

Kültür Mantarından (*Agaricus bisporus*) İzole Edilen Kitosanın Hemostatik ve Antimikrobiyal Yara Örtüsünde Kullanımın Araştırılması

Ebru ÖZTAŞ¹, Başak ÜNVER KOLUMAN², Ahmet KOLUMAN³

¹ Pamukkale Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği bölümü, Denizli, Türkiye.
e-posta: eoztas151@posta.pau.edu.tr, ORCID ID: 0009-0002-2592-6021

² Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Denizli, Türkiye.
e-posta: bkoluman@pau.edu.tr, ORCID ID: 0000-0003-1106-5021

³ Pamukkale Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği bölümü, Denizli, Türkiye.
e-posta: akoluman@pau.edu.tr, ORCID ID: 0000-0001-5308-8884

www.dergipark.org.tr/rjbb

Alınış Tarihi: 26.10.2023

Kabul Tarihi: 06.12.2023

Anahtar Kelimeler: Kitosan, Kanama Durdurucu, Antimikrobiyal, *Agaricus Bisporus*, Yara Örtüsü

Özet

Bu çalışmada, *Agaricus bisporus*'tan kitosanı izole ederek elde edilen kitosanın yara örtüsünde kullanmak üzere antimikrobiyal ve hemostatik aktiviteleri araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada *Agaricus bisporus* kültür mantarına demineralizasyon işlemi ve ardından deproteinizasyon işlemi uygulayarak kitin elde edilmiştir. Elde edilen kitine deasetilasyon işlemi uygulayarak kitosan elde edilmiştir. Elde edilen kitosanın morfolojisi, kimyasal yapı ve deasetilasyon derecesi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında antimikrobiyal edilen kitosanın Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal özelliği araştırılmıştır. Elde edilen kitosanın hemostatik aktivitesi araştırılmış ve kanamayı durdurmak için geçen süreyi belirlenmiştir. FE-SEM ile elde edilen morfoloji analiz sonuçlarına göre kitosanın yüzey morfolojisi amorf yapıya sahiptir. FT-IR spektroskopisi ile elde edilen kimyasal analiz sonuçlarında, kitosan için karakteristik pikler olan amid I bandının ve amid II'nin sırasıyla 1633 cm⁻¹ ve 1558 cm⁻¹ absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir. Antimikrobiyal test sonuçlarına göre, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı duyarlılık göstermiştir. Bununla birlikte elde edilen kitosan üzerine kan damlası bırakılarak pıhtı oluşum süresi 5 ve 14 saniye aralığında olduğu belirlenmiştir. *Agaricus bisporus*'tan elde edilen kitosan, antibakteriyel ve hemostatik özellikleriyle yara örtülerinin üretiminde ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir bileşen olma potansiyeline sahiptir.

The Use of Chitosan Extracted from Grown Mushrooms (*Agaricus bisporus*) in Hemostatic and Antibacterial Wound Dressing

www.dergipark.org.tr/rjbb

Received: 26.10.2023

Accepted: 06.12.2023

Keywords: Chitosan, Bleeding Stopper, Antimicrobial, *Agaricus Bisporus*, Wound Dressing

Abstract

The objective of this study was to examine the antimicrobial and hemostatic properties of chitosan derived from *Agaricus bisporus*, with the intention of utilizing it in wound dressings. This study involved the extraction of chitin from *Agaricus bisporus* mushrooms through demineralization and deproteinization techniques. The resulting chitin was then subjected to deacetylation to obtain chitosan. The morphology, chemical structure, and degree of deacetylation of the chitosan were examined. Furthermore, the antimicrobial efficacy of the chitosan was evaluated against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The study also investigated the hemostatic properties of the chitosan by determining the time required for bleeding cessation. Based on the morphology analysis using FE-SEM, it was found that the surface structure of the chitosan exhibited an amorphous nature. The chemical analysis using FT-IR spectroscopy revealed characteristic peaks for chitosan, specifically the absorption bands at 1633 cm⁻¹ and 1558 cm⁻¹, corresponding to the amide I and amide II bands, respectively. The antimicrobial testing demonstrated the chitosan's effectiveness against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Moreover, upon applying a drop of blood to the chitosan surface, it was observed that clot formation occurred within a timeframe ranging from 5 to 14 seconds. Chitosan obtained from *Agaricus bisporus*, with its antibacterial and hemostatic qualities, holds potential as a key component in the manufacture of wound dressings and biomedical applications.

