

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



***Escherichia coli (E. coli)* BİYOFİLMİ ÜZERİNE TİCARİ KİTOZANIN
ANTİBİYOFİLM YETENEĞİNİN SCANNİNG ELEKTRON
MİKROSKOP (SEM)' UNDA KALİTATİF ANALİZİ**

Proje No: THD-2016-6504

Hızlı Destek

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Dilşad ONBAŞLI
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı
Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK
Sercan FİDAN
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Nisan 2017

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar LİSTESİ.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
TEŞEKKÜRLER	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. GENEL BİLGİLER	1
1.1.1. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı.....	1
1.1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları	2
1.1.2.1. Dönüşümlü Tutunma	3
1.1.2.2. Dönüşümsüz Tutunma	3
1.1.2.3. Koloni Oluşumu.....	4
1.1.2.4. Biyofilmin Olgunlaşması	4
1.1.2.5. Biyofilm Oluşturan Hücrelerin Koparak Ayrılması.....	4
1.1.3. Quorum Sensing	4
1.1.4. Kitin ve Kitosan Tanımı	5
1.1.5. Kitosanın Kimyasal Özelliği	6
1.1.6. Kitosanın Çözünürlüğü	7
1.1.7. Kitosanın Kimyasal Aktivitesi	8
1.1.8. Kitosanın Üretimi.....	9
1.1.9. Kitosanın Antimikrobiyal Özelliği	11
1.1.9.1. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivite Mekanizması	12
1.1.9.2. Kitosanın Antimikrobiyal Etkisini Etkileyen Faktörler	12
1.1.9.2.1. Moleküler Ağırlığı (MW).....	13
1.1.9.2.2. Deasetilasyon Derecesi (DD)	14
1.1.9.2.3. Ph.....	14
1.1.9.2.4. Sıcaklık.....	15
1.1.9.2.5. Katyonlar ve Polianyonlar	15
1.1.10. Kitosanın Kullanım Alanları	16

2.MATERYAL VE METOT	21
2.1. Coverslip Üzerinde <i>E.coli</i> Biyofilminin Oluşumu ve Oluşan Biyofilmin Kitosan Duyarlılığının SEM ile Görüntülenmesi	21
3.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	24
KAYNAKLAR.....	26

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünübilirlik durumu	8
Tablo 1.2. Kitosanın sahip olduğu bazı fiziksel özellikler	9

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. 72 saat süreyle 4°C’de kurumaya bırakılan Golden Delicious cinsi elmanın kalikse alanındaki E. coli hücrelerinin oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüsü **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.2. 72 saat süreyle 4°C’de kurumaya bırakılan Golden Delicious cinsi elmanın kalikse alanındaki E. coli hücrelerinin oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüsü **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.3. Biyofilm oluşumunun beş basamağı ve bu basamakları gösteren mikrograflar. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.4. Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.5. Deasetilasyon işlemi..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.6. Geleneksel kitosan üretim şeması **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.7. Kitin ve kitosanın olisakkakaritleri ile kitosanın enzimatik olarak hazırlanması **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.8. E.coli'ye karşı kitosanın antimikrobiyal aktivite üzerindeki pH etkisi (▼ ve , pH 9.0; ve , pH 8.0; ▲ ve Δ, pH 7.0; ■ ve □, pH 6.0; ● ve ○, pH 5.0) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.9. Kitosanın hidrojel yapıları (kovalent bağ, + pozitif yüklü kitosan, kitosan, ilave polimer, iyonik çapraz bağlayıcı, iyonik etkileşim) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 2.1. NB besi ortamında 8 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi (kontrol) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 2.2. %0,125 kitosan içeren NB besi ortamında 8 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 2.3. NB besi ortamında 24 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi (kontrol) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 2.4. % 0,125 kitosan içeren NB besi ortamında 24 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmaya maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne
(Proje No: THD-2016-6504) teşekkür ederiz.

ÖZET

Biyofilm, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) içine gömülü ve yüzeye bağlı mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu bir topluluktur. Birçok klinik alet ve ekipmanda sıklıkla kolonizasyon gerçekleşmekte ve bu biyofilmlerin antibiyotik tedavisine direnç gösteren inatçı infeksiyonların da kaynağı olabildiği görülmektedir. Biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla klasik antimikrobiyal ajan tedavi yaklaşımları dışında daha etkili ve alternatif teknolojilere gereksinim vardır. Kitozan, biyomedikal alanlarda farmasötik bir ajan olarak kaydedeğer bir önem kazanmış, toksik olmayan, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, antimikrobiyal özelliklere sahip bir biyopolimerdir. Çalışmada, yüksek biyofilm oluşturduğu bilinen *E. coli* bakterisi ve bu bakterinin oluşturduğu zararlı biyofilmlerin engellenmesi/giderilmesi için yeni antibiyofilm yaklaşım sunulacaktır. Dolayısıyla çalışmada *E. coli*'nin oluşturduğu biyofilm tabakası kitozanla muamele edilerek SEM analiziyle görüntülenecek ve kitozanın, oluşan biyofilm tabakası üzerinde yaptığı hasar tespit edilecektir.

Anahtar Kelimeler: *E.coli*, Kitozan, Antimikrobiyal, SEM

ABSTRACT

Biofilm is a community of surface-bound microbial cells embedded in extracellular polymeric materials (EPS). Many clinical instruments and equipment frequently undergo colonization, and these biofilms can also be a source of persistent infections that resist antibiotic therapy. Apart from classical antimicrobial agent treatment approaches, more effective and alternative technologies are needed to prevent biofilm formation. Chitosan is a non-toxic, biocompatible, biodegradable biomolecule with antimicrobial properties that is of vital importance as a pharmaceutical agent in biomedical fields. In the study, a new antibiotic approach will be presented for the prevention and elimination of known *E. coli* bacteria that produce high biofilms and harmful biofilms produced by this bacteria. Therefore, the biofilm layer formed by *E. coli* will be treated with chitosan and analyzed by SEM analysis and the damage of chitosan on the formed biofilm layer will be determined.

Key Words: *E. coli*, Chitosan, Antimicrobial, SEM

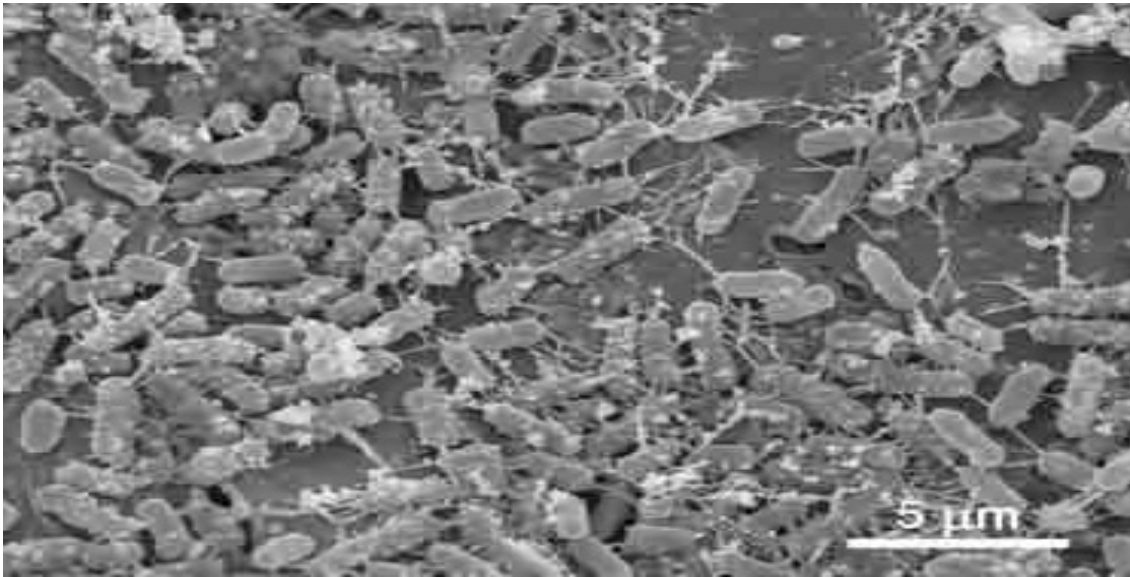
1.GİRİŞ

1.1. GENEL BİLGİLER

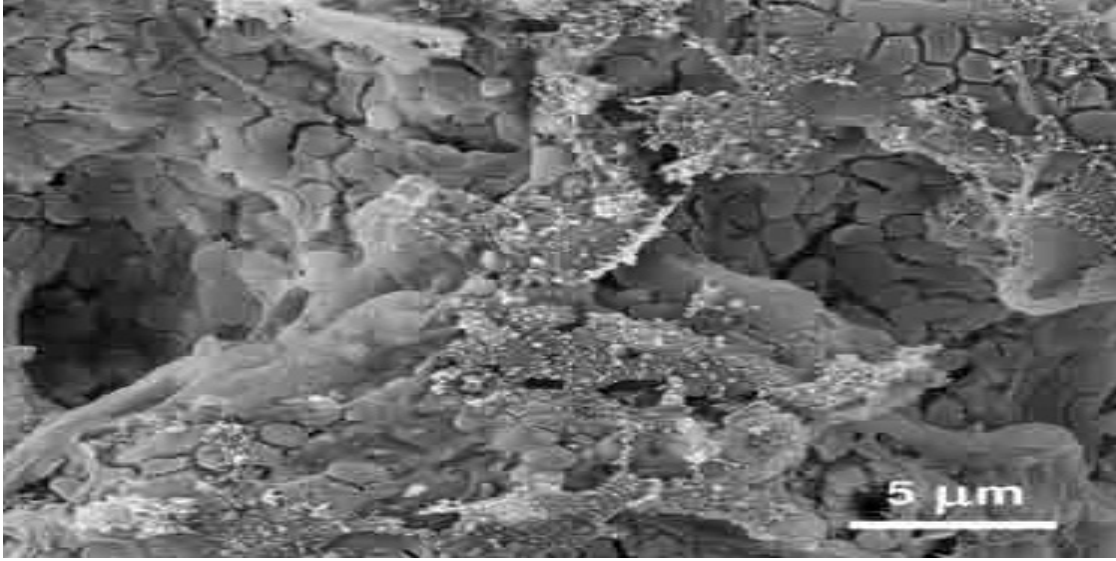
1.1.1. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı

Bakteriyel biyofilm, esasen yüzeye bağlanmış mikrobik hücrelerden oluşan ve biyofilm oluşturunca mikroorganizmalar tarafından üretilen hücre dışı polimerik bir matrikstir (1). Biyofilm yapısının kütleye %97'si hidrate haldedir. Biyofilm matriks yapısını oluşturan diğer bileşenler; %1-2 globuler glikoproteinler, %1-2 EPS ve diğer proteinler, fosfolipit, %1-2 nükleik asit ve lipidler olmasına rağmen bu oranlar organizmaların çeşidine, gelişme ortamının doğasına, fizyolojik özelliklerine, akışkanın tipine ve genel fiziksel özelliklere göre değişim göstermektedir (2).

Matriksin yoğunluğu ve genişliğinin sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değiştiği ifade edilmektedir. Mikroskop altında incelendiğinde biyofilmler; arasından kanalların geçtiği, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstraselüler yapıda birikmesiyle, mercan kayalıklarına benzer yapı oluşturan ve bunun üzerindeki piramid veya mantar şekilli uzantılardan meydana gelen bir oluşum görünümünü vermektedir (2).



