

**BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN
KİTOSAN VE NANOKİTOSAN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanomalzeme Bilim Dalı

Doç. Dr. Özlem BARIŞ

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN KİTOSAN
VE NANOKİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanomalzeme Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN KİTOSAN VE NANOKİTOSAN ÜRETİMİ
VE KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH tarafından hazırlanan bu çalışma 08 / 09 / 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı - Nanomalzeme Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 10/09/2015 tarih ve 36/1254 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI FUNGAL KAYNAKLARDAN KİTOSAN VE NANOKİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanomalzeme Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem BARIŞ

Nanokitosan, kitosan ve kitin biyopolimerlerinin en önemli türevlerinden birisi olarak teknolojik ve ticari büyük öneme sahiptir. Antibakteriyel, biyoyumlu ve biyobozunur olması gibi biyolojik özelliklerinin yanında iyi bir absorbent olması gibi özellikleri sebebiyle sayısız alanda kullanılabilir. Nanokitosanın öncül molekülü olan kitin, kabuklu su ürünleri, böcekler, bazı yosunlar ve mantarlar kullanılarak üretilmektedir. Birçok substrat üzerinde kolay yetiştirilmeleri, mevsimsel değişimlerden bağımsız olarak laboratuvarlarda bolca üretilme gibi özellikleri kitin eldesi için mantarların oldukça ideal bir kaynak olduğu birçok literatür tarafından belirtilmektedir.

Bu çalışma ile üç farklı mantar örneği (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp. ve *Rhizoctonia* sp.) kullanılarak elde edilen biyokütleden kitosan elde edilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda %74-75 deasetilasyon seviyesine ulaşan kitosanın kaliteli ve ticari değer taşıyabileceği tespit edilmiştir. Elde edilen kitosandan iyonik jelleşme tekniği ile suda çözünen nanokitosan sentezlenmiştir. Elde edilen nanokitosanın FTIR ve SEM analizleri alınarak karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

2015, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanokitosan, Biyokütle, Mantar, FTIR, SEM

ABSTRACT

Ph. Doctoral Thesis

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION CHITOSAN AND NANOCHITOSAN FROM SOME FUNGAL SOURCES

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanoengineering
Science of Nanomaterial

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Nanochitosan, chitosan and chitin biopolymers has the technological and commercial importance as one of the most important derivatives. Antibacterial, in addition to being biocompatible and biodegradable biological characteristics, such as due to features such as a good absorbant can be used in numerous areas. The Chitin, which is the precursor molecule Nanochitosan, shellfish, insects, algae, and fungi may be produced using some. Easy to be grown on many substrates, the fungi such as the ability to obtain the characteristics of chitosan produced in the laboratory, independent of seasonal changes in abundance is quite ideal source is stated by many literature. With this study three different examples of fungi (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp. and *Rhizoctonia* sp.) obtained using biomass chitosan was obtained.

The results of the calculations, which reached %74-75 deacetylation can carry service quality and commercial value had been identified. The obtained chitosan was synthesized water-soluble ionic gelation techniques in Nanochitosan. Is obtained Nanochitosan, FTIR and SEM analyzes were performed on the process of characterization.

2015, 81 pages

Keywords: Nanochitosan, Biomass, Fungi, FTIR, SEM

TEŞEKKÜR

Bu araştırmaya beni yönlendiren ve her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesi sırasında maddi manevi desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE ve Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanları ve özellikle Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya teşekkür ederim. Kimya Bölümü Öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Tuğba ÖZNÜLÜER ve Sayın Doç. Dr. Kadem MERAL'a analizlerin yapılması aşamalarındaki yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Nanobilim ve Nanomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a ve değerli tez izleme komitesi üyeleri ve savunma sınav jürilerime teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destek ve teşviklerini benden esirgemeyen, annem, babam, kardeşlerim ve eşime teşekkür ederim.

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Eylül, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1. Mantarlar	8
2.2. Mantarların Biyolojik ve Ekonomik Önemi.....	9
2.3. Mantarların Genel Hücre Yapısı	11
2.4. Kitin ve Kitosan.....	13
2.5.Kitin ve Kitosan Kimyasal Yapısı.....	16
2.6. Kitosanın Kullanım Alanları	17
2.7. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler	19
2.8. Nanopartiküllerin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	22
2.9. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında İzlenen Yöntemler.....	23
2.10. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	24
2.11. Nanokitosan.....	25
2.12. Nanokitosanın Uygulama Alanları.....	25
3. MATERYAL ve METOD.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Mantar izolatlarının elde edilmesi	29
3.2.2. Küf mantarın hazırlanması	29
3.2.3. Şapkalı mantarın hazırlanması	29
3.2.4. Biyokütlenin elde edilmesi.....	29
3.2.5. Kitosan eldesi (Deasetilasyon işlemleri)	32

3.2.6. Kitosanın verimi belirlenmesi	33
3.2.7. Kitosanın minerallerinin belirlenmesi	33
3.2.8. Kitosanın asetilasyonunun belirlenmesi	33
3.2.9. Nanokitosan sentezi.....	34
3.2.10. Elde edilen materyallerin karakterizasyon işlemleri	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. <i>Agaricus bisporus</i> 'dan Kitosan Eldesi	39
4.2. <i>Rhizopus</i> sp.'dan Kitosan Eldesi	42
4.3. <i>Rhizoctonia</i> sp.'dan Kitosan Eldesi.....	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	82

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Dk	Dakika
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
g	gram
h	saat
HCl	Hidroklorik asit
KBr	Potasyum bromür
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TTP	sodyum tripolifosfat
w/w	Kütlece Oran
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. A- Mayalar ve B- Hif oluşturan mantarlar	12
Şekil 2.2. Mantarların genel hücre yapısı	12
Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları	17
Şekil 3.1. A- <i>Rhizopus</i> sp.; B- <i>Rhizoctonia</i> sp.; C- <i>Agaricus bisporus</i> resimleri.....	27
Şekil 3.2. Örneklerin çoğaltılmasında kullanılan çalkalamalı ve normal inkübatörler.....	30
Şekil 3.3. Filtrasyon işlemleri ve filtre edilmiş biyokütle örnekler	30
Şekil 3.4. Kurutulmuş biyokütle örnekleri.....	31
Şekil 3.5. Kurutulan biyokütlenin öğütülmesi ve kullanılan öğütücü	31
Şekil 3.6. Kitosan sentez aşamaları.....	32
Şekil 3.7. Kitosan FT-IR spektrumu, Amid-I bandı absorbands ile hidroksil grubu absorbands hesaplanması için taban çizgilerini	34
Şekil 3.8. Nanokitosan sentezinin çözeltisi	35
Şekil 3.9. FTIR analizi için disk hazırlamada kullanılan pres	36
Şekil 3.10. Kitosanan hazırlanan ince diskiler.....	36
Şekil 3.11. FTIR analizi için kullanılan cihaz.....	37
Şekil 3.12. SEM cihazı	38
Sekil 4.1. <i>Agaricus bisporus</i> 'dan elde edilen kitosan.....	39
Şekil 4.2. <i>Agaricus bisporus</i> 'dan izole edilen kitosanın FTIR spektrumu.....	41
Şekil 4.3. <i>Agaricus bisporus</i> 'dan izole edilen kitosanın tarama elektron mikroskop fotoğrafları.....	42
Şekil 4.4. Kurutulmuş ve öğütülmüş örnek	43
Şekil 4.5. İşlemler sonunda <i>Rhizopus</i> sp.'den elde edilen kitosan.....	44
Şekil 4.6. <i>Rhizopus</i> sp.'dan elde edilen kitosanın FTIR spektrumu	45
Şekil 4.7. <i>Rhizopus</i> sp.'dan elde edilen kitosanın SEM görüntüleri	47
Şekil 4.8. Kurutulmuş ve öğütülmüş örnek	48
Şekil 4.9. İşlemler sonunda <i>Rhizoctonia</i> sp.'den elde edilen kitosan	49
Şekil 4.10. <i>Rhizoctonia</i> sp.'dan elde edilen kitosanın FTIR spektrumu	50
Şekil 4.11. <i>Rhizoctonia</i> sp.'dan elde edilen kitosanın SEM görüntüleri	51

