

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

Zeliha YILDIRIM¹, Nilgün ÖNCÜL^{2*}, Metin YILDIRIM¹

¹Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Niğde Üniversitesi, Niğde, Türkiye

²Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tokat, Türkiye

Geliş / Received: 09.09.2015

Düzeltilmelerin gelişi / Received in revised form: 22.10.2015

Kabul / Accepted: 22.10.2015

ÖZ

Kitosan, kitinin kısmen veya tamamen deasetilasyonu ile elde edilen değişik moleküler ağırlıktaki bileşikler için kullanılan genel bir terimdir. Doğada yaygın ve bol miktarda bulunması, yüksek canlılara karşı toksik etki göstermemesi, mikroorganizmaları inhibe etmesi, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyo-uyumlu olması, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer birçok biyopolimere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle kitosan başta gıda olmak üzere su, ilaç, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt, tekstil, mikrobiyoloji, immünoloji, biyoteknoloji, ters osmoz membranları gibi birçok alanda kullanım olanağı bulmaktadır. Bu derleme, kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ve etki mekanizması, antimikrobiyal aktivitesini etkileyen faktörler ve gıda endüstrisinde kullanımı ile ilgili bilgileri içermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, antimikrobiyal aktivite, etki mekanizması, gıda

CHITOSAN AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES

ABSTRACT

Chitosan is a collective name used for a group of compounds having various molecular weights, which are produced from chitin by partially or fully de-acetylating. Because of its distinctive biological and physicochemical properties, including non-toxic, biocompatible, biodegradable, antimicrobial, antioxidant, anticancer and non-antigenic activities, chitosan has found many applications in different areas such as: food, water treatment, pharmaceutical, cosmetics, agriculture, biomedical, paper, textile, microbiology, immunology, biotechnology and reverse osmosis membranes. This review gives information about antimicrobial activity of chitosan, its mode of action against microorganisms, factors affecting its antimicrobial activity and its application in food industry.

Keywords: Chitosan, antimicrobial activity, mode of action, food

1. GİRİŞ

Kitosan $[(C_6H_{11}NO_4)_n (C_8H_{13}NO_4)_m]$, ilk kez Bradconnot tarafından 1811 yılında tanımlanmış olan kitinin (β -1,4-poli-N-asetil-D-glukozamin) kısmen veya tamamen deasetilasyonu ile elde edilen antimikrobiyal özelliğe sahip bir heteropolisakkarittir [1, 2]. Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edildiği için kitosan, farklı oran ve sayıda 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz (D-glukozamin, deasetil form, yaklaşık % 80) ve 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoz (N-asetil-D-glukozamin, asetil form, yaklaşık % 20) moleküllerinin β -(1,4) bağı ile bağlanması sonucu oluşan düz zincirli bir kopolimerdir. Bu iki molekülün sayısı ve dizi içerisindeki sırası

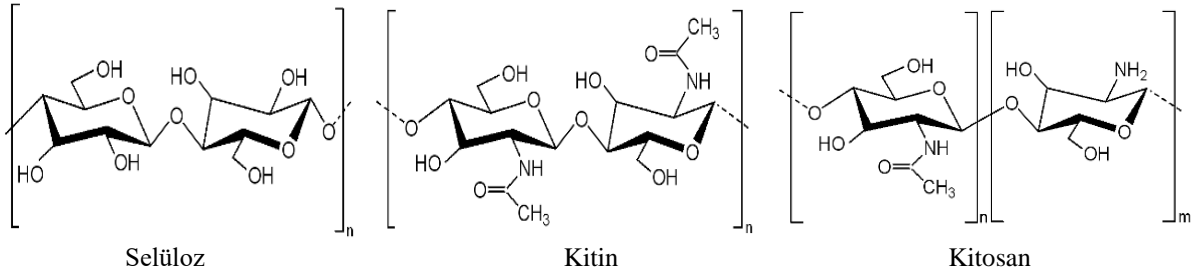
*Corresponding author / Sorumlu yazar. Tel.: +90 356 252 29 01; e-mail/e-posta: nilgun.oncul@gop.edu.tr

kitosanın fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler [3]. Kitin ve kitosanın ayırımında kesin bir ölçü bulunmamasına karşın kitosan terimi, genellikle deasetilasyon derecesi % 50'den fazla olan 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz ve 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranozun kopolimerleri için kullanılmaktadır [4, 5]. Deasetilasyon derecesi, deasetile edilmiş amino grupları (-NH₂) sayısının, asetil-amino grupları (-NH-CO-CH₃) sayısına oranı şeklinde tanımlanmaktadır.

Kitosan serbest radikalleri söndürerek veya metal iyonlarını bağlayarak antioksidan aktivite göstermektedir. Kitosandaki hidroksil (-OH) ve amino (-NH₂) grupları stabil olmayan serbest radikallerle reaksiyona girerek onların stabil moleküllere dönüşmesini sağladıkları ve metal iyonlarını bağladıkları için antioksidan aktiviteden sorumlu temel fonksiyonel gruplardır [6]. Doğada yaygın ve bol miktarda bulunması, yüksek canlılara karşı toksik etki göstermemesi, mikroorganizmaları inhibe etmesi, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyo-uyumlu olması, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer birçok biyopolimere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle kitosan başta gıda olmak üzere su, ilaç, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt, tekstil, mikrobiyoloji, immünoloji, biyoteknoloji, ters osmoz membranları gibi birçok alanda kullanım olanağı bulmaktadır. Katyonik ve makromoleküler yapısı nedeniyle kitosan durultma ajanı olarak kullanılabilir. Bu özgül niteliklerinden dolayı kitosan biyofonksiyonel polimer olarak değerlendirilmektedir [1-3].

2. KITOSANIN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Yengeç, karides, istakoz gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, küf ve maya gibi mikroorganizmaların hücre duvarlarında doğal olarak bulunan kitin, selülozdan sonra doğada en çok karşılaşılan polisakkarittir. Katı formda kitin zincirleri hidrojen bağlarıyla bağlandığı için baskın bir kristalin yapıya sahiptir. Kitosan, kitinin alkali koşullarda (% 40-50'lik sodyum hidroksit, NaOH) 90-150°C'de 4-5 saat süreyle kısmen veya tamamen deasetilasyonu (kimyasal yöntem) ya da kitin deasetilaz enzimi (EC 3.5.1.4) vasıtasıyla enzimatik deasetilasyonu ile elde edilen ve bu nedenle β -(1,4) bağı ile bağlanmış değişen oran ve sayıda D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminden oluşan düz zincirli bir kopolimerdir (Şekil 1). Potasyum hidroksite (KOH) göre çok daha fazla etkin olduğu için deasetilasyon işleminde NaOH tercih edilmektedir. Kimyasal yöntemle deasetilasyon işleminde asidik koşullar da kullanılabilir; ancak glukozidik bağı asidik koşullara çok duyarlı olması nedeniyle aşırı depolimerizasyon gerçekleşeceği için asidik koşullar tercih edilmemektedir. NaOH uygulaması ile deasetilasyonun yanı sıra kısmi depolimerizasyon işlemi de gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle deasetilasyon koşulları, elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesini, asetil gruplarının zincir boyunca dağılım şeklini, molekül ağırlığını ve çözeltideki viskozitesini belirler [4, 7]. Endüstriyel kitosan üretiminde enzimatik yöntemden ziyade ucuz ve kitlesel üretime uygun olması nedeniyle kimyasal yöntem (konsantre NaOH yolu) tercih edilmektedir (Şekil 2).



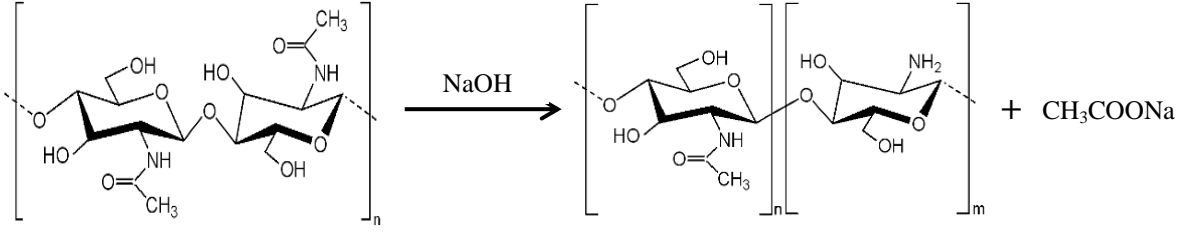
Şekil 1. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları

Kitinin kristalin yapıda bulunması nedeniyle elde edilen kitosandaki asetil grupları zincir boyunca heterojen bir dağılım sergilemektedir [8]. Asetilasyon derecesi genellikle % 5–30 arasında değişmektedir. Alkali uygulaması birkaç kez tekrar edildiğinde tam bir deasetilasyon sağlanabilmektedir [9]. Kitosanlar temel olarak molekül ağırlıkları ve asetilasyon derecesi ile karakterize edilmekle birlikte azot içerikleri de karakterizasyonda önem taşımaktadır.

Kitinin en önemli özelliklerinden biri ağırlıkça % 6,89 oranında asetil-amino grubu (-NH-CO-CH₃) şeklinde azot içermesidir. Azot oranı (-NH₂ ve -NH-CO-CH₃ şeklinde) ağırlıkça % 7'nin üzerine çıktığında kullanımı tercih edilen terim kitosandır [5]. Ticari kitosanların deasetilasyon derecesi genellikle % 85'ten büyük (asetilasyon derecesi <% 15) olup molekül ağırlıkları 100 ile 1000 kDa arasında değişmektedir. Üretim koşullarına bağlı olarak kitosanın molekül ağırlığı değişkenlik gösterdiğinden, molekül ağırlığı 50 kDa ve daha

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

küçük olanlar düşük, 50-150 kDa arasında olanlar orta ve 150 kDa ve daha büyük olanlar ise yüksek molekül ağırlıklı olarak değerlendirilmektedir [10].



Şekil 2. Kitinin NaOH ile deasetilasyonu ve kitosan oluşumu

Amino grubu kitosana metalleri bağlama yani şelatlama özelliği kazandırmaktadır. Dolayısıyla atık sularda ağır metallerin arıtılmasında kitosan kullanımı önem arz etmektedir. Kitosanın şelatlama yeteneğinin diğer doğal polimerlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [5]. Selüloz, dekstran, aljinik asit, agar, agaroz, pektin, karagenan gibi doğal olarak bulunan polisakkaritler nötral veya asidik olmalarına karşın kitosan bazik bir polisakkarittir. Bu özellik kitosanın film oluşturmasında, metal iyonlarını şelatlamasında ve polioksi tuz oluşturmasında önemli rol oynamaktadır [5, 11]. Ayrıca polisakkarit iskeletinde bulunan asetil-amino grupları da kitosana farklı özellikler kazandırmaktadır. Örneğin kitosanın toksik etki göstermemesi, film ve lif oluşturma özelliği, metal iyonlarını adsorbe etmesi, süspansiyonları veya çözünen maddeleri çöktürmesi gibi özgün biyolojik aktiviteleri asetil-amino gruplarından kaynaklanmaktadır [9].

Kitosanın çözünürlüğü önemli parametrelerden biri olup polimerin molekül ağırlığına, üretimde kullanılan kitinin kaynağına, ortamda metal iyonlarının bulunup bulunmamasına, çözücü olarak kullanılan asidin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Molekül ağırlığı ve polimer zincirlerinin metallerle çapraz bağlanma oranı arttıkça çözünürlüğü azalmaktadır. Kitosan suda, organik çözücülerde, nötral ve alkali pH'larda çözünmezken asetik asit, formik asit, laktik asit gibi seyreltik organik asit solüsyonlarında (pH<6) çözünür [9, 11]. Ancak düşük molekül ağırlığına sahip kitosan oligosakkaritleri su içerisinde de çözünebilmektedir. Asidik ortamlarda çözünen kitosanın amino grupları proton bağlayarak pozitif yüklü hale geçer.

Kitosanın fiziko-kimyasal özellikleri deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı ile değişmektedir (Tablo 1) [7]. Kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi ise kitinin kaynağına, izolasyon yöntemine, NaOH ile işlem görme süresine, konsantrasyonuna ve işlem sırasındaki sıcaklığa bağlıdır [12, 13]. Kitosanın stabilitesi depolama sıcaklığı ve süresinden olumsuz yönde etkilenmektedir, öyle ki; pH 7 ve üzerinde oda sıcaklığında uzun süre bekletildiğinde, stabilitesi ve antimikrobiyal aktivitesi azalmaktadır [14].