Şekil 1.1. 72 saat süreyle 4oC’de kurumaya bırakılan Golden Delicious cinsi elmanın kalikse alanındaki E. coli hücrelerinin oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüsü (3)



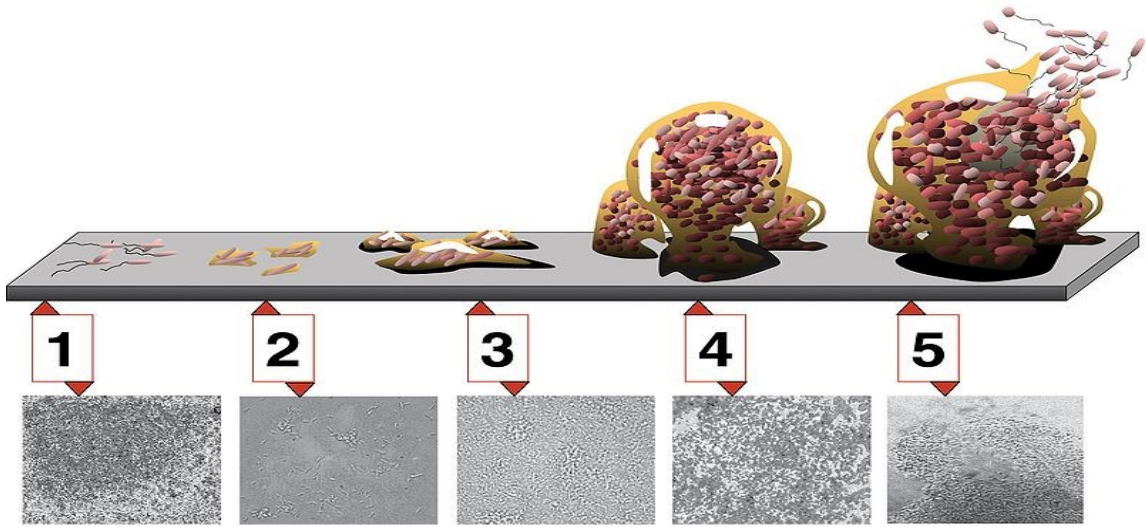
Şekil 1.2. 72 saat süreyle 4oC’de kurumaya bırakılan Golden Delicious cinsi elmanın kalikse alanındaki *E. coli* hücrelerinin oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüsü (3)

Biyofilmin gelişme potansiyeli, mikroorganizmaların yakın çevredeki besinleri kullanımı, hücre içine alınımı ve atıklarının uzaklaştırılmasıyla yakın ilişkili olup, bunların haricinde besin kısıtlanmasıyla sunulan “quorum sensing” diye adlandırılan moleküllerin salınımı, ortamın pH değeri, karbon kaynağı, O₂ perfüzyonu ve ozmolarite de biyofilm gelişimi için önemli etkenlerdir (4, 5). “Quorum sensing”, biyofilm oluşumu sonucunda gen ekspresyonunda önemli değişiklikler ve bu değişiklikler bakteriyel hücre-hücre arasında salınan sinyal sistemidir (6).

1.1.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm tabakası çok çeşitli çevrelerde oluşmasına rağmen, en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir sisteme sahiptir. Gerçekleştirilmiş birçok çalışmada, bakteriyel biyofilmlerin sabit bölgelerde biyolojik dönüşümlerini (başlangıç, olgunlaşma, muhafaza ve çözünme) tamamladıkları belirlenmiştir (7). Biyofilm gelişiminin başlaması ortamda gerekli ve yeterli besinin var olup olmaması gibi spesifik çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Sürekli besin sağlandıkça biyofilm gelişimi devam eder ancak, ortamda besin maddeleri tükendikçe bakterilerin yüzey ile bağlantıları zayıflar ve bakteriler planktonik (serbest) hallerine geri dönerler. Besin azlığı, bakteri hücrelerin taze ve yeni besin kaynakları aramalarına, bulundukları ortamlara daha iyi uyum sağlamalarına ve yayılmalarına neden olur (8).

Bakterilerin yüzeylere tutunmasını etkileyen organik ve inorganik maddelere bağlı olarak içinde bakterilerin olduğu herhangi bir sulu yüzeyde bakteriyel biyofilm oluşabilir (9).



Şekil 1.3. Biyofilm oluşumunun beş basamağı ve bu basamakları gösteren mikrograflar (10)

1.1.2.1. Dönüşümlü Tutunma

Biyofilmler uygun besin koşullarına sahip herhangi elverişli bir ortamda oluşabilir. Hücrelerin bağlandığı uygun yüzeyler metal, cam, plastik, tıbbi implant, paslanmaz çelik gibi abiyotik veya epitel hücreleri, insan derisi ve hayvan dokuları gibi biyotik olabilir. Sıcaklık, pH ve ortamın iyonik kuvveti gibi çevresel koşullar dışında, sıvı bir ortamda biyofilm oluşumunu engelleyen itici elektrostatik ve hidrodinamik güçler de vardır (11). Yüzeye tutunan hücreler çok az miktarda da olsa EPS üretirler ve bundan dolayı bağımsız hareket edebilme yeteneğindedirler (12). Aynı zamanda yüzeyin özellikleri de bakterilerin yapışmasında önemli etkindir. Bakteriler arasında tür farklılığına göre çeşitli yüzeylere farklı miktarlarda bağlanma gösterirler. Örneğin *Salmonella* ve *Listeria* 'nın hidrofobik yüzeylere tutunmaları, hidrofilik yüzeylere göre daha fazla tutunabildikleri saptanmıştır. Hücreler dönüşümlü tutunma aşamasındayken durulama gibi basit yıkama ile yüzeyden kolayca uzaklaştırılabilirler (13).

1.1.2.2. Dönüşümsüz Tutunma

Dönüşümsüz tutunma, bakterilerin ürettiği EPS varlığında herhangi bir yüzeyle yapmış olduğu zayıf bağların kalıcıya dönüşmesidir (14). Bakteri ile yüzey arasında kısa mesafeli etkileşimler olan hidrofobik etkileşimler, dipol-dipol etkileşimi, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağları gibi fiziksel olaylar gerçekleşmektedir. Bakteri hücreleri flagella (kamçı) ve pili (ince kıl) gibi organellerinin yanı sıra EPS üreterek yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (15).

1.1.2.3. Koloni Oluşumu

Bakteri hücrelerinin yüzeyde birikmesiyle oluşan mikrokoloni, mikroorganizmaların gelişmesi ve EPS sentezi sonrasında meydana gelir (16). EPS, bakteri ile alt katmanı arasında bağ oluşumuna katkıda bulunur ve aynı zamanda oluşan koloniyi çevresel strese karşı stabil hale getirir (17).

1.1.2.4. Biyofilmin Olgunlaşması

Bu evrede biyofilm oluşturan bakteri hücreleri ortamdaki besin maddelerinin etkisiyle mantara benzer yapılara dönüşürler (16, 18). Mikroorganizmaların bir araya gelerek değişik yüksekliklerde birikinti oluşturduğu mikrokoniler arasında besinlerin iletilmesi ve metabolik atıkların uzaklaştırılması gibi birçok hayati olayda dolaşım sistemi gibi görev yapan su kanalları bulunmaktadır (9, 15). Hücrelerin bu yapıya sahip olabilmesi için yaklaşık olarak 10 gün ya da daha uzun bir süreye ihtiyaç vardır (14).

1.1.2.5. Biyofilm Oluşturan Hücrelerin Koparak Ayrılması

Bakteriyel biyofilm oluşumunun son aşamasıdır. Hücreler bu evrede planktonik (serbest) fazlarına geri dönerler (19). Akış gücünün artması, hücre içi enzimatik bozulmalar, EPS ya da yüzey bağlanma proteinlerin açığa çıkması gibi birtakım faktörler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol üstlenir (20). Ortamda besin maddelerindeki azalma da hücresel ayrılmaların önemli bir nedeni olabilmektedir (7). Bu ayrılma olayı dış kuvvetlerin etkisiyle gerçekleşeceği gibi, bakteriyel biyofilm aşamalarının bir parçası olarak tek bir hücrenin ya da çok sayıda hücrenin kopmasının bir sonucu da olabilir (15).

1.1.3. Quorum Sensing

Evrin sürecinde, bakteriler düşmanlarından korumak için bir duvar geliştirmişlerdir. Bu koruma, biyofilm gibi tanımlanan ve biyolojik olarak üretilen polimerler ile çevrelenmiş makro boyutta koloniler oluşturan bir yüzeye bağlı olarak gösterilen yaşam tarzı ile ilişkilidir. Biyofilm oluşumu, bakterilerin hayatta kalması için bir strateji olarak kabul edilir. Bu birliktelik, bakterilere çeşitli tepkilere karşı adaptasyon ve artan tolerans gibi bazı avantajlar sağlar. Ayrıca, biyofilm yapısı içindeki bakteriler, “Quorum Sensing” adı verilen özel bir yolla birbirleri ile iletişim kurabilirler. Bu iletişim için bakteriler kendi çevrelerine nüfuz

edebilen küçük sinyal molekülleri üretir ve özel bir reseptör proteinleri ile konsantrasyona bağlı etkileşim sağlarlar. Quorum sensing; virülans faktörleri, hareketliliği, koruma, biyofilm oluşumu/bakım vb ifade kontrolü gibi birçok hayati süreçlerle ilgilidir. Başka bir deyişle QS, bakteriler arasında popülasyon yoğunluğunu belirler (21).

1.1.4. Kitin ve Kitosan Tanımı

Kitin, Yunan dilinde zırh anlamında kullanılan kiton kelimesinden türetilmiştir. İlk olarak 1811 yılında mantarlarda keşfedilmiş daha sonra 1830’lu yıllarda böceklerden izole edilmiştir ve 1859 yılında ise C. Rouget kitosanı keşfetmiştir (22-26).

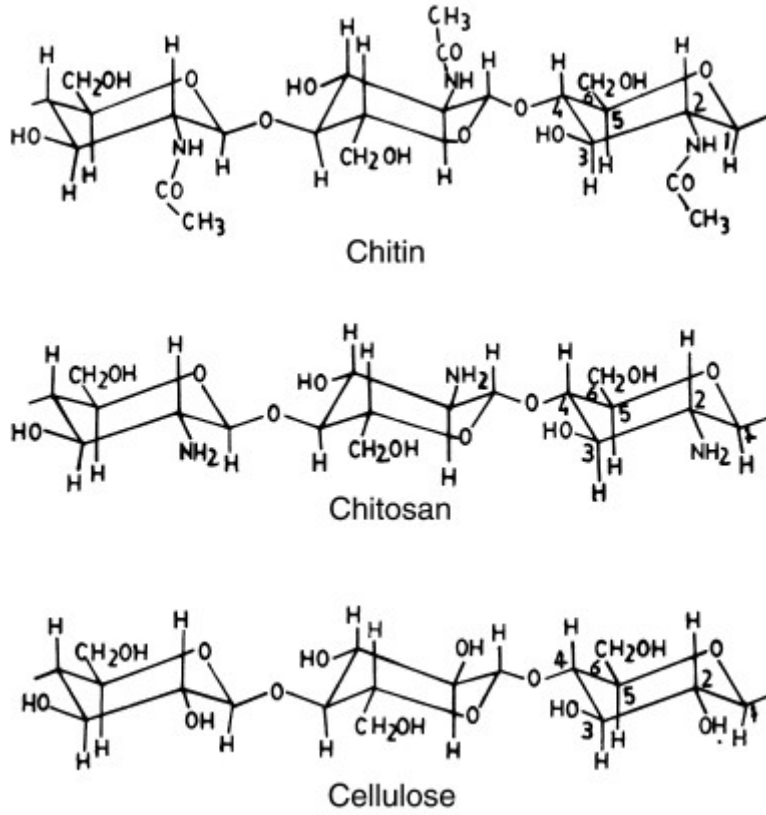
Kitin yapısal olarak selüloza benzer olmasına rağmen, en çok inertliğinden dolayı selüloza göre kitine daha az önem verildi. Bu yüzden kullanılmayan bir kaynak olarak kaldı. Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosan ürünleri kısmen reaktif ve toz, macun, ince tabaka, lif gibi çok çeşitli formlarda üretilebilir (27).

Kitin, selülozdan sonra yeryüzünde en çok bulunan ikinci polimer ve $\beta(1\rightarrow4)$ bağlı glikandır. 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz (N-asetilglukozamin)’den oluşmuş, poli- $[\beta(1\rightarrow4)$ -2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz] olarak adlandırılan en bol polisakkaritlerden biridir (28).