Şekil 4.12. Mantarlardan'dan elde edilen Nanokitosaanın FTIR spektrumu (Absorbans)	54
Şekil 4.13. Mantarlardan'dan elde edilen Nanokitosaanın FTIR spektrumu (Transmisyon)	55
Şekil 4.14. Mantarlardan elde edilen nanokitosaanın SEM görüntüleri.....	56
Şekil 5.1. A) <i>R. arrhizus</i> 'un kitosaanın SEM görüntüsü B) <i>Rhizoctonia</i> sp 'den izole edilen kitosaanın SEM görüntüsü.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri	16
Çizelge 5.1. <i>Agaricus bisporus</i> sistematigi.....	61
Çizelge 5.2. <i>Rhizopus</i> sp. sistematigi.....	62
Çizelge 5.3. <i>Rhizoctonia</i> sp. sistematigi	63
Çizelge 5.4. <i>A. bisporus</i> , <i>Rhizopus</i> sp, <i>Rhizoctania</i> sp, örneklerinden elde edilen kitosanın karakteristikleri belirlenmesi	65

1. GİRİŞ

Mantarlar yaklaşık 1,5 milyon tür olması nedeniyle, böceklerden sonra türlerin sayısı bakımında en yüksek çeşitliliğe sahip canlı grubunu oluşturmaktadırlar (Feofilova 2001). Geçmişten günümüze kadar mantarlar, oldukça besleyici ve fonksiyonel bir gıda ürünü olduğundan her zaman önemli sayılmış ve genel diyet önerileri içerisindeki yerini daima korumuştur. Mantarlar, esas olarak yüksek değerli protein içeriğinin yanında, vitamin ve mineral maddeler açısından oldukça zengin olması nedeniyle beslenmedeki önemi gün geçtikçe arttırmaktadır. Mantarlarda, mineral maddelerden kalsiyum, demir, fosfor, potasyum ve bakır insan diyeti için gereken değerler açısından uygun miktarlarda bulunmaktadır (Tortora *et al.* 2004; Deacon 2006; Abe *et al.* 2010).

Mantarlar doğada çok yaygın olarak bulunurlar ve organik atıkların (özellikle bitkisel atıklar) tekrar doğal döngüye girmesinde önemli rolleri vardır. Ölü bitki ve hayvan kalıntılarının çürüyerek toprağa karışmasında rol oynarlar. Bitkilerin sonbaharda dökülen yaprakları, mantar ve bakteriler tarafından çürütülerek humuslu organik maddelere dönüştürülür. Oluşan fosfat ve nitrat gibi mineraller bitkiler tarafından alınarak yaşam döngüsüne katılır. Ayrıca mantarlar, özellikle fermantasyon endüstrisi, ilaç sanayii ve çeşitli ürünlerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Tortora *et al.* 2004; Deacon 2006; Koyyalamudi *et al.* 2009).

Ekmek sektöründe hamura maya katılmaktadır ki, nişastanın kısmen parçalanması ve metabolik faaliyetler sonucu oluşan karbon dioksit gazının çıkışına sebep olur ve hamur kabarır. Bazı maya mantarları da salgıladıkları enzimlerle, glikozu parçalayarak alkole dönüştürürler. Bira ve şarap gibi alkollü içecekler şekerin fermantasyonu sonucu oluşur. (Deacon 2006).

Mantarlar, ilaç yapımı için de kullanılmaktadır. Çeşitli antibiyotikler, steroid hormonlar, birçok vitaminler mantarlardan elde edilen önemli ecza ürünleridir. *Penicillium chrysogenum* mantarının ürettiği penisilin antibiyotiği, bakteriyel hastalıkların

tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda ise bazı mantar türevi, kanser tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır (Tortora *et al.* 2004; Deacon 2006; Abe *et al.* 2010).

Doğada mantarlar büyük çeşitlilik göstermelerinin yanında en iyi bilinen grup şapkali mantarlar, zehirli ve zehirsiz cinsleri içermektedir. Bu mantarların ayırt edilememesi sonucu zehirlenmelere çok rastlanmaktadır. Bilinçsizce toplanan zehirli mantarların tüketilmesi insanların ölümüne neden olmaktadır. Bu tehlike kültür mantarlarında görülmez. Bu nedenle kültür mantarlarının tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Kültür mantarları laboratuvar şartlarında kolayca yetiştirilebilir. Nemli ve karanlık ortamlarda, gübre ve saman karışımında kolayca yetiştirilen ve zehirlenme tehlikesi olmayan önemli bir besin kaynağıdır. Bu büyük çeşitliliğin içerisinde az sayıda örneğin ise insanlarda enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (Tortora *et al.* 2004; Deacon 2006; Macleod *et al.* 2008).

İnsanların en yakından tanıdığı şapkali mantarların çeşitli türleri ülkemizde doğal olarak yetişir ve dünya çapında da, mantar üretici şirketler tarafından büyük miktarda mantar atıkları değerlendirilmeden çevreye atılmaktadır. Bununla birlikte fungal hücre duvarları polisakkaritler ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Polisakkaritlerin kitin ve glukun gibi yapısal bileşenleri vardır. Glikoproteinlerin ise, yani monoproteinler, galaktoproteinler, xylomannoproteinler ve glukuronoproteinler mantar hücre çeperlerinin interstisyel bileşenlerini oluşturur (Cabib *et al.* 1988; Bowman and Free 2006; Abe *et al.* 2010).

Kitin zincirleri, β -1,4-bağlı N-asetilglukozaminden sentezlenir ve tipik olarak hücre duvarının bazı kısımlarından glikoprotein ve glukundan daha az bir miktarda bulunmaktadır. Hücre duvarı bileşimi koşullara ve gelişme aşamasına bağlı olarak, tek bir mantar izolatu içinde değişiklik gösterebilir (Çalımlı *et al.* 2008; Asachi and Karimi 2013).

Özellikle son yıllarda atıklar yeniden değerlendirilmelerinin gündeme gelmesiyle birlikte, bunların çürümeye bırakması yerine, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle

yeniden değerlendirilmekte ve yeni ürünler elde edilmektedir. Bu şekilde elde edilen ürünlerin başında kitin ve başlıca türevi olan kitosan gelmektedir (Çalimli *et al.* 2008; Chatterjee and Guha 2014).