1. Giriş

Kitin, böceklerin, yengeçlerin, karideslerin ve istakozların dış iskeletinde, karidesler ve böcekler gibi diğer omurgasızların iç yapısında, ayrıca mantarların ve mayaların hücre duvarında bulunan sert, elastik olmayan ve beyaz bir polisakkarittir. Kitin, selülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimerdir [1]. Kitin, β (1-4) glikozidik bağlantı ile birleştirilmiş n-asetil-d-glukozamin doğrusal bir polimerdir: (1 \rightarrow 4, 2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukan) ve α , β ve γ olmak üzere üç farklı polimerik formu vardır [1-4]. Kitosan, rastgele β -(1-4) D-glukozamin (deasetillenmiş birim) dağılmış zincirleri ve kitin deasetilasyonu olarak bilinen bir süreçten gelen n-asetil-d-glukozamin (asetillenmiş birim) tarafından oluşturulan doğrusal bir polisakkarittir [4]. Kitin, kimyasal olarak su, alkoller, aseton, hekzan gibi yaygın çözücülerde çözünmemektedir. Bu nedenle kitin inert bir malzeme olarak kabul edilen bir maddedir. Ancak, kitosan, bazı asitlerin sulu çözeltilerinde çözülebilme yeteneği sayesinde daha reaktif bir biyopolimer olarak kabul edilir. Bu özelliği nedeniyle günümüzde birçok çalışma ve uygulama fırsatlarına sahiptir, bu da farklı alanlarda çeşitli uygulamaların sayısının artmasına yol açmıştır [4-6]. Bu durum kitosanı kitinden daha çok kullanılan bir ürün haline getirmiştir, bunun ana nedeni kitosanın işlevselliği ve çözünürleştirme kolaylığıdır. Bu özellikler kitosanın çeşitli şekillerde dönüşüme açık olmasını mümkün kılmaktadır [1]. Kitosan, antimikrobiyal, antifungal ve antiviral aktiviteler, biyoyoumluluk, biyobozunur, emülsifiye etme, yağ emme, kirlatici metalleri adsorbe etme ve filmojenik olmak gibi özelliklere sahiptir. Bu nedenle kitosanın çeşitli endüstriyel alanlarda geniş kapsamlı uygulamalara sahip olduğu düşünülmektedir [7]. Literatürde kitosanı izole etmek için kullanılan çeşitli teknikler rapor edilmiştir, çoğunlukla balıkçılık endüstrisinde elde edilen kaynağın özelliklerine bağlıdır. Bununla birlikte, iyi kitin ve kitosan kaynakları olarak kabul edilebilecek çeşitli alg ve mantarlardan kitosan izole etmek mümkündür. Günümüzde mantarlar, daha yüksek saflıkta ve daha iyi kalitede kitosan üretimi için ilginç bir alternatif kaynak olarak kabul edilmektedir [8, 9]. Aslında, mantarlardan elde edilen biyokütlenin kullanımı, kitin ve kitosanın büyük ölçekte eşzamanlı olarak ekstraksiyonu, yıl boyunca bulunabilirlik gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra, ekstraksiyon işlemi kabuklu deniz ürünlerinin ekstraksiyon işlemlerine göre daha ekonomik, kullanımı kolay ve zaman açısından daha verimlidir [10, 11]. Mantarlardan kitin ve kitosan elde etmek için kullanılan yöntemler oldukça benzerdir [12]. Genel olarak, kitin ve kitosan elde etme işlemleri birbirini takip eden şu aşamalarla gerçekleştirilir: (1) Hammaddenin hazırlanması, (2) Protein ekstraksiyonu (deproteinasyon), (3) İnorganik safsızlıkların giderilmesi (demineralizasyon) (mantarlardan kitin ekstraksiyonunda gerekli olmayan bir aşamadır), (4) Elde edilen kitinin renginin bozulması ve (5) Kitin deasetilasyonu. Kitinin ekstraksiyonunu takiben, kitin kitosana dönüştürme aşamaları gerçekleşmektedir. Bu da kimyasal süreçler veya mikrobiyolojik fermantasyon reaksiyonları ve enzimatik reaksiyonlar dahil olmak üzere biyolojik yöntemlerle yapılabilmektedir. Ancak biyolojik yöntemler iyi verim sağlamazlar ve henüz ekonomik olarak uygun değillerdir [12].

Bu çalışmada *Agaricus bisporus* mantarından elde edilen kitosan, sürdürülebilir ve ekonomik bir üretim sürecini

göstererek biyopolimer üretiminde yenilikçi bir adım sunmaktadır. Aynı zamanda, antimikrobiyal aktivite ve hemostatik özellikleri tıbbi alanlarda kitosanın potansiyelini vurgulanmaktadır. Bu çalışma kapsamında *Agaricus bisporus*'a demineralizasyon ve deproteinasyon işlemleri uygulandıktan sonra kitin elde edilmiştir. Kitinin deasetilasyonu sonucunda kitosan sentezlenmiştir. Elde edilen kitosanın özellikleri FE-SEM ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen kitosanın antibakteriyel ve hemostatik aktivitesi, yara örtülerinin geliştirilmesinde ve biyotıp uygulamalarında hammadde olarak kullanımını doğrulamak amacıyla değerlendirilmiştir.

