


Atık Çay Ekstraktında Üretilen *Aspergillus niger* Misellerinden Elde Edilen Kitosanın Özellikleri

Rukiye Avcı , Arzu Çağrı Mehmetoğlu  ✉

Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Esentepe Kampüsü, Serdivan, Sakarya

Geliş Tarihi (Received): 09.12.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 02.10.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): acagri@sakarya.edu.tr (A. Çağrı Mehmetoğlu)

☎ 0 264 295 5920 📠 0 264 295 5601

ÖZ

Bu çalışmada, atık çay ekstraktından üretilen *Aspergillus niger*'den kimyasal yöntemlerle kitosan özütlenerek, bu kitosan örneklerinin belirli özellikleri araştırılmıştır. Kurutulmuş atık çaylardan %5, 10 ve 20 konsantrasyonlarda hazırlanan karışımlar sterilize edilip süzüldükten sonra *A. niger* aşılantısı ve 25°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen biyokütleden kimyasal yöntem kullanılarak kitosan ekstrakte edilmiştir. Elde edilen kitosanın yapısal özellikleri FT-IR, FESEM ve NMR ile belirlenmiştir. Üretilen kitosanın antimikrobiyal özellikleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, mayalara ve küflere karşı disk difüzyon testi kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, %5, 10 ve 20 konsantrasyonlarda hazırlanan çay ekstraktlarında üretilen *A. niger* misellerinin kitosan ekstraksiyon veriminin sırasıyla %13.98, 15.71 ve 17.57 olduğunu göstermiştir. Elde edilen FT-IR, FESEM ve NMR spektrumlarının benzer çalışmalarda rapor edilen *A. niger*'den üretilen kitosan ve ticari kitosan ile uyumlu olduğu görülmüştür. Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı %1 ve 2-4 kitosan solüsyonları sırasıyla 7 ile 8 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Saccharomyces cerevisiae* kitosana karşı en hassas kültür olarak belirlenmiştir. Ticari kitosan, fungal kitosana göre test edilen mikroorganizmalara karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Fungal kitosanın deasetilasyon derecesi %92 olarak bulunmuştur. Araştırmada elde edilen bulgulara göre, çevre açısından önem kazanan atık maddelerin değerlendirilmesi amacıyla atık çaylarda geliştirilen *A. niger* küfünden kitosan üretimi ilk defa gerçekleştirilmiş olup, çalışma bu konudaki araştırmalar için yol gösterici niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, Kitosan, Atık çay

Characteristics of Chitosan from *Aspergillus niger* Micelles Produced in Waste Tea Extract

ABSTRACT

This study investigated specific properties of chitosan extracted by chemical methods from the micelles of *Aspergillus niger* grown in tea waste extract. Mixtures prepared from dried tea wastes at 5, 10 and 20% concentrations were sterilized and filtered, then *A. niger* was inoculated and incubated at 25°C for 5 days. Chitosan was extracted from the biomass by using a chemical method. The results of FT-IR, FESEM, and NMR analyses were used to determine the structural properties of chitosan extracted. In addition, antimicrobial properties of chitosan against Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts, and molds were determined by using the disk diffusion test. Results showed that chitosan extraction efficiencies were 13.98, 15.71 and 17.57% for *A. niger* micelles produced in tea extracts prepared at 5, 10 and 20% concentrations, respectively. It was observed that FT-IR and NMR spectra were compatible with both chitosan from *A. niger* reported by similar studies and commercial chitosan. It was observed that 1 and 2-4% chitosan solution formed inhibition zones of 7 and 8 mm in diameter against Gram positive and Gram negative bacteria, respectively. *Saccharomyces cerevisiae* was the most susceptible culture to chitosan. Commercial chitosan showed better antimicrobial activity against the tested microorganisms than fungal chitosan. The deacetylation degree of fungal chitosan was 92%. According to the results of this study, the production of chitosan from *A. niger* mold

grown in waste teas was carried out for the first time in order to evaluate the waste materials that have gained importance in terms of the environment, and this study could be used as a guide for future studies on this subject.

Keywords: *Aspergillus niger*, Chitosan, Tea waste

GİRİŞ

Kitin, N-asetil-D-glukozamin birimlerine sahip bir yapı oluşturmaktadır. Sulu çözücülerde ve organik çözücülerde çözünmemesi nedeniyle endüstriyel kullanımı çok azdır. Selülozdan sonra doğada çok yaygın bulunan, yenilenebilir ve elde edilmesi kolay bir biyopolimerdir [1]. Bazı funguslarda, suda yaşayan kabuklu canlılarda, ve böceklerde bulunmaktadır. Kitinin en önemli türevlerinden biri olan kitosan molekül zincirindeki N-asetil-D-glukozamin birimlerinin, D-glukozamin birimlerine dönüştürülmesi yani deasetilasyon işlemiyle elde edilmektedir. Deasetilasyon derecesi en az %60 olan kitine, kitosan denmektedir ve kitosanı kitinden ayıran temel parametre, deasetilasyon derecesidir [2].

Kitosan doğadaki en önemli ve en fonksiyonel doğal polimerlerdendir. Kullanım alanının geniş olması ve türevlenebilir olması onu daha cezbedici bir hale getirmektedir. Kitosanın; doğal bir kaynak olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve çevre kirliliğine sebep olmaması, bitkisel ve hayvansal dokular için uyumlu olması ve toksik bir etkisinin olmaması, biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olması, molekül yapısının değiştirilebilir olması nedeniyle endüstriyel alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanım alanına sahiptir [3-5]. Günümüzde ticari olarak kitosanın üretimi, genellikle kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından ekstraksiyon işlemi ile elde edilmektedir. Fakat bu kitosan kaynağının elde edilmesinde kabukluların yapılarındaki proteinlerden kaynaklı alerji risklerinin olması, mevsimsel şartların sınırlandırılması gibi bazı dezavantajları vardır [6]. Bu gibi dezavantajların olmaması için, fermantasyon teknolojisiyle mikroorganizmaların büyük ölçekli çoğaltılmasıyla, hücre duvarında kitin ve kitosan bulunan fungal canlıların ek kaynak olarak kullanılması için çalışmalar uygulanmaya başlamıştır. Küfler, ilkel besleyici ortamlarda kolaylıkla üreyebilme ve çoğalma özellikleri sayesinde ucuz ve sınırsız bir kaynak olması, az miktarda mineral içermeleri sebebiyle, ekstraksiyon işleminde kabuklu canlılarda yapılan demineralizasyona gerek duyulmaması gibi olumlu yönleri sahiptir [7], [8]. Ayrıca kitosanın; fermantasyon şartlarında fizikokimyasal özellikleriyle (deasetilasyon, molekül ağırlığı, viskozite gibi) bazı değişikliklerin yapılmasıyla kontrol edilebilmektedir [6].

Yapılan çalışmalarda, *Aspergillus niger*'in kolay bulunabilir olması ve hücre duvarındaki kitosan miktarının (%11) fazla olması nedeni ile kitosan üretimi için en iyi küflerden birisi olduğu rapor edilmiştir [6, 9]. *A. niger* küfünün kitosan miktarının 107 mg/g (%11) gibi yüksek seviyelere çıkabildiği Pochanavich ve Suntornsuk [9] tarafından kanıtlanmıştır.