Karides, yengeç gibi kabuklu olup suda yaşayan canlıların ana bileşenidir. Böceklerin iskelet yapısında ve mantarların hücre duvarlarında bulunur. Dünyada ortalama yıllık kitin üretimi 150×10^3 ton dolayında olduğu bildirilmektedir. Bu üretimin 32×10^3 tonu mantarlardan, 56×10^3 tonu karidesten, 23×10^3 tonu istiridyelerden ve 39×10^3 tonu birtakım deniz kabuklularından karşılanmaktadır. Böcek kabuklarında ortalama %23,5 civarında kitin bulunurken, bu oran yengeç ve karideste sırasıyla %17 ile %32 civarları arasında değişim göstermektedir (29).

Kitosan $[\beta(1\rightarrow4)$ -2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz] kendine özgü bazik bir polisakkarittir ve genellikle bir homopolimer olarak ifade edilmektedir. Ancak, kitinin destilasyon işlemi nadiren tamamlanır. Çoğu ticari ve laboratuvar ürünleri N-asetilglukozamin (NAG) ve N-glukozamin tekrar birimlerinin bir kopolimeri olma eğilimindedirler. Kitosanın hazırlanması ve iki tekrarlı birimlerinin oranı kullanılan kaynağa bağlıdır, ama glukozamin birimleri baskındır. Kitosan yapısal olarak selüloza benzerdir ve ikisi arasındaki tek fark, karbon-2 (C-2) pozisyonunda selülozda ihtiva eden hidroksil (-OH) grubu yerine kitosanda amin (-NH₂)

grubunun bulunmasıdır. Kitosanın $\beta(1\rightarrow4)$ anhidroglikozidik bağı selülozda da mevcut olmasına rağmen, bu karakteristik özellik selüloz tarafından kullanılmaz (30).



Şekil 1.4. Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı (31)

1.1.5. Kitosanın Kimyasal Özelliği

Kitosan, bir amino grubunun yanısıra hem primer, hem de sekonder hidroksil grupları sırasıyla C-2, C-3, C-6 konumlarında olmak üzere toplam üç tane reaktif fonksiyonuna sahiptir (32). Bu grupların kimyasal modifikasyonları farklı uygulama alanlarında çok sayıda yararlı olan malzemeler sağlamaktadır (33).

Deasetilasyon derecesi (DD), kitinden glukozamin monomer kalıntıların oranıdır. Bu kitinin çözünürlüğü ve çözelti özellikleri üzerinde dikkat çekici bir etkiye sahiptir. Genel olarak, kitin ve kitosan asetik asit gibi sulu seyreltik asitlerde çözünürlüklerine göre ayırt edilirler (34). Kitin, seyreltik asetik asit içinde çözünmez. Kitin belli bir derece üstünde (yaklaşık olarak %60 deasetilasyon) deasetilasyonlandığı zaman bir asit içinde çözünür hale gelir ki, bu da kitosan olarak atfedilir (35). DD'yi ölçmek için IR spektroskopisi (35-39), UV spektroskopisi (40), dairesel dikroizm (41), ^1H NMR spektroskopisi, (42, 43), ^{13}C katı hal NMR spektroskopisi (44), jel geçirgenlik kromatografisi (40), titrasyon yöntemleri (38, 44-

47), martık salisilaldehit analizi (38), denge boya adsorpsiyonu (48), element analizi, HPLC ile takip edilen asit bozulması (49), termal analiz (50) ve piroliz kütle spektrometrisi (51) gibi birçok yöntem kullanılmıştır. Molekül ağırlığı doğal ve sentetik polimerlerin kullanımları için çok önemli bir parametredir. Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, kullanılan kaynağa ve deasetilasyon koşullarına (sırasıyla; süre, sıcaklık ve NaOH'ın konsantrasyonu) bağlıdır. Kabuklu deniz hayvanlarının ihtiva ettiği kitinin deasetilasyonundan elde edilen kitosanın molekül ağırlığı 100,000 g/mol üzerinde olabilir. Sonuç olarak, tıbbi alanlar gibi uygulamalarda kolaylık sağlama için kimyasal metotlarla molekül ağırlığının azaltılması gerekmektedir. Kitosanın molekül ağırlığı, ışık saçılım spektroskopisi (52-54) jel geçirgenlik kromatografisi (55-59) ve viskozimetri (48, 60-62) gibi çeşitli yöntemler ile belirlenebilir.

1.1.6. Kitosanın Çözünürlüğü

Kitosanın çözünürlüğü olgusu, kimyasal modifikasyon, film oluşturma veya lif oluşumu gibi durumlarda kullanılması açısından oldukça önemlidir. Kitin ve kitosanın çözünürlüğü ise; pH'ya bağlıdır ve nötral saf suda mümkün değildir. Bu nedenden ötürü, kitinin organik çözücüler veya asidik pH'daki sulu çözeltileri ılımlı koşullar altında da mümkün olmamaktadır. Nedeni ise; kitinin molekül içi-dışı hidrojen bağlarına sahip olan yarı kristalik polimer yapısından kaynaklanmaktadır. Birçok çözücü bulunmasına rağmen, çoğu toksite, aşındırıcılık ve mutajenik özelliklerinden dolayı kullanışlı değildir. Kitine göre daha iyi çözülebilir formu olan kitosan, pH 6,5 değerinin altında kalan pH değerlerinde serbest haldeki amin gruplarının protonlanması ile kitosan, seyreltik mineral çözeltileri veya organik asitler içinde kolayca çözülebilir. Bu protonasyon mekanizması sayesinde katyonik formuna bürünen kitosan birçok uygulama alanında kullanılır. Bu uygulama alanlarında asetik asit ve formik asit sıklıkla kullanılan çözücülerdir. Bu çalışmalara bağlı olarak kitin ve kitosan için çok sayıda çözücü literatürde bulunabilir (63).

Tablo 1.1. Kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünübilirlik durumu (64)

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

(+) : çözünübilir, (-) : çözünemez

Genel olarak, kitin ve kitosanın çözünürlüğü molekül ağırlığı arttıkça azalır. Kitin ve kitosanın 8 veya daha düşük polimerizasyonu sonucu oluşan oligomerleri, pH'ya bağlı olmaksızın suda çözünübilir (65). Suda çözünebilen kitin ancak, ya kitinin homojen deasetilasyonu (66) ya da kitosanın N-asetilasyonu ile hazırlanabilir (67, 68).

Suda çözünürlüğü, heterojen reaksiyon yerine homojen reaksiyon yoluyla ve deasetilasyon derecesinin yaklaşık olarak 0,5 olduğunda elde edilebilir. Homojen reaksiyon ile N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin ünitelerinin gelişigüzel bir şekilde kopolimer ürünleri oluşurken, heterojen reaksiyonda bu iki birimin bir blok kopolimer ürünlerini meydana getirir. X-ışınları difraksiyon çalışmalarında, bu iki polimerin deasetilasyon dereceleri aynı olmasına rağmen, blok kopolimerin son derece kristalize olduğunu, buna karşın düzensiz kopolimerin neredeyse amorf olduğu ortaya çıkarıldı. Suda çözünürlüğü, rastgele asetil gruplarının dağılımı ve kitinin sıkı kristal yapısının tahrip olmasından dolayı geliştirilmiş hidrofilitesine dayandırılmıştır (66, 68).

1.1.7. Kitosanın Kimyasal Aktivitesi

Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), sekonder (C-3) hidroksil grupları ile her deasetillenmiş birimi C-2 konumunda ki amino grupları olmak üzere üç reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kitosanın mekaniksel ve fiziksel özelliklerinin yanı sıra, sudaki çözünürlüğünü değiştirmek için kimyasal modifikasyonlara uğrayabilirler. Hidroksil grubunu içeren kitosanın, çözelti ortamında verdiği reaksiyon tipik esterleşme ve eterleşme

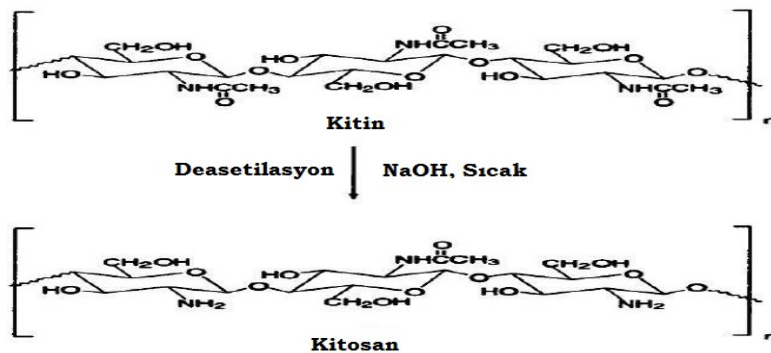
reaksiyonlarıdır. Kitosanın nükleofilik özellikte olan amino grubu ise, alkil halojenürler, asit klorürler, aldehytler veya ketonlar ile reaksiyona sokulmasıyla indirgeyici alkilasyon ve N-alkilasyon, N-asilasyon gibi reaksiyonları verir. Seçimli O-süstitüsyon reaksiyonu, reaksiyon süresince bir amino grubunun koruma altına alınması ile gerçekleştirilebilir. Kitosanın yapısı aynı zamanda, çapraz bağlanmalarlar ve bütünleştirme kopolimerizasyonu ile değiştirilebilir (69, 70).

Tablo 1.2. Kitosanın sahip olduğu bazı fiziksel özellikler (71)

Özellik	Değer
Molekül ağırlığı	50-2000 kDa
DD	%40-100
Viskozite	< 2000 mPaS
Su bağlama kapasitesi	%450-1150
Yağ bağlama kapasitesi	%314-535
Yığın yoğunluğu	0,06-0,39 g/cm ³
Renk	Donuk sarı-beyaz
Çözünürlük (suda)	pH<6,5

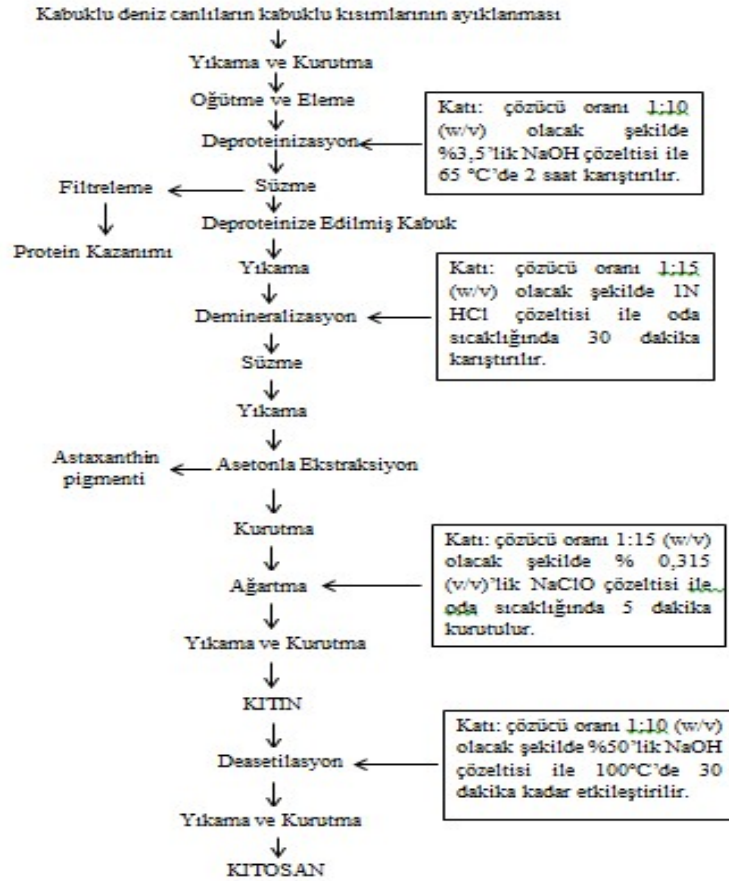
1.1.8. Kitosanın Üretimi

Bazı mantar türlerinde sınırlı miktarlarda bulunmasından dolayı, kitosan, kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile ticari olarak elde edilir (69). Asetilasyonun amacı seyreltik asetik asit içinde kolayca çözülebilir kitosan üretmektir. Deasetilasyon, kitinin yapısında ihtiva eden N-asetil bağlarını hidrolize etmek için %40-50'lik sulu NaOH çözelti ile 100 °C'de veya daha yüksek sıcaklıklarda en az 30 dakika kadar etkileşimini kapsayan bir işlem olarak tanımlanabilir. Bu gibi heterojen işlem ile mükemmel bir deasetilasyon elde etmek zordur, ancak işlemi tekrarlayarak % 98'e varan asetilasyon değerlerine ulaşılabilir (72). Kitosanın toz şeklinin yerine jel formunu alkali ortamda deasetilasyon işlemi ile %100'e yakın kitosan hazırlamışlardır.