2. Malzeme ve Yöntem

2.1. Gereç

Taze *Agaricus bisporus* mantarları marketten (Denizli, Türkiye) satın alınmıştır. Sodyum hidroksit çözeltisi ve hidroklorik asit çözeltisi Sigma Aldrich'ten (St Louis, A.B.D.) tedarik edilmiştir. Kullanılan tüm reaktifler yüksek saflık derecesine sahiptir ve tüm reaktif çözeltileri için deiyonize su kullanılmıştır.

2.2. Kitin İzolasyonu

Daha önce literatürde rapor edildiği gibi kitin izole edilmiştir [13]. Kültür mantarı şebeke su ile yıkanarak blenderde parçalanmış ve yaklaşık 10 gün oda sıcaklığında kurutulmuştur. Demineralizasyon basamağında numune 1:20 (g/mL) oranında 0.5 M HCl çözeltisine eklenmiştir. Daha sonra 500 rpm'de 15 dakika 50 °C'de karıştırılarak distile su ile nötr olana kadar yıkanmıştır. Mantarlarda düşük oranda mineral bulunduğu için kısa süreli ve düşük konsantrasyonlu HCl çözeltisi uygulanarak mineral içeriğinden arındırılmıştır. Elde edilen numune 7 gün oda sıcaklığında kurutulmuştur. Minerallerinden ayrıştırılan numunenin yapısındaki proteini uzaklaştırmak için 2 M NaOH 1:20 (g/mL) oranında 4 saat 80 °C'de 700 rpm ile karıştırılmıştır. Ardından distile su ile yıkanmıştır ve 7 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

2.3. Kitin Deasetilasyon Prosedürü

Kitinin deasetilasyon prosedüründe yapılan işlemler daha önce literatürde rapor edilmiştir [14]. Elde edilen kitin ve % 60 NaOH 1:10 (g/mL) oranında, 700 rpm 90 °C'de 4 saat karıştırıldıktan sonra distile su ile nötr olana kadar yıkanmıştır ve 7 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

2.4. Karakterizasyon

2.4.1. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM)

Elde edilen toz kitosan numunelerin görüntü analizleri alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (Field Emission Scanning Electron Microscopes, FESEM) ile yapılmıştır. Her bir numune altın-paladyum ile kaplanmıştır (Quorum Q150R). Tüm FESEM (SUPRA 40VP, Carl Zeiss, Almanya)

görüntüleri 20 kV'ta alınmıştır. 10000X büyütme oranları ile çalışılmıştır.

2.4.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Elde edilen kitosan numunelerin kimyasal bağ yapıları, Diamond ATR kristali içeren Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi (IS50 FT-IR, Thermo Scientific, ABD) ile analiz edilmiştir. FT-IR spektrumları 450 ile 4000 cm^{-1} arasında 1 cm^{-1} çözünürlük ile kaydedilmiştir.

2.4.3. Deasetilasyon derecesi (DD)

Numunenin deasetilasyon oranı FTIR spektrumu ile elde edilmiştir. Bu spektroskopik teknik, bazı amid bantlarını (I-III) ve kullanılan potasyum bromür peletinin kalınlığını düzeltmek için bir iç referans gibi başka bir bantı içeren bazı absorban bantlarının korelasyonu yoluyla DD belirlenmesini sağlamaktadır. 1633 ve 3282 cm^{-1} 'deki amid I ve -OH gerilme titreşimi bantlarının absorban oranlarına göre kitosanın DD aşağıdaki formül (1) kullanılarak hesaplanmıştır [15, 16].

$$\%DD = 97.67 - (26.486 \frac{A_{1633}}{A_{3282}}) \quad (1)$$

Burada A_{1633} , N- asetil grubu amid I bandının absorban değeridir. A_{3282} ise hidroksil grubundan kaynaklanan O-H gerilme titreşim bandının absorban değeridir.