Kitosanın küf misellerinden üretiminin geleneksel yöntemlere göre verimi çok daha düşük olduğu için son yıllarda araştırmacılar verim artırıcı çalışmalar üzerine odaklanmıştır. Bu projede de atık çay otları küf üretiminde besiyeri olarak kullanılarak kitosan veriminin artırılması ve üretim maliyetinin düşürülmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda projemizin amacı atık çayda üretilen *Aspergillus niger*'den, kimyasal yöntemlerle kitosan üretmek ve üretilen kitosanın belirli özelliklerini belirlemektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Atık Çay Ekstraktının Hazırlanması

Kitosan üretimi için kullanılan demlenmiş çaylar İstanbul'da bir kafeden temin edilmiştir. Alınan demlenmiş siyah çaylar (900 g, Ofçay, Rize, Türkiye) kısmi olarak süzülüş ve etüvde 180°C'de 4 saat kurutulduktan sonra gerektiğinde kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır.

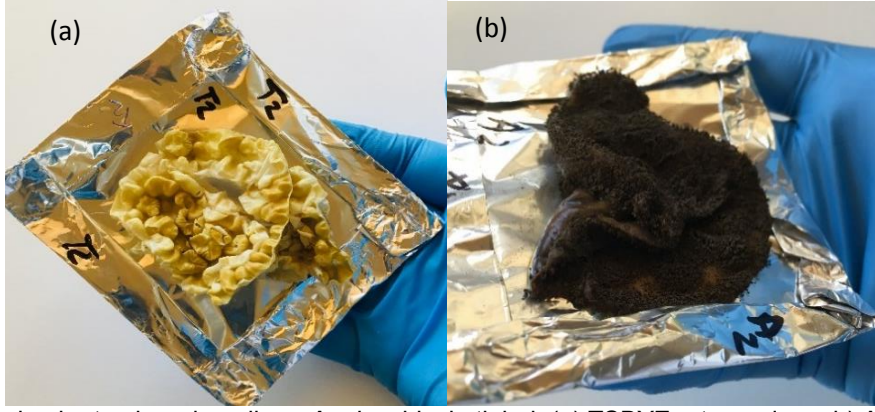
Kurutulan çaylar saf su ile içerisinde %5, 10 ve 20 (a/h) (g/mL) oranında karışım hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra steril çaylar oda sıcaklığına soğutulduktan sonra Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak steril şartlarda filtre edilmiştir. Süzülüş çay 4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

Kullanılan Mikroorganizmalar

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

Aspergillus niger Küfünden Kitosan Ekstraksiyonu

A. niger TSB + %0.6 yeast extract (TSBYE) besiyerinde aktiveleştirildikten sonra 5 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilmiş olan *A. niger* kültüründen 100 µL 100 mL süzülen çaylara ve kontrol olarak kullanılan 100 mL TSBYE'ye inoküle edildikten sonra 25°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kitin ve kitosan elde etmek için, *A. niger* biyokütleri besiyerinden No.1 Whatman filtre kağıdı kullanılarak filtre edilip daha sonra da saf su ile yıkanmıştır.

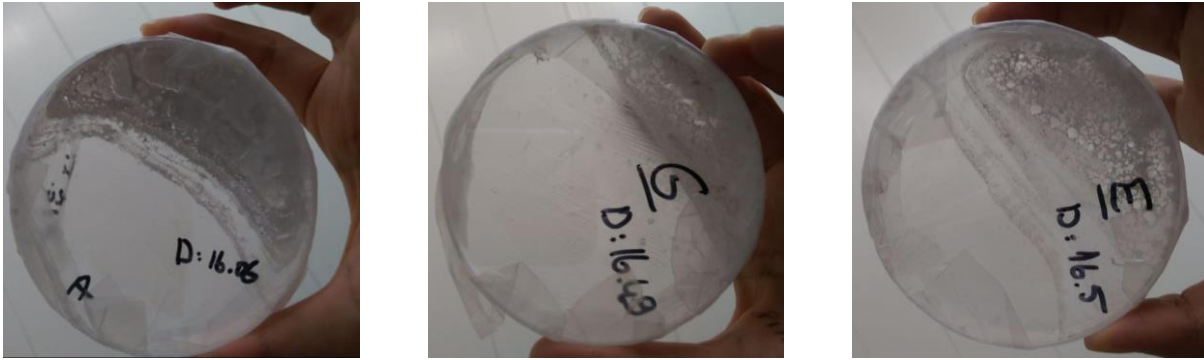


Şekil 1. Farklı besiyeri ortamlarında gelişen *A. niger* biyokütleleri: (a) TSBYE ortamında ve b) Atık çay ortamında gelişmiş

Figure 1. *A. niger* biomass grown in different media: (a) TSBYE and b) Waste tea medium

Kitosan ekstraksiyon için Pochanavanich ve Suntornsuk'un [9]'un kullandıkları metot referans alınmıştır. Bu metoda göre, *A. niger* biyokütlesi kuru ağırlığı belirlemek amacıyla etüvde 60°C'de bir gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan biyokütle (Şekil 1), santrifüj tüplerine tartılarak koyulmuş ve 1:30 mL oranında, 1 N NaOH çözeltisi üzerine eklenmiştir. Biyokütle homojenizatör (Braun MQ5220, Almanya) yardımı ile parçalandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Örnekler santrifüj işlemine (9000 rpm, 15 dakika, 4°C'de) tabi tutulduktan sonra pellet kısmı saf su ile yıkanmıştır ve %2'lik asetik asit çözeltisi eklenerek pH'nın 7 olması sağlanmıştır. Örnekler santrifüj (9000 rpm, 15 dakika, 4°C'de) edildikten sonra pellete %2'lik

asetik asit 1:40 (hacmen) oranında ilave edildikten sonra çalkalamalı su banyosunda, ağzı kapalı olarak 95°C'de 8 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Soğuduktan sonra örnekler tekrar santrifüj işlemi (9000 rpm, 15 dakika, 4°C'de) uygulanmıştır. Santrifüjlendikten sonra, çözünmeyen kısım (kitin) ayrılıp süpernatant kısmının pH'sı 2 N NaOH çözeltisi kullanılarak 10'a ayarlanmıştır. Tekrar uygulanan santrifüj işlemi (9000 rpm, 15 dakika, 4°C'de) sonunda pellet kısmı 100 µL, %2'lik asetik asit ve distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen karışıma steril petrielerde liyofilizasyon işlemi uygulanmış, 2 gün-42°C'de kurutulmuş ve son ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen kitosan (Şekil 2) -20°C sıcaklıkta depolanmıştır.



Şekil 2. Liyofilizasyon ile elde edilen kitosanlar

Figure 2. Chitosans obtained by lyophilization

Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Kitosan deasetilasyonunun derecesi titrasyon işlemiyle belirlenmiştir [11]. Kitosan 20 cm⁻³, 0,01 M HCl asit ve 50 cm⁻³ deiyonize suda çözündürüldükten sonra 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra kitosan çözeltisi 0,01 M NaOH ile titre edilmiştir. Renk dönüşümü olunca işlem durdurulmuştur. Asetil yüzdesi ve deasetilasyon

derecesi aşağıdaki Denklem (1) ve (2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Asetil} = V \times 0,04305 \div w \quad \text{Denklem (1)}$$

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

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

Denklem (2)

Vizkozite

Ölçüm için, %1'lik oranında kitosan örneği elde etmek için *A. niger*'den elde edilen kitosan (ANK) veya kontrol için ticari kitosanın (TK) %2'lik asetik asit içerisinde karıştırılmıştır. Karşının vizkozitesi, vizkozimetre (Fungilab Ubbelohde Spin R-5, İspanya) kullanılarak ölçülmüştür [9].