Şekil 1.5. Deasetilasyon işlemi (72)

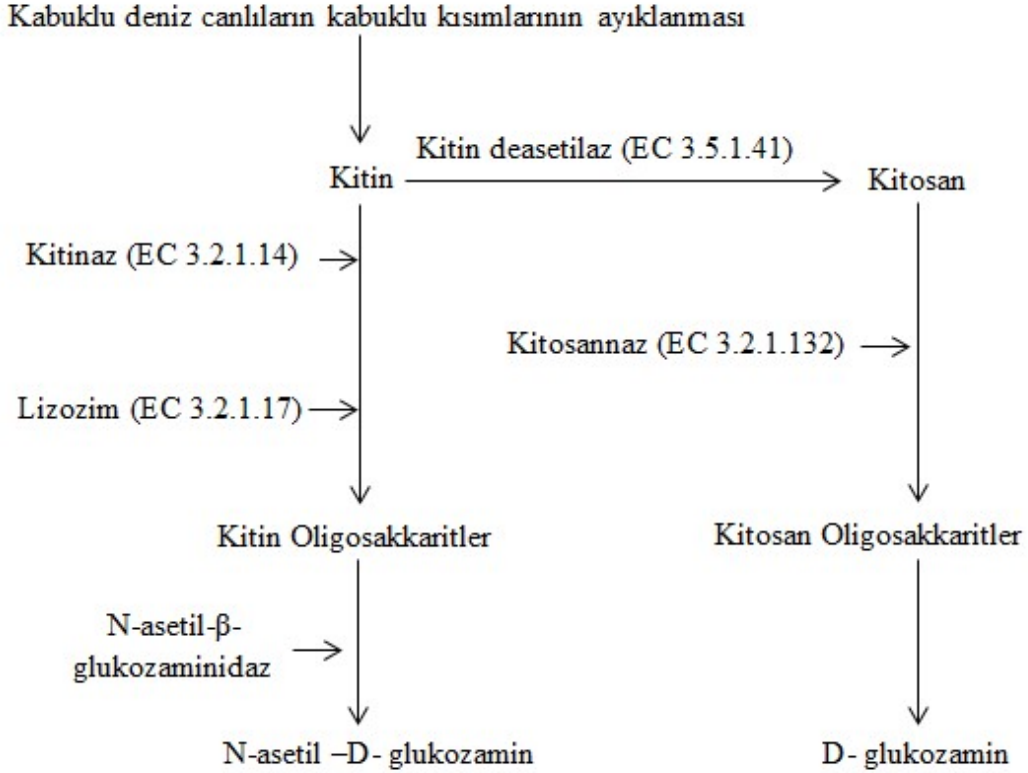
Doğada kitin kaynağını en çok ihtiva eden yengeç (Dungeness yengeci), karides (Pasifik karidesi), ıstakoz ve kerevit kabuklarından kitosan, kolayca elde edilebilir. Denizcilik sektöründe, bu kaynaklardan elde edilen atıklar yıllık 1,2 milyon tondan fazladır fakat, kabuklu deniz canlıların yenilebilir kısımları ayırt edildikten sonra geriye kalan bu atıkların sadece %20'lik bir kısmı işlenebilmekte ve ürün olarak değerlendirilebilmektedir (73).



Şekil 1.6. Geleneksel kitosan üretim şeması (73)

Kitin ve kitosanın üretimi sonrasında büyük miktarlarda sıvı kimyasal atık meydana gelir. Bu nedenle geniş çapta kitosan üretimi için kitosanın istenilen özelliğinin korunmasına karşın deasetilasyon işleminin basitleştirilmesine gerek duyulmuştur (74). Kitosanın hazırlanmasında bu dezavantajların üstesinden gelmek için kitin deasetilazların kullanılmasıyla alternatif enzimatik yöntem keşfedilmiştir. Kitinin kitosana dönüşümü için kitin deasetilazların kullanımı, şu anda kullanılan kimyasal prosedürlerin aksine, yeni ve kontrollü, degrade olmayan bir süreç; üretimin sonucunda iyi tanımlanmış kitosan olasılığını sunar (75). Hirano,

kataliz enzim setleriyle kitin ve kitosan oligosakaritlerini hazırlamış ve kitin-N-deasetilaz enzimini kullanarak enzimatik dönüşüm ile kitinden kitosanı elde etmiştir (76).



Şekil 1.7. Kitin ve kitosanın oligosakkaritleri ile kitosanın enzimatik olarak hazırlanması (76)

1.1.9. Kitosanın Antimikrobiyal Özelliği

Kitosanın su arıtma, petrol yayılımını giderme, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, yara iyileşmesi, gıda koruma, enzim immobilizasyonu gibi çeşitli alanlarda geniş bir yelpazede uygulamaları vardır. Kitosan geniş bir mikroorganizma aralığına karşı antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu aktiviteyi açıklamak için önerilebilir çeşitli mekanizmalar vardır, bunlardan biri, bu antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili olan polimerin temel yapısı ve amin içeriğidir. Kitosan pozitif yüklü bir molekül ve antimikrobiyal etki hedefi olarak bakterinin negatif yüklü hücre duvarı olup, membranın normal fonksiyonlarını bozar ve engel olur. Örneğin, hücre içi bileşenlerinin dışarıya sızmasını destekler ve aynı zamanda hücre içerisine besin taşınmasını inhibe eder (77-79).

Kitosan tıp, ilaç, gıda, tarım ve tekstil gibi çeşitli alanlarda ve bir antimikrobiyal ajan olarak, uygulamaları bulunmaktadır. Kitosanın antimikrobiyal etkisi, sahip olduğu doğal polikasyonik özelliğinden dolayı atfedilmiş, çeşitli bakteri ve mantarlara karşı kitosanın etkinliğini gösteren

birçok çalışma bildirilmiştir. Kitosan bakterileri takiben, mantarlara ve deniz yosunlarına karşı daha da etkilidir. İlaç uygulamalarında bir antimikrobiyal madde olarak kitosandan etkili bir biçimde yararlanmak için, antimikrobiyal mekanizmasını ve antimikrobiyal aktivitesini etkileyen faktörleri bilmek önemlidir (80).

1.1.9.1. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivite Mekanizması

Kitosanın antimikrobiyal aktivite mekanizması tam olarak kanıtlanamamış olmasına rağmen, çeşitli teoriler öngörülmüştür. En yaygın olarak önerilen mekanizma, kitosanın pozitif yüklü kısmı ile birçok mantar ve bakterinin hücre yüzeyindeki negatif yüklü kısımları arasında ortaya çıkan elektrostatik etkileşimdir. Bu etkileşim daha çok, hücrenin yüzeyini ve hücrenin geçirgenliğini değiştirerek elektrolitler, UV emici madde, proteinler, amino asitler, glikoz ve laktat dehidrojenaz gibi hücre içi bileşenlerinin dışarıya sızmasına neden olur. Sonuç olarak mikroorganizmaların normal metabolizmasını inhibe ederek bu hücrelerin ölümüne yol açmaktadır (74, 81-85). Literatürde önerilen diğer bir mekanizma ise, bazı mantar ve bakterilerin DNA ile kitosan arasındaki etkileşimden dolayı, mRNA ve protein sentezini inhibe etmesidir. Bu olayın meydana gelebilmesi, yani kitosanın mikroorganizmaların hücre içine nüfuz edebilmesi için yeterince düşük bir molekül ağırlığına sahip olması gerekmektedir (79, 86, 87).

Yukarıda yapılan çalışmalar Tokura et al. (88)'un yaptıkları gözlemlerle çelişiyordu. Tokura et al. (88) ortalama molekül ağırlığının 2200 ve 9300 kDa arasında olan kitosanın antimikrobiyal etkisi üzerinde çalışma yapmışlardır. *E. coli* üzerinde yapılan çalışmada, molekül ağırlığı 2200 kDa olan kitosan bakterinin hücre duvarından içeri nüfuz edip bakterinin büyümesini hızlandırırken, molekül ağırlığı 9300 kDa olan kitosan ise, üremesi esnasısında bakterinin hücre duvarında yığılma göstererek mikroorganizmanın üremesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Kitosanın antimikrobiyal etkisinin, DNA transkripsiyonu inhibe etmesi yerine hücre duvarı boyunca besin girişini bloke ederek bakterilerin metabolik aktivitelerinin baskılanmasına bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir.

1.1.9.2. Kitosanın Antimikrobiyal Etkisini Etkileyen Faktörler

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi molekül ağırlığı (83), deasetilasyonun derecesi, (86), pH (84), zincir uzunluğu (89), test edilen mikroorganizmanın suşu veya türünün tipi (90), sıcaklık

(84), katyonlar ve polianyonlar (74), kitosan konsantrasyonu 82), kitosanın türü (temel veya türevi), substrat ve/veya besin bileşimi ve çevre koşulları (91) gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenir.

1.1.9.2.1. Moleküler Ağırlığı (MW)

Tanigawa et al. (89) D-glukozamin hidroklorürün (kitosan monomer) birtakım bakterilerin büyümesine karşı herhangi bir inhibisyon göstermediğini, oysa ki kitosanın etkili olduğunu rapor etmiştir. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin sadece katyonik doğasından değil, aynı zamanda zincir uzunluğuyla ilişkili olduğu öne sürülmektedir.

Hirano and Nagao (92) kitosanın polimerizasyon derecesinin (DP), çeşitli fitopatojenin büyüme inhibisyonu arasındaki ilişkiyi incelemişler ve çalışmalarında yüksek molekül ağırlıklı (HMW) kitosan (MW 400.000 kDa, DD 0.95), düşük molekül ağırlıklı (LMW) kitosan (MW ve DD: belirtilmemiş) ve kitosan oligomeri (DP 2-8) olmak üzere üç farklı kitosan kullanmışlardır. Kitosanın molekül ağırlığının artışına bağlı olarak, kitosanın büyümeyi inhibe ettiğini ve mantar sayısında azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Üremeye karşı LMW-kitosan ile güçlü, HMW-kitosan ile zayıf inhibisyon gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bu durum yüksek molekül ağırlıklı kitosanın, yüksek viskozitesinden dolayı test organizmasının HMW-kitosan ihtiva eden agar jel içinde yayılmasının zorluğu ile açıklanmıştır.

Shimojoh et al. (90) kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin, büyük ölçüde kitosanın moleküler ağırlığına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bazı ağız bakterilerini, mürekkep balığından elde edilmiş kitinin (β -kitin) deasetilasyonu (DD 0,99) sonrasında dört farklı molekül ağırlıklarına sahip kitosanın aynı konsantrasyonlarında kullanarak, 1 dakika boyunca %1'lik laktat tampon (pH 5,8) içinde muamele etmişler ve 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakmışlardır. Molekül ağırlığı 220,000 kDa olan kitosanın bakterisidal aktivitesinin çok, molekül ağırlığı 10,000 kDa olan kitosanın bakterisidal aktivitesinin daha az olduğunu bulmuşlardır. Molekül ağırlığı 70,000 kDa olan kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, bazı bakteriler için 426,000 kDa molekül ağırlıklı kitosanın antimikrobiyal aktivitesinden daha iyi olduğunu fakat, diğerleri için etkinliğinin tersine döndüğünü belirtilmiştir. Bu bulgular ışığında, kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin hedeflenen mikroorganizmalara bağlı olarak değişim gösterdiği öne sürülmüştür.