2.4.4. Kitosan numunelerin antimikrobiyal etkisi belirlenmesi

Antimikrobiyal testleri kapsamında Mueller Hinton Agar üzerine hazırlanmış bakterilerden 8 log kob/mL stok hazırlanarak 100 μL agar yüzeyine aktarılarak drigalski

spatülü ile yayılmıştır (Tablo 1). Bu kapsamda toz formunda hazırlanan kitosan numuneleri yüzeye konulmuştur ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 1. Antimikrobiyal testinde kullanılan bakteri kültürleri

| Bakteri Suşu | Gram Türü | ATCC NO |
|-------------------------------|--------------|---------|
| <i>Escherichia coli</i> | Gram Negatif | 25922 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Gram Negatif | 700603 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Gram Negatif | 27853 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Gram Pozitif | 25923 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Gram Pozitif | 6633 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Gram Pozitif | 19115 |

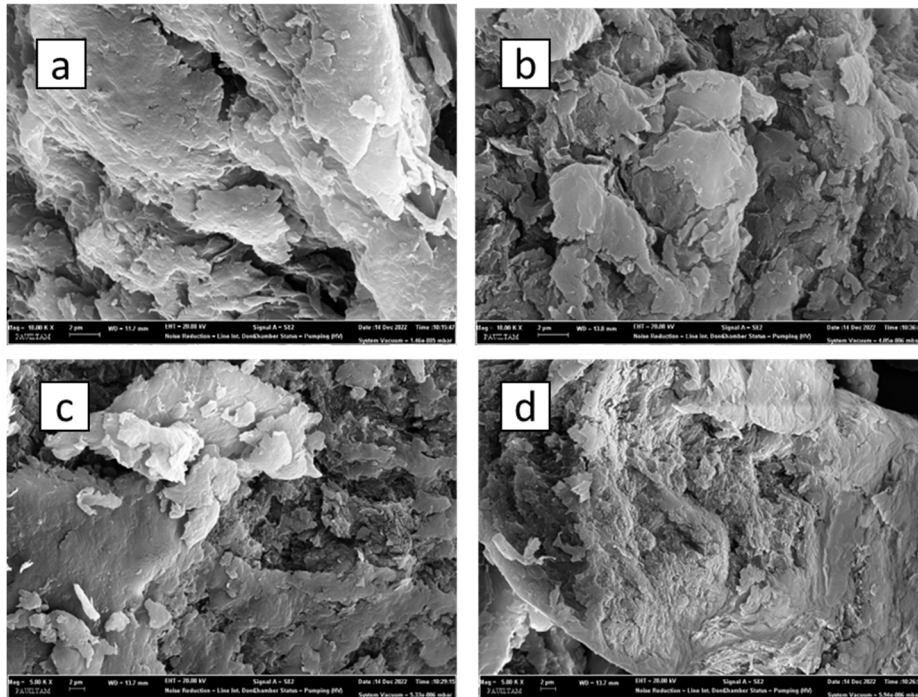
2.4.5. Kitosan numunelerinde hemostatik aktivite belirlenmesi

Çalışma kapsamında gönüllü olarak katılan bir kişiden alınan kan ile pıhtılaşma süresi belirlenmiştir. Damlama ölçüm tekniği kullanılarak birer kan damlası toz kitosan ve kitosan ile hazırlanan yara örtüsü üzerinde pıhtı oluşumu izlenerek pıhtılaşma süreleri kayıt altına alınmıştır.

3. Sonuçlar

3.1. Morfolojik Analiz Sonuçları

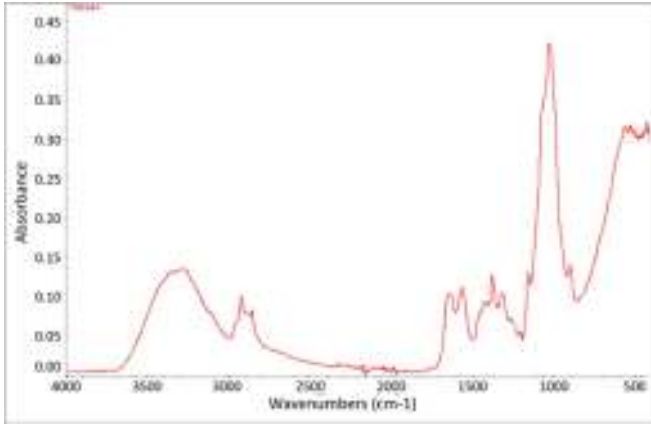
Agaricus bisporus 'tan elde edilen kitosanın FE-SEM görüntüsünde bazı bölgelerde parça parça bulut şeklinde (Şekil 1a, Şekil 1b) bazı bölgelerde yassı yüzeyinin bulunduğu görülmektedir (Şekil 1c, Şekil 1d). Ayrıca yüzey morfolojisi amorf yapıya sahiptir.



Şekil 1. Kitosan numunelerine ait FESEM görüntüleri (scale bar: 2 μm). a) bulut şeklinde bulunan kitosan örneği. b) bulut şeklinde bulunan kitosan örneği. c) yassı bulut şeklinde bulunan kitosan örneği. d) yassı bulut şeklinde bulunan kitosan örneği

3.2. Kimyasal Analiz Sonuçları

Elde edilen numunenin kimyasal yapıları, FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir (Şekil 2, Tablo 2).