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Ölçümü

FT-IR analizleri; Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarında bulunan FT-IR spektroskopisi (Shimadzu IR, Prestige 21, Japonya) kullanılmıştır. ANK veya TK için 400-4000 cm^{-1} bölgesi için spektrumlar elde edilmiştir.

Alan Emülsiyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) Ölçümü

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

NMR Analizi

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü NMR araştırmaları laboratuvarında bulunan Varian Mercury 300 MHz H-NMR spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Çözücü olarak 10 mg D_2O (deteriyum oksit) (Sigma Aldrich, ABD) ve D_6 (DMSO) (Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

Disk Difüzyon Testi

Kitosanların antimikrobiyal özelliğini test etmek için difüzyon testi kullanılmıştır [10]. Bu testte kullanılacak kültürler; *P. expansum*, *A. sydowii*, *A. wentii*, *A. japonicus*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *W. saturns* spp. *saturns*, *S. cerevisiae*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* kültürleri 10 mL TSBYE'de mayalar ve küfler için 25°C 3 gün, bakteriler için ise 35°C'de 24 saat inkübasyona

birakılarak aktifleştirilmiştir. Kitosan solüsyonu (5 mg/mL) 1% (v/v) asetik asit solüsyonunda hazırlanmış ve 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilmiş olan TSBYE her bir petride 20 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir petriye 200 μL ayrı olarak mikroorganizmalar inoküle edilmiştir. Daha sonra mikroorganizma inoküle edilmiş petrilere yerleştirilen steril disklerle %1 asetik asit çözeltisi içerisinde farklı konsantrasyonlarda (%0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8) hazırlanan 10 μL ANK veya TK örnekleri emdirilmiştir. Negatif kontrol olarak %1 asetik asit kullanılmıştır. Bakteriler 35°C'de 24 saat, mayalar 30°C'de 36 saat ve küfler 25°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda ise zon oluşma durumuna göre (+) ve (-) sonuçlar değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analizler

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

BULGULAR ve TARTIŞMA

Aspergillus niger'den Ekstrakte Edilen Kitosan Verimi

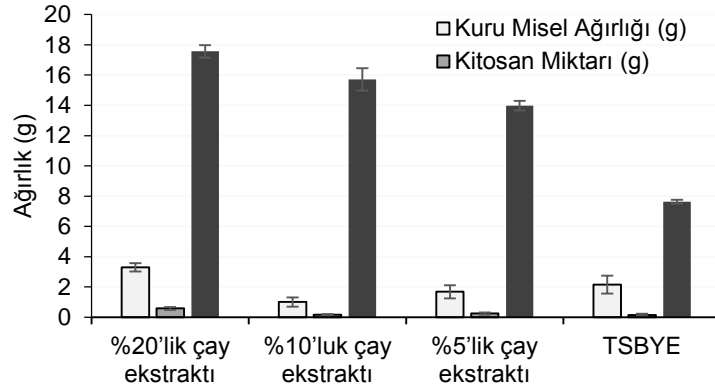
Yapılan çalışmadan alınan sonuçlarda, besiyeri amaçlı kullanılan çay ekstraktında ekstrakt oranı arttıkça küf misel gelişiminin de önemli derecede arttığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 1) (Şekil 3). Örneğin, %20 çay ekstraktı içeren besiyerinde gelişen *A. niger* küfü kuru misel ağırlığı 3.30 g iken %5 ekstrakt içeren besiyerinde gelişen küfün 1.68 g kuru misel ağırlığı olduğu gözlenmiştir. Kuru küf misellerinden elde edilen kitosanın verimi ise besiyerindeki çay ekstrakt miktarı %5'ten %20'ye arttığında %13.98'den %17.57'ye çıktığı rapor edilmiştir ($p < 0.05$). Çay ekstraktının %5 ve %10 olduğu besiyerlerinden elde edilen küf misellerinden ekstrakte edilen kitosan verimi arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Çay ekstraktından elde edilen besiyerinde geliştirilen küflerin kitosan verimleri TSBYE besiyerinde gelişen *A. niger*'e göre de önemli ölçüde fazla bulunmuştur. Buna göre, bu çalışmada besiyerindeki çay ekstrakt miktarının %20 civarında kullanılmasının kitosan içeriği yüksek *A. niger* üretimini sağlayabileceği görülmüştür.

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlardaki çay ekstraktında üretilen *A. niger*'in kuru misel ve kitosan miktarları

Table 1. Amounts of dry micellar and chitosan produced by *A. niger* in tea extracts at different concentrations

Besiyeri	Kuru Misel Ağırlığı (g)	Kitosan Miktarı (g)	Kitosan Verimi (%)
Çay ekstraktı, %20'lik*	3.30±0.28 ^a	0.58±0.09 ^a	17.57±0.41 ^b
Çay ekstraktı, %10'luk	1.00±0.30 ^c	0.16±0.04 ^c	15.71±0.74 ^a
Çay ekstraktı, %5'lik	1.68±0.43 ^b	0.24±0.08 ^b	13.98±0.31 ^a
TSBYE	2.16±0.59 ^b	0.15±0.08 ^c	7.63±0.13 ^c

*Çay ekstraktı kurutulmuş atık çay otunun su içerisinde 121°C'de 15 dakika ısıtılması ve filtre kağıdından süzülmesi ile elde edilmiştir. ^{a-b-c}: Çizgiyle ayrılmış aynı sütunda farklı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark, istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çay ekstraktında üretilen *A. niger*'in kuru misel ve kitosan miktarları
 Figure 3. Amounts of dry mycelium and chitosan of *A. niger* produced in tea extract at different concentrations

Atık çayda; %20-30 polifenol, %4-5 kafein, %2-4 amino asit, %2-4 şeker, %2,5 organik asit, %4-8 yağ, %5 mineral, %0.8 pigment, %16 protein bulunduğu rapor edilmiştir[12]. Atık çayda bulunan besin içeriği, mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam oluşturduğu görülmektedir [13]. *A. niger* de bu ortamda kolaylıkla gelişme imkanı bulmuş ve atık çay ortamı hücre duvarındaki kitosan miktarına da destekleyici etkide bulunmuştur.

Birçok çalışma besiyeri ortamındaki besin içeriklerinin küf misellerindeki kitosan miktarına etkisini incelemiştir [14, 15]. Kitosan veriminde bir artış ya biyokütle verimini artırarak ya da kitosanın hücre duvarı içeriğindeki artışıyla elde edilebilmektedir. Örneğin, kitosan nitrojen içeren bir biyopolimer olduğundan, fungus hücre duvarları için kitin/kitosan üretmek için besin olarak inorganik veya organik nitrojen kaynağına ihtiyaç duyduğu raporlanmıştır [14], Farklı olarak, besin ortamına manganez ve demir gibi minerallerin takviyesi küflerin hücre duvarlarındaki kitosan içerik artışından ziyade biyokütle üretimindeki artış yoluyla kitosan verimini artırdığı gözlenmiştir [16,17]. Benzer bir çalışmada, Rane ve Hoover [17], besiyerinin *Absidia coerulea*'dan kitosan üretimi üzerindeki etkisini incelemiş ve daha fazla miktarda glikoz ve protein ile takviye edilmiş besiyerinin, kitosan verimi üzerine olumlu etkisini göstermiştir. Çayda bulunan manganez, demir, azot, glikoz ve nitrojen kitosan verimine etkisi olan besinlerin çay ekstrakt miktarının artmasıyla paralel artışı küf biyokütlesi dolayısıyla kuru misel ağırlığı ve kitosan verimi artışına neden olduğu düşünülmektedir.