Dallanmamış düz zincirli yapıya sahip olan kitosanın özellikle yüksek molekül ağırlıklı formu asidik ortamda güçlü bir viskozite artırıcı özellik göstermektedir. Kitosan çözeltisinin viskozitesi, konsantrasyon ve deasetilasyon derecesindeki artış ve sıcaklıktaki düşüş ile artmaktadır. Ayrıca viskozite, lizozim enzimiyle parçalanma, yaraları iyileştirme gibi kitosanın biyolojik özelliklerini de etkileyebilmektedir [7].

Kitosanın kimyasal özellikleri şu şekilde özetlenebilir: (i) lineer polimerdir, (ii) reaktif amino (-NH₂), asetil-amino (-NH-CO-CH₃) ve hidroksil (-OH) gruplarına sahiptir ve (iii) birçok metal iyonlarını şelatlama yeteneğindedir [15].

3. KİTOSANIN PARÇALANMASI

Kitosan kimyasal veya enzimatik yolla parçalanabilmektedir. Asit veya alkali yardımıyla gerçekleşen parçalanma kimyasal parçalanma olarak nitelenir. Kitosan, glukozamin-glukozamin, glukozamin-N-asetil-glukozamin ve N-asetil-glukozamin-N-asetil-glukozamin bağlarını kopartan enzimler tarafından parçalanabilmektedir. Oksidasyon-reduksiyon yoluyla da kitosanın depolimerizasyona uğradığı bildirilmesine karşın bu tür parçalanmanın hücrelerde önemli bir yeri bulunmamaktadır. Omurgalılarda kitosanın temel olarak lizozim enzimi ve kalın bağırsaktaki belirli bakteri enzimleri tarafından parçalandığı bilinmektedir [7]. Kitin içeren kültür mantarları, kabuklu deniz ürünleri ve bazı böcek türleri insanlar tarafından uzun yıllardan beri tüketiliyor olmasına karşın 1994 yılına kadar insan vücudunun kitinaz üretmediği kabul edilmiş ve kitin, insanlar tarafından sindirilemeyen bir polimer olarak değerlendirilmiştir [1]. Ancak insanlarda şu ana kadar 8 adet kitinaz belirlenmiş ve bunlardan 3 tanesinin ise enzimatik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Birçok mikroorganizma kitini parçalayabilmektedir. Canlı organizmalarda kitosanın parçalanma hızı ve şekli deasetilasyon derecesine bağlıdır [7, 16, 17]. Deasetilasyon derecesi arttıkça parçalanma hızı azalmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Kitosanın bazı özellikleri üzerine molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkisi [7]

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

4. KİTOSANIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Kitosan; (i) biyo-uyumluluk (doğal bir polimerdir, vücutta parçalanabilir, güvenli ve toksik değildir), (ii) memeli ve mikroorganizma hücrelerine bağlanabilme, (iii) bağ dokusu üzerinde rejeneratif aktivite, (iii) kemik üreten hücre (osteoblast) oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (iv) kanamayı durdurucu (hemostatik) aktivite, (v) antimikrobiyal aktivite, (vi) anti-kanserojen aktivite, (vii) anti-kolesterol aktivite, (viii) kemik oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (ix) merkezi sinir sistemini baskılayıcı aktivite ve (x) bağışıklık sistemini uyarıcı aktivite şeklinde sıralanabilecek birçok biyolojik özelliğe sahiptir [15].

Kitosan ve türevlerinin biyolojik özelliklerinden en önemlisi sahip oldukları antimikrobiyal aktivitedir. Kitosanın antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ayrıca algelere karşı da aktiftir [2, 18, 19]. Altıdan küçük pH değerlerinde glukozamin bileşeninin ikinci karbonundaki amino grubu (-NH₂) proton bağlayıp pozitif yüklü (-NH₃⁺) forma dönüştüğünden kitosanın antimikrobiyal aktivitesi kitine göre daha yüksektir [10]. Kitosan hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olup antibakteriyel aktivite gösterdiği bakterilere örnek olarak *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* verilebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kitosanın bakteriler üzerindeki inhibitör etkisinin daha çok bakteriyostatik olduğu görülmüştür [2, 10].

Kitosan ve türevlerinin antifungal aktivite gösterdiği küflere *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Byssoschlamys* spp., mayalara *Candida albicans*, *Candida lambica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutensis* örnek olarak verilebilir [10, 20, 21].

Kitosanın bitkilerde viral enfeksiyona karşı dayanıklılığı tetiklediği, hayvan hücrelerinde viral enfeksiyonu önlediği ve enfekte olmuş mikrobiyal kültürlerde faj enfeksiyonunun gelişimini önlediği belirtilmektedir [22]. Kitosan ve türevlerinin T2 ve T7 kolifajlar ile 1-97A, Gs2, Gs3, Gs5 ve Gs10 bakteriyofajların neden olduğu enfeksiyonları önlediği bildirilmiştir [22, 23, 24].

4.1. Kitosanın Antimikrobiyal Etki Mekanizması

4.1.1. Antibakteriyel Mekanizma

Kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte polikatyonik yapının antibakteriyel aktivite için ön koşul olduğu belirtilmektedir. Kitinden farklı olarak kitosan ve kitosan oligosakkaritleri yapılarında serbest amino grupları içerirler. Ortamın pH değerinin, kitosan ve türevlerinin sahip olduğu amino gruplarının pKa değerinden (6,3-6,5) düşük olması durumunda kitosan ve türevleri polikatyonik bir yapı kazanmaktadır. Antibakteriyel aktivitede başlıca rolü, polikatyonik formdaki kitosan ile mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan anyonik bileşenler (örneğin Gram-negatif bakterilerde lipopolisakkaritler ve hücre yüzey proteinleri) arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimin oynadığı bildirilmiştir [2]. Elektrostatik etkileşim sonucunda hücre yüzeyinde negatif ve pozitif yüklerin dağılımı farklılaşmakta ve böylece membran stabilitesi bozulmakta ve geçirgenliği değişmektedir. Membran geçirgenliğinin değişmesi ile besin maddeleri hücre içerisine girememekte veya hücre içi bileşenleri hücre dışına sızmakta ve bunların sonucunda da hücre ölümü gerçekleşmektedir [18, 25, 26]. Bu mekanizma elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Taramalı elektron mikroskobu ve geçirimli elektron

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

mikroskobu ile yapılan incelemelerde kitosan uygulanan hücrede morfolojik değişimlerin olduğu (yuvarlak şekilden yoğunlaşmış düzensiz kitle haline dönüştüğü), sitoplazma zarının hücre duvarından ayrıldığı ve sitoplazmada bulunan bileşiklerin kaogüle olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla araştırmacılar kitosan ve türevlerinin ilk etki ettiği yerin hücre duvarı olduğunu ve mikroorganizma ölümünün ise membran yapısının bozulmasından ileri geldiğini belirtmektedirler [27, 28].

Proton bağlama yeteneğine ilaveten kitosan iskeletine bağlı proton bağlayabilen amino gruplarının sayısı da elektrostatik etkileşimde önemli rol oynamaktadır [2, 29]. Kitosandaki amino grubu sayısını artırmak için formamidin ($\text{HN}=\text{CH}-\text{NH}_2$) ile reaksiyon sonucu amino grubu eklendiğinde (guanidin grubu eklenmiş kitosan) antibakteriyel aktivitenin arttığı gözlenmiştir [30]. Yine amino grubu sayısını artırmak için N-ucuna asparajin aminoasidi eklenmiş kitosan oligosakkaritlerinin, bakteri hücre duvarındaki negatif yüklü karboksil gruplarıyla daha kuvvetli etkileşime girdikleri saptanmıştır [31]. Tersine, amino grubuna etil karboksil eklenmiş kitosanın (N-karboksi etil kitosan) antibakteriyel aktivitesini tamamen yitirdiği belirlenmiştir [32].

Ortamın pH değeri kitosanın pKa değerinden yüksek olduğunda antibakteriyel aktiviteden sorumlu olan mekanizma elektrostatik etkileşimden ziyade hidrofobik etkileşimden ve şelatlama etkisinden kaynaklanmaktadır. Ortam pH'sının kitosanın pKa değerinden büyük olması durumunda doğal hidrofobisitesi düşük olan kitosanın inhibitör kapasitesi hücre duvarında bulunan iz metalleri şelatlamasından kaynaklanmaktadır. Lipofilik grupla modifiye edilmiş kitosan türevlerinde ise antibakteriyel aktivite hem hidrofobik etkileşim hem de şelatlama ile gerçekleşmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere nötral veya yüksek pH koşullarında kitosan türevleri normal kitosana göre daha yüksek inhibitör etki gösterebilmektedir [30, 33, 34].

Fiziksel durumu ve moleküler ağırlığı farklı olan kitosanların antibakteriyel etki mekanizmaları da farklılık gösterebilmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı suda çözünen kitosan ile ultra nanopartiküller kitosanlar bakteri hücre duvarından geçerek hücre içine girerler ve DNA ile birleşerek mRNA sentezini ve DNA transkripsiyonunu önleyip bakterileri imha ederler [25, 35]. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanlar ise bakteri hücre yüzeyi ile interaksyona girip hücre geçirgenliğinin değişmesine neden olarak [36] veya hücre etrafında geçirgen olmayan bir tabaka oluşturup hayati öneme sahip bileşiklerin hücre içerisine taşınmasını önleyerek etki göstermektedirler [37, 38].

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları farklılık sergilediğinden kitosanın antibakteriyel etki mekanizması da söz konusu bakterilerde farklı olabilmektedir. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında ince bir peptidoglukan tabakası ile lipopolisakkarit açısından zengin olan dış membran bulunmaktadır. Dış membran büyük moleküllere ve hidrofobik bileşiklere karşı bariyer görevi yaparak Gram-negatif bakterileri hidrofobik antibiyotiklere ve toksik maddelere karşı korumaktadır. Lipopolisakkaritler ise bakteriye hem hidrofilik bir yüzey kazandırmakta hem de dış zarın kararlılığında rol oynamaktadır. Lipopolisakkaritin lipit ve polisakkarit kısımlarında bulunan anyonik gruplar (fosfat ve karboksil) iki değerli katyonlarla (Mg^{+2} iyonları) elektrostatik etkileşime girerek lipopolisakkaritin kararlılığında rol oynamaktadırlar [39]. Bu katyonlar şelatlayıcı maddelerle örneğin etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile uzaklaştırıldığında dış membran kararsızlaşarak lipopolisakkarit molekülleri açığı çıkmaktadır. Bundan dolayı Gram-negatif bakterilere karşı bakterisidal bir etkinin oluşturulabilmesi için dış zarın kararsızlaştırılması gerekmektedir [33].

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı kalın bir peptidoglukan tabakasından oluşmakta ve ayrıca taykoik asitler de hücre duvarında bulunabilmektedir. Taykoik asitler, bazı Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan polianyonik polimerleridir. Taykoik asitler peptidoglukan tabakasındaki N-asetilmuramik aside bağlı (hücre duvarı taykoik asidi) bulunabildikleri gibi sitoplazmik zara bağlı (lipotaykoik asit) da olabilirler. Taykoik asitlerin yapısında bulunan polianyonik gruplar (gliserol fosfat, ribitol fosfat vb.) hücre duvarının kararlılığından sorumlu oldukları gibi zara bağlı birçok enzimin aktivitesinde de kritik rol oynamaktadırlar [2, 40].

Kitosanın antibakteriyel etki mekanizmasında bakteri hücre yüzey özellikleri de rol oynamaktadır. Birçok bakterinin yüzeyinde pili, fimbria ve flagella gibi çıkıntılar bulunmaktadır. Hatta bazı bakterilerin yüzeyinde mikolik asit, kapsüller polisakkaritler veya proteinler de yer almaktadır. Bu polimerler yüzeyle etkileşimde ve yüzeye tutunmada önemli rol oynamaktadırlar [41]. Hücre yüzeyinde bulunan bu polianyonlar da kitosan ve kitosan türevleri ile interaksyona girmektedirler. Gram-negatif bakterilerin hücre yüzeyindeki negatif yükler Gram-pozitif bakterilere göre daha fazla olduğundan kitosan ve türevleri Gram-negatif bakterilere daha kolay adsorbe olmakta ve dolayısıyla daha kuvvetli inhibitör etki göstermektedirler [42].

Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları arasındaki belirgin farka rağmen her iki bakteride de antibakteriyel etki hücre yüzeyi, hücre duvarı veya dış membranla kitosan ve türevleri arasındaki etkileşimle başlamaktadır. Gram-pozitiflerde kitosan, lipotaykoik asit ile etkileşime girerek membran fonksiyonunun bozulmasına neden olur [40]. Gram negatiflerde ortam pH değeri kitosan ve türevlerinin pKa değerinin altında olduğu zaman polikatyonik formdaki kitosan iki değerlikli metallerle polianyonlara bağlanmak için rekabet eder. Ancak pH değeri pKa değerinin üstünde olduğu zaman olay şelatlamaya dönüşür. Hücre duvarında bulunan Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının kitosan ve türevleriyle şelatlanması, hücre duvarı bütünlüğünün bozulmasına ve

Z. YILDIRIM, N. ÖNCÜL, M. YILDIRIM

hidroliz enzimlerinin aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır [43, 44]. Bakterileri dış ortama karşı koruyan hücre duvarları zarar gördüğünde hücre zarının fonksiyonları örneğin geçirgenliği de değişmektedir. Hücre zarında kitosan ve türevlerinin bağlanma noktaları fosfolipitler ve proteinlerdir. Kitosan ile hücre membranı arasındaki temas, membranda bulunan negatif yüklü fosfolipitler üzerinden gerçekleşmekte ve böylece membran geçirgenliği değişebilmektedir. Etkileşimin devam etmesiyle membran proteinleri denatüre olmakta ve kitosan fosfolipit tabakasının içine nüfuz etmektedir [33, 38, 44, 45]. Artan hücre geçirgenliği hücre membran kararlılığının bozulmasına ve hücre içi bileşiklerin (örneğin potasyum iyonları, düşük moleküler ağırlıklı proteinler, nükleik asitler, glukoz, laktat dehidrogenaz) hücre dışına taşınmasına ve sonuçta da hücrenin ölümüne neden olabilmektedir [2, 10, 44].

4.1.2. Antifungal Mekanizma

Kitosanın antifungal aktivitesinin mekanizması henüz tam olarak ortaya konulamamasına karşın bununla ilgili iki hipotez öne sürülmektedir. Birinci hipoteze göre antibakteriyel etkide olduğu gibi polikationik kitosan ve türevleri maya ve küf hücrelerinin yüzeyinde bulunan negatif yüklerle reaksiyona girerek hücre geçirgenliğinin değişmesine ve sonuçta da hücre içindeki elektrolitlerin ve aminoasitlerin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır. İkinci hipoteze göre ise kitosan, fungal hücrelerin içine girmekte ve sonra hayati öneme sahip bileşiklere adsorbe olarak mRNA veya protein sentezinin yavaşlamasına veya engellenmesine neden olmaktadır [46, 47, 48]. Her iki inhibisyon mekanizmasının kitosanın moleküler ağırlığı ile ilişkili olduğu, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın birinci mekanizmayla, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın kolay bir şekilde hücre içine girmesi nedeniyle ikinci mekanizmayla etki gösterdiği ifade edilmektedir [21]. Kitosanın çeşitli küflere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunun % 0,0018-0,1000 arasında değiştiği belirtilmektedir. Küflere karşı aktivite, kitosanın konsantrasyonu, ortamın pH değeri, kitosanın polimerizasyon derecesi ile ortamda lipit ve protein gibi bileşiklerin bulunup bulunmamasına göre değişkenlik sergileyebilmektedir [18, 49]. Kitosanın funguslar üzerindeki etkisinde kitosan konsantrasyonunun kilit faktör olduğu ve *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* ve *Penicillium digitatum* küflerinin gelişmelerinin tamamen önlenmesi için gerekli kitosan konsantrasyonun % 3 olduğu ifade edilmektedir [50, 51]. Yüksek moleküler ağırlıklı dörtlü amonyum kitosan türevlerinin, kitosan ve düşük moleküler ağırlıklı türevlerine kıyasla *Botrytis cinerea* Pers. ve *Colletotrichum lagenarium*'a karşı antifungal aktivitelerinin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur [21]. Guo ve ark. [52], yüksek molekül ağırlıklı kitosanları besiyerine eklediklerinde *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Alternaria solani* ve *Valsa mali*'de miselyum gelişiminin inhibe olduğunu ifade etmişlerdir. Düşük molekül ağırlıklı kitosanın % 0,01-1,00 düzeyinde uygulanması durumunda *Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum*'da miselyum gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir [53]. Benzer şekilde kitosanın molekül ağırlığının *Rhizopus stolonifer*'in gelişimi, miselyumların uzaması ve spor çimlenmesinin inhibisyonu üzerinde etkili olduğu ve ayrıca morfolojik değişimlere de neden olduğu bildirilmiştir. Hernandez-Lauzardo ve ark. [54] tarafından gerçekleştirilen çalışmada kitosanın molekül ağırlığının *Rhizopus stolonifer* küfüne karşı inhibitör etkisinde önemli bir parametre olduğu ortaya koyulmuştur. Düşük molekül ağırlıklı kitosanın *Rhizopus stolonifer* miselyumlarının gelişimi üzerine en yüksek antifungal etkiye sahip olduğunu ve kitosan konsantrasyonu arttıkça bu inhibitör etkinin de bir miktar arttığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, yüksek molekül ağırlıklı kitosanların düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanlara göre *Rhizopus stolonifer* sporilasyonu, spor şekli ve sporlarının çimlenmesi üzerinde daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada, düşük molekül ağırlıklı kitosanın *Rhizopus stolonifer*'e karşı inhibitör aktivitesinin kullanılan konsantrasyona bağlı olduğu ortaya konulmuştur. *Rhizopus stolonifer*'e karşı maksimum antifungal aktivite 2 mg/mL düzeyinde kitosan uygulandığında gözlenmiştir. Belirtilen konsantrasyonda kullanıldığında miselyum gelişiminin önlenmesi, hücre dışına potasyum iyonu sızıntısının maksimum düzeyde olduğu ve sitoplazma zarında bulunan H⁺-ATPaz enzim aktivitesinin yaklaşık % 33 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca kitosan uygulanan örnekte besiyeri pH değerinin arttığı (5,4'den 6,9'a), kontrol örneğinde ise azaldığı (pH 5,4'ten 4,4'e) gözlenmiştir [55].

4.1.3. Antiviral Mekanizma

Kitosanın virüs ve bakteriyofajlara karşı aktivitesinde de yapısında bulunan pozitif yüklerin önemli olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda kitosanın anyonik türevlerinin örneğin 6-O-sülfat ve N-suksinat-6-O-sülfatın faj enfeksiyonu üzerine hiçbir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir [23, 24]. Anyonik kitosan türevlerinin antiviral etkilerinin düşük ve deasetilasyon derecesi yüksek kitosanların antiviral etkilerinin de yüksek olması kitosanın yapısında bulunan pozitif yüklü grupların antiviral aktiviteden sorumlu olduğunu göstermektedir [56]. Ayrıca % 50 deamine edilmiş kitosan türevlerinin antiviral etkilerini kaybetmeleri de pozitif yüklerin antiviral aktivite için önemini bir kez daha ortaya koymuştur [23].

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

Kitosan ve türevlerinin bakteriyofajlara karşı antiviral aktivitesi molekül ağırlığına, molekül yapısına, deasetilasyon derecesine ve bakteriyofaj tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [56]. Kitosanın bakteriyofajların çoğalmasımı birkaç farklı mekanizma ile inhibe ettiği öne sürülmektedir. Kitosan (i) konakçı bakteri hücrelerinin canlılığını azaltarak, (ii) olgun ve/veya yeni faj partiküllerinin enfekte etme yeteneklerini engelleyerek ve (iii) virülant fajların çoğalmasımı (replikasyonunu) bloke ederek antiviral aktivitesini gösterebilmektedir [22]. Ayrıca polimerizasyon derecesi düşük kitosan oligosakkaritlerinin faj partiküllerinin yapısında özellikle reseptör tanıma bölgelerinde değişime neden olarak da fajlara etki edebildiği belirtilmektedir [56].

Kitosanın viral replikasyonun hangi aşamasında etkili olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Faj adsorpsiyonundan sonra kültür ortamına kitosan ilavesinin, faj inokülasyonundan önce kitosan ilavesi kadar etkili olduğu bildirilmektedir. Bundan dolayı kitosanın faj adsorpsiyonunu önleyerek antiviral etki göstermesi mümkün değildir. Büyük bir olasılıkla kitosan bakteriyofaj replikasyonunun belirli aşamalarını bloke ederek antiviral etki göstermektedir. Bu yüzden kitosan tarafından faj enfeksiyonunun önlenmesinde kitosanın temel işlevi ya faj partiküllerinin inaktivasyonu ya da faj çoğalmasımın önlenmesi şeklindedir. Faj enfeksiyonunun önlenmesinde her bir işlevin oransal katkısı, kitosanın moleküler yapısına ve bakteriyofajın tipine bağlıdır [22].

Faj partiküllerinin inaktivasyonunun kitosanın polimerizasyon derecesi ile ilişkili olduğu ve dolayısıyla aynı konsantrasyonlarda polimerizasyon derecesi yüksek (250 ve daha yüksek polimerizasyon dereceli) kitosanların polimerizasyon derecesi düşük (15-19 polimerizasyon dereceli) kitosanlara göre T2, T4 ve T7 kolifajlara karşı daha fazla etkili oldukları tespit edilmiştir. Diğer taraftan kitosan oligosakkaritlerinin yüksek moleküler ağırlıklı kitosanlara göre *Bacillus thuringiensis*'de 1-97A fajının replikasyonuna karşı daha etkili oldukları ortaya konulmuştur [24]. Bu çelişkili sonuçlara yol açan faktörler henüz belirlenmiş değildir.

Bitki yapıklarına kitosan uygulandığında viral enfeksiyonun kontrol altına alındığı ve virüslerin neden olduğu yerel yaranlama sayısında azalma sağlandığı bildirilmektedir [56]. Hayvan hücrelerinde yapılan çalışmalarda da kitosanın hayvanların bağışıklık sistemlerini uyararak veya virüsün bağlanma reseptörleri ile hayvan hücrelerinin viral reseptörleri arasında gerçekleşen etkileşimi önleyerek antiviral etki sergilediği ifade edilmektedir [56, 57].

4.2. Antimikrobiyal Aktiviteyi Etkileyen Faktörler

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerine birçok faktör etkilidir. Bu faktörler, (a) mikrobiyal faktörler, (b) kitosanın moleküler özellikleri ile ilgili faktörler, (c) kitosanın fiziksel özellikleri ile ilgili faktörler ve (d) çevresel faktörler olmak üzere başlıca 4 grupta toplanmaktadır [2].

4.2.1. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Mikrobiyal Faktörlerin Etkisi

4.2.1.1. Mikroorganizma Türü

Geniş antimikrobiyal spektruma sahip olan kitosan mikroorganizma türüne bağlı olarak farklı düzeylerde inhibitör aktivite göstermektedir. Bazı araştırmacılar kitosanın antibakteriyel aktivitesinin Gram-negatif bakteriler üzerine daha kuvvetli olduğunu belirtmesine [42, 58] karşın başka araştırmacılar Gram-negatif bakterilerin koruyucu dış membrana sahip olmaları nedeniyle Gram-pozitif bakterilerin kitosana daha fazla duyarlı olduklarını [59] ifade etmektedirler. Hatta bazı araştırmacılar Gram-pozitif ve negatif bakterilere karşı kitosanın antibakteriyel aktivitesi arasında önemli bir farkın olmadığını da belirtmektedirler [60]. Çalışmalarda farklı sonuçlar alınmasının nedeni olarak, başlangıç materyallerinin ve deney koşullarının farklılığı gösterilmiştir [2]. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ilgili literatür bilgileri farklılık gösterse de genel olarak maya ve küflerin kitosana en duyarlı grup oldukları, bunları Gram pozitif ve sonra da Gram negatif bakterilerin takip ettiği kabul edilmektedir. Mikroorganizma gruplarının kitosana karşı duyarlılıklarındaki değişkenlikten temel olarak membran bileşimi, yapısı, kalınlığı ve yük dağılımındaki farklılığın sorumlu olduğu bildirilmiştir [61].

