyümesini baskılar. Kalsiyum karbonat ile reaksiyona girerek, laktik asit, geri kazanılan ve su ile durulanan daha hafif kabukluklardan ayrılan bir kalsiyum laktat çökeltisinin oluşumuna neden olur. Bu işlem kafalar ve iç organlar dahil tam karides atığı veya saflaştırılmış kabuklu kabukları üzerinde gerçekleştirilebilir (Oh, 2007). Bu nedenle proteinlerin eşzamanlı sıvılaştırılması ve deproteinizasyonu, eklenen suşlar tarafından üretilen proteazların etkisiyle, biyolojik atığın kendisinde bulunan proteazlar veya işlenmiş karideslerin bağırsak sisteminde bulunan bağırsak bakterileri tarafından meydana gelebilir. Laktik asit fermantasyonunun etkinliği birçok faktöre

bağlıdır. Bunlardan başlıcaları karbon kaynağı ve konsantrasyonu, inokulumların türü ve miktarı, fermantasyon sırasında başlangıç pH'ı ve pH değişimi, fermantasyon süresi ve sıcaklık gibi faktörlerdir (Prameela, 2010). Laktik asit bakterileri ile yapılan fermantasyonda, ticari proteazların eklenmesi deproteinizasyonu arttırabilir. Ayrıca demineralizasyon etkinliği ve elde edilen ürünün kalitesi yüksektir (Rao, 2000).

4.2.2.2. Laktik Asitsiz Fermantasyon

Kabuklu kabuklarının fermantasyonu için laktik asitsiz fermantasyon uygulamalarında hem bakteriler hem de mantarlar kullanılmaktadır (Wang, 1998). Birçok faktörün fermantasyon süreci ve buna bağlı olarak deproteinizasyon ve demineralizasyon verimlerini etkilediği gözlemlenmiştir (Jung, 2005).

Kitin ekstraksiyonunun mikroorganizmalar tarafından çeşitli biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilmesi, kimyasal işlemler ile karşılaştırıldığında daha basit, üretken ve çevre dostudur. Buna karşın mikrobiyal fermantasyon kimyasal yöntemlere kıyasla daha uzun işlem sürelerine sahiptir. Ayrıca mikrobiyal fermantasyon yüksek artık proteinlere neden olan minerallerin varlığından kaynaklanan proteazlara daha zayıf erişilebilirlik gibi dezavantajlara sahiptir. Fakat özellikle biyomedikal uygulamalar için deproteinizasyon oranı son kullanım gereksinimlerine bağlı olarak iyileştirilebilir. Bu iyileşmeyi elde edebilmek için iki aşamalı fermantasyonlar veya mikroorganizmaların ortak fermantasyonu gibi ardışık veya eşzamanlı işlemler kullanılabilir. Yüksek düzeyde saflaştırılmış kitin elde edebilmek için, artık mineraller ve proteinleri uzaklaştırmak üzere daha hafif kimyasal işlemlerle biyolojik sürecin tamamlanması gerekir.

BÖLÜM 5

KİTİN VE KİTOSANIN KULLANIM ALANLARI

Çok işlevli bir polimer olan kitosan çeşitli amaçlar için uygulanabilir kabul edilmiştir. Kitosan birçok uygulamada kullanılabilir olmasını düşük maliyeti, sindirilebilirliği, biyouyumluluğu ve çok yönlülüğü gibi özellikleri sayesinde elde etmiştir (Kim & Rajapakse, 2005). Biyomedikal ve çevre mühendisliği alanlarında pek çok sorunu çözmek adına kitosan ve türevleri kullanılabilir. Heyecan verici pek çok özelliği ile kitosan biyomedikal ve çevre alanlarının dışında; gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi, biyoteknoloji, tıp, tekstil endüstrisi, kağıt endüstrisi, tarım gibi pek çok alanda daha kendisine yer edinmiştir.

5.1. Gıda Endüstrisi

Gıda endüstrisinde %83'ten fazla deasetilasyon seviyesine sahip olan kitosanlar diyet katkı maddeleri olarak kullanılmıştır. Yağa bağlanma kabiliyeti nedeniyle kitosan, obeziteyi kontrol etmek için besin takviyesi olarak da kullanılır (Ramya, Venkatesan, Kim & Sudha, 2012). Kitosan lifine bağlı yağ, vücudun ememeyeceği bir kütle oluşturur ve vücut tarafından yok edilir. Kitosan lifi, yağlar, safra asitleri ve negatif yüklü lipidler ile kimyasal olarak bağlanır. Bazı çalışmalarda kitosanın hipokolestrerolemik olduğu da belirtilmiştir (Ibrahim, Osman & Mahmoud, 2011). Kitosan insan vücudu tarafından sindirilemediği için kalori değeri yoktur. Bu sayede kitosan kilo verme ürünü olarak da kullanılabilir.

Kitosan ayrıca gaz ve aroma sızdırmazlık özellikleri sayesinde raf ömrü arttırılmış paketlenmiş gıda ürünlerinde çevre dostu bir ambalaj malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Yakın gelecekte sentetik ambalaj filmlerinin yerine sürdürülebilir bir alternatif olarak öngörülmektedir (Miteluț, Tănase, Popa & Popa, 2015; Mujtaba vd.,

2019). Mantar bozulmalarına karşı et ve diğer gıda ürünlerinde doğal koruyucu madde olarak kitosan kullanılmıştır. Kitosan ayrıca meyve ve sebzelerde koruyucu olarak kullanılır ve besin kaybını önlemeye yardımcı olur (Kerch, 2015; Duan vd., 2019). İçeceklerin arıtılması, muhafaza edilmesi ve biyoaktif bileşiklerin kapsüllenmesi için de kitosan kullanılır (Rocha, Coimbra & Nunes, 2017).

5.2. İlaç Endüstrisi

Kitosan ilaç formülasyonlarında güvenli bir yardımcı madde olduğunu son yıllarda kanıtlamıştır (Baldrick, 2010). Antiülser ve antasit özellikleri sayesinde kitosan, midede ilaç tahrişini önlemektedir. Serbest mide asidini bağlamakta ve uyuşturucu görevi görmektedir. Ayrıca kozmetik ve eczacılıkta emülgatör olarak da kullanılmıştır.

5.2.1. Kozmetik

Kitosan kremler, losyonlar ve tırnak cilaları gibi pek çok kişisel bakım uygulamalarında ve başta cilt bakımı ile saç olmak üzere çeşitli kozmetik uygulamalarında kullanılan doğal katyonik bir zamktır. Kitosan cilt yüzeyinde nemlendirici ve koruyucu elastik bir film oluşturur. Bu sayede kitosan losyonlar ve güneş kremleri gibi nemlendirici ürünlerin formülasyonunda faydalı bir malzeme olmaktadır. Cildi deterjanlar ve olumsuz çevre koşullarına karşı korur ve pürüzsüzleştirir. Hidrasyon özelliği olarak kitosanın hyalüronik asitten daha üstün olduğu gözlemlenmiştir. Önemli ek avantajları sayesinde kitosan dudak bakımı ve güneşten korunma uygulamalarında tercih edilen çok işlevli bir etken madde olmuştur. Dudaklar için sadece koruma amaçlı değil aktif bir dudak bakım maddesi olarak da kitosan kullanılır. Kitosan ilavesi dudakları daha yumuşak hale getirir ve aynı zamanda uzun süreli renk yapışmasını ve bir güneş kremi formülasyonundaki UV filtrelerinin su direncini önemli ölçüde artırmayı destekler. Kitosan ayrıca saç kozmetiklerinde şekillendirici bir polimer ve deodorantlarda aktif bir bileşen olarak kullanılır. Antimikrobiyal özelliği ile kitosanın enzim üreten bakterilerin aktivitesini inhibe etmesi sayesinde kitosanın deodorantlarda kullanımı ek avantajlar getirir. Ayrıca koku giderici etki ve cilt uyumluluğu olarak değerlendirildiğinde kitosanın triklosandan daha iyi olduğu ve koku adezyonu bakımından kitosan içeren formülasyonun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Tzaneva vd., 2017).

5.2.2. İlaç Taşınımı

Çeşitli aktif ürünlerin taşıyıcısı olarak kitosan ilaç tedariğinde de önemli bir malzeme olmuştur (Dash, Chiellini, Ottenbrite & Chiellini, 2011; Sonia & Sharma, 2011). İlaç konjugatı, biyobozunur salım sistemi, hidrojel sistemi ve birçok bileşen için polielektrolit kompleksi olarak kitosan, ilaç salınımında etkin bir rol almaktadır. Kitosan bazlı sistemler, biyo görüntüleme uygulamaları, gen terapisi, antibiyotikler, antienflamatuar ilaçlar, büyüme faktörleri ile proteinler ve peptitlerde kullanılır (Rhim, Park & Ha, 2013). Polimer üzerindeki pozitif yüklü birincil amino grupları ile kitosan, mukusun negatif yüklü sialik asit ve sülfonik asit alt yapıları arasındaki etkileşimler sebebiyle mukoadezif özellikler ortaya koyar (Pardeshi & Belgamwar, 2016; Ramya, Venkatesan, Kim & Sudha, 2012). Penetrasyonu arttırıcı ve mokoadezif özelliklerinden dolayı nazal formülasyonlarda en çok kullanılan eksipiyanlardan biri kitosandır. Bazı çalışmalarda ilaçların burundan beyine iletimi için birkaç kitosan formülasyonu önerilmiştir (Rassu vd., 2016). Sadece kitosan değil türevlerininde ilaç iletiminde faydalı olduğu gözlemlenmiştir (Anitha, vd., 2011).

5.3. Biyoteknoloji

Sitolitik T-lenfositlerin proliferasyonu yoluyla kitosan, tümör hücrelerinin büyümelerini inhibe eder ve bu sayede anti-tümör özellik ortaya koyar (Kim, 2005). Kitosanın çeşitli biyolojik sistemlerde antiviral özellikler gösterdiği de belirtilmiştir. Sahip olduğu amino gruplarının katyonik yükleri hayvanlarda ve bitkilerde savunma ve bağışıklık sistemlerini aktive etmek için bazı ek avantajlar getirmektedir. Kitosan ve türevleri, memeli hücrelerinde in vitro hücre dışı lizozimal aktiviteyi ve bağ dokusu oluşumunu uyarır. Kitosan hem insanlarda hem de bitki ve hayvanlarda hücresel düzeyde mikrobiyal savunmayı geliştirir. Kitosan ve kitooligosakkaritler, hücresel sistemlerde radikal kaynaklı hasarı kontrol etmek için bir temizleyici antioksidan olarak da kullanılabilmektedir. Kitosan ayrıca proteinlere yüksek afinite, enzimlerle doğrudan reaksiyon ve kimyasal modifikasyon için reaktif fonksiyonel grupların mevcudiyeti, hidrofiliklik, mekanik stabilite, rijitlik ve farklı geometrik konfigürasyonda hazırlanabilme özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyon materyali olarak kullanılmaktadır (Klotzbach, Watt, Ansari & Minteer, 2008).

5.4. Antimikrobiyal Maddeler

Kitosan, yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilme, biyobozunurluk, biyouyumluluk, ekolojik güvenlik ve daha geniş antimikrobiyal spektrumlu türevler hazırlama olasılığı gibi çeşitli avantajları ile çok önemli bir doğal polimerdir. Kitosanı diğer dezenfektan türlerinden ayıran pek çok avantajı bulunmaktadır. Bunlar memeli hücrelerine karşı daha düşük toksisiteye ve düşük direnç olasılığına, daha yüksek öldürme oranına, daha geniş bir aktivite spektrumuna ve daha yüksek bir antibakteriyel aktiviteye sahip olmasıdır.

Kitosan; fosfat, karboksil, N-asetilglukosamin, N-asetilmuramik asit gibi negatif yüklü grupların kitosanın polikatyonik yapısı ile etkileşime girdiği teikoik asit (gram-pozitif) ile ilişkili lipopolisakarit (gram-negatif) ve peptidoglikandan oluşan hücre duvarı ile genel olarak bakterinin dış yüzeyinde etki gösterir. Hücre duvarında yer alan iki değerlikli katyonlardaki şelatlayıcı etki, zarın bütünlüğünün bozulmasına da katkıda bulunur. Polikatyonik kitosan 200 mg/L altındaki konsantrasyonlarda, negatif yüklü bakteri yüzeyine bağlanarak aglütinasyona neden olur. Fakat bu değerin üzerindeki konsantrasyonlarda, daha fazla sayıda pozitif yük bakteri yüzeylerine net bir pozitif yük verir ve onları süspansiyon halinde tutar. Hücre geçirgenliğini değiştirmek için kitosan hücre zarı ile etkileşime girer. Ayrıca kitosan eser miktardaki metalleri seçici olarak bağlayan ve bu sayede toksin üretimi ile mikrobiyal büyümeyi engelleyen bir kenetleme maddesi olarak da kullanılabilmektedir. Aynı zamanda kitosan konakçı dokuda pek çok savunma sürecini aktive eder. Su bağlayıcı bir ajan olarak hareket eder ve çeşitli enzimleri inhibe eder. Pozitif yüklü kitosan bazı mantar ve bakterilerin hücresel DNA'sı ile etkileşime girer ve bunun sonucunda RNA ve protein sentezini inhibe eder. Gerçekleştirilen çalışmalarda Kitosanın doza bağlı büyümeyi önleyici etki gösterdiği görülmüştür (Badawy & Rabea, 2011). Kitosanın antimikrobiyal etkisi, molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, polimerizasyon derecesi, pH, doğal çevre, organizma tipi, türevlendirme, çözünürlük ve sıcaklık gibi içsel ve dışsal faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterebilir. Polimer ve mikroorganizmalar arasında artan etkileşime ve polielektrolit komplekslerine yol açan yeni katılan gruplar nedeniyle kimyasal olarak modifiye edilmiş kitosanların bazıları yüksek antibakteriyel aktivite gösterir. Kitosan türevlerinin antimikrobiyal etki şekilleri ana kitosanın antimikrobiyal etki şekline bağlantılıdır. Bununla birlikte, birçok rapor, pozitif yüklerin yalnızca varlığının değil,

aynı zamanda konumunun da antimikrobiyal aktivitede önemli bir rol oynadığını doğrulamıştır (Bakshi, Selvakumar, Kadirvelu & Kumar, 2018; de Britto, Celi Goy, Campana Filho & Assis, 2011; Xu, Xin, Li, Huang & Zhou, 2010; Fu, Shen, Jiang, Huang & Yan, 2011). Kuaterner kitosan türevlerinin antimikrobiyal aktiviteleri bazı gram-pozitif, gram-negatif bakteri ve mantarlara karşı değerlendirilmiştir. Kitosan kuaterner tuzundaki alkil, aril kısımları ve karboksimetilasyonu içeren diğer kombinasyonların da gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir (Xu, 2010; Rúnarsson, Holappa, Malainer, Steinsson, Hjálmarsdóttir, Nevalainen & Másson, 2010; Sajomsang, Gonil & Saesoo, 2009) Kuaterner tuzların hücre duvarında yer alan iki değerlikli katyonlar üzerindeki şelatlayıcı etkisi de zarın bütünlüğünün bozulmasına yardımcı olur (Goy, Britto & Assis, 2009).

İnsanlarda diş çürüklerinden sorumlu olan Streptococcus mutans, glisidil trimetilamonyum klorürün kovalent ilavesi yoluyla kuaternize edilmiş kitooligosakarite duyarlı olduğu da gözlemlenmiştir (Kim, Lee, Lee & Park, 2003). Kuaterner amonyum tuzlarının kitosan omurgasına eklenmesi, kitosanın suda çözünürlüğünün yanı sıra antimikrobiyal aktiviteyi arttırmanın en iyi yöntemlerinden biridir.

5.5. Tıbbi Uygulamalar

Tıp alanında kitosan, fıtık tedavilerinde, vasküler ve kardiyovasküler protezlerde, ortopedik ve periodontal implantlarda kullanılmaktadır (Khor & Lim, 2003). Biyolojik olarak emilebilir ve kitosandan yapışmış dikişlerde tıbbi olarak çok kullanışlıdır (Ishihara vd., 2001). Yumuşak dokular için foto çapraz bağlanabilir kitosan biyolojik bir yapıştırıcı olarak da değerlendirilebilir. Kitosan, yeterli optik düzeltme, optik berraklık, mekanik kararlılık, gaz geçirgenliği, immünolojik uyumluluk ve ıslanabilirlik gibi pekçok özelliği ile kontakt lens için uygulanabilir bir yapıştırıcı olarak değerlendirilmektedir.

5.5.1. Gen İletimi

Elektrostatik etkileşimler sayesinde nükleik asitleri bağlama yeteneğine sahip olan kitosan, kitosan-DNA kompleksi ayrışmadan önce hücreye endositozlanır (Dash, Chiellini, Ottenbrite & Chiellini, 2011). Kitosan, verimli hücre transfeksiyonu amacıyla hem kapsüllenmiş DNA'nın lizozomal kaçışında hem de membran adezyonunda önemli bir rol oynar. Hibrit DNA-kitosan sistemleri birçok avantaja sahip kompleksler ve nanosferlerdir. Bu avantajlar; serum nükleaz bozulmasına karşı yüksek koruma,

aktivitede karşılaştırılabilir bir kayıp olmadan uzun süreli depolama için poliplekslerin liyofilizasyonu, çoklu plazmitler için diğer biyoaktif ajanların birlikte kapsüllenmesi, lizozomdan kaçışı artırmak ve dolayısıyla kompleksin bozulmasını azaltmak için lizozomotropik ajanların dahil edilmesi ve hedefleme ile reseptör aracılı endositoz için ligandların kitosan-DNA komplekslerine konjugasyonudur (Kumar, Muzzarelli, Muzzarelli, Sashiwa & Domb, 2004).

5.5.2. Yara İyileşmesi

Kitosanın klinik vakalarda yara iyileşmesini hızlandırma yeteneğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Açık yaralarda derinin iz bırakmadan kendini yenilemesine katkı sağladığı görülmüştür. Kitosanın yara iyileşmesinde doku kültüründe doku büyümesini ve farklılaşmasını teşvik ettiği ve fibroplazileri inhibe ettiği düşünülmektedir. Yara iyileşme sürecinde kitosan, makrofaj fonksiyonunu ve kollajenaz gibi çok sayıda enzimin, interlökinler ve tümör nekroz faktörü gibi sitokinlerin salgılanmasını modüle eder (Dai, Tanaka, Huang & Hamblin, 2011; Jayakumar vd., 2011).

5.5.3. Hemostatik Ajan

Hem askeri hem de sivil senaryolarda ciddi yaralanmalardan kaynaklanan şiddetli kanamayı durdurabilen hemostatik pansumanlar çok büyük önem arz etmektedir (Champion, Bellamy, Roberts & Leppaniemi, 2003; Kauvar, Lefering & Wade, 2006). Gerçekleştirilen çalışmalara göre kitosan hem hemostatik bandajlar gibi çeşitli yara iyileştirme uygulamalarında kullanılabilir hem de hemostatik bir ajan gibi davranmaktadır (Fischer, Bode, Demcheva & Vournakis, 2007; Jayakumar, Nwe, Tokura, & Tamura, 2007; Harish Prashanth, & Tharanathan, 2007). Kanın kitosanla temas ettikten sonra hızla pıhtılaştığı ve kitosan tarafından indüklenen hemostatik mekanizmanın klasik kan pıhtılaşma kaskadından bağımsız olduğunu pek çok çalışmada belirtilmiştir (Baldrick, 2010; Rao & Sharma, 1997; Klokkevold, Fukayama, Sung & Bertolami, 1999; Whang, Kirsch, Zhu, Yang & Hudson, 2005). Kitosan tabakasının tamamlayıcı sistemin alternatif yolunun güçlü bir aktivatörü olmasına, asetilasyonun neden olduğu ortaya konulmuştur. Kitosandaki pozitif yüklü gruplar ile kırmızı kan hücresi zarları üzerindeki negatif yüklü muraminik asit kalıntıları arasındaki iyonik çekim, kitosanın pıhtılaştırıcı aktivitesi için muhtemel gerekçedir. Kitosanın hemostatik etkilerinin hem trombosit hem de eritrosit agrefasyonları ile ilişkili olduğu son yıllarda giderek artan çalışmalar ve yayınlar ile görülmektedir.