Benzer çalışmalarda da, birçok küfün kitosan verimleri gözlenmiştir [9, 18-20]. Örneğin, *A. niger* ve *Rhizopus oryzae*'nin sırasıyla 107 ve 138 mg/g kuru ağırlıkta kitosan üretimi ve %11 ve 14 kitosan verimi verdiği gösterilirken, *L. edodes*'in kitosan verimi %3.3, *Zygosaccharomyces rouxii*'nin kitosan verimi %3.6

olarak raporlanmıştır [9]. Bu çalışmada ise, üç ayrı konsantrasyona sahip besiyeri ortamlarından en yüksek kitosan içeriği %20'lik çay ekstraktında geliştirilen *A. niger* misellerinden elde edilen %17.57 kitosan ile diğer çalışmalarla kıyaslandığında daha fazla verim alındığı görülmektedir.

Kitosan Örneklerinin Deasetilasyon Derecesi

TK'nın deasetilasyon değeri %89 olarak ölçülürken ANK'nın deasetilasyon değeri ise %92 bulunmuştur. Deasetilasyon derecesi kitosanın fizikokimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametredir. Yüksek derecede deasetilasyona sahip kitosan, yüksek pozitif yüklere sahiptir ve pıhtılaştırıcı veya şelatlayıcı ajan, berraklaştırıcı ajan veya antimikrobiyal ajan olarak gıda uygulamaları için daha uygundur [20]. Pochanavanich ve Suntornsuk'un [9] yaptıkları çalışmada ticari kitosanın deasetilasyon değeri %98 ve fungal kitosanın deasetilasyon değeri %90 olarak raporlanmıştır. Sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için FTIR ve alkali metot gibi farklı analiz metotları kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan alkali metodu tirrasyon tekniği ile yapıldığı için hassasiyeti diğer metoda göre düşüktür. Deasetilasyon derecesinin diğer çalışmalarda raporlanan sonuçlara göre yüksek çıkmasının nedenlerinden birisinin bu olduğu düşünülmektedir.

Kitosan Örneklerinin Viskozitesi

ANK'nın viskozitesi 0.5-0.8 centipoises (cP) ve TK'nın viskozitesi 3.1-3.5 cP olarak bulunmuştur. Pochanavanich ve Suntornsuk [9] yaptığı çalışmada fungal kitosanın viskozitesi 3.1-6.2, centipoises (cP) olup, yengeç kitosanının viskozitesinden oldukça düşüktür (Tablo 2). Bu çalışmada ANK'nın ve TK'nın viskozitesi Pochanavanich ve Suntornsuk [9] tarafından bildirilenlerden düşük çıkmıştır.

Tablo 2. Kitosanların viskozite değerleri

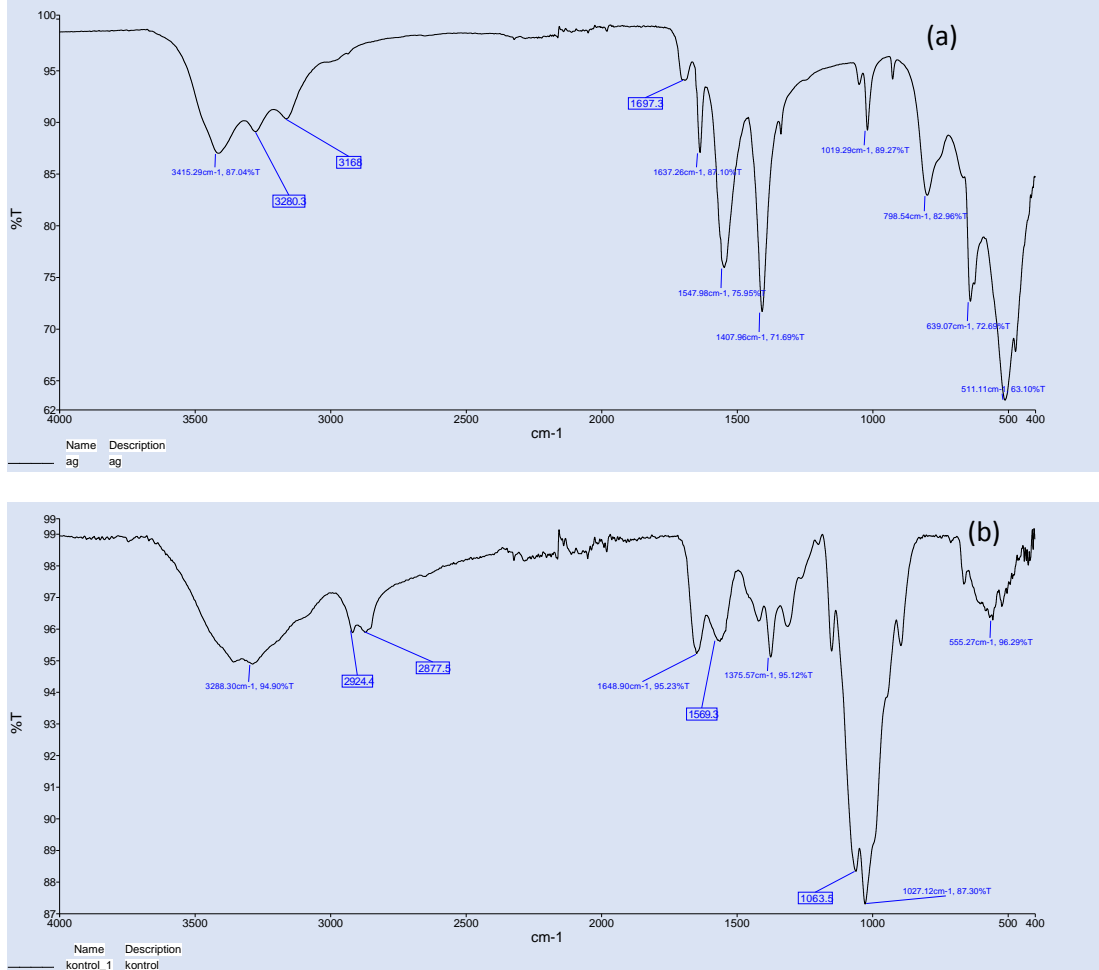
Table 2. Viscosity values of chitosans

Sıcaklık (°C)	TK (rpm)	Viskozite	ANK (rpm)	Viskozite (cP)
20°C	3.1	4	0.4	0.5
25°C	3.5	4.3	0.6	0.8

Kitosan Örneklerinin Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi Ölçümü

Atık çayda üretilen *A. niger*'den ekstraksiyon yoluyla üretilen kitosandan ve TK'dan elde edilen FT-IR pikleri Şekil 4'te verilmiştir. Sırasıyla; ANK'nin 3415 cm⁻¹ bandı ve TK'da 3288 cm⁻¹ bandı, -NH₂ ve -OH grubunun gerilme titreşiminden kaynaklı olduğu söylenebilir [21],

[22]. ANK'nin 1637 cm⁻¹ bandı ve TK'nin 1648 cm⁻¹ bandı ise karbonil gerilme -NH amid bağlantı proteininden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ANK 1637 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹ ve 1547 cm⁻¹, 1542 cm⁻¹ bantlarının karbonil (C=O-NHR) ve amin (-NH₂) grubunun ana karakteristik bantlarına ait olduğu düşünülmektedir [23, 24].