Şekil 2. Kitosan numunesine ait FT-IR spektrumu

Tablo 2. Kitosana ait önemli ATR-FT-IR absorbands bant değerleri

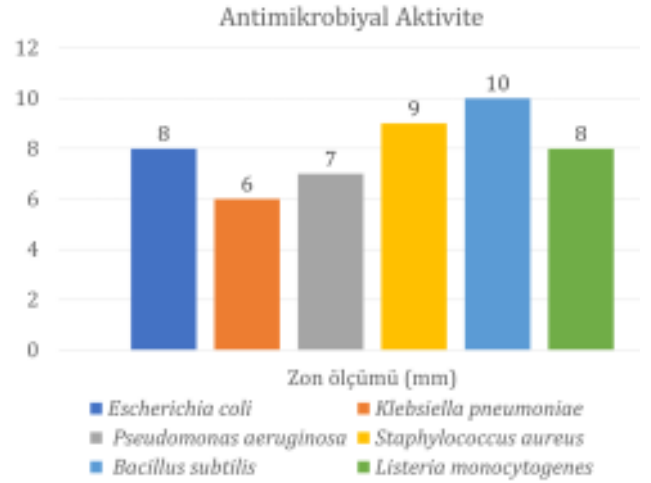
| Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | Absorbans bantları |
|----------------------------------|--|
| 3282 | Birincil aminlerde (NH ₂) gerilme ve piranoz halkasında (OH) gerilme |
| 2918 | CH ₂ OH grubunda (CH ₂) asimetrik gerilme titreşimi |
| 2850 | Piranoz halkasında (C-H) gerilme |
| 1633 | NHCOCH ₃ grubunda (C=O) gerilme (Amid I bandı) |
| 1558 | NHCOCH ₃ grubunda (NH ₂) gerilme (Amid II bandı) |
| 1152 | (C-O-C) asimetrik gerilme (glikozidik bağ) |
| 1024 | İkincil OH grubunda (C-O) gerilme |
| 896 | Piranoz halka iskeleti titreşimleri |

3.3. Deasetilasyon Derecesi (DD)

Kitosanın FTIR spektrumunda amid I bandının (~1633 cm⁻¹) absorbands değeri ve -OH gerilme bandının (~3282cm⁻¹) absorbands değerleri sırasıyla 0,11164 ve 0,13462 olarak tespit edilerek denklem (1) de yerine yazarak deasetilasyon derecesi hesaplanmıştır. Bu kapsamda sentezlenen kitosanın DD'si %75,70 olarak belirlenmiştir.

3.4. Antimikrobiyal Aktivite Test Sonuçları

Yapılan analizde, incelenen tüm bakteri suşlarının kitosana duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Antimikrobiyal test sonuçlarına göre, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Listeria monocytogenes* suşları, kitosana karşı duyarlılık göstermiştir (Şekil 3). Bu bulgular, test edilen kitosan bu belirli bakteri suşlarına karşı etkili olduğunu ve potansiyel tedavi seçenekleri olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. Kitosanın Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi

Suşlar içerisinde; *Klebsiella pneumoniae* etrafında belirgin şekilde oluşan zonları, elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Kitosan numunenin *Klebsiella pneumoniae* üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon bölgesi ölçümü

Yapılan çalışmada, antibiyotikler, yani amoksisilin, seftriakson ve sefotaksim, *E. coli* üzerinde agar plakalarında test edilmiştir. Bu antibiyotikleri içeren disklerin çevresindeki inhibisyon bölgeleri sırasıyla yaklaşık 18 mm, 22 mm ve 20 mm ölçülmüştür. Ayrıca, kitosan, etrafında yaklaşık 8 mm ölçülen bir inhibisyon bölgesi sergilemiştir. Bu bulgular, bu varsayımsal senaryoda, seftriakson'un *E. coli*'nin büyümediği en geniş alanı gösterdiğini, onu yakından gentamisin ve amoksisilin izlediğini göstermektedir. Kitosan, etkili olmasına rağmen, deneyde bu antibiyotiklere göre daha küçük bir inhibisyon bölgesine sahip olduğu görünmüştür.

3.5. Hemostatik Aktivite Ölçüm Sonuçları

Taze insan kanı ile pıhtılaşma damlama ölçüm tekniği kullanılarak pıhtı oluşumu izlenerek süresi belirlenmiştir. Toz kitosan üzerine kan damlası bırakılarak pıhtı oluşum süresi 5 ve 14 saniye aralığında olduğu belirlenmiştir.

4. Tartışma

Kitin deniz kabuklularında (yengeç, karides gibi), kelebek kanatlarında, arı gibi böceklerin kabuklarında, mikroorganizma ve mantarlarda bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında *Agaricus bisporus* kullanma nedenlerinden biri ülkemizde seralarda ve organik atıkların geri dönüşümü ile yetiştirilen, yenilebilir bir mantar olmasıdır. Kitin ve kitosanın ticari olarak piyasada karides, yengeç ve kerevit gibi canlıların kabuk yapısının işlenmesinden sonra elde edilmektedir.