2002 yılında FDA Irak ve Afganistan'da yer alan birliklere dağıtım için "HemCon Medical Technologies Inc." Tarafından geliştirilen kitosan bazlı bir ürünü onayladı. Araştırmalara göre kitosan pansumanları standart gazlı bezle karşılaştırıldığında, gelişmiş hemostaz yoluyla kan kaybını ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir. Bu nedenle ChitoSAM, Celox, Chitoflex ve HemCon gibi kitosan bazlı ticari ürünler ortaya çıkmıştır. Hemostatik avantajları nedeniyle kitosan ve türevleri hakkında araştırmalar ve çalışmalar devam etmektedir (Littlejohn vd., 2011)

5.5.4. Doku Mühendisliği

Kitosan bir biyo-iskele olarak doku mühendisliğinde özellikle deri ve kemik için pek çok avantaja sahiptir. Kitosanlar enflamatuar reaksiyonlar veya toksik bozunma olmadan bozundukları için iskele malzemesi olarak fazlasıyla ilgi çekici olmuştur (Kim, 2013). Gözenekli kitosan, keratinositler, deri fibroblastları ve kemik osteoblastları için yapı iskelesi olarak kullanılmıştır. Doku hücrelerinin bağlanması, çoğalması ve yaşayabilirliğinin uyarılmasını sağlayan kitosan yapısal olarak hücre dışı matrislere benzemektedir. Kitosan yapı iskeletleri, jel, film, sünger, partikül sistem vb. pek çok çeşitli formlarda üretilmiştir (Jayakumar, Menon, Manzoor, Nair & Tamura, 2010). Kitosan bazlı sistemler, karaciğer, kornea, adipoz doku, cilt, CNS ve kan damarı yeniden mühendisliği gibi yumuşak dokular için de değerlendirilmiştir (Hsu, Hsieh & Tseng, 2015).

5.6. Tekstil Uygulamaları

Tekstil ürünlerine yeni özellikler kazandırma amacıyla diğer polisakarit lifler modifiye edilmiş kitosan veya bir kitosan filmi ile kaplanmaktadır (Kumar, 2004). Kitosan türevleri sayesinde tekstil ürünlerinde antistatik ve kir tutmaz özellikler elde edilmektedir. Kitosan tıbbi tekstil ürünlerinde dikişler, iplikler ve lifler için de kullanılmaktadır. Atık su arıtmada boya giderimi de kitosanın kullanıldığı başka bir tekstil alanıdır (Lim & Hudson, 2003). Kitosan türevleri pamuğun antimikrobiyal apresinde kullanılmaktadır (Fu, 2011).

5.7 Kağıt Endüstrisi

Geri dönüştürülmüş kağıdı güçlendirmek ve karton, tuvalet kağıdı, gıda ambalajı, çevre dostu ambalaj vb. yapabilmek için kitosan uygulanmaktadır. Selüloza çok benzediği için kitosan, kimyasal katkıları azaltılarak kağıt üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır. Kitosan ile elde edilen kağıdın neme dayanıklı ve pürüzsüz olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Bobu, Nicu, Lupei, Desbrieres & Angot, 2011). Kitosan ayrıca kağıt hamuru fabrikası atık suyunda topaklaştırıcı olarak da kullanılmaktadır (Wang, Chen, Yuan, Sheng & Yu, 2009).

5.8. Tarım

Kitosan tarım alanında, gübre katkı maddesi, bitki düzenleyici, tarımsal ürünler için koruyucu ve antiviral ajan olarak kullanılmıştır (Badawy & Rabea, 2011). Kitosan son yıllarda bitki korumada, büyümeyi hızlandırıcı, toprak ıslahında, ikincil metabolitlerin üretimini artırıcı ve savunmayı etkinleştirici olarak başarıyla kullanılmaktadır.

5.9. Çevre Koruma

Serbest amino gruplarının kolay bulunabilmesi sayesinde kitosan, birçok negatif yüklü yüzeyle reaksiyona girer. Bu nedenle kitosan, herbisitler, pestisitler, metaller, boyalar, fenolik bileşikler gibi çeşitli kirleticilerden atık suyun dekontaminasyonu için adsorban olarak kullanılmıştır (Kyzas & Bikiaris, 2015). Kitosan atıkların biyolojik olarak arıtılmasından üretilen aktif çamurun şartlandırılmasında ve gıda endüstrisinde pıhtılaştırıcı bir ajan olarak kullanılmaktadır. Genellikle hayvan yemleri için potansiyel uygulamalara sahip olabilecek protein içeriği ile (%30-75) gıda işleme atıklarından ortaya çıkan pıhtılaşmış yan ürünlerde kitosan sayesinde elde edilmektedir. Deniz ürünleri işleme atık sularındaki amino asitlerin (glisin, serin, glutamik asit, alanin ve arginin) pıhtılaşması için de kitosan kullanılmıştır. Eşsiz moleküler yapısının getirdiği avantajlar sayesinde kitosan, naftol boyaları, kükürt, asit, reaktif, direkt ve dispers dahil olmak üzere pek çok boya türü için çok yüksek bir afiniteye sahiptir.

5.9.1. Atık Su Arıtma

30 yılı aşkın bir süredir kitosan su arıtma proseslerinde kullanılmaktadır. Ayrıca kitosan petrol atıklarının üzerine yayıldığında petrol kütlesini bir arada tutar ve bu sayede atıkların yayılmasını engelleyerek temizlenmesini kolaylaştırır. Kitosan atık su akışı sırasında, atık su içerisinde bulunan ince partikül maddeleri, ağır metaller, gresleri ve yağları filtreleyerek giderir. Kitosan N-benzilsülfonat türevleri, asidik ortamlarda metal iyonlarının uzaklaştırılması için sorbentler olarak kullanılabilir iken hidroksimetil kitin ve suda çözünür kitosan türevleri, anyonik atık akımları için daha kullanışlıdır. Günümüzdeki ciddi çevre sorunlarından biri petrol çıkarma atık suyu (WWOE) gibi yağlı atık suların arıtılması ve bertaraf edilmesidir. Çünkü emülsifiye edilmiş yağ damlacıkları kaynaklı etkenler bu atık suların arıtılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle alüminyum sülfat, polialüminyum klorür ve poliakrilamid gibi endüstriyel pıhtılaştırıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu pıhtılaştırıcılar biyolojik olarak parçalanamazlar ve bu nedenle tehlikeli aktif çamurlar oluştururlar. Kitosan artık yağ ile yüksek bir afiniteye sahiptir. Ayrıca biyolojik olarak parçalanabilirliği, topaklanma kabiliyeti, adsorpsiyonu ve hidrofilikliği nedeniyle atık su arıtma amaçlarında etkin bir şekilde kullanılmıştır.

5.9.2. Şelatlama

Amino grubu elektron açısından zengin bir donör görevi gördüğünden ağır metal iyonlarının kitosan tarafından şelasyon vasıtayısla uzaklaştırılması önemli oranda ilgi görmüştür. Kitosanın atık sudan bakır, kurşun, civa ve uranyum gibi zararlı metal iyonlarını şelatladığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda kitosanın kabuk, aktif çamur ve diğer ticari iyon değiştiricilerde kullanılan sentetik polimer poli(4-aminostiren) gibi doğal maddelerden daha yüksek şelatlama kabiliyetine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Tirtom, Dinçer, Becerik, Aydemir & Çelik, 2012). Kitosan krom dışındaki ağır ve toksit metaller için 1 mmol/g'den fazla bir bağlama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği ile diğer doğal malzemeler ile karşılaştırıldığında endüstriyel atıklardan Ni^{2+}'yı temizleme konusunda daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca kitosan nötr pH'ta Hg^{2+}'nin sert sulardan uzaklaştırılması amacıyla da etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sayede yer altı suyundaki arsenik konsantrasyonunu <0,05 ppm değerlerine kadar düşürebilmektedir (Varma, Deshpande & Kennedy, 2004).

5.9.3. Yeşil Kimya

Hem sera etkisine bağlı çevresel sorunlar hem de CO_2'nin bir karbon kaynağı olarak yeniden kullanılabilmesi adına endüstriyel atık gazlardan CO_2 geri kazanımı çok önemli bir konudur. Kitosan, CO_2 fiksasyonu için uygun bir alternatif amino işlevselleştirilmiş polimer olarak kullanılan doğal bir poliamindir.

Tüm bu uygulamalara ek olarak kitosanın özelliklerinden dolayı etkin olarak kullanıldığı veya uygulanabilirliği konusunda araştırmaların devam ettiği konularda vardır ve her geçen gün kullanım alanları artmaktadır.

BÖLÜM 6

MATERYAL VE METOT

6.1. Materyal

Çalışmalarda kullanılan materyaller kitosan ve kimyasallar olarak iki ana başlıkta gruplanmıştır.

6.1.1. Kitosan

Analizler için iki çeşit Kitosan kullanılmıştır.

1.Numune: Sentez (Çimçim Karides) Kitosan: Laboratuar şartlarında üretilen kitosandır. Trakya Üniversitesi Laboratuvarında, Karides kabuğundan elde edilmiştir.

2. Numune: Ticari Kitosan. Karides kabuğundan üretilmiş, ticari olarak satılan kitosandır. Adaga Gıda Ticaretten alınmıştır.

Kullanılan kitosanların aynı hammaddeden yapılmış olmasına dikkat edilmiştir.

6.1.2. Kumaş

Çalışmalarda ön terbiye işlemi görmüş, %100 pamuk ipliğinden üretilmiş beyaz dokuma kumaş kullanılmıştır.

6.1.2.1. Kitosan Numunelerinin Beyaz Patiska Kumaşa Kaplanması

Kumaşa Kitosan çözeltisinin kaplanması, düz bir zemin üzerinde rakle yardımı ile sürme kaplama tekniği ile yapılmıştır. Kitosan kaplanan kumaşlar, Kurutma dolabında 100ºC de 10 dakika kurutulmuştur. Kaplamalı kumaşların fikse işlemi, 110ºC de 3 dakika olarak kurutma dolabında yapılmıştır.

6.1.3. Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım yerleri aşağıdaki gibidir:

Asetik Asit: Kitosanın çözülmesinde kullanılmıştır.

Hidroklorik Asit (HCL) Kitosan sentezinde kullanılmıştır.

Sodyum Hidroksit (NaOH): Kitosan sentezinde kullanılmıştır.

Metil Alkol: Kitosan sentezinde kullanılmıştır.

Kloroform: Kitosan sentezinde kullanılmıştır.

6.2. Yöntemler

6.2.1. Karides Kabuklarından Kitin İzolasyonu ve Kitosan Eldesi

Karides kabukları distile suda yıkandı ve 50°C'de etüvde kurutuldu. Daha sonra kurutulan kabuklar öğütüldü. Karedesten kitin izolasyonu üç aşamada gerçekleştirilmiştir: deproteinizasyon, demineralizasyon ve renk giderimi.

Demineralizasyon aşamasında öğütülmüş numune 2M 250 mL HCL solüsyonu (v/v) ile muamele edilirken, deproteinizasyon aşamasında 2M NaOH solüsyonu (w/v) ile muamele edildi. Asit ve baz ile muamele edildikten sonra saf su, metil alkol ve kloroform karışımında 4:2:1 oranında depigmentasyona tabi tutuldu. Bu işlemden sonra izole edilen kitin tekrar 50°C'de etüvde kurutuldu. Kitinin deasetilasyonu, kuru kitin numunesinin 4 saat boyunca 140°C'de %70 NaOH çözeltisi (w/v) içinde işlenmesiyle gerçekleştirildi. Deasetilasyondan sonra karides kitini kitosana dönüştü. Elde edilen kitosan, pH nötr olana kadar distile su ile durulandı ve 50°C'de etüvde kurutuldu (Erdoğan, 2020).

6.2.2. Kitosanın Karakterizasyonu

6.2.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi

Sentez (Çimçim Karides) ve Ticari Kitosanların IR spektrumları, 4000–400 cm^{-1} frekans aralığında bir Shimadzu FTIR spektrometresi kullanılarak elde edildi. Bu analiz Deva Holding Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi.

6.2.2.2. Deasetilasyon Derecesi (DD)

Kitosan örneklerinin deasetilasyon derecesi (DD), aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Erdoğan & Kaya, 2016).

$$DD\ (\%) = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \times 115] \quad (6.1)$$

6.2.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosanlarının (Çimçim Karides) camsı geçiş sıcaklığını belirleyebilmek için Waters The Discovery DSC250 termal analiz cihazı kullanıldı. 10°C/dakika sıcaklık artış hızı ile 25-350°C aralığında ve azot atmosferinde analiz edildi. Numuneler 3-5 mg aralığında tartılan numuneler, DSC kaplarına koyularak analiz yapıldı. Bu analiz Deva Holding Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi.

6.2.2.4. Kuru Madde Tayini

Kuru madde tayini yapabilmek için, gravimetrik yöntem kullanıldı. Sabit tartıma getirilen vezin kaplarına kitosan örneklerinin kurutma işleminden önce tartımı alındı. 105°C'de 3 saat etüvde kurutma işlemi yapıldı ve sonrasında desikatörde oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. Soğuma işleminden sonra tartım alınarak ağırlık farkı olup olmadığı gravimetrik olarak tayin edildi. Nem miktarı aşağıdaki denklem ile hesaplandı. Bu analiz Deva Holding Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi. Şekil 6.1'de Deva Holding Analiz Laboratuvarında çekilen bir fotoğrafta vezin kapları görülmektedir.

$$\frac{[((Kurutma\ işleminden\ önceki\ tartım)-(Dara))-((Kurutmadan\ sonraki\ tartım)-(Dara))]}{Kurutma\ işleminden\ önceki\ tartım-Dara} \quad (6.2)$$



Şekil 6.1. Kurutma kaybı için vezin kapları

6.2.2.5. Termogravimetriği (TGA) Analizi

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan (Çimçim Karides) numunelerinin termal ayrışma davranışları azot atmosferinde, 25°C'den 700°C'ye ısıtılarak NETZSCH STA 449F3 cihazı ile incelenmiştir. Yaklaşık 10-13 mg arasında numune kullanılarak 20/10 K/dk ısıtma hızında TG ve DTG eğrileri elde edilmiştir. Bu analiz Gebze Teknik Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi.

6.2.2.6. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Ticari Kitosan (Karides Kabuğu) ve Sentez Kitosan (Çimçim Karides) örneklerinin X-ışını kırınım spektrumları, 3° ila 80° tarama açısı ile 40 kV, 40 mA ve 2θ'da ölçülmüştür. Bu analiz Gebze Teknik Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi.

6.2.2.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği 250-500-1000-2000-4000-8000-15000 ve 30000 defa büyütülerek Ticari Kitosan ve Sentez Kitosanın (Çimçim Karides) yüzey morfolojisini araştırmak için kullanıldı. Bu analiz FEİ-QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskobunda Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Şekil 6.1'de analizin yapıldığı cihaz görülmektedir.



Şekil 6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (NABİLTEM, 2022)

6.2.2.8. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (SEM-EDX) Analizi

SEM-EDX; ESEM ile yapılan bir kimyasal mikro analiz tekniği olmakla birlikte Enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi olarak kullanılmaktadır. EDX tekniği; nano veya mikro ölçekte analiz edilen numunenin hacminin elementel bileşiminin karakterizasyonunu yapabilmek için elektron ışınları tarafından bombardıman sırasında numuneden yayılan X-ışınlarını kullanarak analiz eder.

Bir ESEM'de, bir numunenin yüzeyi boyunca bir elektron ışını taranır ve yol boyunca atomlardan X-ışınları floresansı üretilir. X-ışını fotonlarının enerjisi, onları üreten elementin karakteristiğidir. EDX X-ışını dedektörleri, yayılan X-ışınlarının sayısını ve enerjilerini ölçer. Elektron demetinin uyardığı alanın yaydığı X ışınlarının enerjisi belirlenerek numunedeki elementler belirlenebilir. Bu çalışma yöntemine nitel analiz denir, çünkü yalnızca numunedeki öğelerin türlerini belirler. Bu karakteristik X-ışınlarının tespit oranı, mevcut elementlerin miktarını ölçmek için de kullanılabilir. Bu moda kantitatif analiz denir. Elektron ışını numunenin alanını tararken, EDX sistemi ayrıca numune içindeki elementlerin uzamsal varyasyonlarını gösteren bir X-ışını haritası elde edebilir. EDX sistemi, moleküler yapı hakkında değil, yalnızca numunede bulunan kimyasal elementler hakkında bilgi sağlar. EDX'in tipik uygulama alanları, malzeme analizi, kalite kontrol, hasar analizi ve adli tıptır (Colpan, Nalbant & Ercelik, 2018; Tangül, 2019). Bu analiz FEİ-QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskobunda Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

6.2.2.9. Antimikrobiyal Aktivite

Kitosanların antimikrobiyal aktiviteleri, farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri kullanılarak, 6 mikroorganizmaya ve 1 maya mantarına karşı belirlenmiştir. Bakteri olarak; (Gram (-) *E. coli* ATCC 25922, Gram (+) *S. aureus* ATCC 25923, Gram (+) *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. typhi* ATCC 14028 ve *Candida albicans* ATCC 10231 maya mantarı olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite mikrobroth distülüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antibiyotik kontrolü olarak bakteri kültürlerinde Ampisilin ve Gentamisin, maya kültüründe ise Amphotericin B kullanılmıştır. Kitosan çözeltilerinin hazırlanmasında, distile su, %1'lik asetik asit karışımı kullanılmıştır. Her bir plakaya bakteri ve maya kültürleri aşılanarak, 24 ve 48 saat süre ile 37 ºC'de inkübe edilmiştir. Analiz, Trakya Üniversitesi TÜTAGEM Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

6.2.2.10. Kitosanlar ile Kaplanmış Kumaşların Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

Kitosan numunelerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve aynı kitosanlarla kaplanmış tekstil malzemelerinde antibakteriyel etki testleri yapılarak, kitosanların, antibakteriyel ajan olarak işlevsellikleri ortaya konmuştur. Kitosan ile bitim işlemi görmüş kumaş numunelerinin (Gram (+) insan patojeni bakteri *S.aureus* ATCC 6538'e karşı antibakteriyel etkinliği nitelik ve nicelik olarak AATCC 100 test metotlarıyla incelenmiştir.

6.2.2.10.1. AATCC 100 Metodu (Tekstil Malzemelerinin Antibakteriyel Aktivite)

Bu metod, bakterisidal etkiyi tespit etmek için kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Tekstil malzemeleri üzerindeki antibakteriyel kaplamaların antibakteriyel aktivite derecesini değerlendirmek için kullanılır. Bu test metodunda kullanılan kumaş numuneleri çapı 48 mm olacak şekilde dairesel olarak hazırlanmıştır. Kumaş örnekleri deneyden önce 121^{o}C sıcaklık ve 1.5 atm basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. İşlem görmemiş kontrol numunesi ile birlikte çalışılmıştır. Ekim yapılan numuneler 37^{o}C de 24 saat bekletilmiştir. Vida kapaklı tüpler içinde gerçekleştirilen bu çalışmada 0 saat ve 24 saatlik temas süresi ile çalışılmıştır. Temas süresi sonunda tüpten çıkarılan kumaş numunesi Müller-Hintton sıvı besiyerine içine konarak vorteks ile karıştırıldı. Böylece, kumaş örneklerinin yüzeyine kolonize olmuş bakterilerin sıvı besiyerine geçişi sağlandı.