Şekil 4. Elde edilen ANK (a) ve TK'nin (b) FT-IR spektrumları ve tepe değerleri, (T:Transmittance)
Figure 4. FT-IR spectra and peak values of (a) ANK and (b) TK (T: Transmittance)

ANK'nin 1407 cm⁻¹ bandı -NH ikincil aminleri, 1019 cm⁻¹ bandı C=O germe ve 1407 cm⁻¹, 1338 cm⁻¹'deki bantları kitosanın sakkarit yapısına atfedilmektedir [25]. Ticari kitosanın 1569 cm⁻¹ ve 1375 cm⁻¹ bantları yine ANK'dan elde edilen spektrumdaki bantları ile benzerdir. ANK'a ait spektrumun 798 cm⁻¹'deki bandı -NH birincil ve ikincil aminleri, 1637 cm⁻¹, 1547 cm⁻¹ ve 1407 cm⁻¹ bantları proteinin kitosana bağlandığını göstermektedir. Kitosanın spektrumu, amid (1697 cm⁻¹) ve amino gruplarının karakteristik bantlarını göstermiştir [26]. Ancak, bu absorpsiyon bandının amino deformasyon modunun karakteristiği olduğu raporlanmaktadır [27]. TK'ya ait spektrumda bahsedilen birincil ve ikincil amin bantları görülmemiştir.

ANK'a ait spektrumda gözlemlenen 1407 cm⁻¹'deki keskin pik CH₃ gruplarındaki simetrik eğilmeyi göstermektedir. Şekil 5 incelendiğinde ANK örneğinin 3415 cm⁻¹ bandı,

87.04 %T ve TK ile benzer şekilde 3288 cm⁻¹ bandı, 87.30 %T benzer iki pik görülmektedir. ANK'nin daha geniş bir pike dönüştüğü TK ile kıyaslandığında 3288,30 cm⁻¹ bandı, 94.90 %T olduğu, TK'nin spektrumunda ise daha az olduğu görülmektedir. Kitosana dönüşüm sonrasında, sekonder amid gruplarıyla ilişkili olan 3415-3280-3168-1697-1407 ve 1019 cm⁻¹ dalga sayılarındaki ve C-H bağlarıyla ilgili 1407 cm⁻¹'de primer amidle ilişkili pik ortaya çıktığı düşünülmektedir [28].

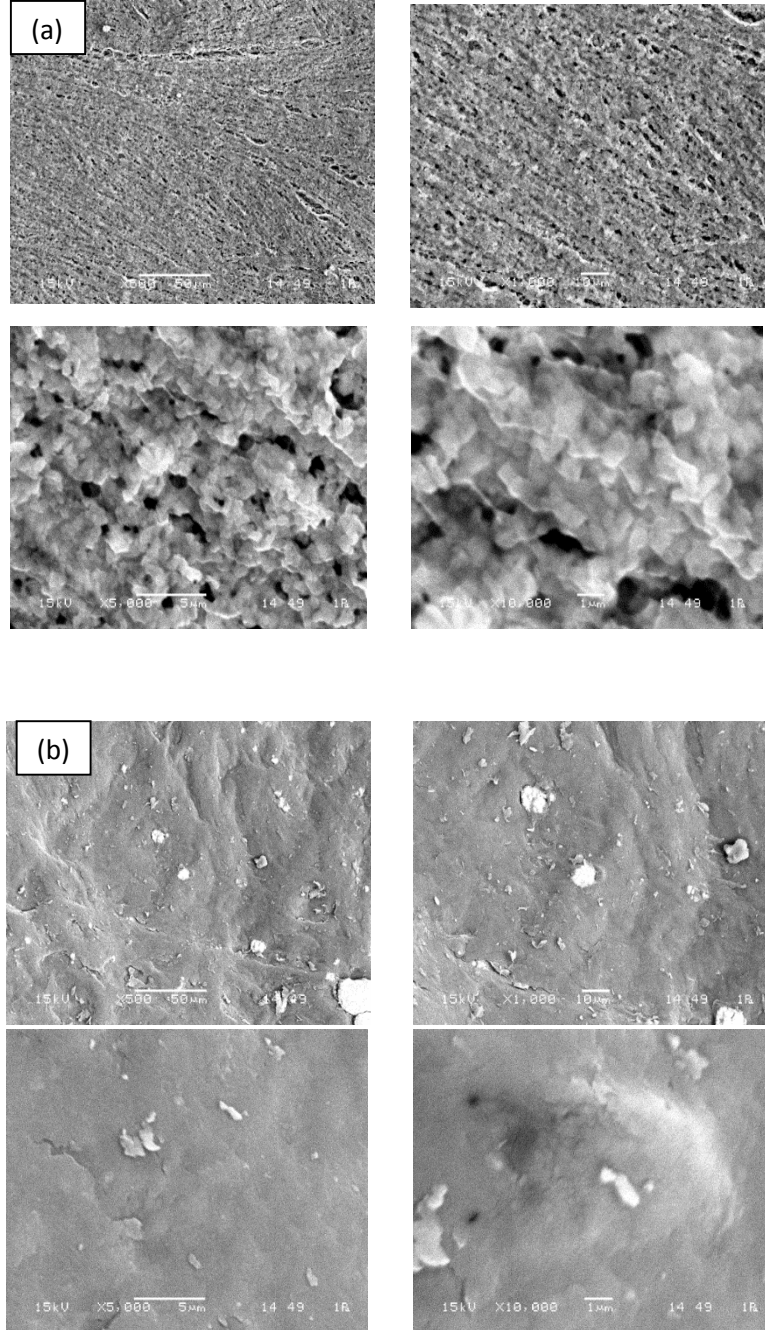
Elde edilen TK'nin değerleri ANK ile kıyaslandığında; 3288 cm⁻¹, 1648 cm⁻¹, 1569 cm⁻¹, 1027 cm⁻¹ ve 555 cm⁻¹ bantlarının uyumlu olduğu görülmektedir. TK spektrumunun 500 cm⁻¹ bölgesinde ANK'ye göre farklılık görülmüştür. Bunun sebebinin, TK'nin kabuklulardan ekstraksiyonu işleminden kalan kalıntı maddelerinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Koçer [29]'in *A. niger*'den üretilen kitosanın FT-IR sonuçları ile

kıyaslandığında atık çayda geliştirdiğimiz ANK'nin FT-IR analizi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Kitosan Örneklerinin Alan Emülsiyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) Sonuçları

ANK'nin yüzey morfolojisi incelendiğinde hem porlu hem de nanofiber yapılarının olduğu gözlenmiştir (Şekil 5a). TK'nın yüzey morfolojisinin de yine zayıf ve çok net olarak görülemeyen fiberlerden oluştuğu ve mikro