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Kitin doğada genellikle, deniz yosunları, tek hücreliler (kamçılılar, amip kirpikliler vs.), sölenterler, yumuşakçalar, eklembacaklılar, bakteriler, mantarlar, böcekler ve bazı bitkilerde bulunur. Ticari kitin/kitosan üretiminde kullanılan en zengin kaynaklar ise; yengeç, karides, ıstakoz ve kerevit (Tatlısu ıstakozu) kabuklarıdır (Çalimli *et al.* 2008; Antonio *et al.* 2012).

Dünyada yıllık kitin üretiminin yaklaşık 150×10^3 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Bunun 56×10^3 tonu karidesten, 39×10^3 tonu çeşitli deniz kabuklularından, 32×10^3 tonu mantarlardan ve 23×10^3 tonu istiridyelerden elde edilmektedir. Böcek kabuklarında yaklaşık %23,5 oranında kitin bulunurken bu oran yengeç ve karideste sırasıyla %17 ile %32 arasında değişmektedir (Guang 2002).

Kitosan, kitinin en önemli türevlerindendir, birçok formda kullanılabilir ve ticari olarak elde edilir. Kitosan, doğal yapıda bir polisakkarit ve katyonik özelliği olan polimerdir. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında biyolojik olarak hiç bir toksik etkisi yoktur, düşük bir immün tepkisi oluşturur ve daha ucuz elde edilir. Kitinin deasetilasyon türevi olan kitosan, asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür. Asit ortamda amino gruplarının protonasyona uğraması sonucunda ise suda çözünebilir (Kurita 2001; Lúcia *et al.* 2014).

Kitosanın kullanım bulduğu alanlar genel olarak; cerrahi malzemelerde dezenfektanlar olarak üretimi, tohum büyümesi ve çimlenmesinde, haşerelere karşı tohumlar üzerine koruyucu olarak, gıdaların bozulmasını önlemek için koruyucu malzemelerin üretimi, antifungal malzeme olarak taze ürün saklama yeteneğini geliştirmek için, cilt yanıkları tedavisinde, kan kolesterolünün azaltılma, enzimlerin stabilitesinde ve proteinlerin analizinde, çimlenme ve verim artışı sağlamakda, bitkiler de köklenme ve kuru

ağırlığının artırması, lif ve elyaf üretimi, kozmetik malzemelerde, petrol ürünleri ve nükleer malzemelerin rafine edilmesi, anti-alerjik ilaçlar üretiminde, su ve atık-su arıtma sistemlerinde, petrol ile kirlenmiş suyun arıtılması, radyoaktif ve organik bileşiklerde, DDT gibi pestisitleri içeren endüstriyel atık suların arıtılması, metil civa asetat, asetaldehit, arsenik ve petrolda klor bileşikleri arıtılması olarak sıralanabilir (Elibol 2008; Geçer 2010).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çok sayıda mantar türünün kitin ve kitosan üretimi için alternatif kaynaklar olarak kullanılmış olduğunu göstermiştir (Amorim *et al* 2006; Cardoso 2012).

Kabuklu canlılar (Karides, Istakoz vb.) kitosanın endüstriyel üretimi için önemli bir kaynaktır. Ancak kabuklulardan elde edilen kitosan bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar şöyle sıralanabilir;

- 1- Kaynakları mevsimsel ve sınırlıdır.
- 2- Üretim maliyeti yüksek ve fazla işgücü gerektirir.
- 3- Çevre dostu değildir.
- 4- Büyük miktarlarda kimyasallar (asitler ve bazlar) yüksek sıcaklıklar ve
- 5- ekstraksiyon için gerekli uzun işlem süresi (genel olarak alkali konsantrasyonu %30–50 w/v ve sıcaklık 100°C) gereklidir.
- 6- Deniz kabuklularda kalsiyum karbonat kaldırmak için demineralizasyon uygulanması gereklidir.
- 7- Yüksek molekül ağırlığı ve protein kirliliği için biyomedikal uygulamalarını sınırlandırır.

Bütün bu dezavantajlar dikkate alındığında kitosan üretimi için mantarlar iyi kaynaklardan biri olarak dikkat çekmektedir. Mantarların kitosan üretimi için çeşitli avantajları vardır. Bunlar;

- 1- Orta ve düşük moleköl ağırlığına göre birçok biyomedikal uygulamalar için uygundur.
- 2- Karideslerin serbest proteinleri alerjik olmasına karşın mantar türlerinin çoğu için böyle bir risk bulunmamaktadır.
- 3- Molekül ağırlığı ve mantarın kitosan deasetilasyon derecesin fermantasyon koşulları değiştirilerek kontrol edilebilir.
- 4- Mantar biyokütle kaynağı sınırsızdır.
- 5- Biyolojik atıklar mantar kültivasyonu için ekonomik bir platform olarak kullanılabilir.

Prosesleri sanayi seviyesine kadar ölçeklenmiş olmaması ise mantarların en önemli dezavantajlarından biridir (Amorim *et al* 2006; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014; Lúcia *et al.* 2014).

Bu amaçla geliştirilen yeni tekniklerden biri de nanoteknoloji ve bu teknolojiyle hazırlanan polimer ve bazı nanomalzemelerdir.

Nanoteknoloji boyutları 100 nm ve daha küçük maddelerden (0.1–100 nm arasında) yeni yapılar veya sistemler oluşturma, bu sistemlerin karakterizasyonu, manipölasyonu ve analiz etme konularını esas almaktadır.

Nano terimi bir ölçeklendirme biriminden gelmektedir ve nanometre metrenin milyarda biri kadardır. Bu derece küçük yapıların benzersiz ve yeni fonksiyonel özellikler taşıdıklarının belirlenmesi ile nanoteknolojiye gösterilen ilgi ve bu araştırma alanında yapılan çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Bu derece küçük materyallerin, daha büyük materyallerle karşılaştırıldıklarında, farklı özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Fiziksel güç, kimyasal reaktivite, elektrik iletkenliği, manyetizma ve optik etkiler bu farklılıklar arasında sayılabilir (Saklar 2009).

Nanoteknolojinin birçok uygulamaları vardır. Şimdiye kadar yürütölen nanoteknoloji araştırmalarının çoğu elektronik, ilaç ve otomasyon sektörlerinde olmuştur. Bu

sektörlerden elde edilen bilgilerle nanoteknolojiyi gıda güvenliğindeki uygulamalar (pestisitlerin ve mikroorganizmaların tespiti) çevrenin korunması (su saflaştırma) ve nutrientlerin dağıtımı gibi gıda ve tarım ürünlerinde kullanılmaya da adapte etmek mümkündür (Sözer and Kokini 2009; Stamford *et al.* 2013).

Bu çalışma ile fungal kaynaklardan elde edilen kitinin ticari olarak değerlendirilebilecek kitosana ve devamında nanoteknoloji için önemli bir ürün olan nanokitosan partiküllerinin üretilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Nanokitosan, kitosan biyopolimerinin en önemli türevlerindendir. Bu nanopartiküller morfolojik olarak, beyaz, yuvarlak ve pürüzsüzdürler. Nanokitosan mükemmel fizikokimyasal özelliklere sahip olan doğal bir malzemedir (Ting and Shen 2005; Lúcia *et al.* 2014).