İçindeki bakterileri sayabilmek için besiyeri uygun dilusyonlarda seyreltilerek katı besiyerine ekim yapıldı. *S.aureus* ile ekim yapılan petriler 37^{o}C de 24 saat inkübe edildi. Üreyen bakteri kolonilerinin sayısı sayısı dilüsyon oranıyla çarpılarak üreme miktarı tespit edilmiştir. Test örneklerinin temas süreleri 0 ve 24 saat olarak değerlendirilmiştir. Örneklerdeki bakteri sayısı hesaplanmış ve bakteri azalma % değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

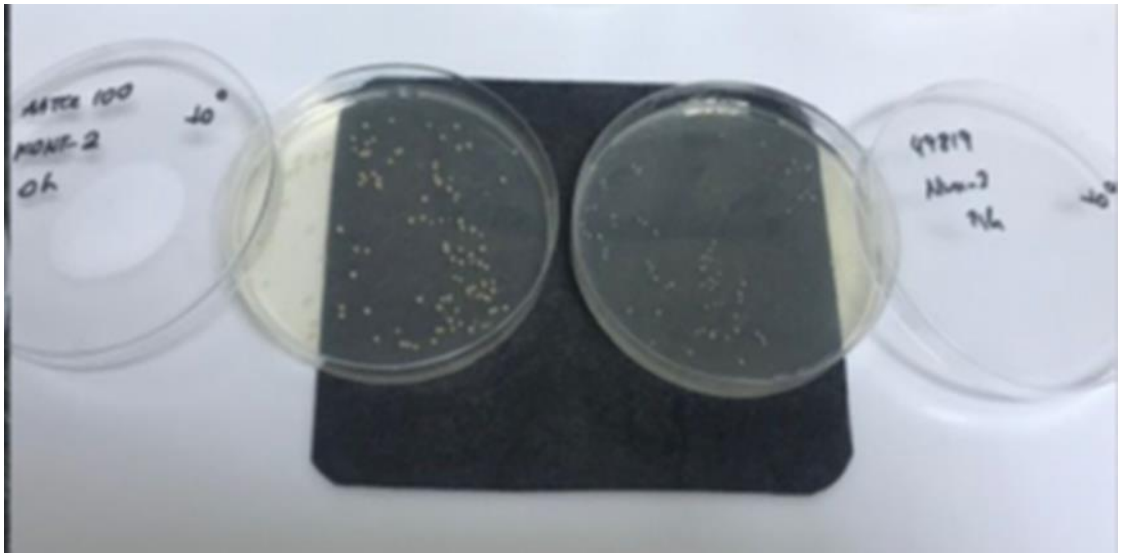
(R%=((B-A)/B)x100) 4)

% R =% azalma

A: İstenen temas süresi (24 saat) sonundaki bakteri sayısıdır.

B: "0" temas zamanındaki (başlangıçtaki) bakteri sayısıdır.

Kitosan kaplanmış Beyaz patiska kumaş numunelerinin AATCC 100 Metodu ile *S.Aureus* karşı antibakteriyel etkinini belirlenmesi için bakteri sayımı görülmektedir.



Şekil 6.3. AATCC 100 Metodu İle Bakteri Sayımı

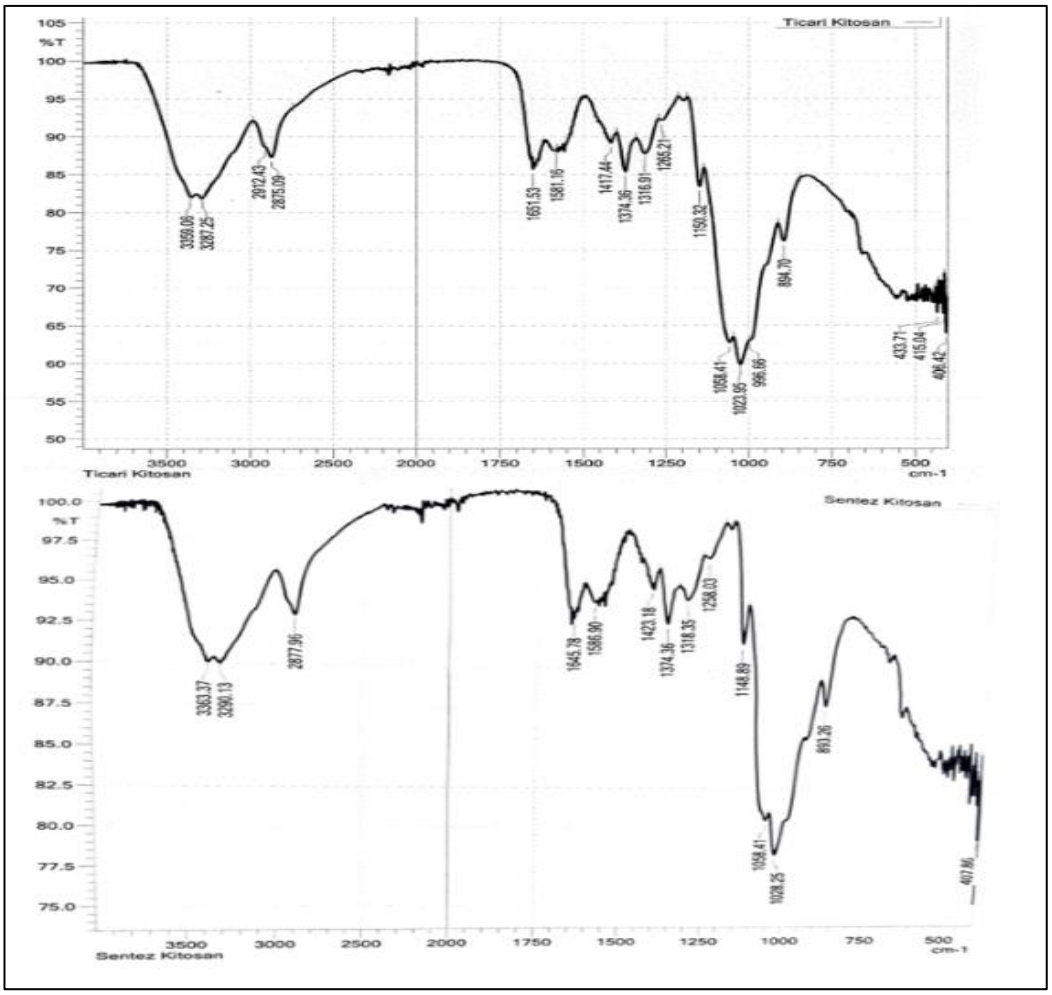
BÖLÜM 7

SONUÇLAR

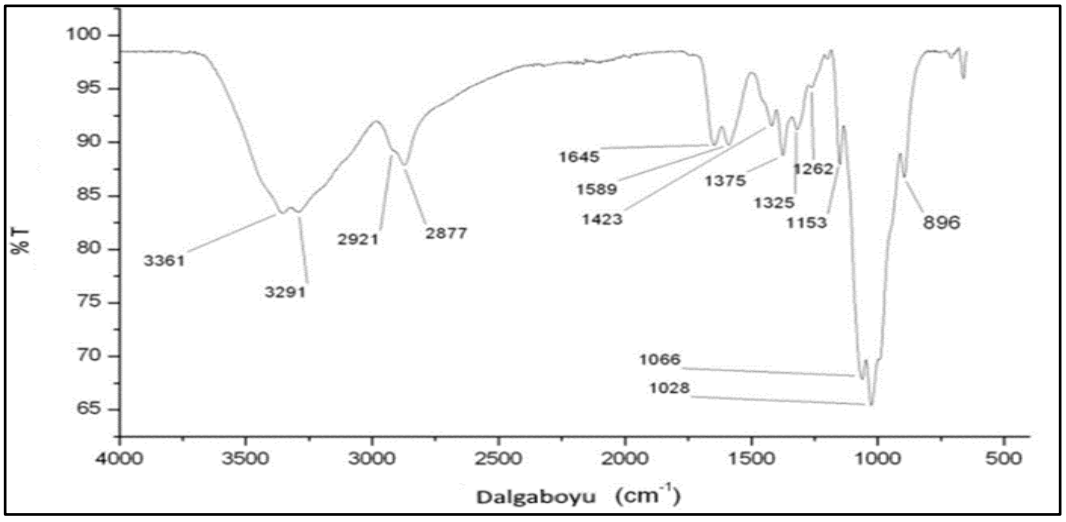
7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi

Kitosanda yer alan fonksiyonel grupları belirleyebilmek ve inceleyebilmek için FTIR analizi yapıldı. Şekil 7.1'de Ticari ve Sentez Kitosan için FTIR analiz sonuçları yer almaktadır.

FTIR analiz sonuçlarına göre; 3287–3359 cm^{-1} bölgesinde güçlü bir gerilme bandı yer almaktadır. Molekül içi bulunan hidrojen bağlarının beraberinde N-H ve O-H gerilmesine karşılık gelmektedir. C-H bağları 2912 ve 2875 cm^{-1} civarındaki bantlarda gerilme vermiştir. Bu gerilme bantları, polisakkaridin karakteristik özellikleri olarak görülmektedir ve ksilan, glukanlar ve karagenanlar gibi diğer polisakkarit spektrumlarında da bu bantlara rastlanmıştır (Melo-Silveira vd., 2011).



Şekil 7.1. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için FTIR Spektrumu



Şekil 7.2. Literatürde Bulunan Kitosan için FTIR Spektrumu

Artık N-asetil gruplarının varlığı, sırasıyla 1652 cm^{-1} (amid I'in C=O gerilmesi) ve 1317 cm^{-1} (amid III'ün C-N gerilmesi) civarındaki bantlarda olduğu incelenmiştir. Bu, tipik N-asetil gruplarının üçüncü bant özelliğidir ve diğer bantlarla örtüştüğü mümkün olmaktadır (Fernandes Queiroz, Melo, Sabry, Sassaki & Rocha, 2014). 1582 cm^{-1}'de yer alan bant, birincil aminin N-H bükülmesine karşılık gelmektedir (Lim & Hudson, 2004). CH3 simetrik deformasyonları ve CH2 bükülmesi, sırasıyla 1374 ve 1417 cm^{-1} civarında bantların varlığıyla doğrulandı. 1150 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı, C-O-C köprüsünün asimetrik gerilmesine bağlanabilir. 1058 ve 1024 cm^{-1}'deki bantlar C-O esnemesine karşılık gelmektedir. Bu karakteristik yapılar kitosanın yapısında olup maddelerin kitosan olduğu kanıtlamıştır. Ayrica ticari kitosan ve sentez kitosan hemen hemen aynı FTIR kromatogramı vermiştir (Fernandes Queiroz, 2014).

Literatürde yer alan Şekil 7.3‘te verilen kitosan FTIR sonuçları ile Sentez Kitosan ve Ticari Kitosanın kromatogram sonuçlarının benzer olduğu görülmektedir (Fernandes Queiroz, 2014).

7.2. Deasetilasyon Derecesi

Sentez ve Ticari Kitosan için FTIR spektrumundan faydalanılarak deasetilasyon derecesi hesaplanmıştır. Ticari Kitosan için deasetilasyon derecesi % 68, Sentez Kitosan için deasetilasyon derecesi % 59 olarak saptanmıştır.

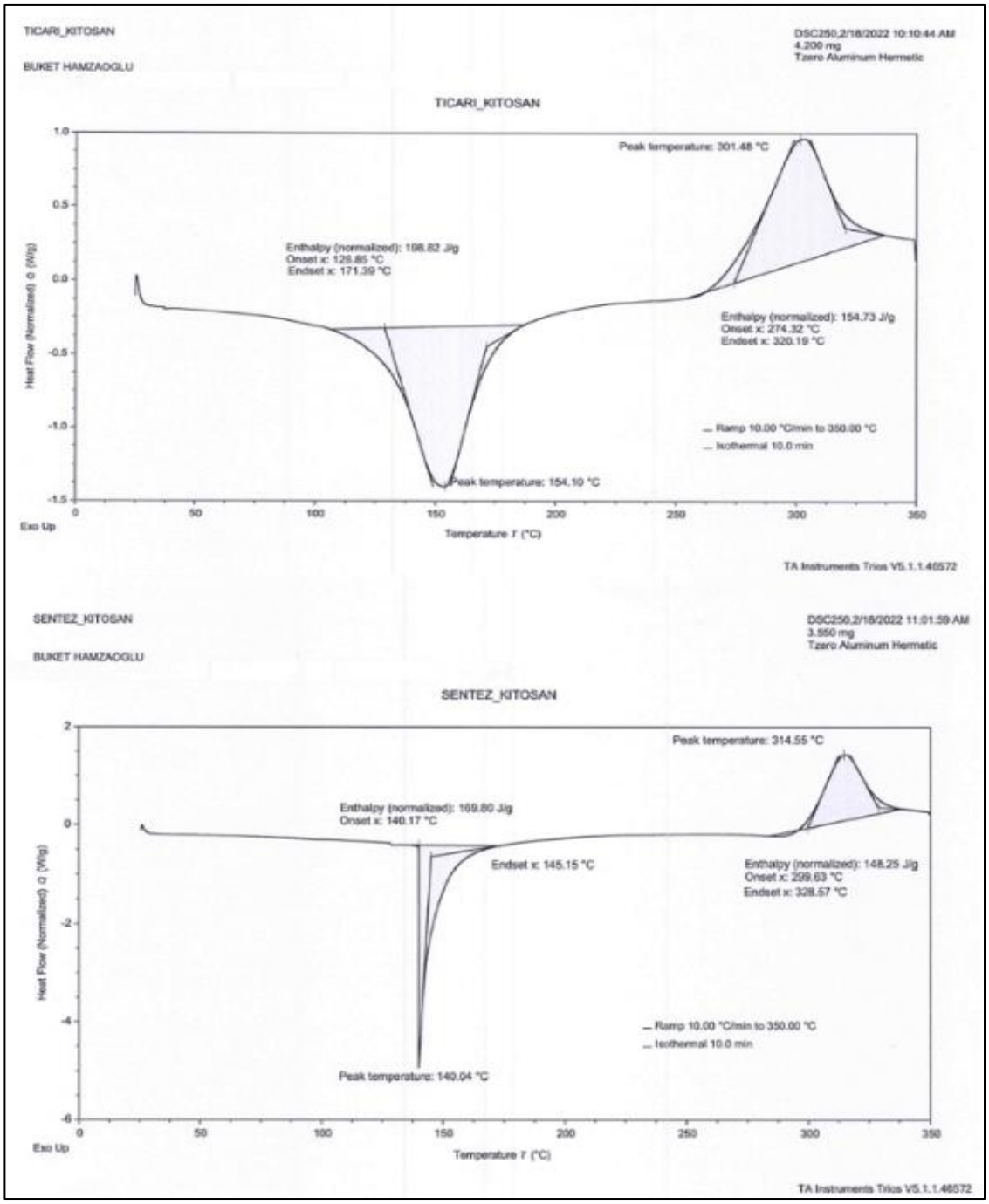
7.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Kitosanın camsı geçiş sıcaklığı, kitosan eldesinde kullanılan yönteme, elde edildiği kaynağa ve analiz yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Kitosanın molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi ve kristalinite derecesi gibi özellikleri camsı geçiş sıcaklık değerini değiştirmektedir (Zhou, Ma, Shi, Yang & Nie, 2011). Deasetilasyon derecesi arttıkça camsı geçiş sıcaklığı değerinin de arttığı bulunmuştur (Bhat, Bhat, Khalil, Mishra, Datt & Banthia, 2010).

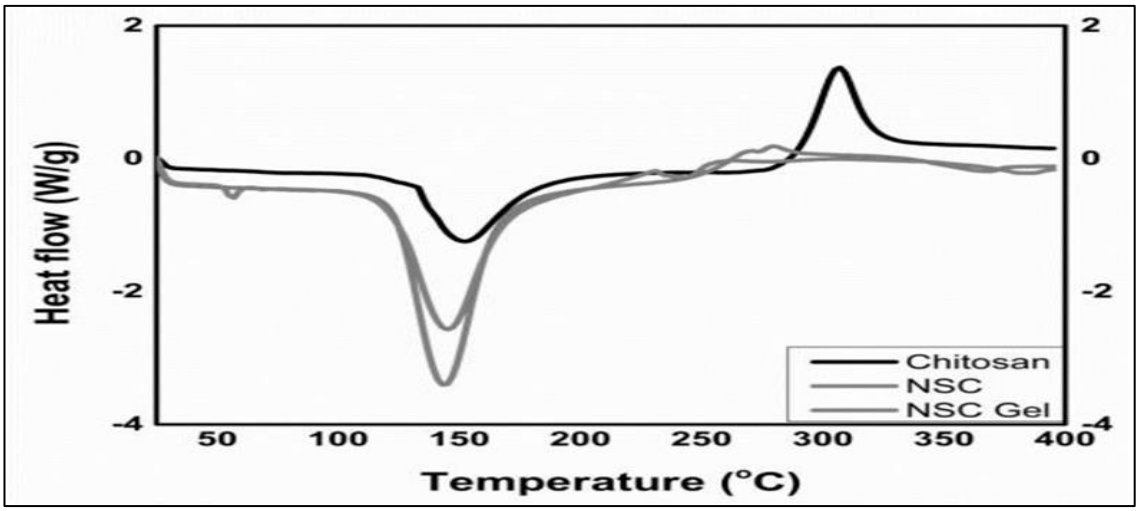
Kullanılan Ticari kitosan ve sentez Kitosan numunelerinin ısı kapasitesi değişimi nedeniyle camsı geçişi (Tg), kristalizasyonu ve erimesi olmak üzere toplam 3 faz değişimlerinin belirlenmesi için DSC analizi yapılmıştır.Şekil 7.3’te DSC analiz sonuçları verilmiştir.

DSC analiz sonuçlarında; karides kaynaklı kitosanların termogramında hem ekzotermik hem de endotermik pikler gözlemlendi. Ticari kitosanı için 154°C’de, Sentez

Kitosan için 140°C gözlemlenen endotermik pik, numunelerin yapısında bulunan suyun uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, Ticari Kitosan için 301°C'de ve Sentez Kitosan için 315°C'deki gözlemlenen ekzotermik tepe, numunedeki amin gruplarının ayrışması olarak kabul edilir (Şekil 7.3).



Şekil 7.3. Ticari Kitosan ve Sentez İçin DSC Analiz Sonucu



Şekil 7.4. Kitosan İçin DSC Analiz Sonucu (Bashir, 2019)

Literatürde Shadid Bashir, Yin Yin Teo, S. Ramesh, K. Ramesh ve Muhammad Rizwan tarafından 2019 yılında yapılan çalışmalarda Kitosan için DSC analiz sonuçlarında endotermik eğri 152°C'de ve ekzotermik eğri ise 300°C'de verilmektedir. Şekil 7.4'te literatürde yer alan kitosan için DSC analiz sonucuna yer verilmiştir(Bashir vd., 2019). Bu bilgilere göre bu çalışmada kullanılan Sentez Kitosan ve Ticari Kitosanın literatürde verilen Kitosan DSC eğrilerine benzer faz ayrışmaları verdiği görülmektedir. Bu da kullanılan ticari ve sentez maddelerin kitosan olduğunu desteklemektedir. Kullanım alanı geniş olan ve çok fazla çeşidi bulunan Kitosan malzemelerin birbirlerinden ayrılması ve maruz kaldıkları ısı etkisi karşısındaki davranışlarının önceden bilinebilmesi için DSC ölçümünün önemli olduğu düşünülmektedir.