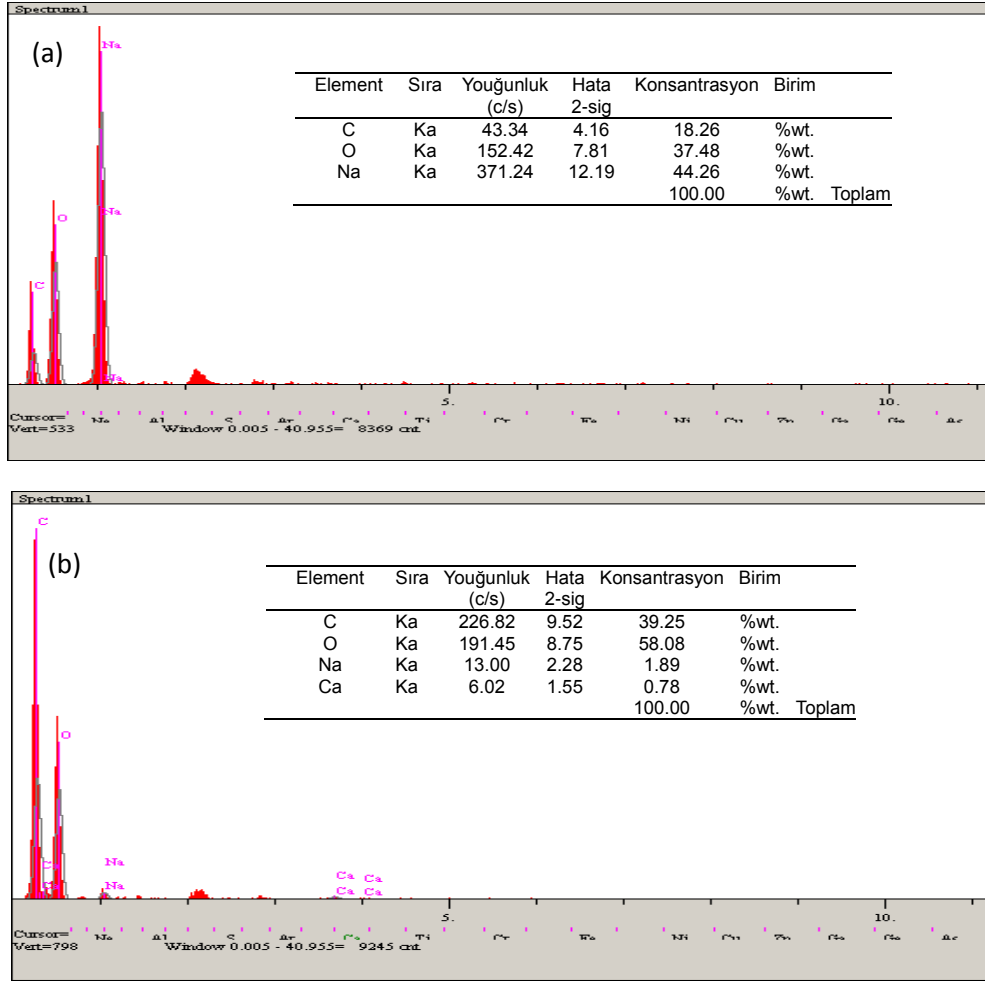
porların olduğu gözlenmiştir (Şekil 5b). Mevcut çalışmadakine benzer şekilde krill, Gammarus argaeus ve pembe karides gibi Crustacea grubuna ait canlılardan elde edilen kitin ve kitosan yapılarının yüzeyleri porlu ve fiber yapılardan oluştuğu diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir [36-38]. Funguslardan elde edilen bazı kitin ve kitosanların ise porlu ya da fiber yapılarının bulunmadığı tespit edilirken [39], diğer bazı funguslardan elde edilen kitin ve kitosanın sadece fiber yapılardan oluştuğu raporlanmıştır [40-42].



Şekil 5. ANK (a) ve TK'nın (b) FESEM görüntüleri
Figure 5. FESEM images of (a) ANK and (b) TK

ANK'nin mineral yapısını gösteren kompozisyon spektrumunda, TK'ya göre karbon konsantrasyonunun düşük olduğu dolayısıyla daha kısa zincire sahip olduğu

söylenbilir (Şekil 6). ANK'da sodyum miktarının TK'dan çok daha fazla olduğu, ANK'da ticari kitosandan farklı olarak kalsiyumun olmadığı görülmektedir.

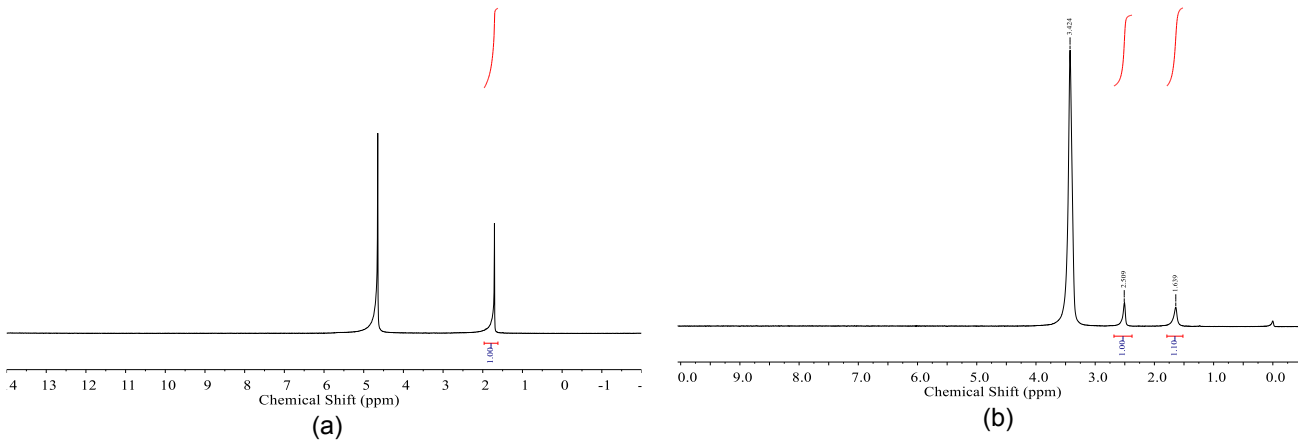


Şekil 6. ANK (a) ve TK'nın (b) mineral dağılım spektrumları
 Figure 6. Mineral distribution spectra of (a) ANK and (b) TK

NMR

ANK'ya ait NMR spektrumunda (Şekil 7a) D₂O ile çözündürülmüş kitosan spektrumunda iki ürün elde edilmiştir. Elde edilen piklerde; 1.5-2 ppm arasında kitosan numunesi ve 4.5-5 ppm arasında D₂O çözeltisi

görüntülenmiştir. ANK'nın D₆ (DMSO) ile çözündürülmüş kitosan spektrumunda ise dört pik elde edilmiştir (Şekil 7b). Bunlar; 0.1 ppm NMR'dan kaynaklı pik, 1.5-2 ppm arası kitosan numunesi, 2.5 ppm H₂O, 3.5 ppm'de de D₆ (DMSO) görüntülenmiştir. Bu sonuç yapı ile uyumludur.



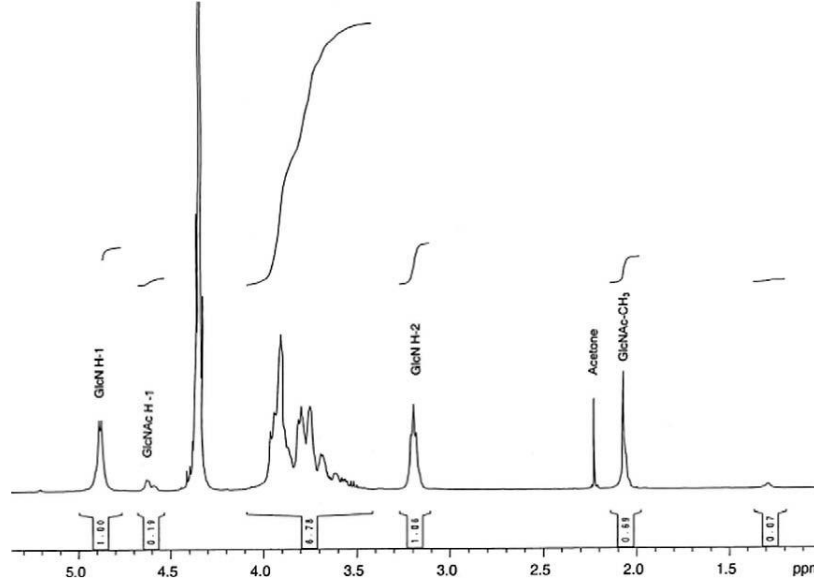
Şekil 7. ANK'nın D₂O ile çözünmüş H-NMR spektrumu (a) D₆ ile çözünmüş spektrumu (b)
 Figure 7. H-NMR spectrum of ANK dissolved in (a) D₂O and (b) D₆