Nanokitosan çevre dostudur ve insanlara zarar vermeyen biyoaktiviteye sahiptir. Çoğunlukla, kontrollü bir salım, yapay organlarda gen transferi için bir ilaç taşıyıcısı ve bağışıklık profilaksisi için kullanılabileceği literatürde belirtilmektedir. Buna ek olarak, kitosan nanopartiküller tekstillerin direnci artırmak için kullanılmıştır (yıkılabilecek özelliklerinin artırılması) ve antimikrobiyal etkilere sahiptir (Ting and Shen 2005; Antonio *et al.* 2012).

Nanopartikül üretimi üzerine yapılan çalışmalar parçacık büyüklüğünün azalmasıyla kitosanın sahip olduğu özelliklerde artış meydana geldiğini göstermiştir. Süreli yayınlarda nanobüyükte kitosan hazırlamak için kullanılan çok sayıda yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden en çok kullanılanları iyonik jelleşme ve ters misel yöntemleridir. Ters misel yönteminde daha kararlı ve küçük parçacıklar üretmek mümkün olsa da kullanılan toksik çapraz-bağlayıcı maddelerden kalabilecek artıklardan dolayı iyonik jelleşme yöntemi daha çok tercih edilmektedir (Lee *et al.* 2004; Qi *et al.* 2004; Calvo *et al.* 1997; Banerjee *et al.* 2002; Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

Günümüzde endüstriyel uygulamaları kitin ve kitosanın yetiştirilmesinde mantarların etkin kaynağı sunabileceğini göstermektedir. Mantarlar, birçok substrat üzerinde kolay

yetiştirilmeleri, mevsimsel değişimlerden bağımsız olarak laboratuvarda bolca üretilibilme gibi özellikleri kitin eldesi için mantarları oldukça ideal bir kaynak yapmaktadır. Bu nedenlerle, kitosan üretiminde kabukluların yerini mantarların alması beklenmektedir.

Planlanan bu çalışmada, fungal kaynaklardan (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp. ve *Rhizoctonia* sp.) elde edilen biyokütle kullanılarak kitosan saflaştırılması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Elde edilen kitosan, FTIR ve SEM analizleri için hazırlanarak mantarların kitosan polimerlerinin çıkarımı, kitosan karakteristikleri belirlenmesi, kitosan verimler, kül içeriği ve deasetilasyon derecesi hesaplanması yapılmıştır. Ayrıca elde edilecek kitosan, iyonik jelleşme tekniği ile suda çözünen nanokitosan sentezlenmiştir. Elde edilen nanokitosan FTIR ve SEM analizleri için hazırlanarak karakterizasyon işlemleri yapılmış ve çalışma verileri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Mantarlar

Doğada organik maddeler ve nemli yerlerde bulunan ve ekosistemin önemli parçalarından biri olan mantarlar, insanlar açısından da büyük öneme sahiptir. Mantarlar, diğer canlılara göre (bitkiler, hayvanlar ve bakteriler) birçok yönden ayrılmaktadırlar. Besin elde etme yolları, hücresel özellikleri ve moleküler yapıları mantarları diğer canlılardan ayıran en belirgin özelliklerdendir. Diğer önemli ayırım, mantar hücre duvarlarıdır. Çoğunlukla bu canlıların hücre duvarları kitinden oluşmaktadır (Dix and Webster 1995; Kayser *et al.* 2002; Abe *et al.* 2010).

Mantarların çoğu çok hücreli heterotrof organizmalardır, fakat genel beslenme şekilleri, yapıları ve üremeleri açısından diğer çok hücrelilerden farklıdırlar. Besinlerini, ekzoenzim olarak adlandırılan enzimler sayesinde hücre dışında sindirirler ve emilimle hücre içine alırlar. Bu güçlü hidrolitik enzimleri besin üzerine salgılayarak, karmaşık molekülleri kullanabileceği daha basit bileşiklere parçalarlar. Emilim ile gerçekleştirilen beslenme şekli mantarlara ayrıştırıcı (saprofit), parazit ya da ortakçılık (mutualistik) özellik kazandırır. Saprofitik mantarlar besinlerini yere düşmüş ağaç gövdeleri, hayvan ölümleri ve canlı organizma artıkları gibi cansız organik maddelerden alırlar. Mutualistik ve parazitik mantarlar besinlerini canlı konakçısının hücrelerinden emerler. Ancak, mutualistik mantarlar ilişki kurdukları organizmaya bazı yararlar sağlar (Campbell and Reece 2008).

Mantarlar tek çekirdekli veya çok çekirdekli, haploid, dikaryotik veya diploid olabilen, tallus yapısı homokaryotik veya heterokaryotik özelliklere sahip ökaryot canlılardır. Vejetatif durum genellikle hareketsiz, substratın üzerinde bulunan veya içine doğru protoplazmik uzantılarla bağlanmış bir miselden oluşmaktadır. Mantarların hayat döngüleri basit olabildiği gibi genelde karışıktır. Üremeleri eşeyli (çekirdek birleşmesi ve mayoz) ve/veya paraseksüel (eşey organları ve mayoz olmaksızın genetik materyal

aktarımı) ve/veya eşeysiz (mitotik çekirdek bölünmesi) olarak gerçekleşebilmektedir. Genellikle sporokarları mikroskobik veya makroskobik olarak karakteristik özellikler göstermekte olup sadece sınırlı doku farklılaşması görülmektedir (Webster and Weber 2007; Abe *et al.* 2010).

Mantarlar; Mikrofunguslar ve Makrofunguslar olmak üzere pratikte iki grup olarak incelenebilir. Mikrofungus; tek hücreli (patojenik örnekler içerebilmektedir) veya iplikli yapıdaki mikroorganizmalardır. Havada, toprakta ve bitki üstlerinde çok sayıda bulunmaktadır.

Makrofunguslar ise; zehirli, yenmez ve yenebilir olarak üçe ayrılabilir. Bu mantarlar bazı dünya ülkelerinde genellikle gıda olarak yararlanılırken, uzak doğu ülkelerinde (Çin, Japonya, Tayvan, Kore) mantarlar yüzyıllardır ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır. Makromantarlar, Ascomycetes ve Basidiomycetes bölümlerine aittir (Zhang *et al.* 2007).

Bilinen mantar türlerinin yaklaşık %4'ünü zehirli türler, %2'sini yoğun ilgi gören veya yenen türler ve %19'unu normal yenilebilir türler oluşturmaktadır. Mantar türlerinin kalan %75'ini oluşturan türler tehlikeli olmasa bile aşırı odunsu, sümüksü, tozumsu ve tüylü olmaları gibi istenmeyen özelliklerinden dolayı yenmez mantar olarak kabul edilmektedir. Mantarlar alemi (Chytridiomycota, Oomycota, Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycota) olmak üzere yaygın bir şekilde kabul gören 5 bölümde incelenmektedir (Hallen 2002; Abe *et al.* 2010).