Mantar ve mikroorganizmalardan elde edilen kitin ile kabuklu canlılardan elde edilen kitin arasındaki fark, kabuklulardan kitin elde edilirken mevsimsel ve bölgesel farklılıkların ve kalsiyum karbonat ile diğer minerallerin uzaklaştırılması için ağır asit işlemine ihtiyaç duyulmasıdır. Mantarlarda, minerallerin kabuklulara göre daha düşük olduğu için demineralizasyon aşaması genellikle ihmal edilebilir [17]. Ancak, bu çalışmada, kitosanın yüksek saflık oranına sahip olması için düşük konsantrasyonda HCl kullanarak demineralizasyon aşaması gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada *Agaricus bisporus* 'a demineralizasyon ve deproteinizasyon işlemleri uygulandıktan sonra kitin elde edilmiştir. Kitinin deasetilasyonu sonucunda kitosan sentezlenmiştir. Elde edilen kitosanın karakterizasyonu için FE-SEM ve FT-IR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitosanın antibakteriyel ve hemostatik aktivitesi, yara örtülerinin geliştirilmesinde ve biyotıp uygulamalarında hammadde olarak kullanımını doğrulamak amacıyla değerlendirilmiştir.

Son araştırmalar, kitosanın belirli bir alanda etkin bir şekilde kullanılmasında yüzey morfolojisinin önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Kitosanın yüzey morfolojisi organizmalara göre değişmektedir. Genel olarak kitosan üç yüzey morfolojisine ayrılabilir: (1) gözenekli ve mikrofibriler yapı, (2) gözeneksiz veya mikrofibriler yapı ve (3) sadece mikrofibriler yapıya sahiptir. *Metapenaeus stebbingi* (karides) kitosanı [18] ve ipekböceği krizaliti kitin ve kitosan [19] yapıları hem mikrofibril hem de gözenekli yapılar göstermektedir. Bazı çalışmalar [20, 21] mantar kitininin mikrofibril yapısına sahip olduğunu gösterse de Yen ve Mau tarafından incelenen mantar kitini ve kitosan yapıları mikrofibril veya gözenekli yapılar göstermemiştir [22]. Bu çalışmada, kitosan yüzey morfolojisi mikrofibril veya gözenekli yapı göstermemiştir.

Kitosan numunenin kimyasal yapısı, FT-IR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu kapsamda kitosanın FTIR spektrumunda, kitosan için karakteristik pikler olan amid I bandının ((C=O)'nun gerilmesi) ve amid II'nin ((NH₂)'nin gerilmesi) sırasıyla 1633 cm⁻¹ [23] ve 1558 cm⁻¹ [24] absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir. Kitosan tipik olarak kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Elde edilen kitosan, N-asetilglukozamin birimleri ve D-glukozamin birimlerinden oluşan bir akopolimerdir. Deasetilasyon derecesi kitosanı karakterize eden ana parametrelerden biridir. Düşük DD sahip olan kitosanın yüksek DD sahip kitosanlara göre polimerlerinin hızlı

parçalanması ve akut inflamasyonu uyarmada daha etkili olduğu bildirilmiştir [25].

Hattori ve Ishihara tarafından yapılan bir çalışmada, kitosanın %75 ila %88 arasındaki deasetilasyon derecesine sahip olanlar, platelet-rich plasma (PRP) içinde tam kan, yıkanmış eritrositler ve trombositlerin en yüksek düzeyde agregasyon göstermiştir [26]. Ospina ve ark., *Ganoderma lucidum* mantarından elde ettiği kitinleri iki farklı deasetilasyon protokolü uygulayarak ilk protokol için %80,14 ikinci protokol için %80,29 olarak deasetilasyon dereceleri elde etmiştir [27]. Bu çalışma kapsamında sentezlenen kitosanın DD'si %75,70 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızdaki elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Doğal bir antimikrobiyal ajan olarak kitosan, tarım, gıda ve biyomedikal alanlarda uygulanmaktadır. Kitosan ile muamele edilmiş mikroorganizmalarda yapılan transkriptomik analizler ayrıca kitosanın bakteri veya mantarlara karşı etki şeklinin çoklu hücre içi ve hücre dışı etkilere sahip olabileceği sonucuna varmıştır. Kitosan umut vaat eden büyük bir antimikrobiyal potansiyel gösterse de bu çalışmaların çoğu hala laboratuvar düzeyindedir [28]. *Agaricus bisporus* 'tan elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivite testi tayininde disk difüzyon yöntemiyle, numune çevresinin bakteriye karşı inhibisyon alanı oluşturmasıyla tespit edilmiştir. Numunenin altında üreme olması, 1 ve 0 mm arasında zon oluşması ve 1mm'den yüksek zon oluşması antimikrobiyal aktivitenin var olduğu değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal testleri kapsamında *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Listeria monocytogenes* suşları, kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler etrafında belirgin şekilde oluşan zonları, elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Mantarlardan ve deniz kabuklularından elde edilen kitosanın antimikrobiyal özelliği karşılaştırılan çalışmalarda mantar kaynağından sentezlenen kitosanın daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [29].