Kitosanın tipik bir H NMR spektrumu Şekil 8'da gösterilmiştir. Bu spektrumda kitosanın pikleri 2-3-2.4

ppm olarak raporlanmıştır [43]. Polimerin her birim kalıntısında altı karbon ve yedi hidrojen atomu bulunur

ve bu atomlar C-H bağları üretir. Ek olarak, polimer kalıntısının her bir birimi, dört oksijen atomu ile bağlanmış ve O-H grupları oluşturan dört hidrojen atomuna sahiptir. Birim kalıntısındaki bu bağların her biri kendi karakteristik ortamına sahiptir ve dolayısıyla kendi kimyasal kaymasına sahiptir. Polimerin H-NMR spektrumu, birbirlerine olan bağlantıları nedeniyle hafifçe değiştirilmiş olan bireysel birim kalıntılarının spektrumlarının üst üste binmesidir. 2.0-2.1 ppm'deki tepe noktası, üç N-asetil glukozamin (GlcNAc) protonunu temsil eder ve 3.1-3.2 ppm'deki tepe,

glukozamin (GlcN) kalıntısının H-2 protonunu temsil eder. Molekülün spektrumunda, anomerik olmayan protonların sinyalleri kısmen örtüşür ve spektrumun ortasında geniş bir sinyal zarfı oluşturur. H NMR spektrumunun çeşitli bantları arasında 2.0-2.1 ppm metil protonları en yüksek çözünürlüğe sahiptir. Sonraki protonların sinyalleri, 4.05 ppm'de çözücünün (D_2O/CD_3COOD) HOD sinyalleriyle örtüşür. Çözücülerin kalıntı protonları için kimyasal kaymaların D_2O ($d = 4.7$ ppm) olduğu çalışmalarca bildirilmiştir [44].



Şekil 8. 65°C'de D_2O içinde kitosanın H-NMR spektrumu (600 MHz). Referans olarak aseton kullanılmıştır (2.2 ppm) [45]

Figure 8. H-NMR spectrum of chitosan in D_2O at 65°C (600 MHz). Acetone was used as a reference (2.2 ppm) [45]

NMR spektrumlarında kitosanın moleküler ağırlık dağılımı ve ortalama moleküler ağırlığın yanı sıra içsel viskozite de önemli bir rol oynamaktadır. Kitosan çözeltisi agregat içermemelidir, bu nedenle kitosan için çözücü dikkatli seçilmelidir [46]. Yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında elde ettiğimiz sonuç değerlere yakın bulunmuştur. Kitosanın pikinin biraz düşük olmasının nedeninin elde edilen kitosanın viskozitesinin düşük olmasına bağlanabilir.

Kitosanların Antimikrobiyal Özellikleri

ANK test edilen mikroorganizmaların üremelerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 8 ile 11 mm arasında ölçülmüştür (Tablo 3). ANK'nin minimum inhibisyon konsantrasyonu *S. cerevisiae*'ye karşı %0.25 olarak gözlemlenirken, *S. Enteriditis*, *S. Typhimurium* ve *A. syndowii*'ye karşı %4 olarak rapor edilmiştir. TK'da ise minimum inhibisyon konsantrasyonu *S. aureus*'a karşı %0.125'de gözlemlenirken, en düşük antimikrobiyal etki ise %2 konsantrasyonla *P. expansum*'a karşı görülmüştür (Tablo 4). Bu çalışmada üretilen ANK %1 konsantrasyonlarda *L. monocytogenes* ve *S. aureus*, %2 konsantrasyonlarda *E. coli* ve %1 konsantrasyonlarda da *S. Typhimurium* ve *S. Enteriditis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur (Şekil 9). Genel olarak bu çalışmada, TK, ANK'ye göre daha düşük

konsantrasyonlarda test edilen mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu gözlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kitosanın bakteriler üzerindeki inhibitör etkisinin daha çok bakteriyostatik olduğu görülmüştür. Kitosanın antifungal aktivite gösterdiği mayalardan bazıları *C. albicans*, *C. lambica*, *S. cerevisiae*'dir [32], Yaptığımız çalışmamızda da fungal kitosanın en fazla antimikrobiyal etki gösterdiği mikroorganizma *S. cerevisiae*'dir.

Khalaf [30] yaptığı benzer bir çalışmada *R. oryzae* tarafından üretilen kitosanın, yengeç kabuklarından elde edilen kitosan ile karşılaştırıldığında, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.* ve *E. coli* gibi çeşitli patojenik bakteri suşlarına karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur. *A. niger* misellerinden ticari kitosana kıyasla *E. coli* ve *Salmonella spp.*'ye daha az antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Yine benzer bir çalışmada, No ve ark., [31] farklı viskoziteye sahip kitosan çözeltilerinin *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* ve *S. aureus*'un gelişimi önemli oranda engellediğini, *E. coli*'nin gelişiminde ise 4-5 log'luk bir azalış sağladığını raporlamışlardır [32]. Bu çalışmada da benzer olarak kitosan *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Tablo 3. ANK'nın farklı mikroorganizmaların üremelerine karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapı (mm)
 Table 3. Inhibition zone diameter for ANK against the growth of different microorganisms (mm)

Mikroorganizmalar	Konsantrasyon (%)							
	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	6
<i>Aspergillus japonicus</i>	-	-	-	+	+	+	+	++
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>A. clavatus</i>	-	-	-	+	+	+	++	++
<i>A. syndowii</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. wentii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	-	+	+	+	++
<i>Williopsis saturnus spp. saturnus</i>	-	-	-	+	+	+	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	+	+	++	++	+++
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	+	+	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	++
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

Inhibisyon zon çapları: 7-8 mm (+) 9-10 mm (++) 11-12 mm (+++), Zone yok (-)

Tablo 4. TK'nın farklı mikroorganizmaların büyümelerine karşı oluşturdukları inhibisyon zonları (mm)
 Table 4. Inhibition zones for TK against the growth of different microorganisms (mm)

Mikroorganizma	Konsantrasyon (%)							
	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	6
<i>A. japonicus</i>	-	-	+	+	+	++	++	+++
<i>A. flavus</i>	-	-	-	+	+	+	++	+++
<i>A. clavatus</i>	-	-	+	+	+	++	++	+++
<i>A. syndowii</i>	-	-	-	-	+	+	++	++
<i>A. wentii</i>	-	-	-	+	+	++	++	+++
<i>P. expansum</i>	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>W. saturnus</i>	-	-	-	-	+	+	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	+	++	++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	+	+	+	++	++
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	++	++	++	+++
<i>E. coli O157:H7</i>	-	-	-	-	+	+	++	++
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	-	+	+	++	++
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	+	+	++	++

Inhibisyon zon çapları: 7-8 mm (+) 9-10 mm (++) 11-12 mm (+++), Zone yok (-)



Şekil 9. *S. aureus*'un disk difüzyon petrisinin görüntüsü
 Figure 9. Image of disk diffusion petri dish of *S. aureus*