2.2. Mantarların Biyolojik ve Ekonomik Önemi

Mantar hücreleri çevre, sanayi ve insan sağlığı üzerine önemli etkilere sahiptir. Ekolojik açıdan, mantarların organik maddeleri birincil ayrıştırıcı olarak katılımı olmaksızın doğadaki element döngüsünün gerçekleşmesi mümkün olmayacaktır. Dahası mantarlar doğa ile ilgili aktiviteler ormancılık ve zirai işlemler bakımından da merkezi konuma sahiptir (Kavanagh 2005).

Doğada mutualistik simbiyont, patojen ve saprofit olarak, ölü materyalleri ayrıştırma, besin alma ve fizikokimyasal çevreyi etkileme gibi önemli rollere sahip olmakla birlikte organik kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması (detoksifikasyon) ve çevredeki ağır metallerin biyoremediasyonu da mantar metabolizması tarafından etkili bir şekilde yerine getirilmektedir (Hallen 2002; Koyyalamudi *et al.* 2009).

Ayrıca endüstriyel ticari mallar olarak ekonomik açıdan önemli yiyecek, katkı maddeleri, mayalı içecekler, antibiyotikler, renklendiriciler, eczacılığa ait maddeler, biyoyakıtlar, endüstriyel enzimler, vitaminler, organik asitler, yağ asitleri ve steroller gibi ürünler mayalardan ve mantarlardan fungal metabolizma yoluyla elde edilmektedir (Alberts *et al.* 2003). Ancak bununla beraber insan sağlığı açısından bazı mantarlar ve mayalar hayati tehlike oluşturabilecek özelliklere sahipken, diğerleri sağladıkları antimikrobiyal ve kemoterapötik maddeler sayesinde hayat kurtarıcı özellik göstermektedirler (Kavanagh 2005).

Günlük hayatta karşımıza çıkabilen mantarların en önemli özelliği doğrudan gıda olarak tüketilebilmeleridir. Özellikle yabani yetişen yenen mantarlar olmak üzere birçok mantar türü lezzetlerinden dolayı pek çok ülkede rağbet görmektedir ve yıllık tüketimleri kişi başına 10 kilogramı aşabilmektedir (Kalac and Svaboda 2000; Abe *et al.* 2010).

Yenen yabani mantarlar doku ve aromalarından dolayı daha çok tercih edilmekte olup nadir bulunmalarından dolayı kültür mantarlarından daha pahalıdırlar (Manzi *et al.* 2001; Gursoy *et al.* 2009).

Doğada 2000'den fazla yenen mantar türü bulunmaktadır fakat sadece yaklaşık 22 türün ticari amaçlı olarak yaygın bir şekilde toprak veya odun üzerinde kendine özgü çevresel ve besinsel durumları sağlanarak kültürü yapılabilmektedir (Manzi *et al.* 2001). Bununla birlikte yabani yenen mantarlar sahip oldukları besinsel ve farmakolojik karakterleri sayesinde insan diyetinde gittikçe önem kazanmaktadır (Manzi *et al.* 2001; Gursoy *et al.* 2009).

Mantarların kuru ağırlığını, az miktarda yağ ve ana bileşen olarak yapısal polisakkaritler ile proteinler oluşturmaktadır. Proteinler özellikle insanlar ve hayvansal organizmalar için temel maddelerden biridir. Yüksek miktarda önemli protein, düşük oranda yağ, B grubuna ait bazı vitaminler ve çeşitli aromatik maddeler içermektedir. Kitin, glikojen, mannitol ve trehaloz tipik karbohidrat bileşenleridir. Yağ asidi içeriği ihmal edilebilir derecede düşük iken, esansiyel aminoasit içeriği besinsel açıdan mükemmeldir (Vetter 2003; Koyyalamudi *et al.* 2009).

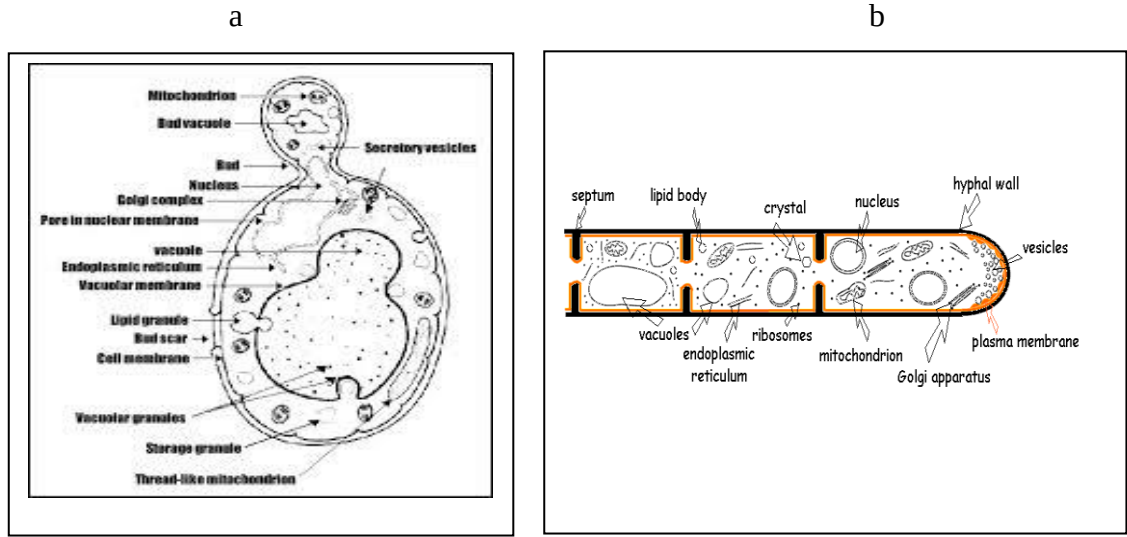
Ayrıca mantarlar yüksek miktarda sindirilemeyen lif, spesifik β -glukan, antioksidan ve aroma bileşenlerine sahiptir. Bu özellikler hem araştırmacıların hem de tüketicilerin ilgisinin artmasını sağlamaktadır (Kalac 2009).

Pek çok mantar türü antikarsinojenik, antiinflamatuvar, bağışıklık sistemi baskılayıcı ajanlar ve antibiyotikler gibi çeşitli iyileştirici aktiviteler göstermektedir. Doğu Asya ülkelerindeki geniş ölçüde yapılan araştırmalar ve tarihi gelenekler pek çok mantar türünün koruyucu ve iyileştirici özelliklere sahip olduklarını kanıtlamıştır. Avrupa türleri hakkında bilgi şimdiye kadar sınırlı kalmıştır. Avrupa'nın yabani yetişen mantarlarının antioksidan aktiviteleriyle ilgili birkaç orijinal makale yayınlanmıştır (Kalac 2009).