Hemostatik materyal olarak alkilenmiş kitosan integral aktivasyon üzerindeki etkisi ve trombüsün oluşum süresi gibi keşfedilmesi gereken bazı problemlere sahiptir. Kitosanın kendisi pozitif bir yüke sahiptir; Pozitif yükün alkilasyondan sonra zayıflayıp zayıflamayacağına ait veriler sınırlıdır. Alkilenmiş kitosanın sentezinde genellikle çok fazla organik çözücü kullanılır, bu da çevreye çok zarar verebilmektedir ve müteakip sanayileşmeyi engellemektedir. Ancak elde edilen hemostatik etki ve antimikrobiyal etki seçkin ve belirgindir. Bu kapsamda üretim teknolojilerinin daha yeşil yaklaşımda olması bu ürünün hemostatik olarak kullanımının da önünü açmaktadır [30].

Misgav ve ark. kronik hemodiyaliz hastalarında iğne çıkarıldıktan sonra gazlı bez ve kitosan bazlı ped karşılaştırdığı çalışmada arteriyel giriş bölgesinde kanama durdurma süresi, 18,5 dakikadan 3 dakikaya ve damar girişiminde 13,2 dakikadan 2,8 dakikaya düştüğünü gözlemlenmişler [31]. Dowling ve ark. kitosanın hidrofobik olarak modifiye ederek gerçekleştirdikleri çalışmada sıçan femoral ven kesisin de kanama süresini %90 azalma gözlemlenmiştir [32].

Bu çalışma kapsamında elde edilen kitosanın hemostatik aktivitesini değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre

kitosan üzerine kan damlası bırakılarak pıhtı oluşum süresi sırasıyla 5 saniye ve 14 saniye aralığında olduğu belirlenmiştir. In vitro uygulamalarda hemostatik ajanlar uygulandıktan 2 dk sonra kanamayı durdurmalıdır [33]. Bu çalışma kapsamında elde edilen kitosan, saniyeler içinde pıhtı oluşturma özelliğini göstermiştir. Kontrolsüz, şiddetli kanamalarda geleneksel yara örtüleri dışında biyopolimer malzemelerden hazırlanan modern yara örtülerinin kanama durdurucu aktiviteyi artırmak, enfeksiyon riskini düşürmek ve yaranın hızla iyileşmesini sağlamak gibi avantajları bulunmaktadır. Kitosan Gram-pozitif bakteriler ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *Agaricus bisporus* 'tan elde edilen kitosanın Gram-pozitif bakteriler ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal özelliği olduğunu desteklemektedir. Bununla birlikte, saniyeler içinde pıhtı oluşturma özelliğini göstermiştir. Modern yara örtüleri ile kanamanın etkili şekilde durdurulması için pansuman yönteminin belirlenmesi, yaranın bulunduğu bölge, travma tipi ve büyüklüğüne, mermi yaralanması, patlama sonucunda meydana gelen yaralanmalarda kullanılacak yara örtüleri hakkında daha fazla fikir edinmek için çalışılmalıdır.

Sonuç olarak doğal polimer olan kitosan çeşitli kaynaklardan sentezlenebilmektedir ve elde edilen kaynağa göre özellikleri değişebilmektedir. Sentezlenen kitosanın, kanamaları hızlı ve etkili şekilde kontrol altına alınması için hemostatik ajan olarak kullanılabilmesi ve Gram-pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal özelliği bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu araştırmanın devamında, söz konusu kitosanın bir yara örtüsüne entegre edilmesi ve yara örtüsünün optimize edilmesi için çalışmaların tamamlanması hedeflenmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik Kurallara Uygunluk

Çalışma Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar no: 15, Tarih: 18.10.2022).

Kaynaklar

[1] Wan, A. C., & Tai, B. C. (2013). Chitin—A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnology advances*, 31(8), 1776-1785.

[2] Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V., & Dutta, J. (2002). Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 42(3), 307-354.

[3] Muzzarelli, R. A. A., & Jeuniaux, C. (1976). In RAA Muzzarelli (Ed.), *Chitin*.

[4] Khor, E. (2014). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*. Elsevier.