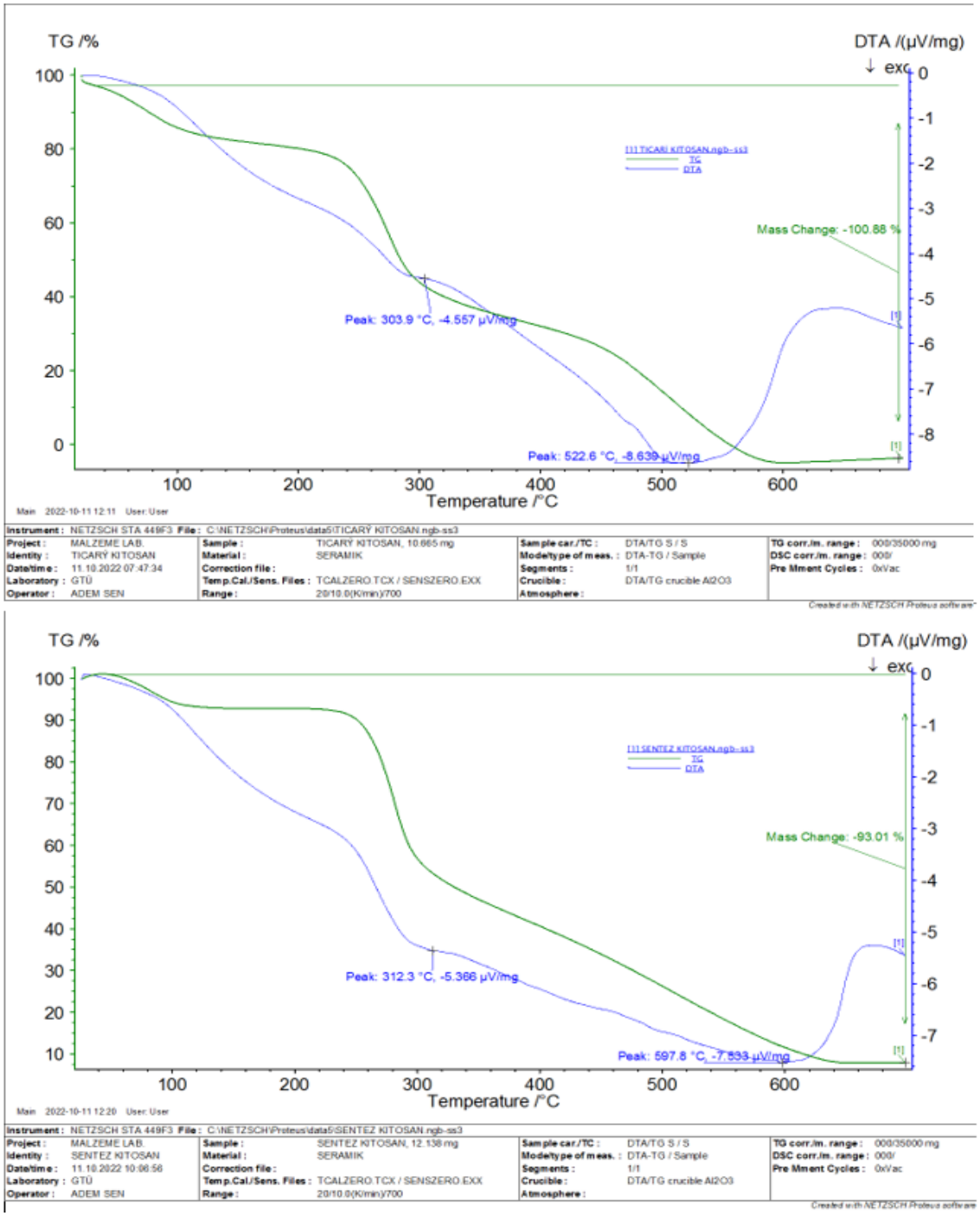
7.4. Kuru Madde Tayini

Elde edilen tartım verilerinden nem % si: Ticari Kitosan içinm%11.5, Sentez kitosanı için %11.1 olarak hesaplandı.

Bu tez için yapılan kuru madde tayini çalışmasında etüv kurutma sıcaklığı 105°C olarak belirlenmiştir. Abdullah TAV tarafından 2019 yılında yapılan çalışmalarda etüv kurutma sıcaklığının 65°C olarak kullanıldığı gözlemlenmiştir. Fakat gerek malzemenin termal özellikleri gerekse kuru madde tayini standartları göz önünde bulundurularak çalışmanın 105°C'de yapılmasının daha uygun olduğuna kanaat getirilmiştir. Bu çalışma ile arasında %5 fark olduğu görülmektedir. Buna sebep olarak kurutma sıcaklığı değişikliğinin sebep olduğu düşünülmektedir (Tav, 2019).

7.5. Termogravimetri (TGA) Analizi

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan karakterizasyonu için TGA analizi yapılmıştır. Şekil 7.5'te Ticari Kitosan için ve Sentez Kitosan için TGA Kromatogramları yer almaktadır.



Şekil 7.5. Ticari Kitosana ait TGA Kromatogramı (üstte) ve Sentez Kitosana ait TGA Kromatogramı (altta)

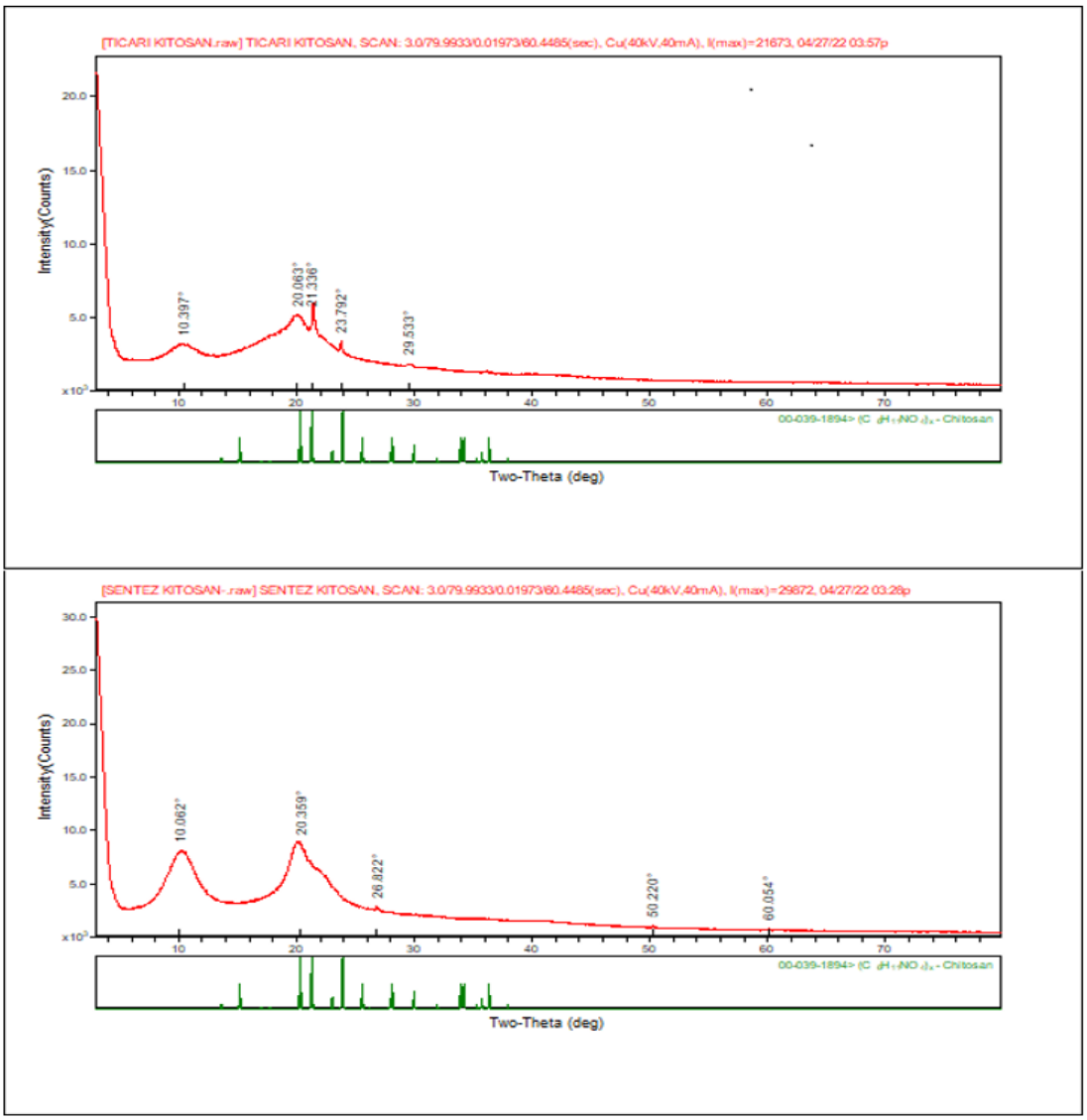
Ticari Kitosan için elde edilen verilerde yaklaşıl 110°C'ye kadar ilk kütle kaybı yaşanmıştır. Kütle kaybı yaklaşık %15 olup ikinci kütle kaybı ise yaklaşık %35'lik kayıp ile 240°C ile 320°C arasında görülmektedir. Üçüncü kütle kaybı %30'luk bir kayıp ile 460°C-600°C arasında gerçekleşmektedir. İlk kütle kaybı olan %15'lik kaybın suyun buharlaşmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. 240°C-320°C sıcaklıklar arasında oluşan bozunmanın deasetillenmiş moleküllerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ticari kitosanda, çoklu bozunum basamaklarının olduğu, ancak ara ürünlerin stabil olmadığı şekil 7.5'te görülmektedir.

Sentez Kitosan için elde edilen verilerde 120°C'ye kadar ilk kütle kaybı yaşanmıştır. Kütle kaybı yaklaşık %8 olup ikinci kütle kaybı ise yaklaşık %40'lık kayıp ile 250°C ile 320°C arasında görülmektedir. Üçüncü kütle kaybı ise lineer bir azalma olarak devam etmektedir. Üçüncü kütle kaybını 320°C ile 620°C arasında yaklaşık %50'lik bir azalma olduğu verilerden elde edilmektedir. İlk kütle kaybı olan %8'lik kaybın suyun buharlaşmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. 250°C-320°C sıcaklıklar arasındaki bozunmanın deasetillenmiş moleküllerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. TGA analiz verilerinde, ara bozunum ürünlerinin belli sıcaklık aralıklarında stabil olduğu tespit edilmiştir. Sentez Kitosan numunesinin, ticari kitosana göre daha kararlı TG eğrisi gösterdiği şekil 7.5 te görülmektedir.

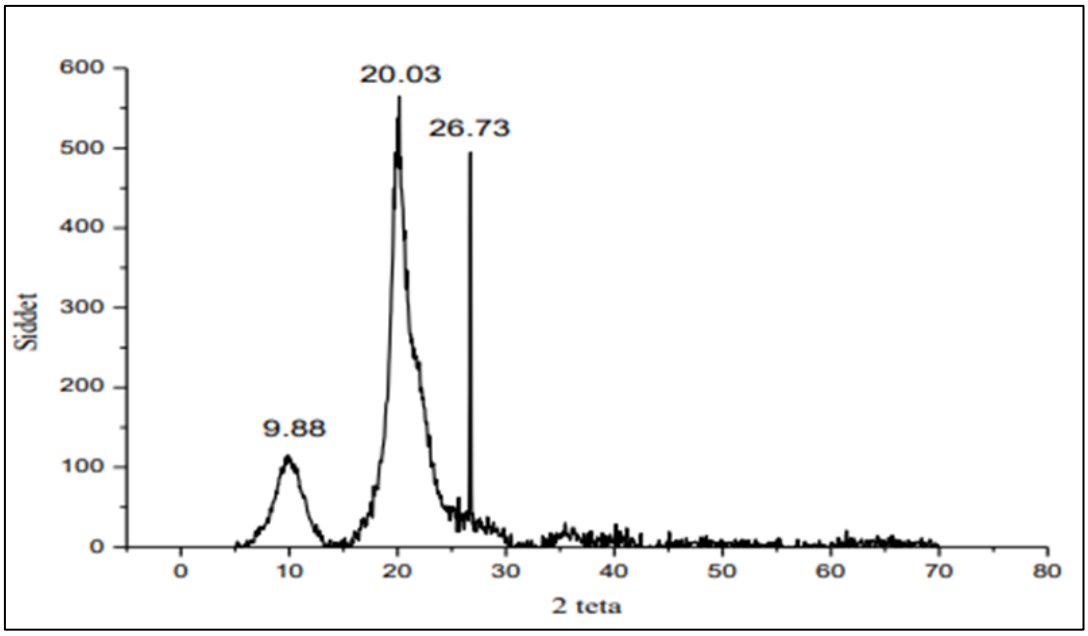
7.6. X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosana ait toz haline getirilen örneklerin kristal yapılarını inceleyebilmek için XRD analizi yapılmıştır. Elde edilen kırınım desenleri XRD spektrumu ile verilmiştir.

Şekil 7.6'da verilen Ticari Kitosana ait XRD analiz sonucu grafiğinde kitosanın 2θ karakteristik yansıma pikleri 10.397º, 20,063º, 21,336º ve 23.792°'de görülmektedir. Bu analiz sonucunda yer alan pikler kitosanın amorf bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Yine Şekil 7.6'da verilen Sentez Kitosana ait XRD analiz sonucu grafiğinde kitosanın 2θ karakteristik yansıma pikleri 10.062º, 20,359º ve 26,822°'de görülmektedir. Bu analiz sonucunda yer alan pikler kitosanın amorf bir yapıya sahip olduğunu kanıtlamaktadır.



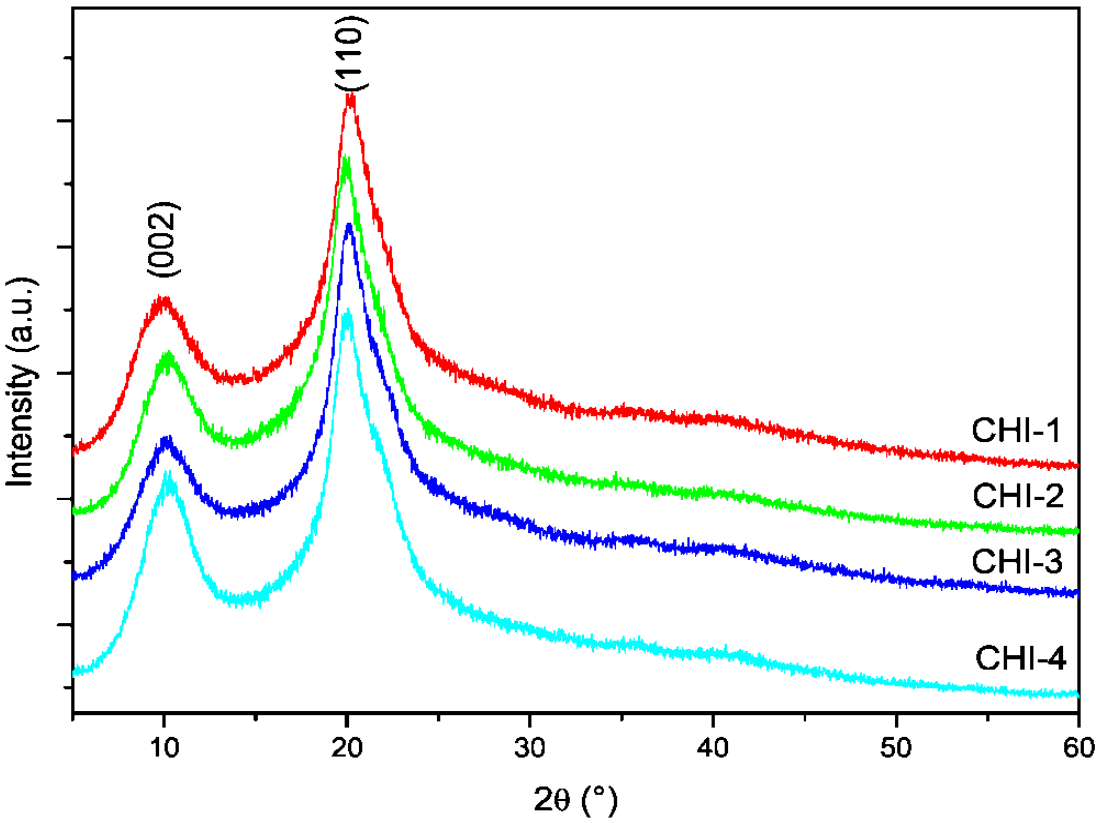
Şekil 7.6. Ticari Kitosana ve Sentez Kitosana Ait XRD Analiz Sonuç Grafiği



Şekil 7.7. Kitosan için XRD Spektrumu

Literatürde yer alan bilgilere göre Onur Kabadayı tarafından 2018 yılında yapılan çalışmalarda kitosan için benzer bir XRD analiz sonucu görülmektedir. Şekil 7.7'de bu çalışma ile ilgili XRD spektrumu yer almaktadır. Bu bilgilere göre ise Kitosan için 2θ karakteristik yansıma pikleri 9,88º, 20,03º, 26,73º verilmiştir.

Literatürde yer alan bir değer XRD analizinde ise Kitosanın karakteristik pikleri 10 ve 20 derecede ortalanmıştır. Şekil 7.8'de yer alan numuneler XRD spektrumunda 2θ sırasıyla kristalografik düzlemlere (002) ve (101) karşılık gelen kırınım grafiklerinde görülmektedir (de Queiroz Antonino vd., 2017).



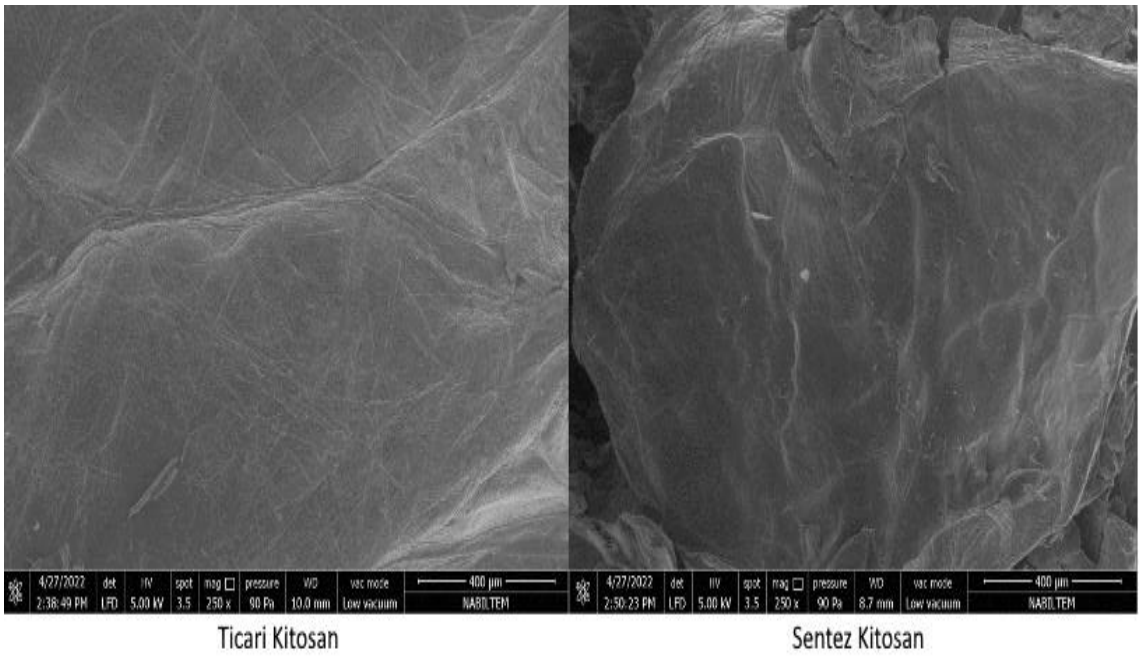
Şekil 7.7. Farklı koşullarda hazırlanan Kitosan için XRD Spektrumu (de Queiroz Antonino, 2017)

7.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

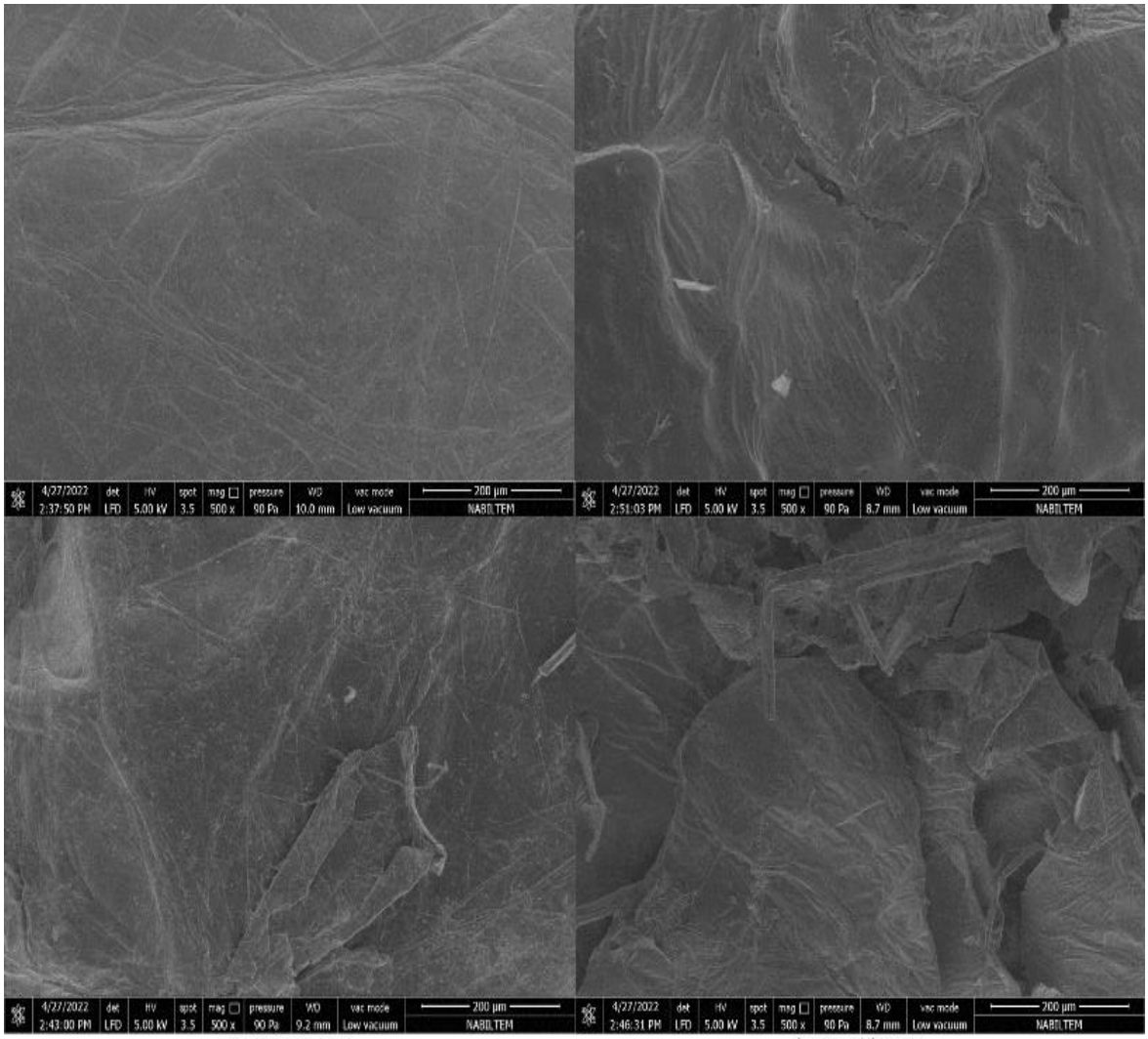
Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 8 farklı boyutta yaklaştırma yapılarak yüzey morfolojileri incelenmiştir. Şekil 7.9-7- 7.16'da sırasıyla 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 15000 ve 30000 kez yakınlaştırma yapılıp ve sırasıyla 400 µm, 200 µm, 100 µm, 50 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm ve 3 µm boyutlarında SEM görüntüleri alındı. SEM görüntülerinden elde edilen bilgilere göre Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için düzensiz bir dağılım sergileyen nanoliflerden oluştuğu görülmektedir. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosanın ağsı bir yapıda olduğu görüntülerden elde edilebilmektedir. Kitinin kullanılacağı alan yüzey morfolojisine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Kitinde gözenekli bir yapı bulunması, kitinin doku mühendisliği açısından yararlı bir ajan olduğu anlamına gelmektedir (Kaya, Erdogan, Mol & Baran, 2015b).