4.2.1.2. Hücre Yaşı

Belli bir mikrobiyal hücrenin yüzeysel yük dağılımı gelişme fazına bağlı olarak farklılık gösterdiğinden kitosanın antimikrobiyal aktivitesi de gelişme fazına bağlı olarak değişebilmektedir [49]. Yapılan çalışmalarda *S. aureus* CCRC 12657 [62] ve *E. coli*'nin geç logaritmik fazda [49] kitosana karşı çok duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ancak *E. coli* O157:H7'nin kitosan türevlerine karşı en fazla orta-logaritmik fazda, en az ise durgun fazda duyarlı oldukları gözlenmiştir [63]. Mikroorganizmalar arasındaki bu farklılığın hücre yüzeyindeki yük dağılımının mikroorganizma türüne bağlı olarak da değişkenlik göstermesinden kaynaklandığı belirtilmiştir [64].

4.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Kitosanın Moleküler Özelliklerinin Etkisi

4.2.2.1. Pozitif Yük Yoğunluğu

Yüksek pozitif yük yoğunluğu kuvvetli elektrostatik etkileşime neden olduğundan antimikrobiyal aktivitede çok önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Pozitif yük kitosan veya türevlerinin deasetilasyon derecesi ile ilişkilidir [2]. Yüksek deasetilasyon derecesi (% 97,5) yüksek pozitif yük yoğunluğuna neden olduğundan deasetilasyon derecesi yüksek olan kitosanın antimikrobiyal aktivitesi de deasetilasyon derecesi orta seviyede olan kitosana göre daha fazladır. Dolayısıyla deasetilasyon derecesinin artmasıyla birlikte kitosanın antibakteriyel aktivitesi de artmaktadır [33, 65]. Ayrıca molekülde bulunan disakkaritin tipi ve disakkaritlerin yer değiştirme derecesi de kitosanın *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesinde önemlidir. Araştırmacılar, *E. coli* ve *S. aureus*'un test edilen disakkarit-kitosan türevleri içinde yer değiştirme derecesi % 30-40 olan sellobiyoz-kitosan türevleri ile maltoz-kitosan türevlerine karşı çok duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Bu farklılığın, yer değiştirme derecesinin kitosan moleküllerinin pKa değerini değiştirmesinden ve bu yüzden de aynı pH koşullarında kitosan türevlerinde doğal kitosana göre daha fazla pozitif yük oluşmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [66].

Kitosanın, gümüş ve çinko gibi metal iyonlarıyla kompleks oluşturması durumunda antimikrobiyal spektrumunun genişlediği ve antimikrobiyal aktivitesinin 4-20 kat arttığı belirlenmiştir [60, 67]. Dörtlü amonyum grubu eklenmiş kitosan ve metal iyonu ile kompleks oluşturan kitosanda pozitif yük yoğunluğu arttığından söz konusu kitosanların antibakteriyel aktiviteleri de artmaktadır [60, 68, 69].

4.2.2.2. Moleküler Ağırlık

Kitosanın molekül ağırlığı ile bakterisidal aktivitesi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan birçok çalışmada çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda kitosanın moleküler ağırlığının artmasıyla *E. coli*'ye karşı aktivitesinin azaldığı, bazı çalışmalarda aktivitesinin arttığı, diğerlerinde ise molekül ağırlığın inhibitör aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [2, 34]. Ancak genel olarak düşük moleküler ağırlıklı kitosanların (<10 kDa) bakteri, maya ve küflere karşı inhibitör aktivitesinin daha iyi olduğu kabul görmüştür. Bununla birlikte antimikrobiyal aktivite için en az 7 glukozamin ünitesinin gerekli olduğu bildirilmiştir [34, 61]. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın hücre duvarı üzerine adsorbe olarak, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın ise hücre içine girerek inhibitör etki gösterdiği bildirilmektedir [21].

4.2.2.3. Hidrofilik/Hidrofobik Oran

Sudaki çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle kitosanın kullanımı oldukça sınırlıdır [15]. Kitosan ve türevlerinin suda çözünme özelliklerini iyileştirmek ve kullanımlarını yaygınlaştırmak amacıyla kimyasal modifikasyonlara başvurulmaktadır. Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında suda çözünen kitosan ve türevlerinin elde edilmesinde en çok kullanılan kimyasal yöntemler sakkarilizasyon, alkilasyon, akilasyon, dörtlü amonyum grubu eklenmesi ve metalizasyondur [69]. Örneğin dörtlü amonyum grubu kitosanın hidroksil veya amino grubuna bağlandığında antimikrobiyal aktivitesinin arttığı ve inhibitör spektrumunun normal kitosana göre genişlediği belirlenmiştir [68].

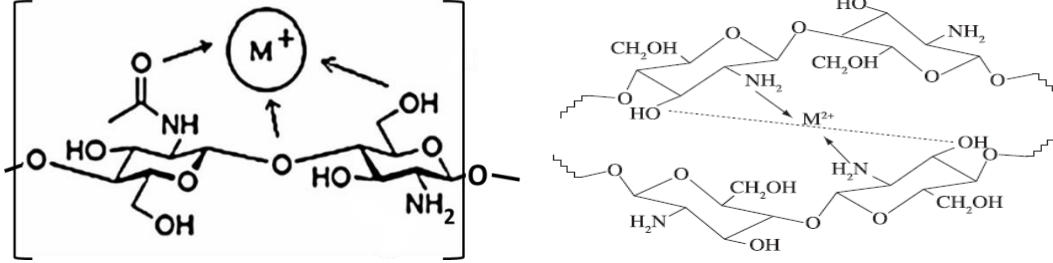
Polimerlerin yapısında ve yük yoğunluğundaki değişime bağlı olarak sitoplazmik zarla etkileşimleri ve dolayısıyla etki mekanizmaları direkt olarak farklılaşabilmektedir. Kitosan türevlerinin hidrofilik/hidrofobik oranlarının değişimi antimikrobiyal özelliklerini etkilemektedir [70]. Kitosanın amino grubuna değişik zincir uzunluğundaki akil gruplarının bağlanması, hidrofobik özelliği artırması nedeniyle bakteriyel hücre ile etkileşimini ve inhibitör etkisini arttırdığı belirlenmiştir [30, 34, 71]. Akil grubu eklenmesiyle antibakteriyel aktivite artışındaki en önemli etkenin akil grubunun zincir uzunluğu olduğu ifade edilmektedir. N-hekzanoil kitosan sülfatın hidrofobitesinin, N-propanoil kitosan sülfattan daha yüksek olması nedeniyle inhibitör etkisinin de daha fazla olduğu bildirilmiştir [71].

4.2.2.4. Şelatlama Kapasitesi

Kitosanın metalleri bağlama yeteneği ilginç bir şekilde geçiş metalleri (Au, Ag, Cu, Cr, Ni, Zn, Mn, Co, Mo, Fe, Hg, Pd, Cd gibi ağır metaller) ile sınırlı kalmaktadır; zira d ve f orbitalleri içermeyen alkali (Li, Na, K, Rb, Cs ve Fr) ve toprak metalleri (Be, Mg, Ca, Ba, Sr ve Ra) kitosana iyi bir şekilde bağlanamamaktadırlar. Bu durum kitosana ağır metalleri seçici bir şekilde bağlama yeteneği kazandırmaktadır. Kitosan farklı mekanizmalarla hem metal katyonları (Şekil 3) hem de metal içeren anyonları bağlayabilmektedir. Katyonlar

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

iyon-dipol etkileşimi ile elektronegatif oksijen ve azot atomlarına, anyonlar ise asidik koşullarda elektrostatik çekim ile protonlanmış amino gruplarına bağlanırlar [72]. Kitosan farklı endüstrilerde metal iyonlarının uzaklaştırılması veya geri kazanılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. Mikroorganizmaların hücre duvarı molekülleri ile etkileşimde bulunan metal iyonları (örneğin Mg iyonları) hücre duvarı kararlılığının korunmasında çok önemli rol oynamaktadırlar. Dolayısıyla kitosan metal iyonlarını şelatlayarak antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedir [18, 33].



Şekil 3. Kitosanın metal bağlama yeteneği

4.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Kitosanın Fiziksel Özelliklerinin Etkisi

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi kitosan ile hücre duvarı molekülleri arasında meydana gelen bir seri reaksiyon sonucunda oluşmaktadır. Reaksiyonlardan sorumlu olan moleküllerin yapıları da antimikrobiyal aktivite üzerinde önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla moleküllerin yapılarına bağlı olarak kitosanın fiziksel durumu antimikrobiyal aktivitede önemli bir rol oynamaktadır [2].

4.2.3.1. Çözünür Durumda Antimikrobiyal Aktivite

Çözünür kitosan ve türevlerinin antibakteriyel aktiviteleri daha yüksektir. Kitosan türevlerinin test edilen bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarının normal kitosana göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun temel nedeni çözünür kitosan türevlerinin reaksiyona hazır olmaları ve hızla reaksiyona girmeleridir [69, 73, 74]. Yapılan çalışmalarda Maillard reaksiyonu ile üretilen kitosan türevlerinin (kitosan ile maltoz, glukoz, früktoz ve glukozamin) çözünürlüklerinin arttığı ve bunlardan özellikle kitosan-glukozamin türevinin diğer kitosan türevlerine göre daha yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [74]. Dörtlü amonyum bileşikleri, kitosan molekülüne hem hidrofilik gruplar hem de pozitif yük kazandırdığından çözünürlük ile antibakteriyel aktivitenin birlikte artmasına neden olmaktadır [69].

4.2.3.2. Katı Durumda Antimikrobiyal Aktivite

Çözünür kitosanla karşılaştırıldığında lif, membran, hidrojel, mikroküre ve nanopartikül gibi katı kitosan türevleri çözücüyle sadece yüzeysel bir temas oluşturur. Kitosanın fiziksel durumundaki değişim antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir. Nanopartikül halindeki kitosanın serbest çözünür formdaki polimerlere göre *S. aureus*'a karşı inhibitör etkisinin daha az olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar kitosan nanopartiküllerinin inhibitör aktivitesinin düşük olmasının negatif yüklü bakteri hücre duvarı ile reaksiyona girecek pozitif yüklerin nanopartiküllerde daha az bulunmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir [75]. Ancak başka araştırmacılar kitosan nanopartiküllerinin bakteri hücrelerine yüksek ilgi gösterdikleri için (kuantum-boyut etkisi) normal kitosana göre daha yüksek antibakteriyel aktivitede olduklarını belirlemişlerdir [28].

4.2.4. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisi

4.2.4.1. pH

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi pH'ya bağlıdır. Kitosan düşük pH değerlerinde kuvvetli antimikrobiyal aktivite gösterdiğinden pH değerinin yükselmesiyle inhibitör aktivitesi zayıflamaktadır [33, 76]. Çünkü kitosan sadece asidik ortamda çözünmekte ve antimikrobiyal aktivite için kritik olan polikatyonik forma yalnızca ortam pH'sının kitosanın pKa değerinin (6,3-6,5) altında olması durumunda geçebilmektedir [77]. Ancak kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin nötral pH değerinde tamamen kaybolmadığı birçok araştırmacı

Z. YILDIRIM, N. ÖNCÜL, M. YILDIRIM

tarafından ortaya konmuştur. N-alkil kitosan türevlerinin *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitelerinin pH 5,0'ten itibaren artmaya başladığı ve pH 7,0-7,5'e yükseldiğinde ise maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir [66].

4.2.4.2. İyonik Güç

Ortamin iyonik gücündeki herhangi bir değişim kitosanın inhibitör aktivitesini etkileyebilmektedir [78]. Ortamdaki metal iyonlarının özellikle de iki değerlikli iyonların konsantrasyonunun artması (Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} gibi) kitosanın şelatlama kapasitesini azaltacağından antibakteriyel aktivitesi de azalmaktadır [33, 79]. Ayrıca ortamda bulunan katyonlar bakteri hücre duvarında bulunan negatif yüklere bağlanmak için polikationik kitosanla yarışmaya gireceklerinden antimikrobiyal aktivitenin azalmasına neden olabileceklerdir [2]. Ortama anyonlar ilave edildiğinde de kitosanın antimikrobiyal aktivitesi etkilenmektedir. Anyonların etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada ortama ilave edilen fosfat gruplarının (PO_4^{-3}) konsantrasyonunun artmasıyla oleoil kitosan nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [80]. Katyonik özellikteki kitosanın aljinat, pektin ve protein gibi birçok gıda bileşenine ve polifosfat gibi inorganik polielektrolitlere bağlanma potansiyeli bulunmaktadır [61].