Yalpani et al. (93) kitosanın (orta ve yüksek moleköl ağırlıklı) *Bacillus circulans*'a karşı kito-oligosakkaritlerden (DP 2-30) daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, *E.coli*'ye karşı ise kito-oligosakkaritlerin kitosana göre daha az antimikrobiyal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

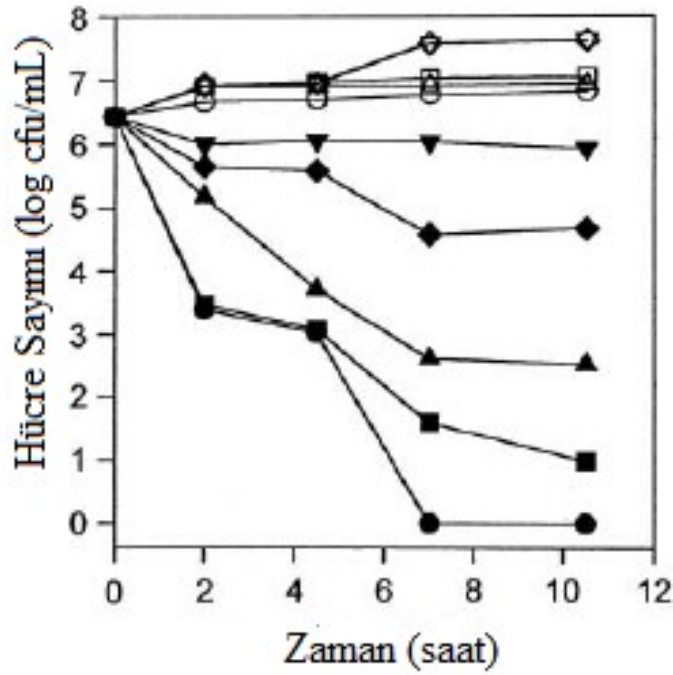
Birçok araştırmacı, kitosanın *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır (94). Hwang et al. (83) kitosanın moleköl ağırlığının 10,000-170,000 kDa aralığında yaptıkları araştırmadan, yaklaşık 30,000 kDa moleköl ağırlığındaki kitosanın *E.coli* üzerinde daha yüksek bakterisidal etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Bazı araştırmacılar kitosanın moleköl ağırlığının, mikroorganizmaların inhibisyonu için kritik önem taşığını öngörmüşler ve daha iyi antimikrobiyal aktivite için kitosanın moleköl ağırlığının 10,000 kDa'dan daha yüksek olması gerektiğini ifade etmişlerdir (95).

1.1.9.2.2. Deasetilasyon Derecesi (DD)

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, kitosanın DD ile doğru orantılıdır (96). DD'de artış, kitosan üzerindeki amino gruplarının sayısında da artma anlamına gelir. Bunun sonucunda, kitosanın tamamen suda çözünmesi ve asidik şartlar altından protonlanan amino gruplarının sayısının artmasından ötürü kitosan ile mikroorganizmaların negatif yüklü hücre duvarları arasında bir etileşim olasılığının artmasına neden olur (97).

1.1.9.2.3. Ph

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi büyük oranda pH'dan etkilenir (86). Tsai and Su (84) kitosanın (DD 0,98) *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisini pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 gibi farklı pH değerlerinde incelemişler, buna bağlı olarak pH değeri arttıkça aktivitenin azaldığını ve kitosanın pH 9.0'da antimikrobiyal etkisinin çok az olduğunu, en yüksek aktiviteyi ise pH 5.0 değerinde olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 1.5). Bazı araştırmacılar kitosanın pH 7.0 değerinde suda düşük çözünürlüğünden ve amino gruplarının deprotonasyonundan dolayı, pH 7.0'da kitosanın antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Bu bulgular kitosanın antimikrobiyal aktivitesi onun doğal katyonik yapısından ileri geldiği öne sürülmektedir (37, 44).



Şekil 1.8. E.coli'ye karşı kitosanın antimikrobiyal aktivite üzerindeki pH etkisi (▼ ve ○, pH 9.0; ◆ ve ◇, pH 8.0; ▲ ve △, pH 7.0; ■ ve □, pH 6.0; ● ve ○, pH 5.0) (42)

1.1.9.2.4. Sıcaklık

Tsai and Su (42) *E.coli*'ye karşı kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki sıcaklığın etkisini incelemişler ve 150 ppm kitosan ihtiva eden fosfat tamponu (pH 6.0) içindeki hücre süspansiyonları, farklı zaman aralıklarında 4, 15, 25 ve 37°C'de inkübe edilmiş ve hayatta kalan hücrelerin sayımını yapmışlardır. Bu bulgular sonucunda antibakteriyel aktivitenin sıcaklık ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. 25°C'de 5 saat içinde ve 37°C'de 1 saat içinde *E.coli* hücrelerinin tamamen öldüğünü saptamışlardır. Bununla birlikte düşük sıcaklıklarda (4 °C ve 15°C) ilk 5 saat içinde *E.coli*'nin sayısında azalma olmasına rağmen daha sonra bu sayının sabitleştiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, düşük sıcaklıklarda hücreler ve kitosan arasında etkileşim oranında azalmasının bir sonucu olarak antimikrobik aktivitenin düşmesine neden olduğu sonucuna varmışlardır.

1.1.9.2.5. Katyonlar ve Polianyonlar

Young and Kauss (39) kitosanın, plazma membran ve/veya *Glycine max* hücreleri üzerinde bulunan Ca^{+2} iyonlarının serbest hale getirdiğini ve bu da hücre zarının bütünlüğünü

bozduğunu, ayrıca hücre içi elektrolitlerin hücre dışına sızmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Hücre zarının yapısındaki protein bileşenleriyle veya fosfolipitlerle kitosan (polikasyonik) arasında çapraz bağlanma göstermesinden dolayı zar geçirgenliğinin etkilendiği öne sürülmüştür. Kitosan buna ek olarak, hücre içi maddelerin hücre dışına sızmasına; dolayısıyla, hücrenin ölümüne neden olur.

Young et al. (32) *G.max*'daki UV emici maddenin hücre dışına sızması kitosan kaynaklı olduğunu ve $Ba^{+2} > Ca^{+2} > Sr^{+2} > Mg^{+2} > Na^{+} > K^{+}$ iyonların etkinliği sırasına göre divalan katyonların bu sızıntıyı daha güçlü inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Dengeleyici komplekslerden oluşmuş hücre zarı yüzeyinden salınan Ca^{+2} iyonlarıyla katyonların yer değiştirmesi sonucu kitosan kaynaklı sızıntının azaldığı varsayılmıştır.

Tsai and Su (42) $MgCl_2$, $BaCl_2$ ve $CaCl_2$ gibi toprak alkali metalleri ihtiva eden tuzların ilavesiyle *E.coli*'ye karşı kitosanın bakterisidal etkisinin azaldığını belirtmişlerdir. İyonların etkinliklerinin sırası $Ba^{+2} > Ca^{+2} > Mg^{+2}$ şeklindedir. Bunun sonucu olarak yazarlar; kitosan ile katyonlar arasında kompleks oluşturduğunu önermişlerdir. Young et al (32) varsayımının aksine kitosanın, mevcut amino gruplarının indirgenmesiyle bakterisidal etkiye neden olduğu ileri sürülmüştür.

Kaytonlar tarafından kitosan kaynaklı sızıntısının azaltılmasına ek olarak, bu sızıntı ayrıca Na poligalakturonat ve Na poli-L-aspartat polianyonların ilave edilmesi ile azaltıldığı belirlenmiştir (32). Kitosanın amino ve karboksil polianyon gruplarının eşit sayıda olduğunda elektrolitlerin sızmasının tamamen önlendiği gözlenmiştir. Kitosanın polikasyonik-poliyon komplekslerinin oluşumu sonucu çökelti oluşmasından dolayı sızıntının önlenmesi bu duruma bağlı olarak açıklanmıştır. Bununla birlikte, monomerik galakturonat ile aspartatın, sızma ve kitosanın çökmesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (97).

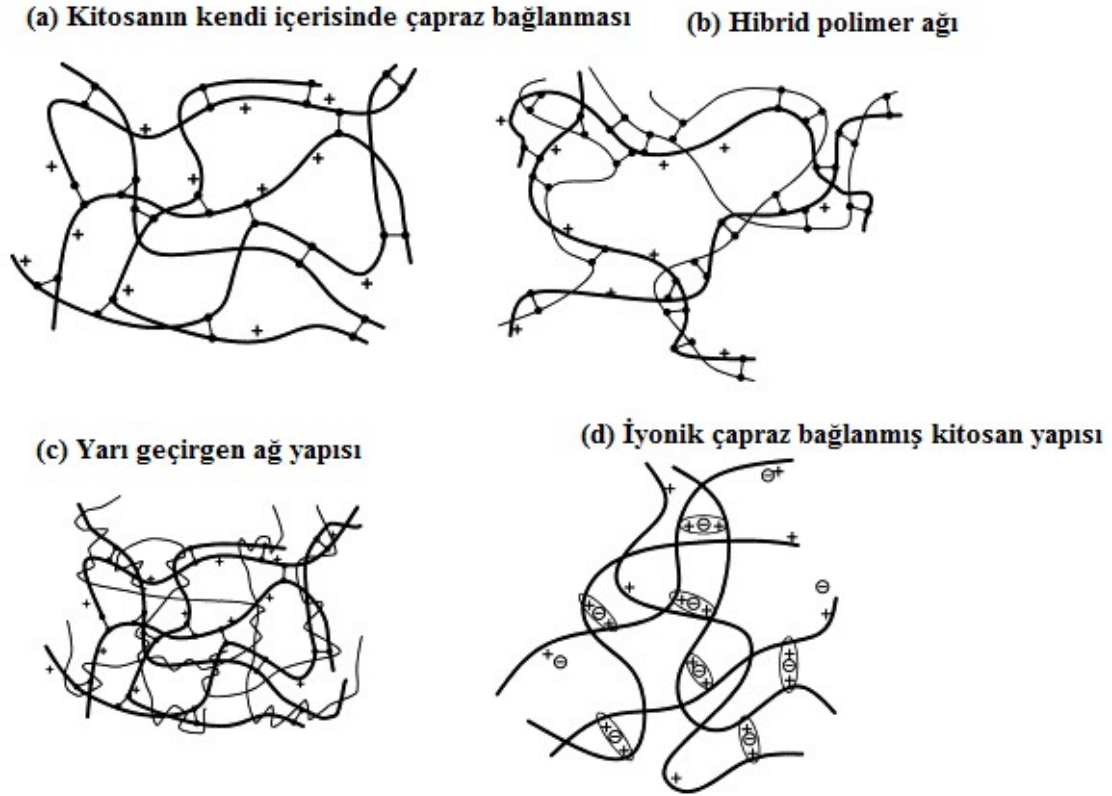
1.1.10. Kitosanın Kullanım Alanları

Kitosan günümüzde tıp, gıda, ziraat, kozmetik, eczacılık, atık su arıtma ve tekstil sektörü gibi birçok alanda kullanılabilmektedir. Ülkemizde kitosanın kullanımını diğer ülkelere göre kıyaslandığında, ülkemizdeki kullanım oranının çok düşük olduğu görülmektedir. Tekstil sektöründe, ürünlere antimikrobiyal özellik kazandırması, yünlü kumaşlara çekmezlik kazandırması, reaktif boyamada tuz miktarının azaltılması, asit boyar maddeler ile pamuğa boyanabilirlik kazandırma, antistatik özellik kazandırma, deodorant maddesi olarak kullanım gibi birçok amaç için kullanılmaktadır. Ayrıca, kitosan ile diğer liflerin karışımından üretilen

Crabyon (kitosan ve viskon karışımı, TEC SERVICE), chitopoly (kitosan ve polinozik lif karışımı, Fuji) gibi çeşitli antimikrobiyal lifler de bulunmaktadır (98).