Tez çalışmasında kullanılan Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için yapılan SEM analizlerinde gözenekli bir yapının aksine, nanolif yapı olduğu görülmektedir.

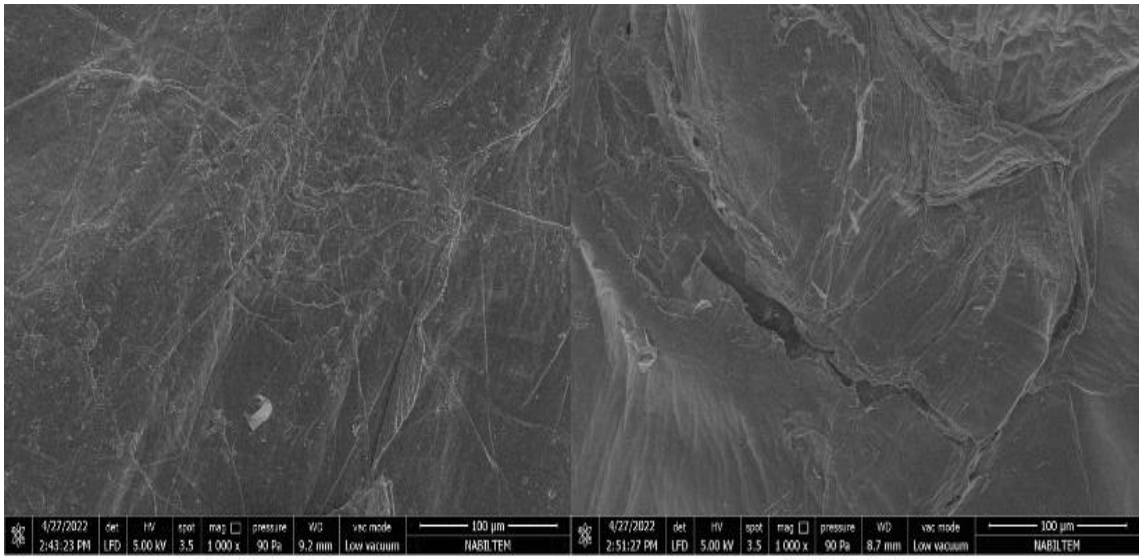
Literatürde yer alan bilgilere göre; Synowiecki ve Al-Khateeb (2003) tarafından yapılan çalışmalarda kitin yüzeyinde yer alan gözeneklerin sayısı kitinin metal iyonlarını absorbe etme yeteneğinde bir artışa sebep olduğunu, lifli yapıya sahip kitinlerin ise tekstillerde kullanılabileceği belirtilmektedir (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003b).



Şekil 7.8. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 250x Yaklaştırma-400 µm Boyutta SEM Görüntüsü

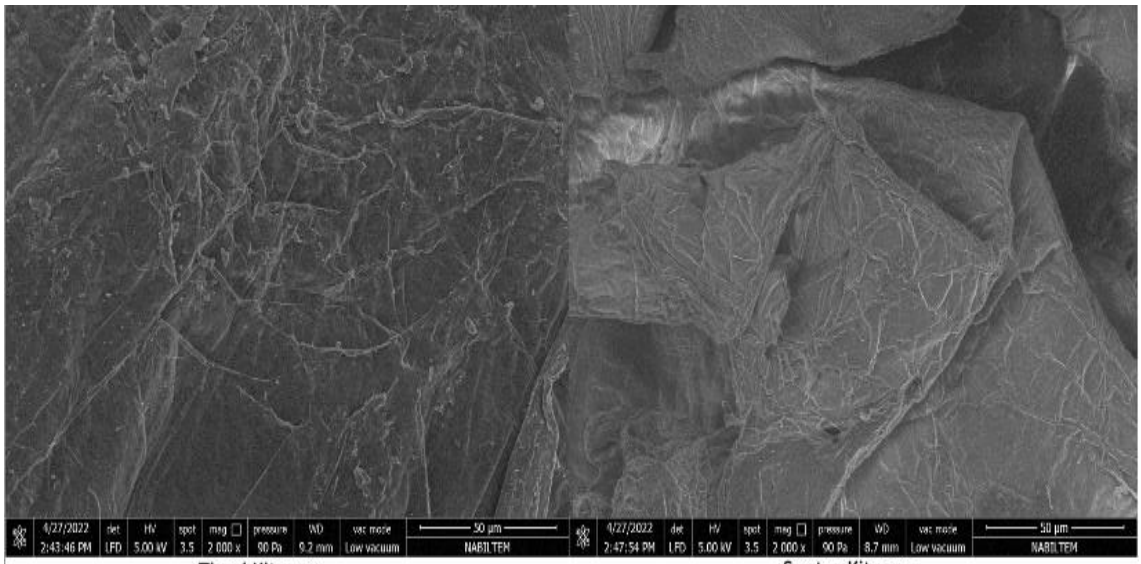


Şekil 7.9. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 500x Yaklaştırma-200 µm Boyutta SEM Görüntüleri



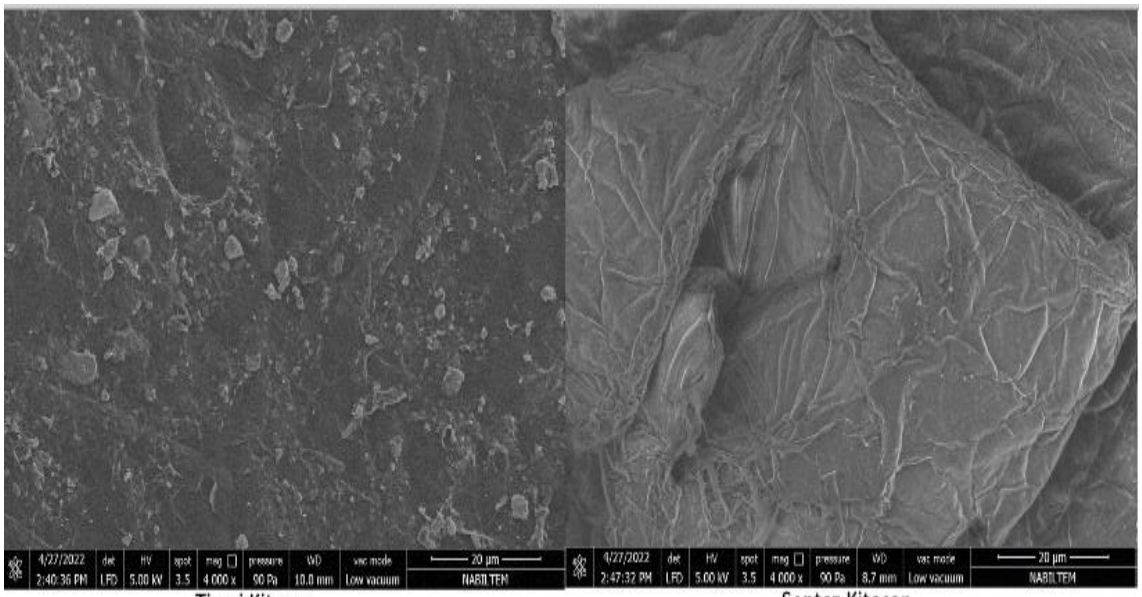
Ticari Kitosan Sentez Kitosan

Şekil 7.10. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 1000x Yaklaştırma-100 µm Boyutta SEM Görüntüleri

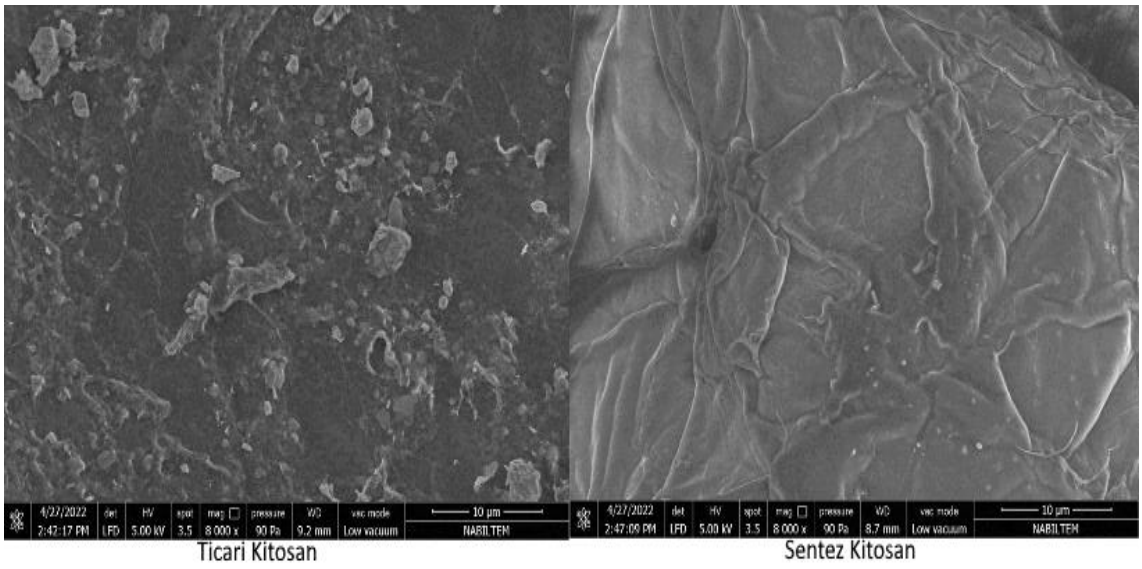


Ticari Kitosan Sentez Kitosan

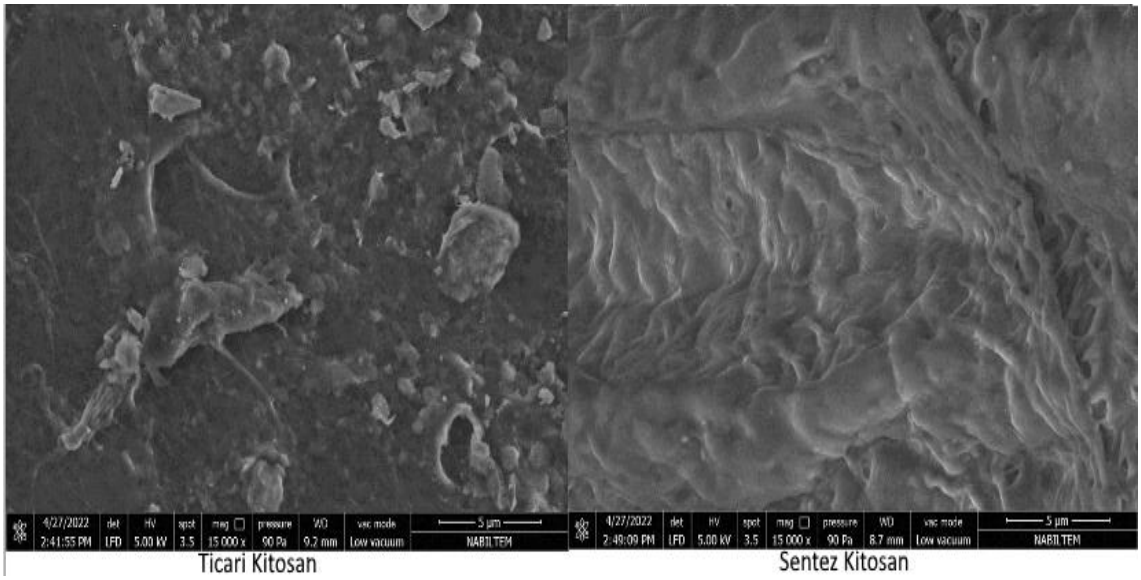
Şekil 7.11. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 2000x Yaklaştırma-50 µm Boyutta SEM Görüntüleri



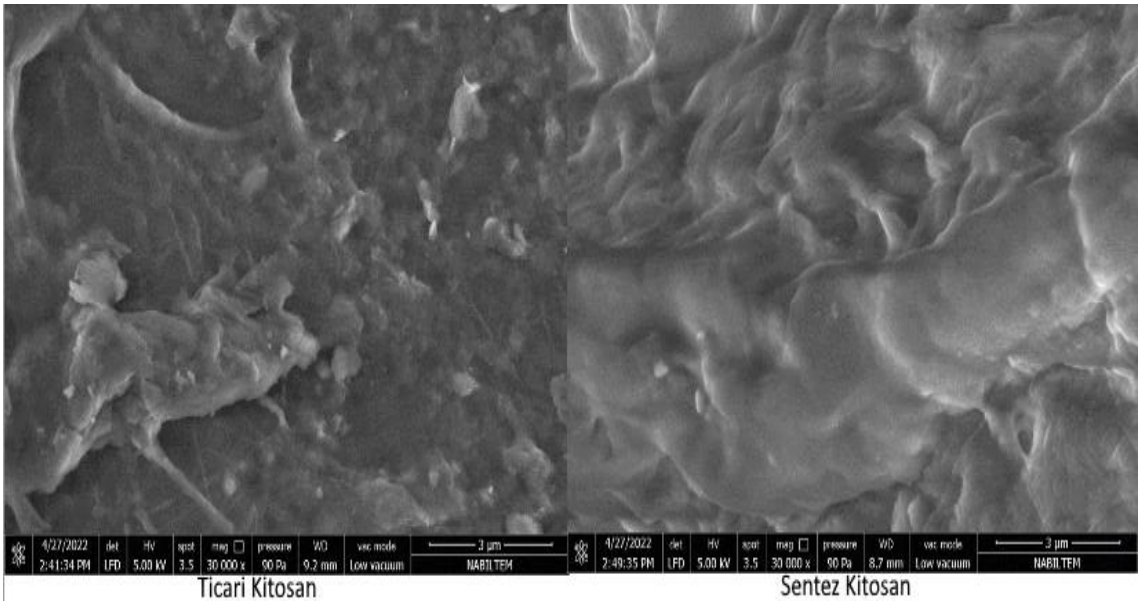
Şekil 7.12. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 4000x Yaklaştırma-20 µm Boyutta SEM Görüntüleri



Şekil 7.13. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 8000x Yaklaştırma-10 µm Boyutta SEM Görüntüleri



Şekil 7.14. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 15000x Yaklaştırma-5 µm Boyutta SEM Görüntüleri

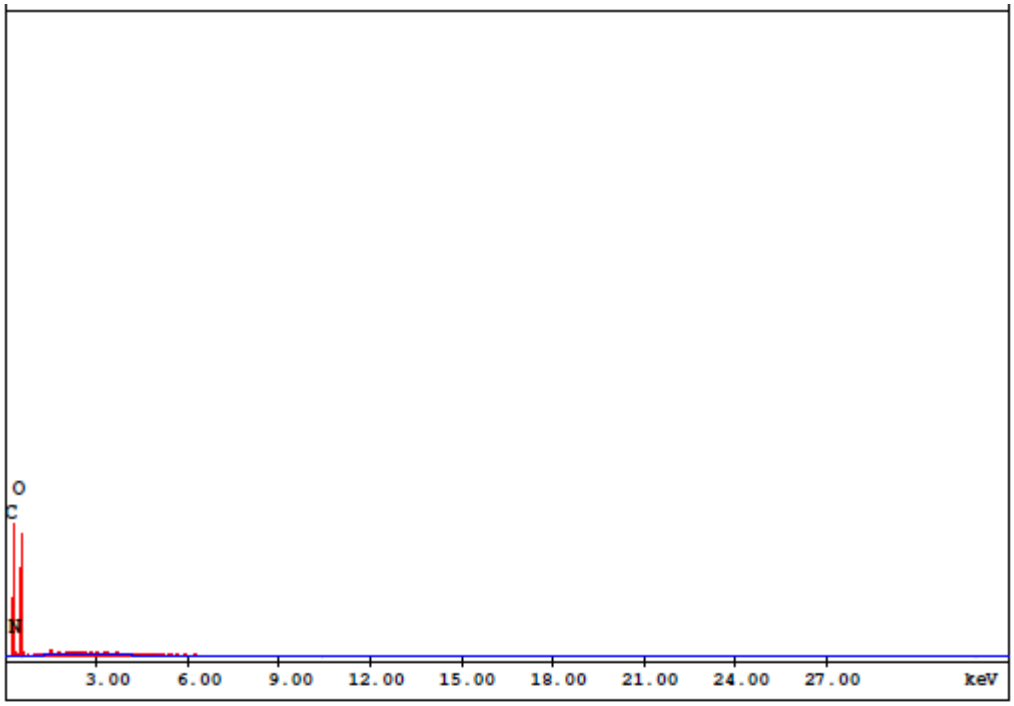


Şekil 7.15. Ticari Kitosan (Solda) ve Sentez Kitosana (Sağda) Ait 30000x Yaklaştırma-3 µm Boyutta SEM Görüntüleri

7.8. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (SEM-EDX) Analizi

EDX analizinde, Kitosan numunelerinin elemntel bileşimini belirlemek için yapılmıştır. Numunelerdeki 3 elementin Karbon (C), Azot (N) ve Oksijen (O) bulunduğu yüzdelik oranlarına göre karşılaştırma yapılmıştır. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için üçer defa yapılan SEM-EDX analizi yer almaktadır. Şekil 7.17'de Ticari Kitosana ait SEM-EDX analiz sonuçları yer almaktadır. SEM-EDX sonuçlarına göre Karbon (C) miktarı yaklaşık %44.61, Azot miktarı %2.00 ve Oksijen (O) miktarı %53.39 olarak bulunmuştur.

Şekil 7.18, Şekil 7.19 ve Şekil 7.20'de Sentez Kitosana ait SEM-EDX analiz sonuçları yer almaktadır. SEM-EDX sonuçlarına göre Karbon (C) miktarı yapılan analizler için ortalama yaklaşık %44.59, Azot miktarı %11.53 ve Oksijen (O) miktarı %43.88 olarak bulunmuştur.