5. KİTOSANIN GIDA ENDÜSTRİSİNDEKİ UYGULAMALARI

Kitosan ve türevleri gıda endüstrisinde antimikrobiyal, antioksidan, emülgatör, kalınlaştırıcı, stabilizör, durultucu ve asitlik giderici, enzimatik esmerleşmeyi önleyici ve diyet lif kaynağı olarak uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca kaplama ve yenilebilir film üretiminde, enzim immobilizasyonunda ve besin maddelerinin enkapsülasyonunda da kullanılmaktadır [81, 82]. Ancak, inhibitör spektrumunun geniş, doğal ve insan sağlığı açısından güvenli olmasından dolayı kitosan ve türevleri gıda endüstrisinde daha çok gıda koruyucusu olarak uygulama alanı bulmaktadır. Bu amaçla daha çok ambalaj materyalinin bir parçası olarak kullanılarak gıdalarda mikroorganizmaların gelişmeleri önlenmekte ve böylece gıdanın kalitesi ve raf ömrü iyileştirilmektedir [19, 83, 84]. Antimikrobiyal özelliğinin yanı sıra kitosan gıda sanayinde elma suyu [85] ve sirke [86] üretiminde berraklaştırma maddesi, sosis üretiminde antioksidan [6], liçi [87], elma ve armut suyu [88] ile patateste [89] enzimatik esmerleşmeyi önleyici madde ve meyve sularında asitlik giderici ajan [90] olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca kitosan su bağlama ajanı olarak da rol oynayarak birçok enzimi inhibe edebilmektedir [91]. Bilindiği üzere gıdalar farklı bileşiklerin (karbonhidrat, protein, yağ, mineral, vitamin vb.) karışımından oluşmaktadır. Dolayısıyla bu bileşenlerden bazıları kitosanla reaksiyona girerek antimikrobiyal aktivitesinin artmasına veya azalmasına neden olabilir. Çeşitli gıda bileşenlerinin kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, nişasta, peyniraltı suyu proteinleri ve tuzun (NaCl) kitosanın inhibitör aktivitesini olumsuz yönde etkilediği, yağın ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [92].

Biyolojik uyum gösteren ve toksik olmayan bir polimer olarak değerlendirilen kitosanın Japonya, Güney Kore, İtalya ve Finlandiya'da gıda uygulamalarında ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ise yara tedavisi ile ilgili uygulamalarda kullanımına onay verilmiştir [7].

5.1. Ekmekteki Uygulamaları

Kitosanla kaplamanın ekmeğin yüzeyinden nem kaybına engel olduğu ve böylece ağırlık kaybı olmadığı, sertleşme ve retrogradasyonun geciktirildiği ifade edilmiştir. Buna paralel olarak kitosanla kaplanan ekmeğin raf ömrünün kontrol örneğine göre 24 saat kadar uzayabildiği belirtilmiştir [93]. Başka bir çalışmada da kitosanla kaplamanın mikrobiyal gelişimi inhibe ederek ve retrogradasyonu geciktirerek ekmeğin kalitesi ile raf ömrünü iyileştirdiği gözlenmiştir [94]. Lee ve ark. [95] yaptıkları bir çalışmada yüksek molekül ağırlıklı (30 ve 120 kDa) kitosanın düşük molekül ağırlıklı (1,5 kDa) kitosana göre ekmeğin raf ömrünü artırmada daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

5.2. Meyve ve Sebzelerdeki Uygulamaları

Meyvelerin raf ömrünü belirleyen önemli hususlar, küf gelişimi, fizyolojik bozulmalar ve fiziksel hasarlardır. Meyvelerde gözlenen mikrobiyal bozulma daha çok küf kaynaklıdır. Kitosan kaplama ve filmleri CO_2 'e göre O_2 'ne karşı daha fazla geçirgen olduklarından meyvelerin kitosanla kaplanması durumunda anaerobik solunum önlenmekte, solunum hızı azaltılmakta, küf gelişimi inhibe edilmekte, etilen sentezi ve karbondioksit geçişi azaltılarak olgunlaşma geciktirilmektedir. Kitosanla kaplama işlemi meyve dokularındaki atmosferi

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

değiştirdiğinden ve antifungal etki gösterdiğinden meyvelerin depolama ömrünü iyileştirmekte ve meyve çürümesini kontrol altına alabilmektedir [19, 51, 96-99].

Domates ile yapılan bir çalışmada kitosana kaplama işleminin depolama esnasında solunum hızını, etilen üretimini ve ağırlık kaybını azalttığı, yumuşamayı ve kırmızı pigmentasyonu geciktirdiği belirlenmiştir [100, 101]. Kitosana kaplanan elma [102], muz [103], narenciye [104, 105], mango [103, 106], şeftali [107], havuç [108] ve marulda da [92] solunum hızının ve etilen üretiminin azaldığı, çürümenin kontrol altına alındığı ve yumuşamanın geciktiği gözlenmiştir.

Çok çabuk bozulan ve raf ömrü çok kısa olan çileğin, kitosana kaplanması durumunda raf ömrünün arttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur [99, 109]. Çilekte bozulmanın kontrol altına alınmasında kitosanın antifungal özelliği ve/veya savunma enzimlerini (kitinaz ve β -1,3-glukanaz) tetikleme yeteneğinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir [110].

Liçi meyvesinde hasattan sonra gözlenen esmerleşmenin nedeni polifenol oksidaz enzimi aktivitesi, antosiyaninin hidrolizi ve o-kinonların melaninlere enzimatik olmayan polimerizasyonu sonucunda gerçekleşmektedir [87]. Yapılan çalışmalarda kitosanın, polifenol oksidaz aktivitesindeki artışı önlediği, antosiyanin, flavonoid ve toplam fenolik bileşiklerde meydana gelen değişimi geciktirdiği ve dolayısıyla liçi meyvesinde esmerleşmeyi önlediği belirlenmiştir [87, 111]. Ayrıca bazı araştırmacılar kitosana kaplama işlemiyle meyvelerin besin içeriğinin (örneğin kalsiyum, E vitamini) artırılabilirliğini de ortaya koymuşlardır [97].

5.3. Meyve Suyundaki Uygulamaları

Proton bağlayabilme yeteneği kitosana asit giderici özellik kazandırmaktadır. Ayrıca katyonik ve makromoleküler yapısı nedeniyle kitosana durultma ajanı olarak da kullanılabilir. Bu nedenle kitosanın gıda işleme atık sularında ve meyve suyu üretiminde koloidal ve dispers formda bulunan partiküllerin uzaklaştırılmasında etkili olabileceği belirtilmiştir [112]. Yapılan çalışmalarda elma, üzüm, limon ve portakal suyunda durultucu olarak çözünür kitosana kullanıldığında meyve sularının bentonit ve jelatine oranla daha berrak olduğu ve ayrıca meyve sularının kabul edilebilirliklerinin de arttığı belirlenmiştir [113, 114].

Kitosana meyve sularının asitliğini kontrol etmek amacıyla da kullanılabilir. Kitosanın, havuç ve elma suyunun titrasyon asitliğinde önemli bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir [90]. Ayrıca elma ve armut suyu üretiminde kitosana kullanımının enzimatik esmerleşmeyi önlediği de belirlenmiştir [88]. Rhoades ve Roller [115] yaptıkları çalışmada, kitosanın elma suyunda mayaların gelişimini tamamen önlediğini ancak laktik asit bakterileri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir.

5.4. Et ve Ürünlerindeki Uygulamaları

Et ve et ürünleri yüksek yağ içeriklerinden dolayı lipit oksidasyonuna ve ayrıca yüksek besin içeriğinden dolayı da mikrobiyal bozulmaya oldukça duyarlıdır. Kitosana antioksidan ve antibakteriyel aktivitesinden dolayı depolama esnasında et ve ürünlerinde lipit oksidasyonunu geciktirerek, bozulma etmeni ve patojen bakterilerin gelişimini önleyerek ürünlerin raf ömrünün, duyu ve mikrobiyal kalitesinin iyileşmesinde etkili olabilmektedir [58, 116]. Sığır etine % 1 oranında kitosana ilave edildiğinde tiyobarbitirik asit (TBA) değerinin kontrol örneğine kıyasla % 70 oranında azaldığı belirlenmiştir. Depolama süresince etin kırmızı renginin korunmasında da kitosanın olumlu etkisinin bulunduğu kaydedilmiştir [117].

Sığır eti % 1'lik kitosana çözeltisine ve bunun arkasından % 5'lik trisodyum fosfat çözeltisine daldırıldığında aerobik bozulma etmeni mikroorganizmaların gelişimlerinin etkili bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur [118]. Kitosana-glutamat % 3 oranında sığır eti veya hindi eti kıymasına ilave edildiğinde *Clostridium perfringens* sporlarının çimlenmesinin ve gelişmesinin azaldığı belirlenmiştir [119]. Soğutulmuş domuz ürünlerinde % 0,3 ve % 0,6 düzeyinde kullanılan kitosana-glutamatın etkili bir koruyucu olduğu ve 4°C'de 18 gün süreyle yapılan depolama sonucunda toplam bakteri, maya, küf ve laktik asit bakterileri sayılarının 3 log'a kadar azaldığı belirlenmiştir [83]. Wu ve ark. [120] sığır eti köftelerinin kitosana filmleri ile kaplanmasının lipit oksidasyonunu önlenmede çok etkili olmadığını bulmuşlardır. Bunun temel nedeni olarak kitosana filmlerinin O₂ geçirgenlik özelliklerinin yüksek olması gösterilmiştir.

Radyasyona tabi tutulmuş kitosana et ve ürünlerinde oksidasyonu ve mikrobiyal bozulmayı geciktirdiği belirlenmiştir [121, 122]. Araştırmacılar radyasyona maruz bırakılan kitosana antioksidan kapasitesinin 6 kat arttığını ve bu kitosana et ürünlerinde TBA değerini % 54-88 oranında azalttığını bulmuşlardır [121].

Sosis üretiminde kitosana sodyum nitrit yerine kürleme ajanı olarak kullanım olanakları konusunda da çalışmalar yapılmıştır. % 0,3 laktik asitte çözündürülmüş kitosana % 0,2 oranında yalnız veya % 0,005 nitritle birlikte kullanıldığında % 0,01 oranında kullanılan sodyum nitritle aynı koruyucu etkiyi gösterdiği saptanmıştır

Z. YILDIRIM, N. ÖNCÜL, M. YILDIRIM

[123]. Kalite ve depolama stabilitesini etkilemeden kitosanın sosiste sodyum nitrit kullanım oranını (150 ppm) yarı yarıya düşürdüğü belirlenmiştir [124]. Koruyucu etkisine ilaveten kitosanın sosiste kalıntı nitrit miktarını azalttığı da saptanmıştır [125]. Kitosanın sosisin duyuşal özelliklerinden renk, aroma, görünüm ve yapıyı olumsuz yönde etkilemediği [126, 127], hatta aerobik paketlenen sosislerde kitosanın yağ oksidasyonunu azalttığı belirlenmiştir (127).

5.5. Süt ve Ürünlerindeki Uygulamaları

Kitosanın sütte kullanılabilirliği ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Sade süte % 0,5 oranında kitosan ilavesinin renk, tat ve aromayı olumsuz yönde etkilediği ve esmerleşmeyi arttırdığı ancak, duyuşal özellikte gözlenen bu olumsuzlukların kahve aromalı sütte gözlenmediği bildirilmiştir [128]. Muz aromalı süte kitosan ilavesinin mikrobiyal gelişmeyi tamamen önlediği ve kitosan içeren sütün pH değerinin kontrol örneğine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [129].

Kitosan mikroorganizmaların lag fazlarının uzamasına ve mikrobiyal yoğunluğun azalmasına neden olduğundan süt ürünlerinin muhafazasında kitosan kaplama ve filmleri potansiyel kullanım olanağına sahiptirler [19, 84]. Kitosana kaplama işleminin peynirde *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un gelişimini inhibe ettiği, ancak Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir [130]. Kitosan lizozim enzimi ile birlikte film ve kaplama amacıyla kullanıldığında Mozzarella peynirinde *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens* ile maya ve küflerin gelişimini inhibe ettiği [131] ve raf ömrünü iyileştirdiği [132] rapor edilmiştir. Kitosan filmleri peynir paketlenme amacıyla kullanıldığında peynir üretiminden sonra gözlenen mikrobiyal bulaşmaların önleniği belirtilmiştir [84].