Medikal tekstiller alanında kitosanın kullanımı oldukça yaygındır. Japonya başta olmak üzere 1960'ların ortalarından beri pek çok Asya ülkelerinde bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle doku bütünlüğünün sağlanması amacıyla yara tedavisi için kitosan yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, yapay kan damarları, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, kontakt lens yapımı, kontrollü ilaç salınımı, sargı bezi, yara bandı, tümör inhibitörü, kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), antibakteriyel, antifungal ve hemostatik etki göstermesi gibi birçok amaç için kullanılmaktadır (99).

Berger et al. (100) kitosan hidrojellerinin biyomedikal alanda kullanılabilirliği açısından araştırmalar yapmıştır. Hidrojel yapımında çapraz bağlayıcılar, glioksal ve glutaraldehit en yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Glutaraldehit, kitosanın amin gruplarına imin grubu üzerinden bağlanıp, oluşan bu tip dialdehitler herhangi bir şekilde aditif olmadan direkt olarak reaksiyon gerçekleştirebilme özelliğini gösterirler. Çapraz bağlayıcı olarak dietil squarat, genipin veya oksalik asitin kullanılabileceği belirtilmektedir. İmplantlar ve bandaj yapımında kovalent bağlı hidrojeller kullanılabilirken, özellikle ilaç salınım sistemlerinde iyonik bağlı hidrojeller kullanılmaktadır. Toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olması ve yapılan *in-vivo* testler ile vücut içerisinde zararsız ürünlere (amino şekerler) parçalanmasına bağlı kitosanın herhangi bir zararlı etkisi bulunmaktadır.



Şekil 1.9. Kitosanın hidrojel yapıları (kovalent bağ, + pozitif yüklü kitosan, kitosan, ilave polimer, iyonik çapraz bağlayıcı, iyonik etkileşim) (100)

Yara iyileşmesini hızlandırmada kitosanın oldukça etkin role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özelliğinden dolayı başta diyabet hastaları olmak üzere vücuttaki yaraların çabuk iyileşmesi bakımında hastalar için umut verici tedavi oluşturmaktadır. Kitosanın yara tedavilerinde etkin rol almasının nedeni negatif yüklü heparin ile pozitif yüklü kitosan arasında polielektrolit kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Heparin, antikoagülan bir polisakkarit olup oluşan bu kompleks ve beraberinde hücre büyüme faktörlerinde artmasıyla doku gelişimi desteklenmiş olmaktadır. Bazı araştırmacılar tavşanların yaralı sırtlarına suda çözünebilen kitosanı uygulamışlar ve yaranın hızlı bir şekilde iyileştiğini gözlemlemişlerdir (101).

Kitosan ile elde edilen bandajlar son yıllarda önem kazanmış ve bu bandajlar özellikle Irak savaşında yaralı askerler üzerinde uygulanmıştır. Z. Media firması tarafından üretilen bu bandajlar sayesinde yaralı birçok askerin yaralarının hızla iyileştiği ve çoğu askerin yaşamını kurtardığı belirtilmiştir. Kitosan kaynaklı bu bandaj ürünleri, kanamayı durdurma hızının yaklaşık 60 ml/dk olduğu ve karides, yengeç gibi deniz canlılarına karşı alerjik reaksiyonları

olan askerler üzerinde uygulanmasına rağmen herhangi bir yan etki yaratmadığı literatürde ifade edilmiştir (102).

Muzzarelli et al. (103) kitosan türevi olan 5-metilpirolidinonu elde etmiş ve yara üzerinde uygulandığında lizozim enzimi etkisiyle oligomer yapıya dönüştüğünü tespit etmişlerdir. Kitinle yapılan ilk çalışmaların akabinde Beschitin® (Unitika) adlı kitin kaynaklı ve dokuma olmadan üretilmiş yara sargısı Japonya’da kullanıma sunulmuştur.

Film oluşturabilme özelliğinden ötürü kitosan, yapay böbrek zarı yapımında da kullanılmaktadır. Buna istinaden, suda çözünebilen polimerler ile ve aşı polimerizasyonu ile modifiye edilebilmektedir. Bu membranlar kitosan/PVA karışımıdır. Miya et al. (104) PVA’nın kitosan ile oldukça homojen bir karışım oluşturduğu ve karışımın kopma direncinin her bir bileşenden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Kitosan ile modifiye edilmiş membranlarda, geçirgenlik ve uyumluluk yönünden oldukça iyi sonuçlara rastlanmıştır.

İlaçların kontrollü bir şekilde salınımı önemlidir. Kitosanın biyolojik açıdan uyum göstermesi, birçok ilaç formasyonunda matriks olarak kullanılmasına neden olmuştur ve çeşitli ilaçlar kitosan matriksi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmiştir. Kitosanın ihtiva ettiği serbest amino grubu kitosanın, katyonik özellik kazanmasından ötürü negatif yüklü ilaçlarla, polimerlerle ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır. İlaç salınım sistemlerinde kullanılmasını sağlayan en büyük avantajı, jel oluşturabilmesi ve kopolimer gibi çok çeşitli formlarda bulunabilmesidir. Antasit ve antiülser aktivite göstermesinden dolayı midenin tahriş olmasını engellemesi kitosanı ideal bir materyal haline getirmektedir (105,106).

Kitosanın fonksiyonel grupları ile kalsiyum kaynaklı materyaller ile kompozit oluşturabilme yeteneğinden dolayı ortopedik ve periodontal uygulamalarda da kullanılmaktadır. Bu sayede oluşturulan polimer matriks-kalsiyum kaynaklı bileşik sistemlerinin, sert dokunun yerine kullanılabilmesi yönünden birçok araştırma yapılmaktadır. Polimerin hidroksiapatit ile kombinasyonunun matriksi emildikçe implatta kemiksi yapının gelişimini sağlaması, bu tip kompozitlerin avantajları arasında sayılmaktadır. Kemik protezlerinde kalsiyum-kitosan esaslı kombinasyonu ile kaplanıp vücuda implante edildiğinde kemik hücrelerinin güçlendirilmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu sayede polimer matrikse bağlanan kalsiyum bileşiklerinin migrasyonu da önlemiş olduğu ifade edilmektedir. Bu yapının diğer bir kullanımı ise direkt sert veya kemik doku ile yer değiştirmesi şeklindedir. Ayrıca, kemiklerin zamanla aşınması

sonucu oluşan boşlukları doldurarak kemik bütünlüğüünün korunmasını da sağlamaktadır (105).

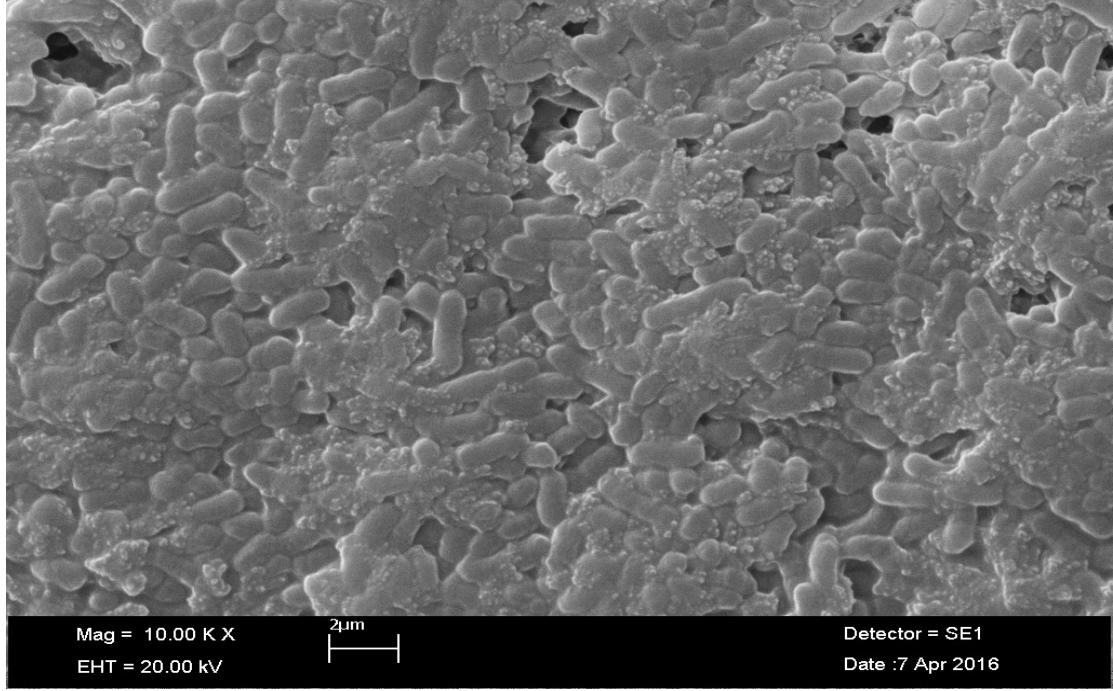
Özetle kitosanın, bahsedilen tüm bu özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal aktivitesi, biyouyumluluğu, diğer materyallerle kompozit oluşturabilmesi, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması gibi sahip olduğu özellikleri sayesinde çeşitli alanlarda kullanımına başvurulmuştur. Kitosan, kullanılacağı yere/dokuya göre mekanik özellikleri güçlendirilebilmektedir (105, 106).

2.MATERYAL VE METOT

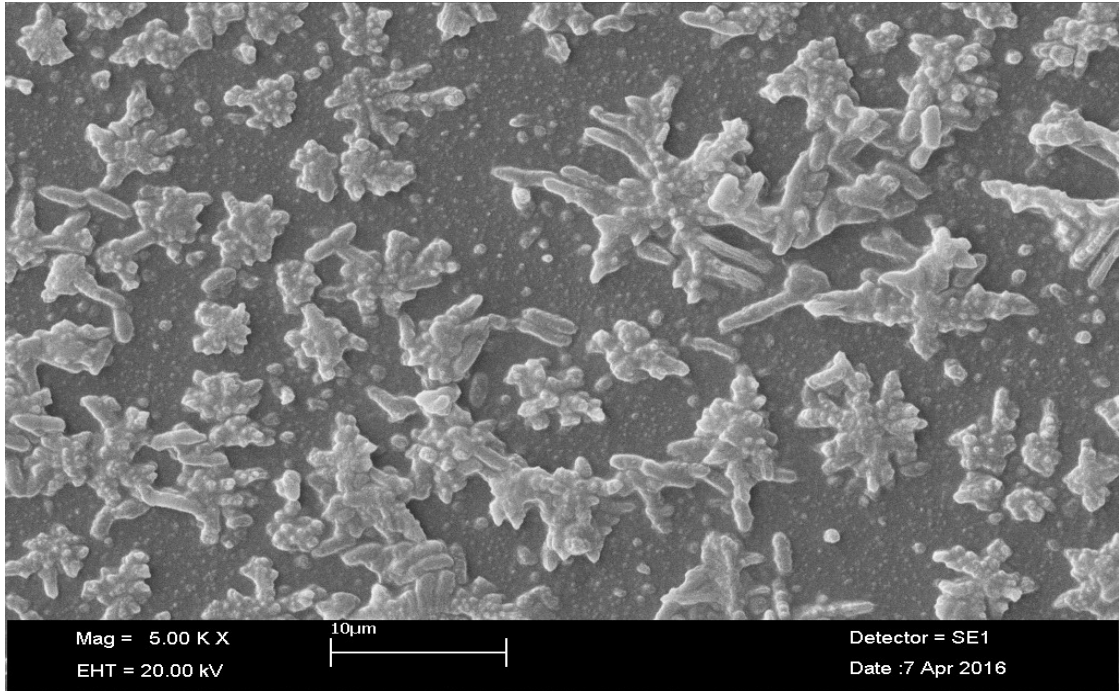
2.1. Coverslip Üzerinde *E.coli* Biyofilminin Oluşumu ve Oluşan Biyofilmin Kitosan Duyarlılığının SEM ile Görüntülenmesi

Steril coverslip sistemindeki kuyucuklara FBS ilave edilip +4°C’de bir gece bekletildi. Daha sonra FBS ortamdan uzaklaştırılıp, kuyucuklar PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara, NB besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda aktif haldeki *E.coli* örneğinin yoğunluğu McFarland 0,5’e (10^8 /mL) ayarlanan örnekten kuyucukların alabileceği kadar ilave edildi ve 37°C’de 90 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında kuyucuklara steril edilen taze NB besiyerinden eklendi ve üzerine MİK testinde belirlenen kitosan konsantrasyonundan ilave edildi. Pozitif kontrol olarak bir kuyucuğa kitosan içermeyen sıvı besiyerine yoğunluğu ayarlanan *E.coli* kültürü ilave edildi. Daha sonra örnekler 8 ve 24 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda örnekler üç defa PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara % 2,5’lik glutaraldehit ilave edilerek +4°C’de bekletildi (107). Numuneler elektron mikroskobu incelemesi için düzenli bir yöntem kullanılarak hazırlandı ve taramalı elektron mikroskobu altında görüntülendi.