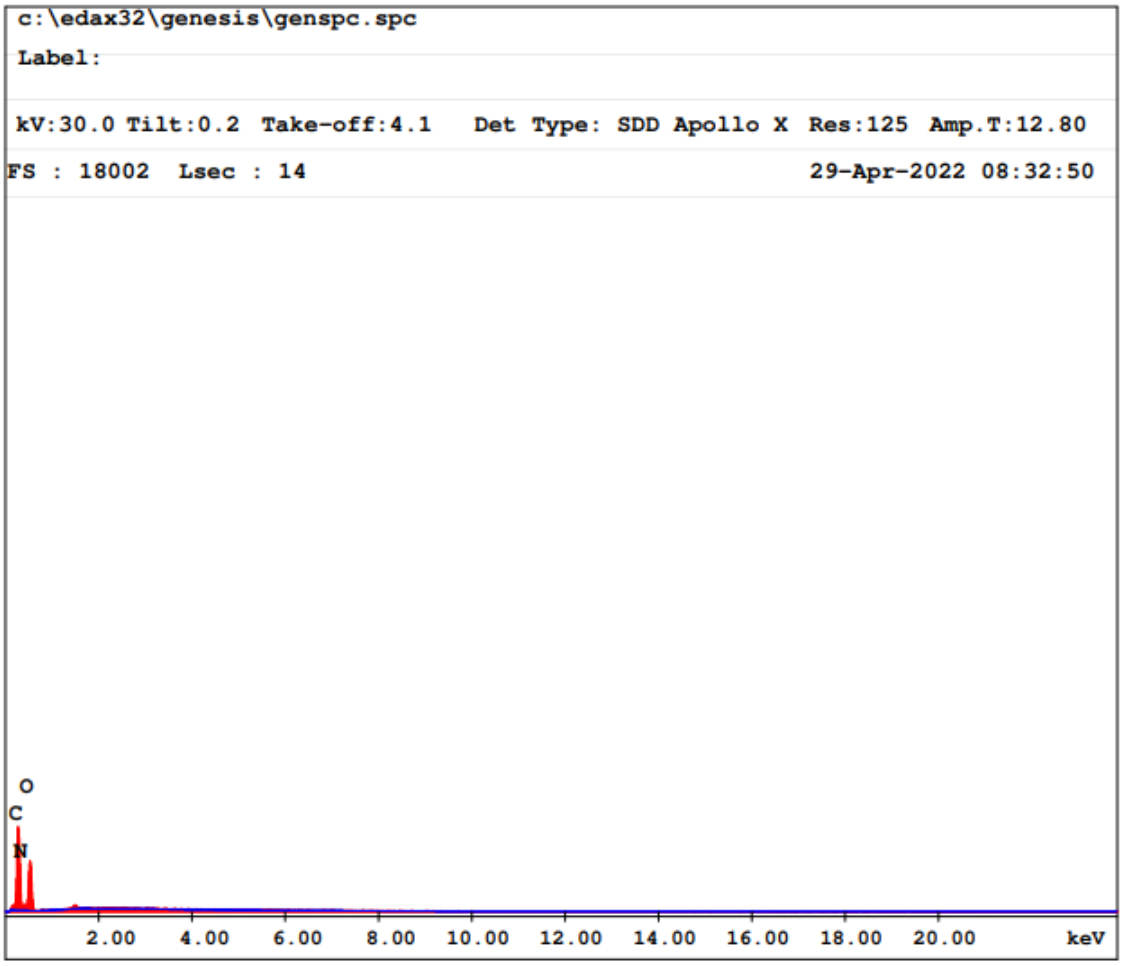
EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	44.61	51.63	0.2281	1.0076	0.5072	1.0004
N K	2.00	1.98	0.0026	1.0002	0.1307	1.0011
O K	53.39	46.39	0.1023	0.9935	0.1929	1.0000
Total	100.00	100.00				

Şekil 7.16. Ticari Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonucu

Çizelge 7.1. Ticari Kitosana ait SEM-EDX Analiz Sonucu

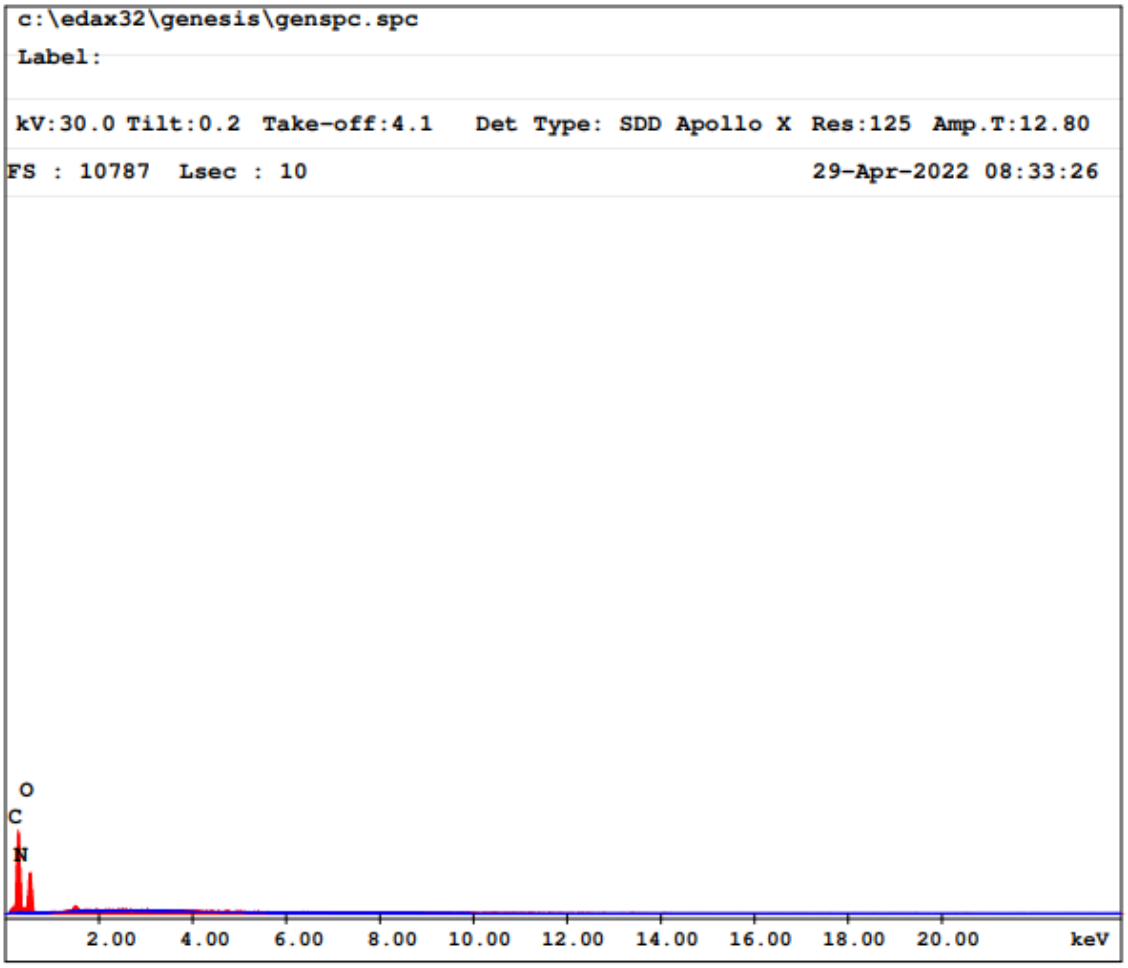
Element	Wt %	At %	K-Ratio	z	A	F
C	44.61	51.63	0.2281	1.0076	0.5072	1.0004
N	2.00	1.98	0.0026	1.0002	0.1307	1.0011
O	53.39	46.39	0.1023	0.9935	0.1929	1.0000
Toplam	100.0	100.0				



EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	43.53	49.96	0.2315	1.0072	0.5278	1.0004
N K	11.24	11.07	0.0151	0.9997	0.1343	1.0008
O K	45.23	38.97	0.0715	0.9931	0.1591	1.0000
Total	100.00	100.00				

Şekil 7.17. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-1

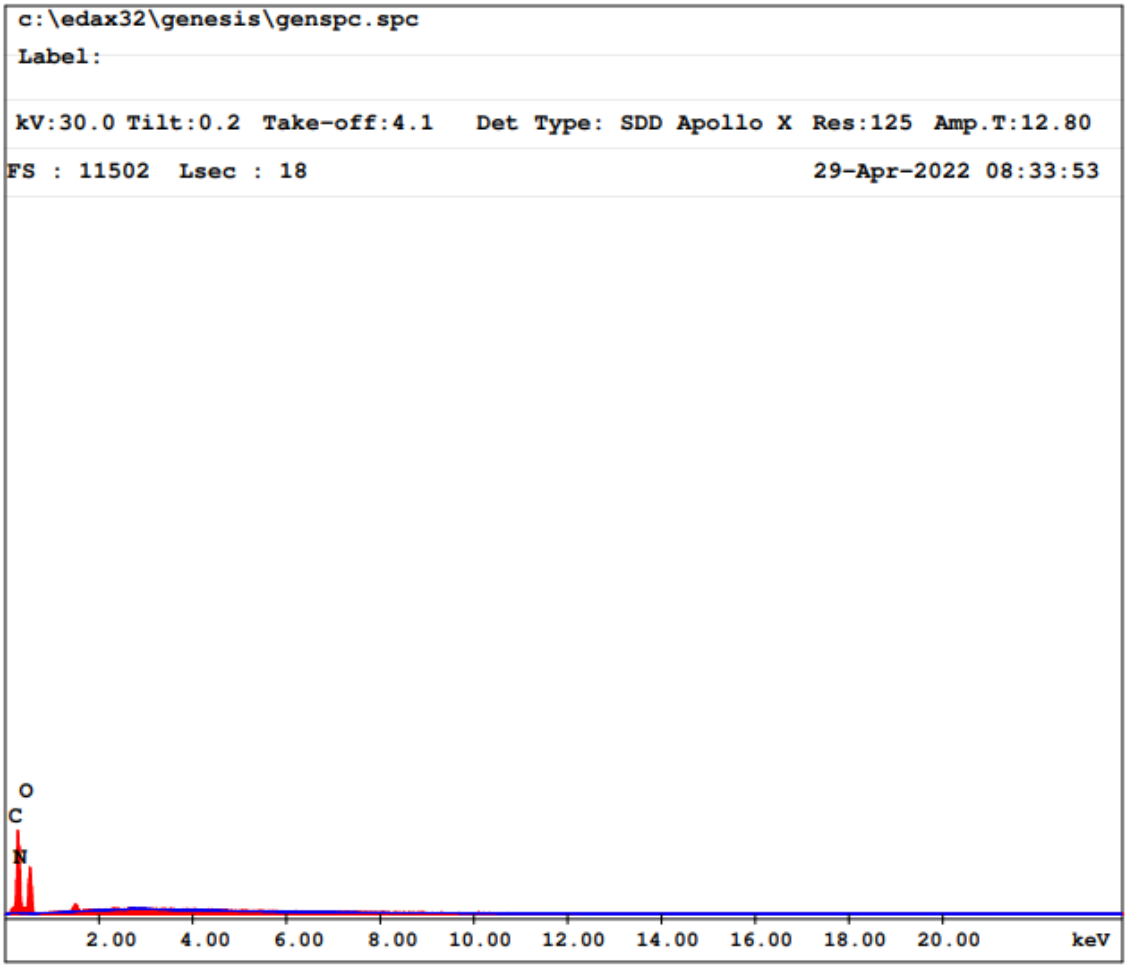


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	46.11	52.54	0.2513	1.0068	0.5411	1.0004
N K	11.28	11.02	0.0145	0.9994	0.1283	1.0007
O K	42.61	36.45	0.0649	0.9927	0.1534	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	456.74	7.04	1.50	64.90
N K	31.42	7.24	6.79	4.34
O K	316.48	7.14	1.81	44.35

Şekil 7.18. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-2



EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	44.13	50.52	0.2371	1.0070	0.5332	1.0004
N K	12.07	11.85	0.0160	0.9996	0.1329	1.0007
O K	43.80	37.64	0.0675	0.9929	0.1552	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	273.05	3.06	1.43	89.38
N K	22.09	3.27	5.66	6.75
O K	208.51	3.33	1.64	62.66

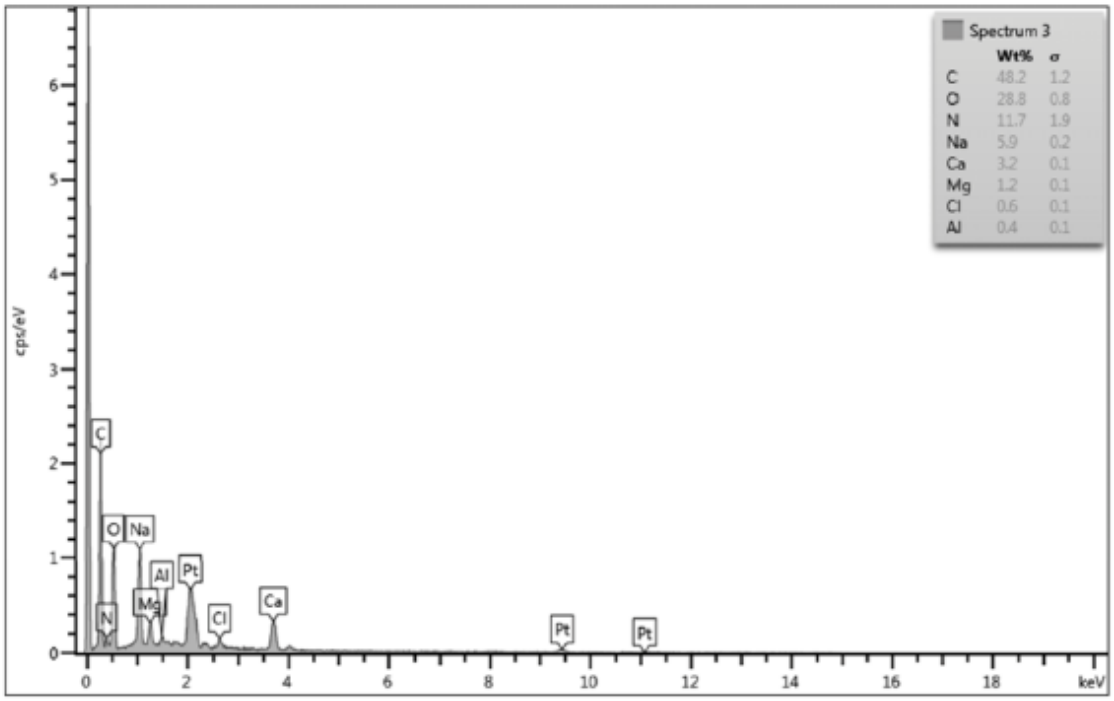
Şekil 7.19. Sentez Kitosana Ait SEM-EDX Analiz Sonuçları-3

Çizelge 7.2. Sentez Kitosana ait SEM-EDX Analiz Sonuçlarının Ortalaması

Element	Wt %	At %	K-Ratio	z	A	F
C	44.59	51.01	0.2400	1.0070	0.5340	1.0004
N	11.53	11.31	0.0152	0.9996	0.1318	1.0008
O	43.88	37.69	0.0680	0.9929	0.1559	1.0000
Toplam	100.0	100.0				

Literatürde 2021 yılında yapılan bir çalışmaya göre kitosanın element yüzdeleri SEM-EDX ile analizlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Karbon (C) %42.8, Oksijen (O) %, 40.8, Azot (N) %8.6, Sodyum (Na) % 4.2, Kalsiyum (Ca) %2.2, Magnezyum (Mg) %0.9 ve %0.5 Klor (CL) olarak verilmiştir. Analiz sonuç grafiği Şekil 7.21'de yer almaktadır (Abdullah Al Balushi, Devi, Rashid Khamis Al Gharibi, Adeeb, Al Hudaifi & Khalfan Al Shabibi, 2021b).

Bir diğer yapılan çalışma ise 2020 yılında Mohammed Eddya , Bouazza Tbib ve Khalil EL-Hami tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada farklı yollarla elde edilen kitosanın Karbon (C), Azot (N) ve Oksijen (O) yüzdeleri SEM-EDX ile analizlenip sonuçlar verilmiştir. Elde edilen verilerde; bu tez için yapılan çalışmaya benzer olarak Fluka Chemika şirketinden alınan kitosan sonuçları bu tezdeki Sentez Kitosana benzemektedir. Bu durumda diğer yollarla elde edilen kitosanlarda miktarlarında yüzdesel olarak farklılıklar gözükmektedir. Buna ek olarak kitosanın elde ediliş şekli değiştiğinde element yüzdelerinde de farklılık gözükebilmektedir (Eddya, Tbib & EL-Hami, 2020).



Şekil 7.20. Kitosanın SEM-EDX Element Bileşimi Analiz Sonucu (Abdullah Al Balushi, 2021c)

7.9. Antimikrobiyal Aktivite Analizi

Karides kitosanının *E.coli, Salmonella, S.aureus, Listeria* ve *Bacillus* bakterilerine ve *Candida* mayasına karşı antimikrobiyal aktivitesi CLSI standart metoduna göre mikrobrot dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 24 saat ve 48 saat olmak üzere ve 6 farklı konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite analizi yapıldı. Şekil 7.22'de 24. Saat sonuçları ve Şekil 7.23'te ise 48.saat sonuçları grafiği yer almaktadır. Ayrıca Çizelge 7.3 ve 7.5'te Ticari Kitosan için 24. ve 48. Saat CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği % Canlılık sonuçları yer almaktadır. Çizelge 7.4 ve 7.6'da da Sentez Kitosan için 24. ve 48. Saat CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği % Canlılık sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 7.3. Ticari Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği

% Canlılık	*E.coli*	*Salmonella*	*S.aureus*	*Listeria*	*Bacillus*	*Candida*
1000 µg/ml	12.8708	25.5581	105.3039	75.6491	23.9439	124.7010
500 µg/ml	43.9441	65.0341	111.0202	114.8640	53.4438	70.2431
250 µg/ml	39.4153	47.9930	72.3496	78.9061	42.8271	69.7759
125 µg/ml	77.2609	78.9694	50.5092	55.8073	70.0206	66.0215
62.5 µg/ml	67.3279	68.5415	120.4286	47.9029	80.7799	84.1816
31.25 µg/ml	61.8520	64.8070	119.4977	49.0321	77.9108	117.6317
Antibiyotik	19.0596	22.4908	36.8714	12.2984	14.1317	42.3105
Kontrol	100	100	100	100	100	100

Çizelge 7.4. Sentez Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 24 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği

% Canlılık	*E.coli*	*Salmonella*	*S.aureus*	*Listeria*	*Bacillus*	*Candida*
1000 µg/ml	103.8179	108.1207	113.1411	96.0207	97.4739	98.7480
500 µg/ml	103.2290	102.9066	129.5188	120.9698	111.3491	99.8820
250 µg/ml	105.3681	112.4118	140.7495	131.5372	122.4597	106.8109
125 µg/ml	103.0530	107.1770	147.9893	134.6965	122.7035	104.7827
62.5 µg/ml	102.5656	101.7874	137.7259	125.8077	118.6939	109.1111
31.25 µg/ml	102.3557	106.6088	133.5280	131.2070	119.6846	103.4913
Antibiyotik	9.6903	8.7302	23.9886	18.9223	22.1640	20.4436
Kontrol	100	100	100	100	100	100



Şekil 7.21. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 24 Saat Antimikrobiyal Aktivite Grafiği

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 24. Saat sonuçlarına göre *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *Listeria* ve *Bacillus* için etkinliklerinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. *Candida* bakterisi için; Sentez Kitosanın 1000 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu, ticari kitosanın ise 1000 µg/ml konsantrasyonda antibakteriyel aktivite etkinlik gözlemlenememiştir. Ticari kitosanın *Candida* bakterisi için 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml konsantrasyonlarında antibakteriyal etkinliği görülmüştür.