SONUÇ

Besiyeri amaçlı kullanılan %20'lik çay ekstraktında üretilen *A. niger* misellerinden %17.57 gibi yüksek verimle kitosan üretimi gerçekleştirilmiştir. Kitosan verimi çay ekstrakt miktarının %5'den %20'ye artmasıyla paralel artış göstermiştir. Elde edilen kitosan miktarı

literatürde yer alan çalışmalarda *A. niger* fungusundan elde edilen değerlerin üzerinde olduğu görülmektedir [8]. Elde edilen ANK FT-IR spektrumları birbirleri ve TK ile uyumlu olmakla birlikte, TK'da 3100 cm⁻¹'de kaybolan absorbans bandının, bu çalışmada üretilen ABK spektrumlarında görülmesi açısından farklılık göstermektedir. Ancak ANK'nın diğer benzer çalışmalarda FT-IR spektrumları ile uyumlu olduğu görülmüştür [29]. ANK, TK'ya göre test edilen mikroorganizma türlerine karşı daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu aktivite, artan kitosan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmakta birlikte artış oranı bakteriyel, maya ve küf türüne göre farklılık göstermektedir. ANK en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. cerevisiae*'ye karşı, en düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise *A. syndowii*'ye karşı göstermiştir. *A. niger* küfünün hücre duvarından elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi %92 olarak bulunurken, ticari kitosanın deasetilasyon derecesi ise %89 olarak bulunmuştur. Literatürle kıyaslandığında bu değerlerin yüksek olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan birçok çalışmada yüksek deasetilasyon derecesi sahip olan kitosanların düşük olanlara nazaran daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [47]. Fungal kitosanın viskozitesi literatürde verilen değerlere göre düşük çıkmıştır. Viskozite, kitosan molekül ağırlığının

belirlenmesinde ve dolayısıyla endüstriyel uygulamalarının belirlenmesinde önemli bir parametredir. Daha yüksek molekül ağırlık içeren kitosan, genellikle endüstriyel uygulamalar için arzu edilmeyen yüksek viskoziteli çözümler sunar. Bu bakımdan daha düşük viskoziteli kitosanlar tercih edilir. Kitosanın çözelti viskozitesi, moleküler boyutuna, katyonik karakterine ve konsantrasyonunun yanı sıra çözücünün pH ve iyonik gücüne de bağlıdır [46]. Atık maddeler kullanılarak yüksek miktarlarda üretilen kütlen elde edilen kitosan biyopolimeri, çevre ve canlıya karşı toksik olmayan özelliğinin olması, biyolojik olarak bozunabilir olması, yüksek biyo-uyumluluğu, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından diğer polimerlere kıyasla daha avantajlı olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı farklı disiplinlerde geniş kullanım alanlarına sahip olabilecektir. *A. niger*'in dünya genelinde yaygın olarak bulunması, kolay kültüre edilebilir olması nedeniyle iyi bir alternatif kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. İlave olarak bu çalışma, Türkiye'de çok fazla tüketilen çay atığına da değerlendirilebilecek bir alan kazandırmış olup bu konudaki araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, 22, 87-108.
- [2] Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially n-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 225-228.
- [3] Tokatlı, K., Demirdöven, A. (2015). Kitosan ve kitosan bazlı yenilebilir film uygulamaları. *Akademik Gıda*, 13, 348-353.
- [4] Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 20-31.
- [5] Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.
- [6] Nwe, N., Stevens, W. (2002). Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters*, 24, 131-134.
- [7] Teng, W.L., Khor, E., Tan, T.K., Lim, L.Y., Tan, S.C. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, 332, 305-316.
- [8] Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S., Sams, C.E. (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3888-3894.
- [9] Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization, Department of Microbiology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand, 35, 17-21.
- [10] Kaya, M., Cakmak, Y. S., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Mentés, A., Tozak, K.O. (2014). New chitin, chitosan, and o-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19, 58-69.
- [11] Donald, H.D., Hayes, E.R. (1988). Determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Methods in Enzymology*, 161, 442-446.
- [12] Menon, K.K.G., Mulky, M.J., Sharma, V.S. (1993). The tea industry in India: how to redesign a native tea culture, processing and marketing, Oxford and IBH, New Delhi, pp. 3-10.
- [13] Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A. (1998). Biosynthesis of glucoamylase from *Apergillus Niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. *Bioresource Technology*, 65, 83-85.
- [14] Moore-Landecker, E. (1996). Fundamentals of the fungi. 4th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 251-278.
- [15] Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W.F., Maw, T., Tan, T.K., Khor, E., Wong, S.M., (2002a). Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 49, 235-237.
- [16] Jaworska, M.M., Konieczna, E. (2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 220-224.
- [17] Rane, KD, Hoover, DG. (1993). An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Process Biochemistry*, 28, 115-118.
- [18] Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K., Sannan, T. (1989). Screening of Mucoraceae strains suitable for chitosan production. In Chitin and Chitosan ed. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sanford, P. pp. 171-178. London: Elsevier Applied Science.
- [19] Crestini, C., Kovac, B., Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering*, 50, 207-210.
- [20] Hang, Y.D. (1990). Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnology Letters*, 12, 911-912.
- [21] Xu, Y., Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 215-226.
- [22] Wang, X., Du, Y., Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56, 21-26.
- [23] Arof, A.K., Osman, Z. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 48, 993-999.
- [24] Salokhe, V.M., Rakshit, S.K., Pranoto, Y. (2005.) Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nişin. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 38, 859-865.

- [25] Mincheva, R., Manolova, N., Sabov, R., Kjurkchiev, G., Rashkov, L. (2004). Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials. *e-Polymers* 058, 1-11.
- [26] Han, J., Zhou, Z., Yin, R., Yang, D., Nie, J. (2010). Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 199-205.
- [27] Brugnerotto, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- [28] Velde, V., Kiekens, K.P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58, 409-416.
- [29] Koçer, İ., (2015). Farklı Yöntemlerle Kitosan Eldesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- [30] Goy, R.C., De Britto, D., Assis, O.B.G. (2009). A Review of the antimicrobial activity of chitosan, polímeros. *Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247.
- [31] Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- [32] Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wanga, L., Li, P. (2007). Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, n-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, 342, 1329-1332.
- [33] Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., Li, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71, 694-697.
- [34] Khalaf, S.A. (2004). Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 1033-1036.
- [35] No, H.K., Lee, S.H., Park, N.Y., Meyers, S.P. (2003). Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7659-7663.
- [36] Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat H., Kadak, A.E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126, 1144-1148.
- [37] Kaya, M., Tozak, K.Ö., Baran, T., Sezen, G., Sargin, I. (2013). Natural porous and nano fiber chitin structure from *Gammarus argaeus* (*Gammaridae crustacea*). *Excli Journal*, 12, 503-510.
- [38] Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C. (2013). Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate Polymers*, 92, 90-97.
- [39] Yen, M.T., Mau, J.L. (2007). Physico-chemical characterization of fungal chitosan from Shiitake stipes. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 472-479.
- [40] Cahn, H.Y., Chen, M.H., Yuan, G.F. (2001). Fungal chitosan. *Fungal Science*, 16(1-2), 39-52.
- [41] Yen, M.T., Mau, J.L. (2004). Physicochemical properties of chitin from shiitake stipes and crab shells. *Annual Tainan Woman's Coll. Arts Technol.* 23, 229-240.
- [42] Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., Saimoto, H. (2011). Preparation of chitin nanofibers from mushrooms. *Materials*, 4, 1417-1425.
- [43] Czechowska-Biskup, C., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., Rosiak, J.M. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan-Comparison of Methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, 5-20.
- [44] Kasaai, M.R. (2009). Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers*, 79, 801-810.
- [45] Yang, B.Y., Montgomery, R. (2000). Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 323, 156-162.
- [46] Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- [47] Park, P.J., Je, J.Y., Byun, H.G., Moon, S.H., Kim, S.K. (2004). Antimicrobial activity of heterochitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 317-323.