5.6. Deniz Ürünlerindeki Uygulamaları

Deniz ürünleri oksidasyona ve mikrobiyal bozulmaya karşı oldukça duyarlıdır. Yapılan çalışmalarda kitosanın deniz ürünlerinde antioksidan etki gösterdiği ve bu etkinin moleköl ağırlığı ile kullanım konsantrasyonuna bağılı olduğu bildirilmiştir [116, 133]. Moleköl ağırlığı 30 kDa olan kitosanın 90 ve 120 kDa olanlara göre daha fazla antioksidan etki oluşturduğu ve kullanım miktarı arttıkça oksidasyonu önleme etkisinin de arttığı belirtilmiştir [133]. Kitosana kaplanan filetolarda lipit oksidasyonunun, kimyasal bozulmanın (toplam uçucu azotlu bileşikler, trimetilamin ve hipoksantin) ve mikrobiyal gelişimin kontrol örneğine göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir [134].

5.7. Yumurtadaki Uygulamaları

Kitosana kaplama işleminin tüketici tercihlerini etkilemeksizin yumurta kalitesinin korunmasında oldukça etkili bir yol olduğu vurgulanmaktadır. Kitosanın, albüminden yumurta kabuğuna doğru nem ve gaz geçişine engel olduğu ve böylece yumurtanın raf ömrünü ve kalitesini iyileştirdiği belirtilmektedir [19, 135-137]. Caner [137] kitosana kaplanan (% 1 asetik asit içerisinde % 3 kitosan) yumurtaların raf ömürlerinin 25°C'de kontrol örneğine göre en az 2 hafta daha uzun olduğunu bildirmiştir. Kitosana kaplanan yumurtaların organoleptik özelliklerinin kitosana kaplanmayan kontrol örneğinden farklı olmadığı da belirtilmiştir. Araştırmacı ayrıca 25°C'de 4 hafta depolama işleminde kitosana kaplanan yumurtanın albümin pH'sının 7,49'dan 8,83'e, kontrol örneğinde ise 7,48'den 9,30'a yükseldiğini belirtmiştir. Bu sonuçlar kitosana kaplama işleminin bir gaz bariyeri olarak rol oynadığını ve dolayısıyla nem ve karbondioksitin kabuktan geçmesini engellediğini doğrulamaktadır. Kitosan-lizozim karışımı ile kaplanan ve 10°C'de depolanan yumurtalarda *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, koliform, maya ve küflerin gelişiminin inhibe olduğu, nem kaybı ve pH değişimlerinin geciktiği bildirilmiştir [138, 139].

5.8. Mayonezdeki Uygulamaları

Bazı araştırmacılar, kitosanın ticari mayonez üretiminde emülgatör olarak kullanılabilceği yönünde bulgular elde etmişlerdir [140, 141].

SONUÇLAR

Kitosan, kitinin alkali koşullarda kısmen veya tamamen deasetilasyonu ya da kitin deasetilaz enzimi vasıtasıyla enzimatik deasetilasyonu ile elde edilen ve bu nedenle β -(1,4) bağı ile bağlanmış değişen oran ve sayıda D-

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminden oluşan düz zincirli bir kopolimerdir. Doğada yaygın ve bol miktarda bulunması, yüksek canlılara karşı toksik etki göstermemesi, mikroorganizmaları inhibe etmesi, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyo-uyumlu olması gibi özellikleri nedeniyle kitosan başta gıda olmak üzere kozmetik, ziraat, tıp, tekstil, biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanım olanağı bulmaktadır. Gıdalar farklı bileşenlerin (karbonhidrat, protein, yağ, mineral, vitamin vb.) karışımından oluşmaktadır. Dolayısıyla bu bileşenlerden bazıları kitosana reaksiyona girerek antimikrobiyal aktivitesinin artmasına veya azalmasına neden olabilmektedir. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ilgili literatür bilgileri farklılık gösterse de genel olarak maya ve küflerin kitosana en duyarlı grup oldukları bunları Gram pozitif ve sonra da Gram negatif bakterilerin takip ettiği kabul edilmektedir. Kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal etki mekanizmasının ve bunu etkileyen faktörlerin somut bir şekilde ortaya konulması bunların uygulama şeklini ve alanını genişletecektir.

KAYNAKLAR

- [1] MUZZARELLIA, R.A.A., BOUDRANT, J., MEYER, D., MANNO, N., DEMARCHIS, M., PAOLETTI, M.G., "Current Views on Fungal Chitin/Chitosan, Human Chitinases, Food Preservation, Glucans, Pectins and Inulin: A Tribute to Henri Braconnot, Precursor of the Carbohydrate Polymers Science, on the Chitin Bicentennial" *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012, 2012.
- [2] KONG, M., CHEN, X.G., XING, K., PARK, H.J., "Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review", *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 51-63, 2010.
- [3] PRASHANTH, K.V.H., THARANATHAN, R.N., "Chitin/Chitosan: Modifications and Their Unlimited Application Potential", *Trends Food Sci. Technol.*, 18: 117-131, 2007.
- [4] YOUNES, I., RINAUDO, M., "Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications", *Mar. Drugs*, 13, 1133-1174, 2015.
- [5] VARMA A.J., DESHPANDEA, S.V., KENNEDY, J.F., "Metal Complexation by Chitosan and Its Derivatives: A Review", *Carbohydr. Polym.*, 55, 77-93, 2004.
- [6] XIE, W., XU, P., LIU, Q., "Antioxidant Activity of Water Soluble Chitosan Derivatives", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 1699-1701, 2001.
- [7] DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITTE, R.M., CHIELLINI, E., "Chitosan-A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications", *Progress in Polymer Sci.*, 36, 981-1014, 2011.
- [8] JAYAKUMAR, R., MENON, D., MANZOOR, K., NAIR, S.V., TAMURA, H., "Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Based Nanomaterials", *Carbohydr. Polym.*, 82, 227-232, 2010.
- [9] KURITA, K., "Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans", *Marine Biotechnol.*, 8, 203-226, 2006.
- [10] GOY, R.C., DE BRITTO, D., ASSIS, O.B.G., "A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247, 2009.
- [11] KUMAR, M.N.V.R., "A Review of Chitin and Chitosan Applications", *React. Funct. Polym.*, 46, 1-27, 2000.
- [12] GUO, X.F., KIKUCHI, K., MATAHIRA, Y., SAKAI, K., OGAWA, K., "Water-Soluble Chitin of Low Degree of Deacetylation", *J. Carbonhydr. Chem.*, 21, 149-161, 2002.
- [13] NEMTSEV, S.V., GAMZAZADE, A.I., ROGOZHIN, S.V., BYKOVA, V.M., BYKOV, V.P., "Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions", *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 521-526, 2002.
- [14] NO, H.K., KIM, S.H., LEE, S.H., PARK, N.Y., PRINYAWIWATKUL, W., "Stability and Antibacterial Activity of Chitosan Solutions Affected by Storage Temperature and Time", *Carbohydr. Polym.*, 65, 174-178, 2006.
- [15] DUTTA, P.K., DUTTA, J., TRIPATHI, V.S., "Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications", *J. Sci. Industrial Res.*, 63, 20-31, 2004.
- [16] FUNKHOUSER, J.D., ARONSON, J.R., "Chitinase Family GH18: Evolutionary Insights from the Genomic History of a Diverse Protein Family", *BMC Evol Biol.*, 7, 96-112, 2007.
- [17] YANG, Y.M., HU, W., WANG, X.D., GU, X.S., "The Controlling Biodegradation of Chitosan Fibers by N-Acetylation in Vitro and in Vivo", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 18, 2117-2121, 2007.
- [18] RABEA, E.I., BADAWY, M.E.T., STEVENS, C.V., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W., "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action", *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465, 2003.
- [19] NO, H.K., MEYERS, S.P., PRINYAWIWATKUL, W., XU, Z., "Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Food: A Review", *J. Food Sci.*, 72: 87-100, 2007.
- [20] GUO, Z., XING, R., LIU, S., ZHONG, Z., J.I.X., WANG, L., LI, P., "Antifungal Properties of Schiff Bases of Chitosan, N-Substituted Chitosan and Quaternized Chitosan", *Carbohydr. Res.*, 342, 1329-1332, 2007.

- [21] GUO, Z., XING, R., LIU, S., ZHONG, Z., JI, X., WANG, L., LI, P., "The Influence of Molecular Weight of Quaternized Chitosan on Antifungal Activity", *Carbohydr. Polym.*, 71, 694-697, 2008.
- [22] CHIRKOV, S.N., "The Antiviral Activity of Chitosan", *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 1-8, 2002.
- [23] KOCHKINA, Z.M., CHIRKOV, S.N., "Effect of Chitosan Derivatives on the Reproduction of Coliphages T2 and T7", *Mikrobiologiya*, 69, 257-260, 2000.
- [24] KOCHKINA, Z.M., CHIRKOV, S.N., "Influence of Chitosan Derivatives on the Development of Phage Infection in the *Bacillus Thuringiensis* Culture", *Microbiology*, 69, 217-219, 2000.
- [25] SUDHARSHAN, N.R., HOOVER D.G., KNORR, D., "Antibacterial Action of Chitosan", *Food Biotechnol.*, 6, 257-272, 1992.
- [26] CHEN, Y.M., CHUNG Y.C., WANG, L.W., CHEN, K.T., LI, S.Y., "Antibacterial Properties of Chitosan in Waterborne Pathogen", *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 37, 1379-1390, 2002.
- [27] HELANDER, I.M., NURMIAHO-LASSILA, E.L., AHVENAINEN, R., RHOADES, J., ROLLER, S., "Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria", *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 235-244, 2001.
- [28] QI, L., XU, Z., JIANG, X., HU, C., ZOU, X., "Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles", *Carbohydr. Res.*, 339, 2693-2700, 2004.
- [29] KIM, H.J., CHEN, F., WANG, X., RAJAPAKSE, N.C., "Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)", *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3696-3701, 2005.
- [30] HU, Y., DU, Y.M., YANG, J.H., KENNEDY, J.F., WANG, X.H., WANG, L.S., "Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Guanidinylated Chitosan", *Carbohydr. Polym.*, 67, 66-72, 2007.
- [31] JEON, Y.J., PARK, P.J., KIM, S.K., "Antimicrobial Effect of Chitooligosaccharides Produced by Bioreactor", *Carbohydr. Polym.*, 44, 71-76, 2001.
- [32] YANCHEVA, E., PANEVA, D., MAXIMOVA, V., MESPOUILLE, L., DUBOIS, P., MANOLOVA, N., RASHKOV, I., "Polyelectrolyte Complexes Between (Cross-Linked) N-Carboxyethylchitosan And (Quaternized) Poly[2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate]: Preparation, Characterization, and Antibacterial Properties", *Biomacromolecules*, 8, 976-984, 2007.
- [33] KONG, M., CHEN, X.G., LIU, C.S., LIU, C.G., MENG, X.H., YU, L.J., "Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*", *Colloids Surfaces B*, 65, 197-202, 2008.
- [34] TIKHONOV, V.E., STEPNOVA, E.A., BABAK, V.G., YAMSKOV, I.A., PALMA-GUERRERO, J., JANSSON, H.B., LOPEZ-LLORCA, L.V., SALINAS, J., GERASIMENKO, D.V., AVDIENKO, I.D., VARLAMOV, V.P., "Bactericidal and Antifungal Activities of a Low Molecular Weight Chitosan and Its N-/2(3)-(Dodec-2-Enyl)Succinoyl/-Derivatives", *Carbohydr. Polym.*, 64, 66-72, 2006.
- [35] KIM, J.Y., LEE, J.K., LEE, T.S., PARK, W.H., "Synthesis of Chitooligosaccharide Derivative with Quaternary Ammonium Group and Its Antimicrobial Activity against *Streptococcus Mutans*", *Int. J. Biolog. Macromol.*, 32, 23-27, 2003.
- [36] LEUBA, J.L., STOSSEL, P., Chitosan and Other Polyamines: Antifungal Activity and Interaction with Biological Membranes. In R. MUZZARELLI, C. JEUNIAUX, G.W. GOODAY (Eds.), *Chitin in Nature and Technology* (pp. 215-222), Plenum Press., New York, USA, 1986.
- [37] CHOI, B.K., KIM, K.Y., YOO, Y.J., OH, S.J., CHOI, J.H., KIM, C.Y., "In Vitro Antimicrobial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture Against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 18, 553-557, 2001.
- [38] EATON, P., FERNANDES, J.C., PEREIRA, E., PINTADO, M.E., MALCATA, F.X., "Atomic Force Microscopy Study of the Antibacterial Effects of Chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*", *Ultramicroscopy*, 108, 1128-1134, 2008.
- [39] HELANDER, I.M., WRIGHT, A.V., MATTILA-SANDHOLM, T.M., "Potential of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobials against Gram-Negative Bacteria", *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 146-150, 1997.
- [40] RAAFAT, D., BARGEN, K.V., HAAS, A., SAHL, H.G., "Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 3764-3773, 2008.
- [41] JUCKER, B.A., HARMS, H., HUG, S.J., ZEHNDER, A.J.B., "Adsorption of Bacterial Surface Polysaccharides on Mineral Oxides is Mediated by Hydrogen Bonds", *Colloids Surfaces*, B9, 331-343, 1997.
- [42] CHUNG, Y.C., SU, Y.P., CHEN, C.C., JIA, G., WANG, H.L., WU, J.C.G., LIN, J.G., "Relationship between Antibacterial Activity of Chitosans and Surface Characteristics of Cell Wall", *Acta Pharmacol. Sin.*, 25, 932-936, 2004.
- [43] JE, J.Y., KIM, S.K., "Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane", *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6629-6633, 2006.
- [44] LIU, H., DU, Y.M., WANG, X.H., SUN, L.P., "Chitosan Kills Bacteria through Cell Membrane Damage", *Int. J. Food Microbiol.*, 95, 147-155, 2004.