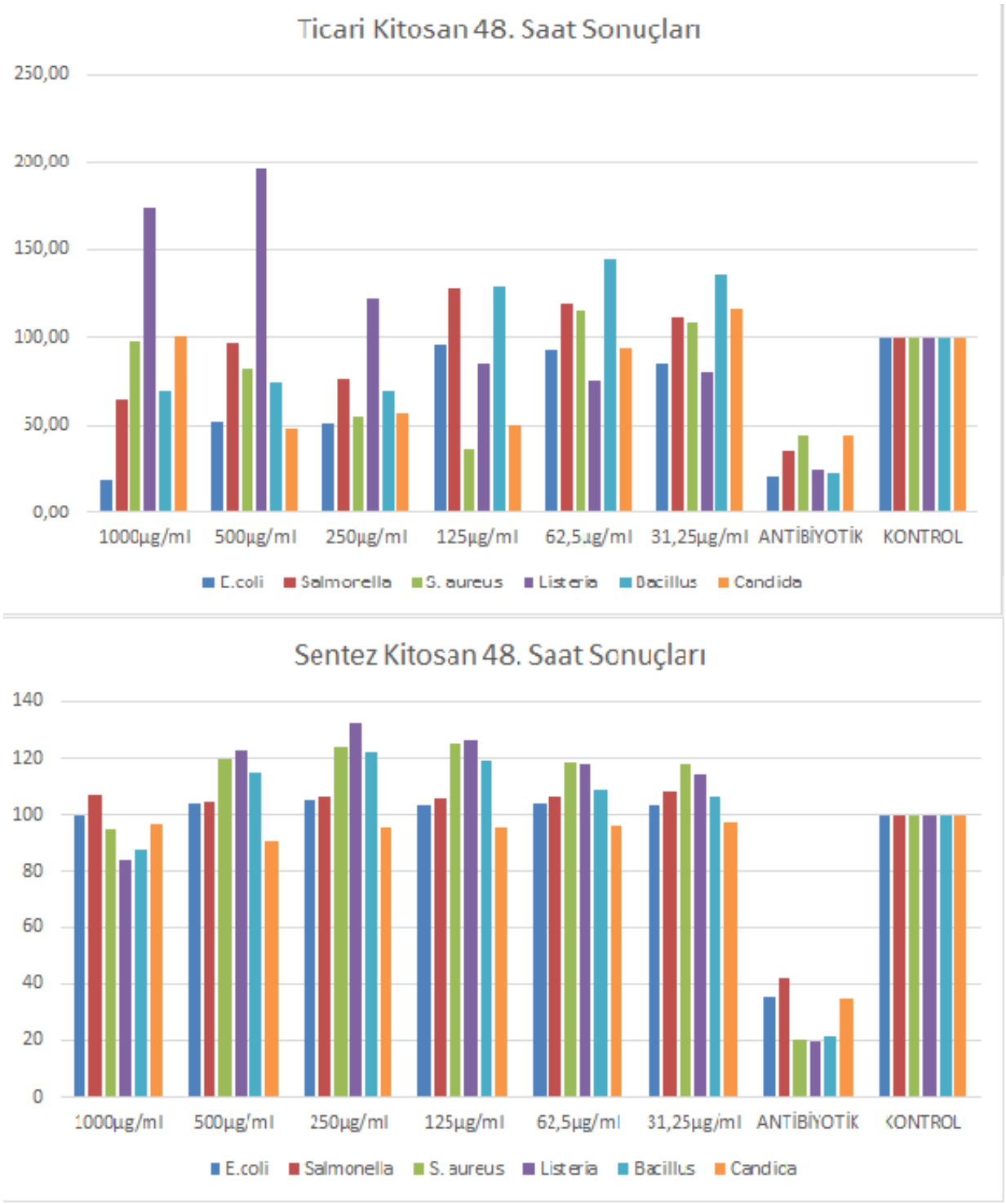
Hem ticari hem de sentez kitosanın 1000 µg/ml konsantrasyonda *Bacillus* ve *Listeria* bakterilerine karşı antibakteriyal etkilerinin olduğu görülmüştür.

Çizelge 7.5. Ticari Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 48 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği

% Canlılık	*E.coli*	*Salmonella*	*S.aureus*	*Listeria*	*Bacillus*	*Candida*
1000 µg/ml	18.2694	64.2543	97.6692	173.7333	69.3069	100.7303
500 µg/ml	52.0497	96.5600	82.8242	196.2903	73.5319	47.9435
250 µg/ml	51.1587	75.6117	54.8196	122.6192	69.5208	57.0440
125 µg/ml	95.6307	128.2247	36.2611	85.1488	129.224	50.6150
62.5 µg/ml	92.6608	119.5195	114.9943	74.4678	144.1117	93.9506
31.25 µg/ml	85.0155	111.4455	108.1731	80.6797	135.7739	115.6352
Antibiyotik	20.6363	34.4343	44.4781	24.5861	22.6120	43.9987
Kontrol	100	100	100	100	100	100

Çizelge 7.6. Sentez Kitosanın CLSI Mikrobrot Dilusyon Metoduna Göre 48 Saatlik Temas Sonrası Antimikrobiyal Etkinliği

% Canlılık	*E.coli*	*Salmonella*	*S.aureus*	*Listeria*	*Bacillus*	*Candida*
1000 µg/ml	99.5989	107.2397	94.7745	84.1717	87.8752	96.7441
500 µg/ml	104.3462	104.6705	119.7338	122.7772	115.0921	90.7776
250 µg/ml	105.5369	106.3753	123.8433	132.4999	122.4420	95.3686
125 µg/ml	103.7258	105.9517	125.0000	126.3651	119.0598	95.6351
62.5 µg/ml	103.9482	106.2011	118.3039	118.2183	109.1860	96.1400
31.25 µg/ml	103.5722	108.1315	117.9319	114.0490	106.2017	97.6053
Antibiyotik	35.1299	41.8907	20.3092	19.8872	21.3222	34.6221
Kontrol	100	100	100	100	100	100



Şekil 7.22. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 48 Saat Antimikrobiyal Aktivite Grafiği

Ticari Kitosan ve Sentez Kitosan için 48. Saatlik antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 7.5-7.6 ve Şekil 7.23'de görülmektedir.

Ticari Kitosan için 48 Saat etkileşim sonuçlarında en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/ml konsantrasyonundaki sonuçlarda *E.coli, Salmonella, S.aureus ve Bacillus bakterilerine ve Candida mayasına karşı* antimikrobiyal etkisinin olduğu, *Listeria* bakterisine karşı ise etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Aynı konsatrasyonda, Sentez Kitosanın E.*coli, S.aureus, Listeria* ve *Bacillus* bakterilerine ve *Candida* mayasına karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu *Salmonella* bakterisine karşı ise etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 31.25 µg/ml konsantrasyonda ise sentez Kitosanın antimikrobiyal etkisinin olmadığı, Ticari Kitosanında, *E.coli* ve *Listeria* bakterilerine karşı etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

7.10. Kitosan Numunelerinin Beyaz Patiska Kumaşa Kaplanması

Çizelge 7.7'de kontrol ve beyaz patiska kumaş numunelerin *S.aureus'a* karşı antibakteriyel aktiviteleri verilmiştir.

Çizelge 7.7. Kumaş Numunelerin *S.Aureus*'a Karşı Antibakteriyel Aktiviteleri

Numune	Kontrol numunesinde temas süresi sonundaki bakteri sayısı (kob/ml)	B (cfu/ml) 0 saatlik temas süresindeki bakteri sayısı	A (cfu/ml) (24 saatlik temas Süresinden sonra bakteri sayısı)	% R
Ticari kitosan ile kaplanmış beyaz patiska kumaş	5.7x105	$1.5x10^5$	1.4x105	%75.44
Sentez kitosan ile kaplanmış beyaz patiska kumaş	5.7x105	$1.43x10^5$	$8.4x10^4$	%41.26

Elde edilen sonuçlarda Ticari kitosan ile kaplanmış beyaz patiska kumaş % R (bakteri azalma yüzdesi) %75 oranlarında, sentez kitosanında %41.26 oranında olmaktadır.

BÖLÜM 8

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında iki farklı kitosanın FTIR, DSC, TGA, SEM, SEM-EDX, Kuru Madde Tayini, Deasetilasyon Derecesi ve Antimikrobiyal Aktivite analizleri yardımıyla yapısal özellikleri karşılaştırıl, Kitosan kaynağının ve üretim yönteminin etkisi tespit edilmiştir.

FTIR analiz sonuçları ile Ticari ve Sentez Kitosanların spektrumlarında yer alan karakteristik yapıların önceki çalışmalar ile benzer olduğu görülmüş ve her iki numuneninde kitosan olduğu kanıtlanmıştır.

Sıcaklık duyarlılıkları polimer malzemelerin kullanım alanlarını belirleyen özelliklerindendir. Yapılan termal analizlerde, ticari ve sentez kitosan numunelerine kontrollü sıcaklık uygulayarak fiziksel özellikleri sıcaklığının fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Kitosanların DSC analiz sonuçlarında endotermik ve ekzotermik olarak iki eğri görülmüştür. Ticari Kitosan için 154°C ve Sentez Kitosan için 140°C sıcaklıkta endotermik eğri görülmüştür. Ticari Kitosan için 301°C'de ve Sentez Kitosan için 315°C sıcaklıktakiler ekzotermik eğrilerdir. DSC analiz sonuçları doğrultusunda, kitinden kitosan elde edilme yönteminin ve kitosan kaynağının Kitosan faz değişimi sıcaklıklarında etkili olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde TGA grafiklerinde de farklılıkların olduğu, Ticari kitosanda, sentez kitosana nazaran daha fazla bozunum basamaklarının olduğu, ancak ara ürünlerin stabil olmadığı tespit edilmiştir.

Ticari Kitosan için % nem miktarı %11.5 ve Sentez kitosan için bu % nem miktarı %11.1 hesaplanmıştır. Her iki kitosanın nem tutma kapasitesinin birbirine yakın olduğu bulunmuştur. Üretim koşulları nem tutma kapasitesini etkilememiştir.

Ticari Kitosana ait XRD analiz sonucu grafiğinde kitosanın 2θ karakteristik yansıma pikleri 10.397º, 20,063º, 21,336º ve 23.792°'de görülmektedir. Sentez Kitosana ait XRD analiz sonucu grafiğinde kitosanın 2θ karakteristik yansıma pikleri 10.062º, 20,359º ve 26,822°'de görülmektedir. Kitosan çeşidine bağlı plarak piklerde kaymaların olduğu tespit edilmiştir.

SEM analiz sonuçları ile Kitosan numunelerinin malzeme yapısı belirlenmiştir. Ticari Kitosan ve Sentez Kitosanın düzensiz bir dağılım sergileyen nanoliflerden oluştuğu, her ikisininde ağsı bir yapıda olduğu görülmüştür.

Ticari Kitosana ait SEM-EDX sonuçlarına göre Karbon (C) miktarı yaklaşık % 44.61, Azot miktarı % 2.00 ve Oksijen (O) miktarı % 53.39 olarak hesaplanmıştır. Sentez Kitosana ait SEM-EDX sonuçlarına göre ise Karbon (C) miktarı ortalama yaklaşık % 44.59, Azot miktarı % 11.53 ve Oksijen (O) miktarı % 43.88 olarak hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal analiz sonuçlarında, ticari ve sentez kitosan numunelerinin aynı bakterilere aynı etkiyi göstermediği tespit edilmiştir. Bu durumun, kitosan üretim yöntemine bağlı olarak kitosan dışındaki yapıların uzaklaştırılma verimliliğine ve dasetilasyon derecesine bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Kitosanın Gram (-) bakterilere daha etkili olduğu görülmüştür.

Ticari Kitosan için deasetilasyon derecesi % 68, Sentez Kitosan için deasetilasyon derecesi % 59 olarak saptanmıştır. EDX sonuçları ile deasetilasyon derecesi sonuçları birbirini desteklemektedir.

Atık karides kabuklarından elde edilen kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerini deasetilasyon şartlarının etkilediği görülmüştür. Farklı kimyasallar ya da yöntemlerin kullanılması kitosanın kristal yapısı, protein miktarı ve fonksiyonel grup miktarı üzerinde etkili olduğu ortaya koyulmuştur.

Kitinden kitosan elde edilmesi farklı yöntemlerle ve birkaç basamakta gerçekleştirilmektedir. Tez çalışmasında ile elde edilen veriler doğrultusunda kitosan üretimine ve kaynağına bağlı olarak fiziksel, termal ve kimyasal özelliklerinde değişimlerin olduğu görülmüştür. Sanayi üretiminde de kitosan kullanımını arttırmak ve istenilen verimi elde edebilmek için kitosan üretiminin ve analiz yöntemlerinin standardize edilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Sentetik kimyasallara uygulanan performans standartlarının oluşturulması gerekmektedir. Bu durum kitosanın önemli bir

dezavantajıdır. Yapılacak çalışmalarla bilimsel olarak fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait veritabanı oluşturulması gerekmektedir. Kitosan kullanımının sanayiye kazandırılması ile atıkların ve çevre kirliliğinin azaltılması sağlanacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdou, E. S., Nagy, K. S., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, *99*(5), 1359–1367. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.051

Abdullah Al Balushi, K. S., Devi, G., Rashid Khamis Al Gharibi, A. S., Adeeb, M. A. S., Al Hudaifi, A. S. M., & Khalfan Al Shabibi, S. S. (2021c). Extraction of Bio Polymers from Crustacean Shells and its Application in Refinery Wastewater Treatment. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, *18*(5). https://doi.org/10.48048/wjst.2021.11543

Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, *150*(7), 2029–2035. https://doi.org/10.1099/mic.0.26980-0

Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K., Nair, S., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2011). Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydraye Polymers, 83(1),* 66-73. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.028

Arbia, W., Arbia, L., Adour, L. & Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - A Review. *Le Centre Pour La Communication Scientifique Directe - HAL - MemSIC*.

Atkins, E. D. T., Dlugosz, J. (1979). Food S. Electron diffraction and electron microscopy of crystalline _-chitin from the grasping spines of the marine worm Sagitta. *Int. J. Biol. Macromol*, 1:29-32

Austin P.R., Brine C.J., Castle J.E., Zikakis J.P. Chitin: New facets of research. *Science.* 1981;212:749–753. doi: 10.1126/science.7221561.

Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, *2011*, 1–29. https://doi.org/10.1155/2011/460381

Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. (2018). Comparative study on antimicrobial activity and biocompatibility of N-selective chitosan derivatives. *Reactive and Functional Polymers*, *124*, 149–155. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.016

Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 1072–1083. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113

Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *56*(3), 290–299. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.09.015

Bartnickigarcia, S., Persson, J., & Chanzy, H. (1994). An Electron Microscope and Electron Diffraction Study of the Effect of Calcofluor and Congo Red on the Biosynthesis of Chitin in Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *310*(1), 6–15. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1133

Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, S., Ramesh, K., Rizwan, M., & Rizwan, M. (2019). Synthesis And Characterization Of Ph-Sensitive N-Succinyl Chitosan Hydrogel And İts Properties For Biomedical Applications. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *64*(3), 4571–4574. https://doi.org/10.4067/s0717-97072019000304571

Becenen, N., & Erdoğan, S. (2022). Chitosan and nano-TiO_2 coating improves the flame retardancy of dyed and undyed denim fabrics by increasing the charring. *Journal of Industrial Textiles*, *51*(1_suppl), 1252S-1278S. https://doi.org/10.1177/15280837221099632

Bhat, A., Bhat, I. U. H., Khalil, H. A., Mishra, R., Datt, M., & Banthia, A. K. (2010). Development and Material Properties of Chitosan and Phosphomolybdic Acid-based Composites. *Journal of Composite Materials*, *45*(1), 39–49. https://doi.org/10.1177/0021998310371552

Blackwell, J., Parker, K. D., & Rudall, K. M. (1965). Chitin in pogonophore tubes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *45*(3), 659–661. https://doi.org/10.1017/s0025315400016489

Bobu, E., Nicu, R., Lupei, M., Desbrieres, J. & Angot, A. P. (2011). Synthesis and characterization of n-alkyl chitosan for papermaking applications. *Le Centre Pour La Communication Scientifique Directe - HAL - Inria*.

Braz, E. M. D. A., Silva, S. C. C. C. E., da Silva, D. A., Carvalho, F. A. D. A., Barreto, H. M., Santos Júnior, L. D. S., & da Silva Filho, E. C. (2018). Modified chitosan-based bioactive material for antimicrobial application: Synthesis and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 640–647. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.205

Bustos R.O., Healy M.G. Microbial deproteinization of waste prawn shell; Proceedings of the Second International Symposium on Environmental Biotechnology; Brighton, UK: Biotechnology' 94; 1994. pp. 15–25.

Campbell, N. A. (1996). *Biology* (4th ed.). Benjamin-Cummings Pub Co.

No, H. K., & Hur, E. Y. (1998). Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(9), 3844–3846. https://doi.org/10.1021/jf9802676

Champion, H. R., Bellamy, R. F., Roberts, C. P., & Leppaniemi, A. (2003). A Profile of Combat Injury. *Journal of Trauma: Injury, Infection &Amp; Critical Care*, *54*(5), S13–S19. https://doi.org/10.1097/01.ta.0000057151.02906.27

Cho, Y. I., No, H. K., & Meyers, S. P. (1998). Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(9), 3839–3843. https://doi.org/10.1021/jf971047f

Chretiennot-Dinet, M. J., Giraud-Guille, M. M., Vaulot, D., Putaux, J. L., Saito, Y., & Chanzy, H. (1997). The chitinous nature of filaments ejected by phaeocystis (prymnesiophyceae) 1. *Journal of Phycology*, *33*(4), 666–672. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00666.x

Chung Y.C., Su Y.P., Chen C.C., Jia G., Wang H.L., Wu J.G., Lin J.G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*(7), 932–936.

Çarıkçı, T. D. (2015). *Deniz kabukluları atığından ultrasonik reaktörde kitosan üretimi* (Tez No. 382330) [Yüksek lisans tezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp

Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y. Y., & Hamblin, M. R. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *9*(7), 857–879. https://doi.org/10.1586/eri.11.59

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *36*(8), 981–1014. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001

de Britto, D., Celi Goy, R., Campana Filho, S. P., & Assis, O. B. G. (2011). Quaternary Salts of Chitosan: History, Antimicrobial Features, and Prospects. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, *2011*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2011/312539

de Queiroz Antonino, R., Lia Fook, B., de Oliveira Lima, V., de Farias Rached, R., Lima, E., da Silva Lima, R., Peniche Covas, C., & Lia Fook, M. (2017). Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (Litopenaeus vannamei Boone). *Marine Drugs*, *15*(5), 141. https://doi.org/10.3390/md15050141

Demir, A., Seventekin, N. (2009). Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. T*ekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, *3*(2), 92–103.

Ding, Z., Mo, M., Zhang, K., Bi, Y., & Kong, F. (2021). Preparation, characterization and biological activity of proanthocyanidin-chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *188*, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.010

Ding, Z., Mo, M., Zhang, K., Bi, Y., & Kong, F. (2021b). Preparation, characterization and biological activity of proanthocyanidin-chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *188*, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.010

Duan, C., Meng, X., Meng, J., Khan, M. I. H., Dai, L., Khan, A., An, X., Zhang, J., Huq, T., & Ni, Y. (2019). Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, *4*(1), 11–21. https://doi.org/10.21967/jbb.v4i1.189

Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P. (2011). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, *18*(1), 3–34. https://doi.org/10.1177/1082013211399195

Eddya, M., Tbib, B., & EL-Hami, K. (2020). A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids. *Heliyon*, *6*(2), e03486. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03486

El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*, 1181–1189. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139

Erdogan, S., & Kaya, M. (2016). High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 118–126. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.059

Erdogan, S. (2020). Textile Finishing With Chitosan And Silver Nanoparticles Against Escherichia Coli Atcc 8739. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. https://doi.org/10.23902/trkjnat.641367

Fernandes Queiroz, M., Melo, K., Sabry, D., Sassaki, G., & Rocha, H. (2014). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs*, *13*(1), 141–158. https://doi.org/10.3390/md13010141

Fischer, T. H., Bode, A. P., Demcheva, M., & Vournakis, J. N. (2007). Hemostatic properties of glucosamine-based materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *80A*(1), 167–174. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30877

Fu, X., Shen, Y., Jiang, X., Huang, D., & Yan, Y. (2011). Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, *85*(1), 221–227. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.019

Furusaki, E. (1996). Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl-β-cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, *29*(1), 29–34. https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00133-6

Gaill, F., Persson, J., Sugiyama, J., Vuong, R., & Chanzy, H. (1992). The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms. *Journal of Structural Biology*, *109*(2), 116–128. https://doi.org/10.1016/1047-8477(92)90043-a

Ghorbel-Bellaaj O., Jellouli K., Younes I., Manni L., Ouled Salem M., Nasri M. A solvent-stable metalloprotease produced by Pseudomonas aeruginosa A2 grown on shrimp shell waste and its application in chitin extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011;**164**:410–425. doi: 10.1007/s12010-010-9144-4.