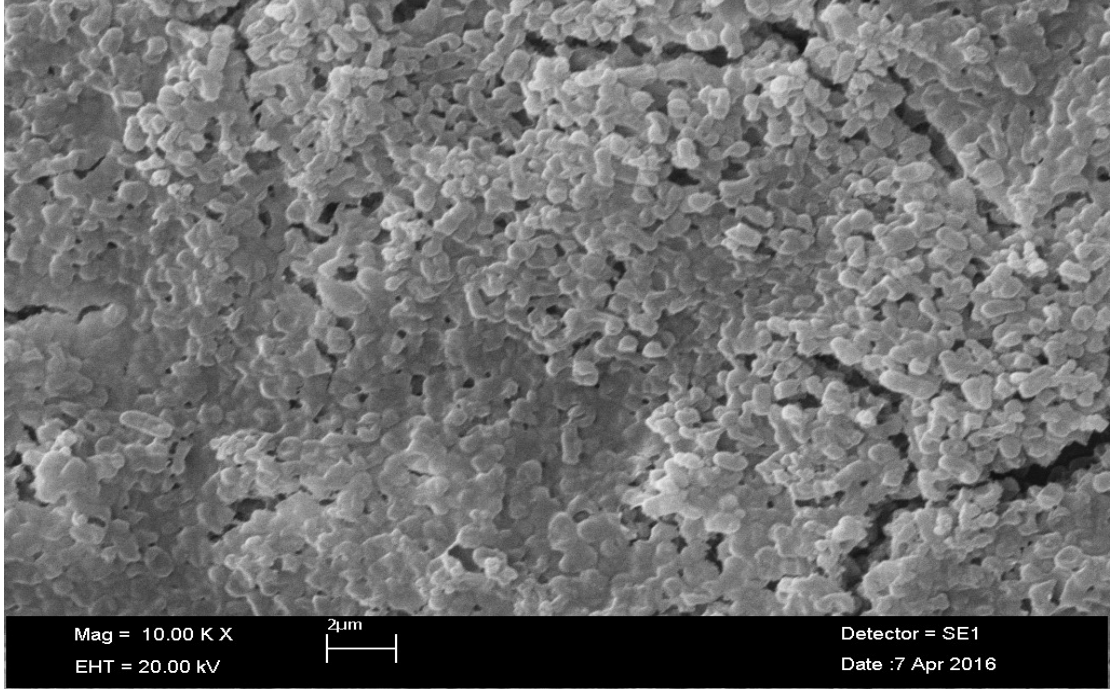
SEM analizi için *E.coli* suşu, kontrol grubu olarak kullanılan NB besiyeri ve kitosan ile 8 ve 24 saat inkübe edildikten sonra, farklı sürelerde oluşan biyofilmlerin arasındaki yapısal farklılık SEM ile görüntülendi (Şekil 2.1, Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). *E.coli* bakterisinin kontrol biyofilmleri yoğun bir ağ tabakası ve ekzopolimerik matriks sergilerken 8 ve 24 saatlik kitosan ilaveli biyofilmlerde ağ yapısı ve ekzopolimerik matriksin gözle görülür bir biçimde dağıldığı dikkat çekmiştir.



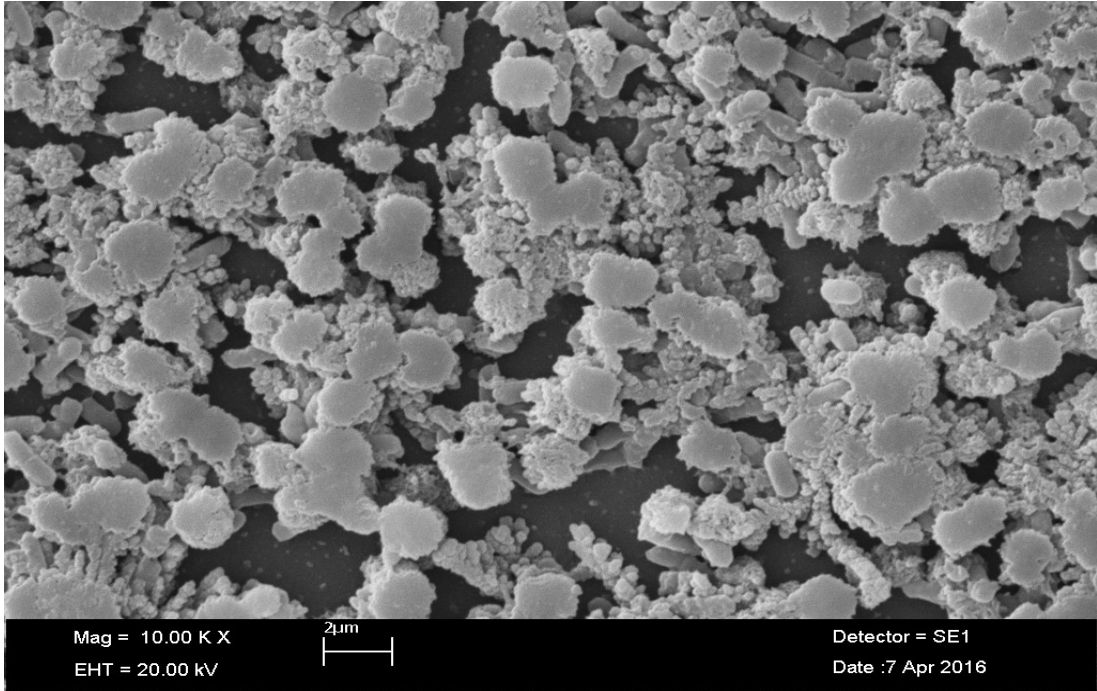
Şekil 2.1. NB besi ortamında 8 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi (kontrol)



Şekil 2.2. %0,125 kitosan içeren NB besi ortamında 8 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi



Şekil 2.3. NB besi ortamında 24 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi (kontrol)



Şekil 2.4. % 0,125 kitosan içeren NB besi ortamında 24 saat kültüre edilen E.coli biyofilmi

3.TARTIŞMA VE SONUÇ

E. coli insanın sindirim kanalından izole edilen baskın fakültatif ve insanda özellikle idrar yolu, karın zarı ve kan ile ilgili ekstra intestinal enfeksiyonlara neden olan enterik mikroorganizmadır (108). *E. coli* biyofilmi, hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) bir matriks içine gömülü bakteri kolonisinden oluşup mikroorganizmaları, olumsuz çevre koşullarından korur ve enfeksiyonlara sebep olur. Rekürren idrar yolu enfeksiyonları için önemli etkeni olmasının yanı sıra *E. coli* biyofilmi, aynı zamanda tıbbi araç ilişkili kalıcı enfeksiyonlardan sorumludur. Biyofilmin yapısal bileşimlerindeki çeşitlilik, biyofilm tabakasının ortadan kaldırılmasında engelleyici ve antibiyotik direncinin gelişmesine bağlı olarak karmaşıklık kazanır. Geleneksel olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlar, kısıtlanmış hücresel hedef aralığına ve biyofilmler üzerinde sınırlı etkinliğe sahiptir (109).

Kitosan kanıtlanmış antimikrobiyal aktiviteye sahip çok yönlü bir malzemedir. İyonik yüzey etkileşimi sonucu hücre duvarından içeriye sızması, mikroorganizmaların çekirdeğine kitosanın penetrasyon yolu ile mRNA ve protein sentezinin engellenmesi ve mikrobiyal büyüme için gerekli besin maddelerinin baskılanmasını provoke etmesi ve metalleri kenetlemesi, dış bariyer oluşturması gibi antibakteriyel mekanizmaları olduğu ileri sürülmüştür. Tüm etkinliklerin aynı anda, fakat farklı yoğunluklarda meydana gelmesi muhtemeldir. Molekül ağırlığı (MW) ve asetilasyon derecesi (DA) de bu aktivitesinin belirlenmesinde önemli bir faktördür. Genelde düşük MW ve DD, mikroorganizmanın büyümesini ve çoğalmasını azaltmada oldukça etkindir. Kitosanın suda çözünebilir türevleri, ana zincire CH₃'ün kimyasal olarak katılmasıyla elde edilerek geniş bir pH aralığında kitosan uygulanabilirliğini arttırmakta ve aynı zamanda imkanların geniş bir yelpazede geliştirilmesi ile antimikrobial etkinliği iyileştirilebilmektedir (110).

SEM çalışması ile, kontrol ve kitosan (% 0,125) ilaveli *E. coli* biyofilmleri (8 ve 24 saat) arasındaki yapısal farklılık görüntülenmiştir. Kitosan ilaveli her iki biyofilm fazında ekzopolimerik matriksin kayda değer bir şekilde dağılmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma, kitosan ile muamele edilmiş biyofilmlerin muamele edilmeyen biyofilmlerle (kontrol) mukayese edildiğinde biyofilmin her iki oluşum fazında da daha yavaş bir gelişim gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.1, Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).

Costa et al. (111) *Streptococcus mutans* biyofilm oluşumu üzerinde kitosanın etkisini araştırmışlar ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini ve olgun biyofilm yapıları üzerinde kayda

değer bir azalma (% 94) olduğunu bildirmişlerdir. Pu et al. (107) kitosanın *C. albicans* biyofilmleri üzerine etkisini araştırmak için SEM analizlerini kullanmışlardır. Sonuçta kitosanın doza bağlı olarak hem planktonik hücreler üzerinde, hem de *C. albicans* biyofilmleri üzerinde önemli derecede inhibitör etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca SEM analizleri ile kitosanla muamele edilmiş grubun biyofilm oluşumu üzerindeki morfolojik defekt görüntülenmiştir. Karthick Raja Namasivayam and Allen Roy (112), serbest ve kitosanla kaplı dört farklı tıbbi bitki ekstraktını *E. coli* biyofilmi üzerinde çalışmışlardır. Polimerle kaplı ekstraktların biyofilm inhibisyon gücünün daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırma sonuçları, bizim elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu veriler kitosanın, idrar yolu, tıbbi araç ilişkili kalıcı enfeksiyonları, rahim enfeksiyonu gibi durumların meydana gelmesinde önemli etkeni olan *E. coli* biyofilm hastalıkları üzerinde uygulanabilecek bir antimikrobiyal ajan olduğunu göstermektedir. Ancak çalışılan kitosanın *E. coli*'ye karşı potansiyel bir antibiyofilm ajan olabilirliği daha ileri *in vivo* çalışmalara ihtiyaç göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
2. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003; 19 (2): 139-150.
3. Annous BA, Fratamico PM, Smith JL. Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *Journal of Food Science* 2009; 74 (1): 24-37.
4. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry: a review. *J Appl Bacteriol* 1993; 75 (6): 499-511.
5. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 167 (2): 179-84.
6. Givskov M, Rasmussen TB, Ren D, Balaban N. Bacterial cell-to-cell communication (quorum sensing). In: Balaban N (ed), *Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation*. Springer-Verlag, Berlin, 2008: p 13-38.
7. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
8. Kolter R, Siegele DA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 1993; 47: 855-874.
9. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* 1998; 42 (1-2): 9-27.
10. Srey S, Jahid IK, Ha SD. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 2013; 31: 572-585.
11. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 249-289.
12. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998; 30 (2): 295-304.
13. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food. Microbiol* 2000; 17(4): 439-447.

14. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
15. Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm Wiss Technol* 1999; 32 (6): 321-326.
16. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2003; 2 (1): 22-32.
17. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (9): 881-890.
18. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 2003; 48 (6): 1511-1524.
19. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184 (4): 1140-1154.
20. Kaplan JB, Ragunath, C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (7): 2633-2636.
21. Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? *Curr Infect Dis Rep* 2008; 10 (1): 22-28.
22. Dodane V, VilivalamVD. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1 1998; 6: 246-253.
23. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol* 2013; 59: 46-58.
24. Muzzarelli R, Biagini G, Pugnali A, Filippini O, Baldassarre V, Castaldini C, Rizzoli C. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1989; 10 (9): 598-603.
25. Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *Glycoconj J* 1997; 14: 535-542.

26. Singh DK, Ray AR. Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives. *Rev Macromol Chem Phys* 2000; 40: 69-83.
27. Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum, New York, 1986.
28. Lower SE. Polymers from the Sea Chitin and Chitosan I' in *Manufacturing Chemist* 1984; 55: 73-75.
29. Wu YE. The effect of chitosan and its derivatives on the dyeability of silk, Phd. Thesis, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong 2002: 91.
30. Muzzarelli RAA. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* (2 nd ed), 3, Bikales NM. (Ed), John Wiley, New York, 1985: 430.
31. Singh DK, Ray AR. Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 2000; 40 (1): 169-183.
32. Furusaki E, Ueno Y, Sakairi N, Nishi N, Tokura S. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 1996; 29 (1): 29-34.
33. Kurita K. Chemical modification of chitin and chitosan. In: Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW (eds), *Chitin in Nature and Technology*. Plenum Press, New York, 1986; p 287-293.
34. Roberts GAF. *Chitin Chemistry*, Roberts GAE (ed), Macmillan Press Ltd, London, 1992: 85-91.
35. Moore GK, Roberts GAF. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int J Biol Macromol* 1980; 2: 115-116.

36. Sannan T, Kurita K, Ogura K, Iwakura Y. Studies on chitin: 7. IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer* 1978; 19: 458-459.
37. Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S, Mima S. IR spectroscopic determination of CONH content in highly deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol* 1980; 2: 323-324.
38. Domszy JG, Roberts GAF. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Makromol Chem* 1985; 186: 1671-1677.
39. Baxter A, Dillon M, Taylor KDA, Roberts GAF. Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int J Biol Macromol* 1992; 14: 166–169.
40. Aiba S. Studies on chitosan. 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography. *Int J Biol Macromol* 1986; 8: 173-176.
41. Domard A. Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements. *Int J Biol Macromol* 1987; 9: 333-336.
42. Hirai A, Odani H, Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹HNMR spectroscopy. *Polym Bull* 1991; 26: 87-94.
43. Varum KM, Anthonsen MW, Grasdalen H, Smidsrød O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 1991; 221: 17–23.
44. Raymond L, Morin FG, Marchessault RH. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydr Res* 1993; 246: 331-336.
45. Hayes ER, Davies DH. Characterization of chitosan. II. The determination of the degree of acetylation of chitosan and chitin. In: Muzzarelli RAA, Pariser ER (eds), *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, MIT Sea Grant Program, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1978: 406–420.

46. Lim SH. Synthesis and characterization of a fiber-reactive and water-soluble chitosan derivative with enhanced antimicrobial activity. MS. Thesis, North Carolina State University, 1999.
47. Terayama H. Method of colloid titration. *J Polym Sci* 1952; 8: 243-253.
48. Maghami GG, Roberts GAF. Studies on the adsorption of anionic dyes on chitosan. *Makromol Chem* 1988; 189: 2239–2243.
49. Niola F, Basora N, Chornet E, Vidal PF. A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydr Res* 1993; 238: 1-9.
50. Alonso IG, Peniche-Covas C, Nieto JM. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *J Therm Anal* 1983; 28 (1): 189-193.
51. Nieto JM, Peniche-Covas C, Pardon G. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectrometry, thermal analysis, and differential scanning calorimetry. *Thermochim Acta* 1991; 176: 63-68.
52. Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol* 1983; 5 (1): 49-52.
53. Duin PJV, Hermans JJ. Light scattering and viscosities of chitosan in aqueous solutions of sodium chloride. *J Polym Sci* 1959; 36: 295–304.
54. Muzzarelli RAA, Lough C, Emanuelli M. The Molecular weight of chitosan studied by laser light-scattering. *Carbohydr Res* 1987; 164: 433-442.
55. Wu ACM, Bough WA, Conrad EC, Alden KE. Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1976; 128 (1): 87-99.

56. Domard A, Rinaudo M. Gel permeation chromatography of cationic polymer on cationic porous silica gels. *Polym Commun* 1984; 25: 55-58.
57. Ottoy MH, Varum KM, Christensen BE, Anthonsen MW, Smidsrfd O. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydr Polym* 1996; 31 (4): 253-261.
58. Boryniec S, Strobin G, Struszczyk H, Niekraszewicz A, Kucharska M. GPC studies of chitosan degradation. *Int J Polym Anal Ch* 1997; 3 (4): 359-368.
59. Knaul JZ, Kasaai MR, Bui VT, Creber KAM. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Can J Chemistry* 1998; 76: 1699-1706.
60. Roberts GAF, Domszy JG. Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int J Biol Macromol* 1982; 4 (6): 374-377.
61. Wang W, Bo S, Li S, Qin W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degree of deacetylation. *Int J Biol Macromol* 1991; 13: 281-285.
62. Rinaudo M, Milas M, Dung PL. Characterization of chitosan-Influence of ionic-strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol* 1993; 15 (5): 281-285.
63. Rathke T, Hudson S. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *J Macromol Sci RMC*, 1994; 34 (3): 375-437.
64. Knittel D, Schollmeyer E. Chitosan und seine Derivate für die Textilveredlung Teil 1: Ausgangsposition, Textilveredlung 1998; 33: 67-71.
65. Hudson SM, Jenkins DW. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. In: Chitin and Chitosan. 3 rd ed. New York, Wiley Interscience, 2001.

66. Kurita K, Sannan T, Iwakura Y. Studies on chitin. 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Makromol Chem* 1977; 178: 3197-3202.
67. Kurita K, Koyama Y, Nishimura S, Kamiya M. Facile preparation of water-soluble chitin from chitosan. *Chem Lett* 1989; 1597-1598.
68. Kurita K, Kamiya M, Nishimura S. Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial N-acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydr Polym* 1991; 16: 83-92.
69. Roberts GAF. Chitin Chemistry, Macmillan Press Ltd, London, 1992: 350.
70. Muzzarelli RAA. Chitin. In: Aspinall GO (ed), *The Polysaccharides*, 3, Academic Press, New York, 1985: p 417-450.
71. Gökçe Y. Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2008: 81.
72. Mima et al. (Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J Appl Polym Sci* 1983; 28: 1909-1917.
73. Meyers SP, No HK, Lee KS. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J Agric Food Chem* 1989; 37 (3): 575-579.
74. Young DH, Köhle H, Kauss H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol* 1982 70 (5): 1449- 1454.
75. Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol* 2000; 18 (7): 305-312.
76. Hirano S. Chitin biotechnology applications. In: El-Gewely MR (edt), *Biotechnology Annual Review*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands, 1996: p 237-258.

77. Chen YL, Chou CC. Factors affecting the susceptibility of *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. *Food Microbiol* 2005; 22 (1): 29-35.
78. Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* 1999 47 (1-2): 67-77.
79. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol* 1992; 6 (3): 257–272.
80. Momin NH. Chitosan and Improved Pigment Inkjet Printing on Textiles. PhD Thesis, RMIT University School of Fashion and Textiles, Melbourne 2008: 186.
81. Young DH, Kauss H. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiol* 1983; 73: 698-702.
82. Fang SW, Li CF, Shih DYC. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J Food Protect* 1994; 56 (2): 136-140.
83. Hwang JK, Kim HJ, Yoon SJ, Pyun YR. Bactericidal activity of chitosan on *E. coli*. In: Chen RH, Chen HC (eds), *Advances in Chitin Science*, 3, Rita Advertising Co Ltd, Taiwan, 1998; p 340-344.
84. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*, *J Food Protect* 1999; 62 (3): 239-243.
85. Helander IM, E. Nurmiäho-Lassila L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 235-244.
86. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci* 2001; 79: 1324-1335.

87. Hadwiger LA, Kendra DF, Fristensky BW, Wagoner W. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In : Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW (eds.), Chitin in Nature and Technology, Plenum Press, New York, 1986: p 209-214.
88. Tokura S, Ueno K, Miyazaki S, Nishi N. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. Macromol. Symp 1997; 120: 1-9.
89. Tanigawa T, Tanaka Y, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y. Various biological effects of chitin derivatives. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP (eds), Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Science Publishers Ltd, London and New York, 1992; p 206-215.
90. Shimojoh M, Masaki K, Kurita K, Fukushima K. Bacterial effects of chitosan from squid pens on oral *Streptococci*. Nippon Nogeik Kaishi 1996; 70 (7): 787-792.
91. Cuero RG. Antimicrobial action of exogenous chitosan. EXS 1999; 87: 315-333.
92. Hirano S, Nagao N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. Agric Biol Chem 1989; 53 (11): 3065-3066.
93. Yalpani M, Johnson F, Robinson LE. Antimicrobial activity of some chitosan derivatives. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP (eds), Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Science Publishers Ltd, London, New York, 1992; 543-548.
94. Chang DS, Cho HR, Goo HY, Choe WK. A development of food preservative with the waste of crab processing. Bull Korean Fish Soc 1989; 22 (2): 70-78.
95. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydr Polym 2001; 44 (1): 71-76.
96. Morimoto M, Shigemasa Y. Characterization and bioactivities of chitin and chitosan regulated by their degree of deacetylation. Kobunshi Ronbunshu 1997; 54 (10): 621-631.

97. Lim SH, Hudson SM. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 2003; 43 (2): 223-269.
98. Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2009; 3 (2): 92-103.
99. Montazer M, Afjeh G. Simultaneous X-Linking and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabric, *Journal of Applied Polymer Science* 2007; 103: 178-185.
100. Berger J, Reist M, Mayer, JM, Fel O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 57 (1): 19-34.
101. Cho YW. Chung SH. Yoo G. Ko SW. Water soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials* 1999; 20 (22): 2139-2145.
102. Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. Food Applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 1999; 10 (2): 37-51.
103. Muzzarelli RAA, Tanfani F, Emanuelli M, Mariotti SN. N-(carboxymethylidene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydr Res* 1982; 107 (2): 199-214.
104. Dinesh K, Singh and Alok RR. Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Journal of Macromolecular Science* 2000; 40 (1): 69-83.
105. Queen HA. Electrospinning Chitosan-based Nanofibers for Biomedical Applications, Master Thesis, NC State University, Raleigh 2006: 60.
106. Şahin UK, Gürsoy NÇ. Tekstil endüstrisinde kitin ve kitosan uygulamaları, *Tekstil Teknik*, Ağustos 2005: 176-245.

107. Pu Y, Liu A, Zheng Y, Ye B. In vitro damage of *Candida albicans* biofilms by chitosan. *Exp Ther Med* 2014; 8 (3): 929-934.
108. Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* 1981; 294 (5842): 665-667.
109. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 2016; 121 (2): 309-319.
110. Goy RC, de Britto, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros* 2009; 19 (3): 241-247.
111. Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe* 2013; 20: 27-31.
112. Karthick Raja Namasivayam S, Allen Roy E. Anti Biofilm Effect of Medicinal Plant Extracts Against Clinical Isolate of Biofilm of *Escherichia coli*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5 (2): 486-489.