2.3. Mantarların Genel Hücre Yapısı

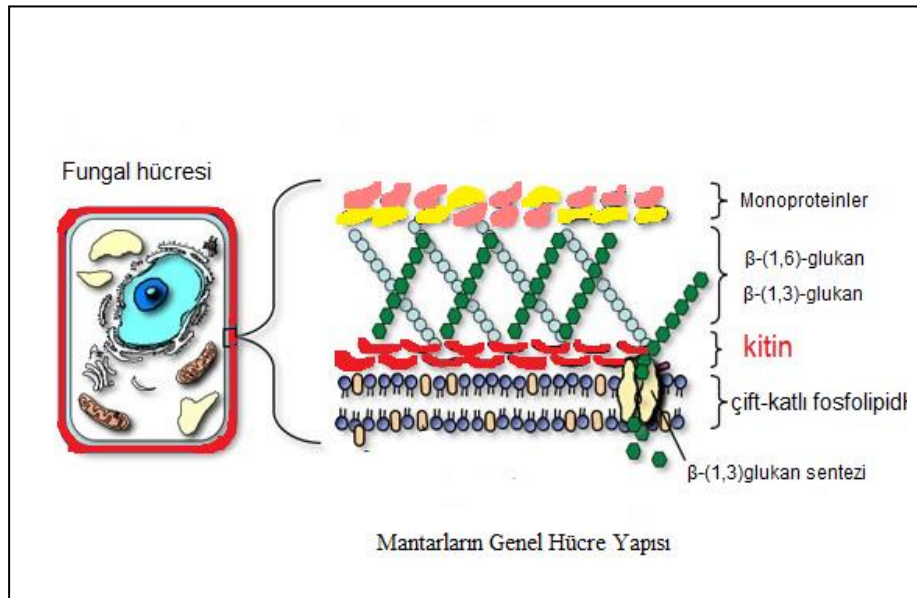
Mantar hücrelerinde genel olarak; su, nukleik asitler, proteinler, karbohidratlar ve lipitler bulunur. Bu içerik bileşikleri temelde birbirine benziyor olmasına rağmen, mantarların oluşturdıkları kimyasal maddeler farklılık gösterir. Mantarlardaki DNA yoğunluğu çok düşüktür (Sümer 2006).

Hücre yapıları dikkate alındığında tek hücreli mantarlar (mayalar) hif oluşturan (küf, şapkalı ve askuslu) mantarlar olarak iki temel grupta incelenebilir (Şekil 2.1.a ve b).



Şekil 2.1. A- Mayalar ve B- Hif oluşturan mantarlar

Hücre duvarı bileşimi değiştirilebilir, koşullara ve gelişme aşamasına bağlı olarak, tek bir mantar izolatu içinde değişiklik gösterebilir (Şekil 2.2) (Bowman and Free 2006; Deacon 2006).



Şekil 2.2. Mantarların genel hücre yapısı

Mantar hücre duvarının %80-90'nını karbohidratlar oluşturmaktadır. Polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin içermektedir. Mannoproteinler, mannan ve bunun polimeri olan mannozun, proteinlerle kovalent bağları olan glikoproteinlerdir. β -glukanlar, β -1,3 ve β -1,6 bağları içeren glukozun dallanmış homopolimerleridir. Ayrıca mevcut olan kitin, β -1,3-1,4 bağları içeren N-asetil-D-glukozaminin dallanmış homopolimeridir. Protein ve lipidler hücre duvar yapısında çok az bulunmaktadırlar. Glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak, duvarın yapısal bileşenini oluşturmaktadır. Proteinler ve gluko(manno)proteinler bu iskelete bağlanırlar. Hücre duvarındaki immünodominant yapı mannandır. Duvar kuru ağırlığının %30'unu ve polisakkarit içeriğinin %40'unu mannan oluşturmaktadır. Glukan ise kuru ağırlığın %47-60'ını oluşturmaktadır. Proteinler %6-25, lipitler %1-7 ve kitin %0.5-9 oranında bulunmaktadır. Mantarlarda çok katlı (kitin, mannan ve glukan) bir hücre duvarı bulunması, mantarları gerçek bir hücre duvarı olmayan hayvan hücresinden ayırmaktadır. Ayrıca mantar hücre duvarında bulunan kitin, mantarın bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmasını sağlamaktadır (Tümbay 1999; Vetvicka 2001).

Hayvan hücreleri gibi ökaryot olan mantarların sitoplazma zarı yapısal olarak insan sitoplazma zarına benzerlik göstermektedir. Dolayısı ile mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bu yapısal benzerlikten dolayı, insan hücresi üzerine de toksik etki yapmaktadır. Sitoplazma zarı sterol içermekte ve sitoplazma içerisinde mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi gibi organeller yer almaktadır. Bunların yanı sıra zarla çevrili gerçek bir çekirdeğe sahiptirler (Tümbay 1999; Vetvicka 2001; Gordon 2005; Kalkancı *et al.* 2008).

2.4. Kitin ve Kitosan

Kitin, yenilenebilir biyopolimerdir dünyada ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan karbonhidrattır. Kitin, beyaz renkte, suda çözünmeyen, sert, elastik olmayan ve azot bakımından zengin (deasetilasyon derecesine bağlı olarak %5-8 arasında değişmektedir) bir bileşiktir. Kitinin, hidrofobik, suda ve birçok organik çözücüde çözünmeyen bir yapısı vardır (Kurita 2001).

Kitin önemli bir doğal kaynaktır, kabuklu su ürünleri ve böcek iskeleti yapısında bulunmaktadır ve mantarlar ile yosunlar hücre duvarlarının bileşenidir (Kurita 2001; Chatterjee and Guha 2014).

Kabuklardaki kitinin ekstraksiyonunda temel işlemler; kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi minerallerin ve proteinlerin alkali ve asit muamelesi ile uzaklaştırılmasıdır. Elde edilen kitinin, yüksek sıcaklıkta (120°C’da) %40 NaOH ile işlem görmesi sonucu deasetillenmiş kitosan elde edilir (Okuyama *et al.* 2000; Varum *et al.* 2001).

Bu şekilde elde edilen ürünlerin başında kitin ve başlıca türevi olan kitosan gelmektedir (Shadidi *et al.* 1999; Duman ve Şenel 2004; Demir *et al.* 2008; Demir ve Seventekin 2009).

Kitosan ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894’de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C’de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan “kitosan”ı elde etmiştir. 1934 yılında kitosandan film üretimi ve lif eldesi konusunda olmak üzere iki patent alınmıştır. Aynı yıl, Clark ve Smith tarafından çok iyi oryante olmuş kitosan lifi üretimi de başarı ile gerçekleştirilmiştir (Dutta *et al.* 2002; Guang 2002).

Kitin ve kitosanın ticari ana kaynağı, Kabukluların kabuğu olmasına rağmen, bazı çalışmalar seçilmiş mantarların yetiştirilmesini endüstriyel uygulamalarda, kitin ve kitosanın etkili bir kaynağını sağlayabildiğini önermektedir (Berger *et al.* 2011; Fai *et al.* 2011; Stamford *et al.* 2013).

Kitosan, kitinin en önemli türevlerindendir, birçok formda kullanılabilir ve ticari olarak elde edilir. Kitosan, doğal yapıda bir polisakkarit ve katyonik özelliği olan polimerdir. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında biyolojik olarak hiç bir toksik etkisi olmayan, düşük bir immün tepkisini oluşturan ve uyumlu olmasına rağmen daha ucuz elde edilir. Kitinin deasetilasyon türevi olan kitosan, asetik asit, formik asit gibi

seyreltik asitlerde çözünür. Asit ortamda amino gruplarının protonasyona uğraması sonucunda ise suda çözünebilir (Kumar 2000; Kurita 2001; Peniche *et al.* 2008; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014; Lúcia *et al.* 2014).

Kitosanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı, en önemli özelliklerindendir. Molekül ağırlığı (25-2000 KD) ve deasetilasyon derecesi (%40-98) üretim koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kitosanın çözünürlüğü, moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlıdır. Düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, sadece pH 9.0 ve üzerinde çözünebilir olduğu, buna karşın yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, pH 6.5 ve altında çözünür olduğu, nötral ve alkali pH değerlerinde çözünmediği gösterilmiştir. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanlar; glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi organik ve inorganik asitlerle tuz oluşturarak çözünür. Kitosan, asitlerde çözüldüğünde lineer polielektrolit bir özellik kazanır ve pozitif yüklü kitosan, polianyonlarla ve negatif yüklü yüzeylerle kuvvetli bir etkileşim gösterir. Pozitif yüklü bir polimer olduğu için, negatif yüklü proteinler, aniyonik polisakkaritler ve nükleik asitler gibi moleküller ile etkileşime girip çökelti oluşturabilir (Singla and Chawla 2001; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014).

Kitosan özellikleri N-deasetilasyon derecesi değiştirilerek istenildiği gibi modifiye edilebilmektedir (Sezer 2007; Lúcia *et al.* 2014).

Kitosanın çözünürlüğünü üzerinde etkili bir diğer faktör de, çözeltide tuzların bulunmasıdır. Çözünürlük, ortama tuzların eklenmesi ile değişir ve iyonik kuvvetin artmasıyla çözünürlük azalır. Kitosan tuzları, (kitosan glutamat, kitosan klorid vb.) genellikle suda çözünebilir (He *et al.* 1998; Shimoda *et al.* 2001; Singla and Chawla 2001; Kockisch *et al.* 2003).

Kitosan çözeltisinin viskozitesi, kitosan konsantrasyonuna, sıcaklığa ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişir. Viskozite, kitosan konsantrasyonu ve deasetilasyon derecesi ile doğru orantılı, sıcaklık ile ters orantılı olarak artar. Kitosan, yüksek

moleküler ağırlığı ve doğrusal dallanmamış yapısı nedeni ile asidik ortamlarda ideal bir viskozite arttırıcı olarak kullanılabilir (Chen and Tsai 1998; Stamford *et al.* 2013), (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri (Sezer 2007).

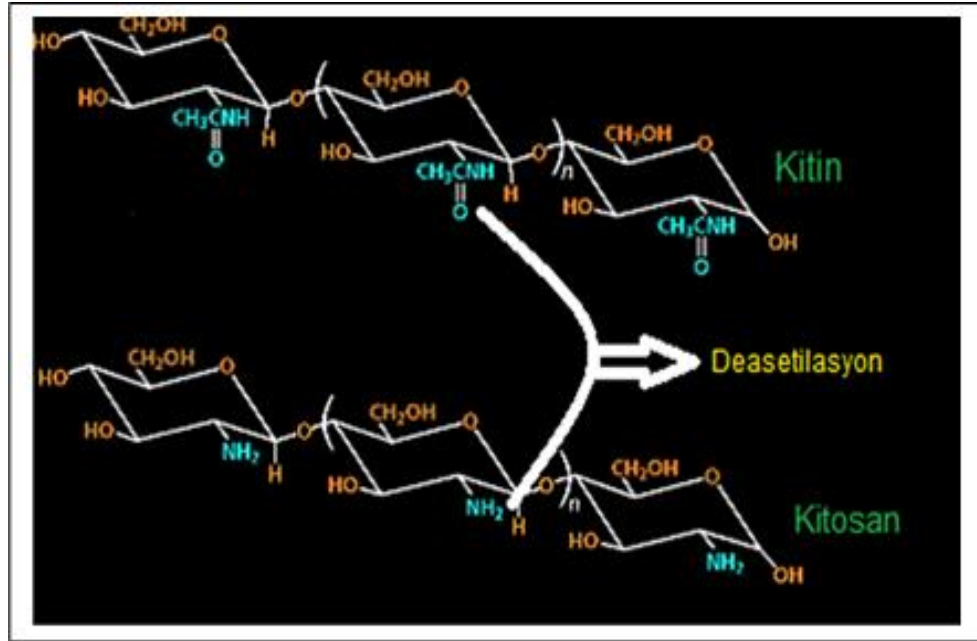
Kitosan Türleri	Deasetilasyon Derecesi (DD)%	Viskozite(cps)
HM _w	81.60	2040
MM _w	81.40	286
LM _w	80.60	115

Pozitif yüklü kitosanın, negatif yüklü mukozal yüzeyler ile arasındaki elektrostatik etkileşim nedeni ile muko-adhesif özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Lehr *et al.* 1992; Needleman and Smales 1995; Rillosi and Bockton 1995; He *et al.* 1998; Shimoda *et al.* 2001; Kockisch *et al.* 2003).

2.5.Kitin ve Kitosan Kimyasal Yapısı

Bir biyopolimer olan kitin, esas olarak poli-[b-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] yapısında olup çok düşük oranda 2-amino-2-deoksi-β-glukopiranoz monomerlerini de içermektedir (Sekil 2.3).

Kitosanın kimyasal yapısı, poli-[b-(1,4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] şeklindedir. Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır (Geçer 2010).



Sekil 2.3. Kitin ve kitosanının kimyasal yapıları (Geçer 2010).

2.6. Kitosanın Kullanım Alanları

Kitosan çeşitli ülkelerde büyük ölçüde kullanılmasına karşın ülkemizde bu oran daha düşüktür. Kitosan günümüzde tıptan-gıdaya, ziraatten-kozmetiğe, eczacılıktan-atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilmektedir. Kitosan türevleri ile hala birçok çalışma söz konusu olup, farklı kullanım alanları ile farklı türevler elde edilmesi temel hedefler arasında yer almaktadır (Elibol 2008; Stamford *et al.* 2013).

Kitosan, katyonik yapılı boyalar, nişastalar, yüzey etken maddeler ve dört değerlikli amonyum tuzları gibi organik bileşikler ile olduğu gibi birçok anyonik ve noniyonik polimerlerle de geçimlidir. Çok değerlikli anyonlarla ise, çapraz bağlanarak jel ve çökelti oluşturur. Civa, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, krom, bakır, demir, mangan, gümüş, altın ve platin gibi metal iyonlarına karşı yüksek düzeyde afinite gösterir ve kompleks oluşturur (Skaugrud 1989; Bhatia and Ravi 2003). Bu özelliği nedeni ile kirlenmiş suların civa, kurşun ve krom gibi ağır metallerden arındırılmasında kullanılmaktadır (Oshita *et al.* 2002; Luisa *et al.* 2003; Cardoso 2012).