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

- [45] CHEN, C.Z.S., COOPER, S.L., “Interactions between Dendrimer Biocides and Bacterial Membranes”, *Biomaterials*, 23, 3359-3368, 2002.
- [46] CHEN, C.S., LIAU, W.Y., TSAI, G.J., “Antibacterial Effects of N-Sulfonated and N-Sulfobenzoyl Chitosan and Application to Oyster Preservation”, *J. Food Prot.*, 61, 1124-1128, 1998.
- [47] AVADI, M.R., SADEGHI, A.M.M., TAHZIBI, A., BAYATI, K., POULADZADEH, M., ZOHURIAAN-MEHR, M.J., RAFIEE-TEHRANI, M., “Diethylmethyl Chitosan as an Antimicrobial Agent: Synthesis, Characterization and Antibacterial Effects”, *Eur. Polym. J.*, 40, 1355-1361, 2004.
- [48] GUERRA-SÁNCHEZ, M.G., VEGA-PÉREZ, J., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G., HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., “Antifungal Activity and Release of Compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by Effect of Chitosan with Different Molecular Weights”, *Pest. Biochem. Physiol.*, 93, 18-22, 2009.
- [49] TSAI, G.J., SU, W.H., “Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*”, *J. Food Prot.*, 62, 239-243, 1999.
- [50] BAUTISTA-BAÑOS, S., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., BOSPUEZ-MOLINA, E., WILSON, C.L., “Effects of Chitosan and Plant Extracts on Growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, Anthracnose Levels and Quality of Papaya Fruit”, *Crop. Prot.*, 22, 1087-1092, 2003.
- [51] BAUTISTA-BANOS, B., HERNANDEZ-LAUZARDO, A.N., VELAZQUEZ-DEL VALLE, M.G., HERNANDEZ-LOPEZ, M., AIT BARKA, E., BOSQUEZ-MOLINA, E., WILSON, C.L., “Chitosan as a Potential Natural Compound to Control Pre and Postharvest Diseases o Horticultural Commodities”, *Crop. Prot.*, 25, 108-118, 2006.
- [52] GUO, Z., CHEN, R., XING, R., LIU, S., YU, H., WANG, P., LI, C., LI, P., “Novel Derivatives of Chitosan and Their Antifungal Activities in Vitro”, *Carbohydr. Res.*, 341, 351-354, 2006.
- [53] LIU, J., TIAN, S., MENG, X., XU, Y., “Effects of Chitosan on Control of Postharvest Diseases and Physiological Responses of Tomato Fruit”, *Postharvest Biol. Technol.*, 44, 300-306, 2007.
- [54] HERNANDEZ-LAUZARDO, A.N., BAUTISTA-BANOS, S., VELAZQUEZ-DEL VALLE, M.G., MENDEZ MONTEALVO, M.G., SANCHEZ-RIVERA, M.M., BELLO-PEREZ, L.A., “Antifungal Effects of Chitosan with Different Molecular Weights on in Vitro Development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill”, *Carbohydr. Polym.*, 73, 541-547, 2008.
- [55] GARCIA-RINCÓN, J., VEGA-PÉREZ, J., GUERRA-SÁNCHEZ, M.G., HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., PEÑA-DÍAZ, A., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G., “Effect of Chitosan on Growth and Plasma Membrane Properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill”, *Pesticide Biochem. Physiol.*, 97, 275-278, 2010.
- [56] KIM, S.K., RAJAPAKSE, N., “Enzymatic Production and Biological Activities of Chitosan Oligosaccharides (COS): A review”, *Carbohydr. Polym.*, 62, 357-368, 2005.
- [57] BACON, A., MAKIN, J., SIZER, P.J., JABBAL-GILL, I., HINCHCLIFFE, M., ILLUM, L., “Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens”, *Infec. Immun.*, 68, 5764-5770, 2000.
- [58] NO, H.K., PARK, N.Y., LEE, S.H., MEYERS, S.P., “Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights”, *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 65-72, 2002.
- [59] ZHONG, Z.M., XING, R.G., LIU, S., WANG, L., CAI, S.B., LI, P.C., “Synthesis of Acyl Thiourea Derivatives of Chitosan and Their Antimicrobial Activities in Vitro”, *Carbohydr. Res.*, 343, 566-570, 2008.
- [60] WANG, X.H., DU, Y.M., LIU, H., “Preparation, Characterization and Antimicrobial Activity of Chitosan-Zn Complex”, *Carbohydr. Polym.*, 56, 21-26, 2004.
- [61] AIDER, M., “Chitosan Application for Active Bio-based Films Production and Potential in the Food Industry: Review”, *LWT-Food Science and Technology*, 43, 837-842, 2010.
- [62] CHEN, Y.L., CHOU, C.C., “Factors Affecting the Susceptibility of *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 to Water Soluble Lactose Chitosan Derivative”, *Food Microbiol.*, 22, 29-35, 2005.
- [63] YANG, T.C., LI, C.F., CHOU, C.C., “Cell Age, Suspending Medium and Metal Ion Influence the Susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to Water-soluble Maltose Chitosan Derivative”. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 258-262, 2007.
- [64] BAYER, M.E., SLOYER, J.L., “The Electrophoretic Mobility of Gram-negative and Gram-positive Bacteria: An Electrokinetic Analysis”, *Journal of General Microbiology*, 136, 867-874, 1990.
- [65] TAKAHASHIA, T., IMAIA, M., SUZUKIA, I., SAWAI, J., “Growth Inhibitory Effect on Bacteria of Chitosan Membranes Regulated by the Deacetylation Degree”, *Biochem. Engineer. J.*, 40, 485-491, 2008.
- [66] YANG, T.C., CHOU, C.C., LI, C.F., “Antibacterial Activity of N-alkylated Disaccharide Chitosan Derivatives”, *Int. J. Food Microbiol.*, 97, 237-245, 2005.
- [67] CHEN, S., WU, G., ZENG, H., “Preparation of High Antimicrobial Activity Thiourea Chitosane-Ag+ complex”, *Carbohydr. Polym.*, 60, 33-38, 2005.

- [68] IGNATOVA, M., STARBOVA, K., MANOLOVA, N., MANOLOVA, N., RASHKOV, I., "Electrospun Nano-fibre Mats with Antibacterial Properties from Quaternised Chitosan and Poly (vinyl alcohol)", *Carbohydr. Res.*, 341, 2098-2107, 2006.
- [69] XIE, Y.J., LIU, X.F., CHEN, Q., "Synthesis and Characterization of Water-soluble Chitosan Derivate and Its Antibacterial Activity", *Carbohydr. Polym.*, 69, 142-147, 2007.
- [70] KENAWY, E.R., WORLEY, S.D., BROUGHTON, R., "The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review", *Biomacromolecules*, 8, 1359-1384, 2007.
- [71] HUANG, R.H., DU, Y.M., ZHENG, L.S., LIU, H., FAN, L.H., "A New Approach to Chemically Modified Chitosan Sulfates and Study of Their Influences on the Inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth", *React. Funct. Polym.*, 59, 41-51, 2004.
- [72] GUIBAL, E., "Interactions of Metal Ions with Chitosan-based Sorbents: A Review", *Separation and Purification Technology*, 38, 43-74, 2004.
- [73] PHAECHAMUD, T., "Hydrophobically Modified Chitosans and their Pharmaceutical Applications", *J. Pharm. Sci. Technol.*, 1, 2-9, 2008.
- [74] CHUNG, Y.C., KUO, C.L., CHEN, C.C., "Preparation and Important Functional Properties of Water-Soluble Chitosan Produced through Maillard Reaction", *Bioresour. Technol.*, 96, 1473-1482, 2005.
- [75] SADEGHI, A.M.M., DORKOOSH, F.A., AVADI, M.R., SAADAT, P., RAFIEE-TEHRANI, M., JUNGINGER, H.E., "Preparation, Characterization and Antibacterial Activities of Chitosan, N-Trimethyl Chitosan (TMC) and N-Diethylmethyl Chitosan (DEMC) Nanoparticles Loaded with Insulin Using Both the Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Methods", *Int. J. Pharm.*, 355, 299-306, 2008.
- [76] ROLLER, S., COVILL, N., "The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice", *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 67-77, 1999.
- [77] LIM, S.H., HUDSON, S.M., "Synthesis and Antimicrobial Activity of a Water-Soluble Chitosan Derivative with a Fiber-Reactive Group", *Carbohydr. Res.*, 339, 313-319, 2004.
- [78] RAAFAT, D., SAHL, H.G., "Chitosan and Its Antimicrobial Potential - A Critical Literature Survey", *Microbial Biotechnol.*, 2, 186-201, 2009.
- [79] CHUNG, Y.C., WANG, H.L., CHEN, Y.M., LI, S.L., "Effect of Abiotic Factors on the Antibacterial Activity of Chitosan against Waterborne Pathogens", *Bioresour. Technol.*, 88, 179-184, 2003.
- [80] XING, K., CHEN, X.G., LIU, C.S., CHA, D.S., PARK, H.J., "Oleoyl-chitosan Nanoparticles Inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Damaging the Cell Membrane and Putative Binding to Extracellular or Intracellular Targets", *Int. J. Food Microbiol.*, 132, 127-133, 2009.
- [81] AGULLO, E., RODRIGUEZ, M.S., RAMOS, V., ALBERTENGO, L., "Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food", *Macromol. Biosci.*, 3, 521-530, 2003.
- [82] BARIKANI, M., OLIAEI, E., SEDDIQI, H., HONARKAR, H., "Preparation and Application of Chitin and Its Derivatives: A Review", *Iran Polym. J.*, 23, 307-326, 2014.
- [83] SAGOO, S., BOARD, R., ROLLER, S., "Chitosan Inhibits Growth of Spoilage Microorganisms in Chilled Pork Products", *Food Microbiol.*, 19, 175-182, 2002.
- [84] FRIEDMAN, M., JUNEJA, V.K., "Review of Antimicrobial and Antioxidative activities of Chitosans in Food", *J. Food Prot.*, 73, 1737-1761, 2010.
- [85] BOGUSLAWSKI, S., BUNZEIT, M., KNORR, D., "Effects of Chitosan Treatment on Clarity and Microbial Counts of Apple Juice", *Z. Lebensm. Technol.*, 41, 42-44, 1990.
- [86] LEE, M.H., NO, H.K., "Clarification of Persimmon Vinegar Using Chitosan", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 277-282, 2001.
- [87] CARO, Y., JOAS, J., "Postharvest Control of Litchi Pericarp Browning (cv. Kwai Mi) by Combined Treatments of Chitosan and Organic Acids. II. Effect of the Initial Water Content of Pericarp", *Postharvest. Biol. Technol.*, 38, 137-44, 2005.
- [88] SAPERS, G.M., "Chitosan Enhances Control of Enzymatic Browning in Apple and Pear Juice by Filtration", *J. Food Sci.*, 57, 1192-1193, 1992.
- [89] DORNENBURG, H., KNORR, D., "Evaluation of Elicitor and High Pressure-Induced Enzymatic Browning Utilizing Potato (*Solanum tuberosum*) Suspension Cultures as a Model System for Plant Tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4173-4177, 1997.
- [90] IMERI, A.G., KNORR, D., "Effect of Chitosan on Yield and Compositional Data of Carrot and Apple Juice", *J. Food Sci.*, 53, 1707-1709, 1988.
- [91] YOUNG, D.H., KOHLE, H., KAUSS, H., "Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension Cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* Cells", *Plant Physio.*, 170, 1449-1454, 1982.
- [92] DEVLIEGHIERE, F., VERMEULEN, A., DEBEVERE, J., "Chitosan: Antimicrobial Activity, Interactions with Food Components and Applicability as a Coating on Fruit and Vegetables", *Food Microbiol.*, 21, 703-714, 2004.

KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

- [93] PARK, I.K., LEE, Y.K., KIM, M.J., KIM, S.D., “Effect of Surface Treatment with Chitosan on Shelf-Life of Baguette”, *J Chitin Chitosan*, 7, 208-13, 2002.
- [94] AHN, D.H., CHOI, J.S., LEE, H.Y., KIM, J.Y., YOUN, S.K., PARK, S.M., “Effects on Preservation and Quality of Bread with Coating High Molecular Weight Chitosan”, *Korean J. Food Nutr.*, 16, 430-436, 2003.
- [95] LEE, H.Y., KIM, S.M., KIM, J.Y., YOUN, S.K., CHOI, J.S., PARK, S.M., AHN, D.H., “Effect of Addition of Chitosan on Improvement for Shelf-Life of Bread”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, 445-450, 2002.
- [96] BAI, R.K., HUANG, M.Y., JIANG, Y.Y., “Selective Permeabilities of Chitosan-Acetic Acid Complex Membrane and Chitosan-Polymer Complex Membranes for Oxygen and Carbon Dioxide”, *Polym. Bull.*, 20, 83-88, 1988.
- [97] HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S.W., TRABER, M.G., “Edible Coatings to Improve Storability and Enhance Nutritional Value of Fresh and Frozen Strawberries (*Fragaria × ananassa*) and Raspberries (*Rubus ideaus*)”, *Postharvest Biol. Technol.*, 33, 67-78, 2004.
- [98] PARK, S.I., STAN, S.D., DAESCHEL, M.A., ZHAO, Y., “Antifungal Coatings on Fresh Strawberries (*Fragaria × ananassa*) to Control Mold Growth During Cold Storage”, *J. Food Sci.*, 70, M202-207, 2005.
- [99] VARGAS, M., ALBORS, A., CHIRALT, A., GONZALEZ-MARTINEZ, C., “Quality of Cold-Stored Strawberries as Affected By Chitosan-Oleic Acid Edible Coatings”, *Postharvest Biol. Technol.*, 41, 164-171, 2006.
- [100] EL GHAOUTH, A., PONNAMPALAM, R., CASTAIGNE, F., ARUL, J., “Chitosan Coating to Extend the Storage Life of Tomatoes”, *HortScience*, 27, 1016–1018, 1992.
- [101] KIM, H.S., SON, B.Y., PARK S.M., LEE, K.T., “A Study on the Properties and Utilization of Chitosan Coating. 2. Changes in the Quality of Tomatoes by Chitosan Coating”, *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 568-572, 1999.
- [102] HWANG, Y.S., KIM, Y.A., LEE, J.C., “Effect of Postharvest Application of Chitosan and Wax, and Ethylene Scrubbing on the Quality Changes in Stored ‘Tsugaru’ Apples”, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 39, 579-582, 1998.
- [103] KITTUR, F.S., SAROJA, N., THARANATHAN, R.N., “Polysaccharide-Based Composite Coating Formulations for Shelf-Life Extension of Fresh Banana and Mango”, *Eur. Food Res. Technol.*, 213, 306-311, 2001.
- [104] CHIEN, P.J., CHOU, C.C., Antifungal Activity of Chitosan and Its Application to Control Post-Harvest Quality and Fungal Rotting of tankan Citrus Fruit (*Citrus tankan* Hayata)”, *J. Sci. Food. Agric.*, 86, 1964-1969, 2006.
- [105] CHIEN, P.J., SHEU, F., LIN, H.R., “Coating Citrus (*Murcott tangor*) Fruit with Low Molecular Weight Chitosan Increases Postharvest Quality and Shelf Life”, *Food Chem.*, 100, 1160-1164, 2007.
- [106] CHIEN, P.J., SHEU, F., YANG, F.H., “Effects of Edible Chitosan Coating on Quality and Shelf Life of Sliced Mango Fruit”, *J. Food Eng.*, 78, 225–229, 2007.
- [107] LI, H., YU, T., “Effect of Chitosan on Incidence of Brown Rot, Quality and Physiological Attributes of Postharvest Peach Fruit”, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 269-274, 2000.
- [108] DURANGO, A.M., SOARES, N.F.F., ANDRADE, N.J., “Microbiological Evaluation of an Edible Antimicrobial Coating on Minimally Processed Carrots”, *Food Control.*, 17, 336-341, 2006.
- [109] HERNANDEZ-MUNOZ, P., ALMENAR, E., OCIO, M.J., GAVARA, R., “Effect of Calcium Dips and Chitosan Coatings on Postharvest Life of Strawberries (*Fragaria×ananassa*)”, *Postharvest Biol. Technol.*, 39, 247-253, 2006.
- [110] EL GHAOUTH, A., ARUL, J., GRENIER, J., ASSELIN, A., “Antifungal Activity of Chitosan on Two Postharvest Pathogens of Strawberry Fruits”, *Phytopathology*, 82, 398-402, 1992.
- [111] JIANG, Y., LI, J., JIANG, W., Effects of Chitosan Coating on Shelf Life of Cold-Stored Litchi Fruit at Ambient Temperature”, *LWT-Food Science and Technology*, 38, 757-761, 2005.
- [112] NO, H.K., MEYERS, S.P., “Application of Chitosan for Treatment of Wastewaters”, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 163, 1–27, 2000.
- [113] CHATTERJEE, S., CHATTERJEE, S., CHATTERJEE, B.P., GUHA, A.K., “Clarification of Fruit Juice with Chitosan”, *Process Biochem*, 39, 2229–2232, 2004.
- [114] RUNGSARDTHONG, V., WONGVUTTANAKUL, N., KONGPIEN, N., CHOTIWARANON, P., “Application of Fungal Chitosan for Clarification of Apple Juice”, *Process Biochem*, 41, 589-593, 2006.
- [115] RHOADES, J., ROLLER, S., “Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan Against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 80-86, 2000.
- [116] KAMIL, J.Y.V.A., JEON, Y.J., SHAHIDI, F., “Antioxidative Activity of Chitosans of Different Viscosity in Cooked Comminuted Flesh of Herring (*Clupea harengus*)”, *Food Chem.*, 79, 69-77, 2002.
- [117] DARMADJI, P., IZUMIMOTO, M., “Effect of Chitosan in Meat Preservation”, *Meat Sci.*, 38, 243-254, 1994.

- [118] CHEONG, J.H., KIM, K.H., KIM, C.R., “Quality Evaluations of Refrigerated Korean Beef Loins Treated with Trisodium Phosphate and Chitosan”, Korean J. Food Sci. Ani. Resour., 21, 10-17, 2001.
- [119] JUNEJA, V.K., THIPPAREDDI, H., BARI, L., INATSU, Y., KAWAMOTO, S., FRIEDMAN, M., “Chitosan Protects Cooked Ground Beef and Turkey against *Clostridium perfringens* Spores during Chilling. J. Food Sci., 71, 236-240, 2006.
- [120] WU, Y., RHIM, J.W., WELLER, C.L., HAMOUZ, F., CUPPETT, S., SCHNEPF, M., “Moisture Loss and Lipid Oxidation for Precooked Beef Patties Stored in Edible Coatings and Films”, J. Food Sci., 65, 300-304, 2000.
- [121] KANATT, S.R., CHANDER, R., SHARMA, A., “Effect of Irradiated Chitosan on the Rancidity of Radiation-Processed Lamb Meat”, Int. J. Food Sci. Technol., 39, 997-1003, 2004.
- [122] RAO, M.S., CHANDER, R., SHARMA, A., “Development of Shelf-Stable Intermediatemoisture Meat Products Using Active Edible Chitosan Coating and Irradiation”, J. Food Sci., 70, M325–331, 2005.
- [123] PARK, S.M., YOUN, S.K., KIM, H.J., AHN, D.H., “Studies on the Improvement of Storage Property in Meat Sausage Using Chitosan-I”, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 28, 167-171, 1999.
- [124] YOUN, S.K., PARK, S.M., KIM, Y.J., AHN, D.H., “Effect on Storage Property and Quality in Meat Sausage by Added Chitosan”, J. Chitin Chitosan, 4, 189-195, 1999.
- [125] YOUN, S.K., PARK, S.M., KIM, Y.J., AHN, D.H., “Studies on Substitution Effect of Chitosan against Sodium Nitrite in Pork Sausage”, Korean J. Food Sci. Technol., 33, 551-559, 2001.
- [126] LIN, K.W., CHAO, J.Y., “Quality Characteristics of Reduced-Fat Chinese-Style Sausage as Related to Chitosan’s Molecular Weight”, Meat Sci., 59, 343-351, 2001.
- [127] JO, C., LEE, J.W., LEE, K.H., BYUN, M.W., “Quality Properties of Pork Sausage Prepared with Water-Soluble Chitosan Oligomer”, Meat Sci., 59, 369-375, 2001.
- [128] LEE, J.W., LEE, Y.C., “The Physico-Chemical and Sensory Properties of Milk with Water Soluble Chitosan”, Korean J. Food Sci. Technol., 32, 806–813, 2000.
- [129] HA, T.J., LEE, S.H., “Utilization of Chitosan to Improve the Quality of Processed Milk”, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 630-634, 2001.
- [130] COMA, V., DESCHAMPS, A., MARTIAL-GROS, A., “Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer: Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants”, J. Food Sci., 68, 2788-2792, 2003.
- [131] DUAN, J., PARK, S.I., DAESCHEL, M.A., ZHAO, Y., “Antimicrobial Chitosan–Lysozyme (CL) Films and Coatings for Enhancing Microbial Safety of Mozzarella Cheese”, J. Food Sci., 72, M355-362, 2007.
- [132] ALTIERI, C., SCROCCO, C., SINIGAGLIA, M., DEL NOBILE, M.A., “Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life”, J. Dairy Sci., 88, 2683-2688, 2005.
- [133] KIM, K.W., THOMAS, R.L., “Antioxidative Activity of Chitosans with Varying Molecular Weights”, Food Chem., 101, 308-313, 2007.
- [134] JEON, Y.J., KAMIL, J.Y.V.A., SHAHIDI, F., “Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of herring and Atlantic cod”, J. Agric. Food Chem., 50, 5167–5178, 2002.
- [135] LEE, H.W., CHOI, J.W., HAN, D.P., PARK, M.J., LEE, N.W., YI, D.H., “Purification and Characteristics of Chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002” J. Microbiol. Biotechnol., 6, 19-25, 1996.
- [136] BHALE, S., NO, H.K., PRINYAWIWATKUL, W., FARR, A.J., NADARAJAH, K., MEYERS, S.P., “Chitosan Coating Improves Shelf Life of Eggs”, J. Food Sci., 68, 2378-2383, 2003.
- [137] CANER, C., “The Effect of Edible Eggshell Coatings on Egg Quality and Consumer Perception”, J. Sci. Food. Agric., 85, 1897-1902, 2005.
- [138] KIM, K.W., DAESCHEL, M., ZHAO, Y., “Edible Coatings for V Enhancing Microbia Safety and Extending Shelf Life of Hard-Boiled Eggs”, J. Food Sci., 73, M227–235, 2008.
- [139] KIM, S.H., YOUN, D.K., NO, H.K., CHOI, S.W., PRINYAWIWATKUL, W., “Effects of Chitosan Coating and Storage Position on Quality and Shelf Life of Eggs”, Int. J. Food Sci. Technol., 44, 1351-1359, 2009.
- [140] DEL BLANCO, L.F., RODRIGUEZ, M.S., SCHULZ, P.C., AGULLO, E., “Influence of the Deacetylation Degree on Chitosan Emulsification Properties”, Colloid. Polym. Sci., 277, 1087-1092, 1999.
- [141] KIM, J.W., HUR, J.W., “Improvement of Functional Properties of Mayonnaise with Egg-Shell Calcium and Chitosan”, Food Eng. Prog., 6, 195-200, 2002.