[5] Bough, W. A., Salter, W. L., Wu, A. C. M., & Perkins, B. E. (1978). Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(12), 1931-1943.

[6] Chandumpai, A., Singhpibulporn, N., Faroongsarng, D., & Sornpravit, P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 467-474.

[7] Caprile, M. D. (2005). Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. *International Solid Waste Association. Hacia un sistema integral de gestión de residuos sólidos urbanos. Copenhagen, ISWA*, 1-6.

[8] MAGHSOUDI, V., & Yaghmaei, S. (2010). Comparison of solid substrate and submerged fermentation for chitosan production by *Aspergillus niger*.

[9] Amorim, R. V. D. S., Pedrosa, R. P., Fukushima, K., Martínez, C. R., Ledingham, W. M., Campos-Takaki, D., & Maria, G. (2006). Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. *Food Technology & Biotechnology*, 44(4).

[10] Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., & Galli, E. (2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of biological macromolecules*, 43(1), 8-12.

[11] Ospina Álvarez, S. P., Ramírez Cadavid, D. A., Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Rojas Vahos, D. F., Zapata Ocampo, P., & Atehortúa, L. (2014). Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed research international*, 2014.

[12] Mohammed, M. H., Williams, P. A., & Tverezovskaya, O. (2013). Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food hydrocolloids*, 31(2), 166-171.

[13] Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., & Sams, C. E. (2004). Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7905-7910.

[14] Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food chemistry*, 60(4), 605-610.

[15] Baskar, D., & Kumar, T. S. (2009). Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydrate polymers*, 78(4), 767-772.

[16] Sabnis, S., & Block, L. H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer bulletin*, 39, 67-71.

[17] 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.

[18] Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H., & Kadak, A. E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126(3), 1144-1148.

[19] Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C., & Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate polymers*, 64(1), 98-103.

[20] Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2011). Preparation of chitin nanofibers from mushrooms. *Materials*, 4(8), 1417-1425.

[21] Yen, M. T., & Mau, J. L. (2004). Annual Tainan woman's coll. *Arts Technol*, 23, 229-240.

[22] Yen, M. T., & Mau, J. L. (2007). Selected physical

properties of chitin prepared from shiitake stipes. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 558-563.

[23] Mahmoud, A. A., Osman, O., Eid, K., Ashkar, E. A., Okasha, A., Atta, D., ... & Fakhry, A. (2014). FTIR spectroscopy of natural bio-polymers blends. *Middle East. J. Appl. Sci*, 4, 816-824.

[24] Rumengan, I. F. M., Suryanto, E., Modaso, R., Wullur, S., Tallei, T. E., & Limbong, D. (2014). Structural characteristics of chitin and chitosan isolated from the biomass of cultivated rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Int. J. Fish. Aquat. Sci*, 3(1), 12-18.

[25] Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Wampande, E. M., Moja, T. N., Nxumalo, E., Maaza, M., ... & Kirabira, J. B. (2021). Isolation and characterization of chitosan from Ugandan edible mushrooms, Nile perch scales and banana weevils for biomedical applications. *Scientific Reports*, 11(1), 4116.

[26] Hattori, H., & Ishihara, M. (2015). Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical Materials*, 10. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015014>.

[27] Mesa Ospina, N., Ospina Alvarez, S. P., Escobar Sierra, D. M., Rojas Vahos, D. F., Zapata Ocampo, P. A., & Ossa Orozco, C. P. (2015). Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 1-9.

[28] Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y., & Lin, C. H. (2021). Antimicrobial actions and applications of chitosan. *Polymers*, 13(6), 904.

[29] Savin, S., Craciunescu, O., Oancea, A., Ilie, D., Ciucan, T., Antohi, L. S., ... & Oancea, F. (2020). Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of chitosan preparations extracted from *Ganoderma lucidum* mushroom. *Chemistry & Biodiversity*, 17(7), e2000175.

[30] Jin, H., & Wang, Z. (2022). Advances in Alkylated Chitosan and Its Applications for Hemostasis. *Macromol*, 2(3), 346-360.

[31] Misgav, M., Lubetszki, A., Brutman-Barazani, T., Martinowitz, U., & Kenet, G. (2017). The hemostatic efficacy of chitosan-pads in hemodialysis patients with significant bleeding tendency. *The Journal of Vascular Access*, 18(3), 220-224.

[32] Dowling, M. B., Kumar, R., Keibler, M. A., Hess, J. R., Bochicchio, G. V., & Raghavan, S. R. (2011). A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials*, 32(13), 3351-3357.

[33] Biranje, S. S., Sun, J., Shi, Y., Yu, S., Jiao, H., Zhang, M., ... & Liu, J. (2021). Polysaccharide-based hemostats: recent developments, challenges, and future perspectives. *Cellulose*, 28, 8899-86