Ghorbel-Bellaaj O., Younes I., Maalej H., Hajji S., Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell waste using Bacillus bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* 2012;**51**:1196–1201. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.034.

Gooday, G. W., Jeuniaux, C., & Muzzarelli, R. (2011). *Chitin in Nature and Technology*. Springer Publishing.

Goy, R. C., Britto, D. D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, *19*(3), 241–247. https://doi.org/10.1590/s0104-14282009000300013

Gökçe, Y. (2008). *Kitosan nanoparçacıklarının sentezi* (Tez No. 233421) [Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp

Guang, W.Y. (2002). *The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk*. (Tez UMI No. 3080241) [Doktora Tezi, The Hong Kong Polytechnic University], ProQuest Deissertations Theses Global. https://www.proquest.com

Hackman, R. H., & Goldberg, M. (1974). Light-scattering and infrared-spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives. *Carbohydrate Research*, *38*, 35–45. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)82336-8

Harish Prashanth, K., & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science &Amp; Technology*, *18*(3), 117–131. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022

Herth, W., Kuppel, A., & Schnepf, E. (1977). Chitinous fibrils in the lorica of the flagellate chrysophyte Poteriochromonas stipitata (syn. Ochromonas

malhamensis). *Journal of Cell Biology*, *73*(2), 311–321. https://doi.org/10.1083/jcb.73.2.311

Hirano, S., & Zhang, M. (2000). Cellulose–acidic glycosaminoglycan blend fibers releasing a portion of the glycosaminoglycans in water. *Carbohydrate Polymers*, *43*(3), 281–284. https://doi.org/10.1016/s0144-8617(00)00155-7

Hsu, S. H., Hsieh, F. Y., & Tseng, T. C. (2015). Self-healing hydrogel for tissue repair in the central nervous system. *Neural Regeneration Research*, *10*(12), 1922. https://doi.org/10.4103/1673-5374.169624

Ibrahim, M., Osman, O., & Mahmoud, A. A. (2011). Spectroscopic Analyses of Cellulose and Chitosan: FTIR and Modeling Approach. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, *8*(1), 117–123. https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1668

İmamoğlu, Ö., 2011. Biyo kontrolde Doğal Ürünlerin Kullanılması: Kitosan. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *68*(4), 215-222.

Ishihara, M., Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Hattori, H., Matsui, T., & Kurita, A. (2001). Photocrosslinkable chitosan: an effective adhesive with surgical applications. *International Congress Series*, *1223*, 251–257. https://doi.org/10.1016/s0531-5131(01)00430-7

Islam, M., Khan, S., & Tanaka, M. (2004). Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine Pollution Bulletin*, *49*(1–2), 103–110. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018

Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., & Tamura, H. (2007). Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, *40*(3), 175–181. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.021

Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S., & Tamura, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, *82*(2), 227–232. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Sudheesh Kumar, P., Nair, S., & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 322–337. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005

Jung W.J., Kuk J.H., Kim K.Y., Park R.D. Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005;**67**:851–854. doi: 10.1007/s00253-004-1871-4.

Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Menteş, A., Aşan Özüsağlam, M., & Çakmak, Y. S. (2014). Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata). *Materials Science and Engineering: C*, *45*, 72–81. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.004

Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A., & Baran, T. (2015b). Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules*, *72*, 797–805. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.034

Kaur S., Dhillon G.S. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015;**35**:44–61.

Kauvar, D. S., Lefering, R., & Wade, C. E. (2006). Impact of Hemorrhage on Trauma Outcome: An Overview of Epidemiology, Clinical Presentations, and Therapeutic Considerations. *Journal of Trauma: Injury, Infection &Amp; Critical Care*, *60*(6), S3–S11. https://doi.org/10.1097/01.ta.0000199961.02677.19

Kerch, G. (2015). Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends in Food Science &Amp; Technology*, *46*(2), 159–166. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.010

Khanafari A., Marandi R., Sanatei S. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 2008;**5**:1–24.

Khor, E., & Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, *24*(13), 2339–2349. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00026-7

Kim, J. Y., Lee, J. K., Lee, T. S., & Park, W. H. (2003). Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against Streptococcus mutans. *International Journal of Biological Macromolecules*, *32*(1–2), 23–27. https://doi.org/10.1016/s0141-8130(03)00021-7

Kim, S., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, *62*(4), 357–368. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.012

Kitin. (2020, Kasım 26). İçinde *Vikipedia*. https://tr.wikipedia.org/wiki/Kitin#Etimoloji

Klokkevold, P. R., Fukayama, H., Sung, E. C., & Bertolami, C. N. (1999). The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *57*(1), 49–52. https://doi.org/10.1016/s0278-2391(99)90632-8

Klotzbach, T. L., Watt, M., Ansari, Y., & Minteer, S. D. (2008). Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. *Journal of Membrane Science*, *311*(1–2), 81–88. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.11.043

Koşkun, M., Berber, B., Çakır, S., Tarhan, B., Sesal, N. C. (2014, Şubat 14-16). *Organik kozmetiğe yeni bir yaklaşım: kitosan nanoparçacıklar* [Konferans sunumu]. 4. Kozmetik Kimyasi, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, Antalya.

Kristl, J., Šmid-Korbar, J., Štruc, E., Schara, M., & Rupprecht, H. (1993). Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, *99*(1), 13–19. https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90317-9

Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, *104*(12), 6017–6084. https://doi.org/10.1021/cr030441b

Kurtuluş, G., & Vardar, F. (2020). Kitosanın Özellikleri, Uygulama Alanları, Bitki Sistemlerine Etkileri. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 222–235. https://doi.org/10.7240/jeps.635430

Kyzas, G., & Bikiaris, D. (2015). Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. *Marine Drugs*, *13*(1), 312–337. https://doi.org/10.3390/md13010312

Leuba, J. L., & Stossel, P. (1986). Chitosan and Other Polyamines: Antifungal Activity and Interaction with Biological Membranes. *Chitin in Nature and Technology*, 215–222. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5_29

Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydrate Research*, *339*(2), 313–319. https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024

Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2003). Review of Chitosan and Its Derivatives as Antimicrobial Agents and Their Uses as Textile Chemicals. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, *43*(2), 223–269. https://doi.org/10.1081/mc-120020161

Lim, S. H. (2002). *Synthesis Of A Fiber-Reactive Chitosan Derivative And its Application to Cotton Fabric as an Antimicrobial Finish and a DyeingImproving Agent.* North Carolina State University.

Littlejohn, L. F., Devlin, J. J., Kircher, S. S., Lueken, R., Melia, M. R., & Johnson, A. S. (2011). Comparison of Celox-A, ChitoFlex, WoundStat, and Combat Gauze Hemostatic Agents Versus Standard Gauze Dressing in Control of Hemorrhage in a Swine Model of Penetrating Trauma. *Academic Emergency Medicine*, *18*(4), 340–350. https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2011.01036.x

Mahmoud N.S., Ghaly A.E., Arab F. Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2007;**3**:1–9. doi: 10.3844/ajbbsp.2007.1.9.

Manni L., Ghorbel-Bellaaj O., Jellouli K., Younes I., Nasri M. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from Bacillus cereus SV1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010;**162**:345–357. doi: 10.1007/s12010-009-8846-y.

Martín-Gil, F., Leal, J., Gómez-Miranda, B., Martín-Gil, J., Prieto, A., & Ramos-Sánchez, M. (1992). Low temperature thermal behaviour of chitins and chitin—glucans. *Thermochimica Acta*, *211*, 241–254. https://doi.org/10.1016/0040-6031(92)87023-4

Melo-Silveira, R. F., Fidelis, G. P., Costa, M. S. S. P., Telles, C. B. S., Dantas-Santos, N., Elias, S. D. O., Ribeiro, V. B., Barth, A. L., Macedo, A. J., Leite, E. L., & Rocha, H. A. O. (2011). In Vitro Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and in Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(1), 409–426. https://doi.org/10.3390/ijms13010409

Menazea, A., Eid, M., & Ahmed, M. (2020). Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial activity of novel Chitosan/Tigecycline composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *147*, 194–199. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.041

Miteluț, A. C., Tănase, E. E., Popa, V. I., & Popa, M. E. (2015). Sustainable alternative for food packaging: Chitosan biopolymer—A review. *AgroLife Scientific Journal*, *4*(2), 52-61.

Moore, G.K. ve Roberts, G.A.F. (1980). Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2: 115-116

Mujtaba, M., Morsi, R. E., Kerch, G., Elsabee, M. Z., Kaya, M., Labidi, J., & Khawar, K. M. (2019). Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 889–904. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109

NABİLTEM (2022, Eylül). *Taramalı elektron mikroskobu*, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı. http://merkezlab.nku.edu.tr/TaramalıElektronMikroskobu(SEM)/0/s/5472/5923

Oh K.T., Kim Y.J., Nguyen V.N., Jung W.J., Park R.D. Demineralization of crab shell waste by Pseudomonas aeruginosa F722. *Process Biochem.* 2007;**42**:1069–1074. doi: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.007

Oktav Bulut, M., Elibüyük, U. (2017). Yengeç Kitininden Kitosan Üretimi. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 213-219.

Özcan, L. (2002). *Kitosan yüzeyine ağır metal adsorpsiyonu* (Tez No. 119734) [Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp

Pardeshi, C. V., & Belgamwar, V. S. (2016). Controlled synthesis of N,N,N-trimethyl chitosan for modulated bioadhesion and nasal membrane permeability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *82*, 933–944. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.012

Peniston Q.P., Lohnson E.L. (1978) *Process for Demineralization of Crustacea Shells*. U.S. Patent No. 4,066,735

Pınar Oğuzhan Yildiz, & Filiz Yangilar. (2014). Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, *30*(3), 198–206.

Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, *35*(1), 17–21. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01118.x

Pokhrel, S., Yadav, P. N., & Adhikari, R. (2016). Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology*, *16*(1), 99–104. https://doi.org/10.3126/njst.v16i1.14363

Potyrailo, R. A., Ghiradella, H., Vertiatchikh, A., Dovidenko, K., Cournoyer, J. R., & Olson, E. (2007). Morpho butterfly wing scales demonstrate highly selective vapour response. *Nature Photonics*, *1*(2), 123–128. https://doi.org/10.1038/nphoton.2007.2

Prameela, K., Mohan, C. M., Smitha, P. V., & Hemalatha, K. (2010). Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. *International Journal of Applied Biology and P*. *1*(1), 903–910.

Ramya, R., Venkatesan, J., Kim, S. K., & Sudha, P. N. (2012). Biomedical Applications of Chitosan: An Overview. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, *2*(2), 100–111. https://doi.org/10.1166/jbt.2012.1030

Rao, S. B. & Sharma C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, *34*(1), 21–28. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199701)34:1

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular*

Biology Reviews, *62*(3), 597–635. https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998

Rao, M. S., Muñoz, J., & Stevens, W. F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. Applied Microbiology and Biotechnology, 54(6), 808–813. https://doi.org/10.1007/s002530000449

Rassu, G., Soddu, E., Cossu, M., Gavini, E., Giunchedi, P., & Dalpiaz, A. (2016). Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *32*, 77–87. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.002

Ravi Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. https://doi.org/10.1016/s1381-5148(00)00038-9

Rhim, J. W., Park, H. M., & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, *38*(10–11), 1629–1652. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, *31*(7), 603–632. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001

Rinaudo, M., Auzely, R., Vallin, C., & Mullagaliev, I. (2005). Specific Interactions in Modified Chitosan Systems. *Biomacromolecules*, *6*(5), 2396–2407. https://doi.org/10.1021/bm0580025

Roberts, G. A., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *4*(6), 374–377. https://doi.org/10.1016/0141-8130(82)90074-5

Rocha, M. A. M., Coimbra, M. A., & Nunes, C. (2017). Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. *Current Opinion in Food Science*, *15*, 61–69. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.008

Rout, S., & Kumar, S. (2001). Physicochemical, Functional and Spectroscopic Analysis of Crawfish Chitin and Chitosan as Affected by Process Modification. *LSU Historical Dissertations and Theses*, *432*. https://doi.org/10.31390/gradschool_disstheses.432

Rúnarsson, G. V., Holappa, J., Malainer, C., Steinsson, H., Hjálmarsdóttir, M., Nevalainen, T., & Másson, M. (2010). Antibacterial activity of N-quaternary chitosan derivatives: Synthesis, characterization and structure activity relationship (SAR) investigations. *European Polymer Journal*, *46*(6), 1251–1267. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.03.001

Sajomsang, W., Gonil, P., & Saesoo, S. (2009). Synthesis and antibacterial activity of methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan chloride. *European*

Polymer Journal, *45*(8), 2319–2328. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2009.05.009

Sakamoto, J., Sugiyama, J., Kimura, S., Imai, T., Itoh, T., Watanabe, T., & Kobayashi, S. (2000). Artificial Chitin Spherulites Composed of Single Crystalline Ribbons of α-Chitin via Enzymatic Polymerization. *Macromolecules*, *33*(11), 4155–4160. https://doi.org/10.1021/ma000230y

Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (Chionoecetes opilio) and shrimp (Pandalus borealis) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*(8), 1527–1532. https://doi.org/10.1021/jf00008a032

Shamshina, J. L., Berton, P., & Rogers, R. D. (2019). Advances in Functional Chitin Materials: A Review. *ACS Sustainable Chemistry &Amp; Engineering*, *7*(7), 6444–6457. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06372

Sini T.K., Santhosh S., Mathew P.T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using Bacillus subtilis fermentation. *Carbohydr. Res.* 2007;**342**:2423–2429. doi: 10.1016/j.carres.2007.06.028.

Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2011). Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery Perspective. *Advances in Polymer Science*, 23–53. https://doi.org/10.1007/12_2011_117

Sorlier, P., Denuzière, A., Viton, C. & Domard, A. (2001). Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*, *2*(3), 765–772. https://doi.org/10.1021/bm015531

Souza, VG, Pires, JR, Rodrigues, C., Coelhoso, IM ve Fernando, AL (2020). Ambalaj endüstrisindeki kitosan kompozitleri - Mevcut trendler ve gelecekteki zorluklar. *Polimerler*, 12 (2), 417.

Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003b). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(2), 145–171. https://doi.org/10.1080/10408690390826473

Şahin, M. (2007). *Kitosanın Schiff baz türevlerinin sentezi ve metal komplekslerinin incelenmesi* (Tez No. 199584) [Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://acikbilim.yok.gov.tr

Tan, S. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, *45*(4), 713–719. https://doi.org/10.1016/s0039-9140(97)00288-9

Tangül, M. B. (2019). *Sürtünmesel Kilitlenen İmplant-Dayanak Bağlantısının Yüzey Elementel Analizinin (Edx) ve Pürüzlülüğünün, Mikro Boşluk Ve Dayanak Yer Değiştirme Miktarının In-Vitro İncelenmesi* (Tez No. 700503) [Doktora tezi, Ege Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp

Tav, A. (2019). *Karides kabuklarından farklı yöntemler ile kitosan üretimi ve karakterizasyonu* (Tez No. 589189) [Yüksek lisans tezi, Yalova Üniversitesi]. YÖK tez merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/giris.jsp

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*(3), 305–316. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00084-2

Thomas, S., Pius, A., & Gopi, S. (2020). *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties*. Elsevier Gezondheidszorg.

Tirtom, V. N., Dinçer, A., Becerik, S., Aydemir, T., & Çelik, A. (2012). Removal of lead (II) ions from aqueous solution by using crosslinked chitosan-clay beads. *Desalination and Water Treatment*, *39*(1–3), 76–82. https://doi.org/10.1080/19443994.2012.669161

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. Polymer, 44(26), 7939–7952. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025

Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, *88*(13), 2917–2923. https://doi.org/10.1002/app.11986

Tzaneva, D., Simitchiev, A., Petkova, N., Nenov, V., Stoyanova, A. & Denev, P. (2017). Synthesis of Carboxymethyl Chitosan and its Rheological Behaviour in Pharmaceutical and Cosmetic Emulsions.. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. https://doi.org/10.7324/japs.2017.71010

Usman, A., Zia, K. M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S., & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 630–645. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.004

Üçgül, B., Aras, S., & Özdemir Küçükçapraz, D. (2016). Farklı hammadde kaynaklarından kitinin saflaştırılması ve tekstil uygulamaları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *9*(1). https://doi.org/10.18185/eufbed.51784

Vaca-Cornejo, F., Reyes, H., Jiménez, S., Velázquez, R., & Jiménez, J. (2017). Pilot Study Using a Chitosan-Hydroxyapatite Implant for Guided Alveolar Bone Growth in Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of Functional Biomaterials*, *8*(3), 29. https://doi.org/10.3390/jfb8030029

Varma, A., Deshpande, S., & Kennedy, J. (2004). Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers*, *55*(1), 77–93. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.08.005

Vega, K., & Kalkum, M. (2012). Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*, *2012*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2012/920459

Wang, J. P., Chen, Y. Z., Yuan, S. J., Sheng, G. P., & Yu, H. Q. (2009). Synthesis and characterization of a novel cationic chitosan-based flocculant with a high water-solubility for pulp mill wastewater treatment. *Water Research*, *43*(20), 5267–5275. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.040

Whang, H. S., Kirsch, W., Zhu, Y. H., Yang, C. Z., & Hudson, S. M. (2005). Hemostatic Agents Derived from Chitin and Chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, *45*(4), 309–323. https://doi.org/10.1080/15321790500304122

Wang, S. L., & Chio, S. H. (1998). Deproteinization of Shrimp and Crab Shell with the Protease of Pseudomonas Aeruginosa K-187. *Enzyme and Microbial Technology*, *22*(7), 629–633. https://doi.org/10.1016/s0141-0229(97)00264-0

Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H., & Zhou, S. (2010). Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, *81*(4), 931–936. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.008

Yang, J. K., Shih, I. L., Tzeng, Y. M., & Wang, S. L. (2000). Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(5–6), 406–413. https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00164-7

Yıldırım, Z., Öncül, N., & Yıldırım, M. (2016). Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, *5*(1), 19–36. https://doi.org/10.28948/ngumuh.239351

Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, *13*(3), 1133–1174. https://doi.org/10.3390/md13031133

Zamani, A., Jeihanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2008). Determination of Glucosamine and *N*-Acetyl Glucosamine in Fungal Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(18), 8314–8318. https://doi.org/10.1021/jf801478j

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*(1), 99–105. https://doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00123-3

Zeng, J., Ren, X., Zhu, S., & Gao, Y. (2021). Fabrication and characterization of an economical active packaging film based on chitosan incorporated with pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, *192*, 1160–1168. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.064

Zhou, Y., Ma, G., Shi, S., Yang, D., & Nie, J. (2011). Photopolymerized water-soluble chitosan-based hydrogel as potential use in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *48*(3), 408–413. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.015

ÖZGEÇMİŞ

Buket Hamzaoğlu Eskişehir'de dünyaya gelmiştir. İlk öğretimini Eskişehir ilinde tamamlayan Buket Hamzaoğlu, lise eğitimini yine Eskişehir Muzaffer Çil Anadolu lisesinde tamamlamıştır. 2013 yılında lise eğitimini tamamlayarak Marmara Üniversitesi Kimya Mühendisliği lisans eğitimine başlamıştır. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamlamıştır. Yine 2018 yılında Trakya Üniversitesi'nde Uygulamalı Bilimler ve Teknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Yabancı dili İngilizcedir.

Profesyonel kariyerine 2018 yılında Polifarma İlaç firmasında kalite kontrol uzman yardımcısı olarak başlamış, 2020 yılında Deva Holding firmasında analitik geliştirme departmanında devam etmiştir. Kariyerine 2023 yılı itibari ile Poliya Polyester firmasında Ar-Ge uzmanı olarak devam etmektedir.