Kitosan, antifungal özelliği nedeniyle çeşitli mikroorganizma enfeksiyonlarına ve parazitlere karşı tarımsal amaçlarla bitkilerin korunmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Bunun yanısıra, kitosan sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeni ile tarımsal amaçlı olarak; çeşitli tahıl, meyve ve sebzelerin mantar ve benzeri mikroorganizma enfeksiyonlarına karşı korunmasında, gıda sanayiinde; meyve suyu, bira vb. meşrubatların temizlenmesinde, kağıt endüstrisinde; selüloz gibi destek materyali olarak, tekstilde; boya bağlama özelliğinden dolayı ağartıcı olarak, kozmetik endüstrisinde; saç ve cilt bakım ürünlerinde, medikal alanda; hemostatik ajan olarak yara ve yanıkların tedavisinde, antimikotik etkisi nedeni ile antifungal ajan olarak, diyet programlarında yağ asitlerini bağlayıcı özelliğinden dolayı zayıflatıcı, kolesterol düşürücü diyet ürün olarak, antikolesterik ve antiaterosklerotik ajan olarak, hiperbilirubinemi, hiperkolesteronemi dermatit ve pürülan hastalıkların (ülserasyon, pododermatit, filegmon) tedavisinde ilaç olarak, oftalmolojide kontak lens yapımında, cerrahide greft, stent ve sütür materyali olarak, biyoteknolojik alanda ise dolgu materyali olarak kromatografik çalışmalarda, canlı hücre ve enzim enkapsülasyonunda, doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Austin *et al.* 1981; Ueno *et al.* 1999; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014).

Kitosanın, en önemli kullanım alanlarından biri de ilaç endüstrisidir. Farmasötik amaçla, ilaç taşıyıcı temel ve/veya yardımcı materyal olarak tabletler, granüller, hidrojeller, nano ve mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Illum 1998; Ofori and Fell 2003; Lúcia *et al.* 2014).

Vücutta ani ilaç serbestleşmesinin önüne geçmek amacıyla uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, biyolojik olarak yıkıma uğrayabilen ve toksik etkileri düşük polimerlerin kullanımı amaçlanır (Langer 1990; Suna 2006).

Bu kapsamda, kimyasal ve biyolojik özellikleri iyi bilinen kitin ve kitosan türevleri kullanılarak koaservasyon, polimerizasyon, iyonotropik jelleşme vb. yöntemlerle oluşturulan nano-mikroküre, nano-mikrokapsül ve boncuklar, ilaç taşıyıcı sistem olarak büyük bir potansiyele sahiptirler (Junginger and Verhoef 1998; Kaş 2002).

Kitin ve kitosan türevi polimerlerin kullanımında, mevcut uygulamalar dışında ideal kontrollü salım formülasyonlarının geliştirilmesi yönünde çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Shu and Zhu 1999; Illum *et al.* 2001; Cardoso 2012; Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

2.7. Kitosanın Özelliklerine Etki Eden Parametreler

Kitosanın kullanımını belirleyen özellikleri başta deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı olmak üzere pH, çözünürlük, viskozite ve renk şeklinde sıralanmaktadır. Bunun yanı sıra seyreltik asitlerde çözünebilen kitosanın suda çözünebilir formda türevlerini elde etmek üzere yapılan çalışmalar sonuç vermiş, özellikle biyoteknolojinin birçok alanında çalışmalar devam etmektedir (El Hadrami *et al.* 2010).

a. Deasetilasyon Derecesi

Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. “Deasetilasyon Derecesi (DD)” kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Böylece geride sadece amin grubu kalmaktadır. Kitosanın deasetilasyon derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Kitinin belli derecede deasetillenmesi (%60 ve üzeri) sonucunda “kitosan” elde edilmektedir (Jonathan *et al.* 1999; Vilchez *et al.* 2005; Chatterjee and Guha 2014).

Deasetilasyon derecesi, deniz kabuklularının cinsine ve üretim yöntemine göre %56-99 arasında değişebilmektedir. Kitosanın kitine göre iki büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kitini çözmek için lityum klorür ve dimetilasetamid gibi toksik özellikte olabilen çözüenler kullanılmasına karşın, kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesidir. İkinci avantajı ise birçok kimyasal reaksiyon için aktif kısım olan serbest amin gruplarına sahip olmasıdır. Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için ninhidrin testi, lineer potansiyometrik titrasyon, yakın-infrared spektroskopi gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanı FTIR

spektroskopisi olmasına karşın, FTIR spektroskopisi sonunda farklı baselinelerin ortaya çıkması nedeniyle yöntemler hakkında halen çeşitli tartışmalar söz konusudur (Jonathan *et al.* 1999; Vilchez *et al.* 2005; Lúcia *et al.* 2014).

b. Molekül Ağırlığı

Kitosanın doğal ve sentetik polimerlere uygulamasında önemli olan diğer bir parametre de molekül ağırlığıdır. Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, elde edildiği kaynağa ve özellikle deasetilasyon koşullarına (sıcaklık, zaman ve NaOH konsantrasyonu) bağlı olarak değişmektedir. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen, kitosanın parçalanmasına neden olmakta ve molekül ağırlığını düşürmektedir. Diğer yandan, çok yüksek sıcaklıklar da kitosanın molekül ağırlığına olumsuz etki etmektedir. Örneğin 280°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kitosan parçalanmaya başlamakta, polimer zinciri kopmakta ve böylece molekül ağırlığı düşmektedir. Molekül ağırlığının belirlenmesinde jel permetasyon kromatografisi, ışık saçılma spektroskopisi ve viskoz metrik yöntemler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Agboh and Qin 1997; Cardoso 2012).

c. Viskozite

Sıcaklık, viskozite, deasetilasyon ve pH derecesi gibi parametreler kitosanın özelliklerine etki etmektedir. Viskozite, demineralizasyon süresinin artması ile düşmektedir. Yaklaşık 4°C’de depolanan kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi stabiliteyi gösterdiği görülmüştür (Knittel and Schollmeyer 1998; Stamford *et al.* 2013).

d. Çözünürlük

Kitin, çok miktardaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile yarı kristalin yapıda bir polimerdir. Bu nedenle seyreltik asitlerde ve birçok organik çözügede çözünmemektedir. Kitosan, katyonik yapısı sayesinde pH<6 ortamında bazı çözültülerde kolayca çözünabilmektedir. Diğer yandan, inorganik asitler içerisinde kitosanın çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kitosanın çözünmesi amacıyla genellikle

asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan çözügen asetik asittir (Knittel and Schollmeyer 1998; Cardoso 2012).

Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen sıcaklık, çözügen konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametre bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için kitosanın en az %75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir (Knittel and Schollmeyer 1998; Chatterjee and Guha 2014).

Asidik ortamda NH_2 grubu $-\text{NH}_3^+$ şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir. Protonlanmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmada ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları, film veya lif oluşumu gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir. Çizelge 2.2’de kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünebilirlik durumu gösterilmiştir (Knittel and Schollmeyer 1998; Cardoso 2012; Stamford *et al.* 2013).

e. Renk

Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki pigment, kitin ile kompleks oluşturmaktadır (4-keto ve 3,4,4’-diketo- β -keroten türevleri). Toz halindeki kitosan oldukça yumuşak olup rengi açık sarıdan beyaza kadar çeşitli tonlarda değişebilmektedir. Kitinden kitosan eldesi esnasında renk giderilmesi aseton ile ekstraksiyon ve ardından %0.3 NaOCl ile oda sıcaklığında yapılan 5 dk işlem sonunda gerçekleşmektedir. Çeşitli literatürlerde, renk giderme işlemi için alternatif olarak; KMnO_4 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ veya H_2O_2 gibi kimyasalların da kullanılabileceği ifade edilmektedir (Knittel and Schollmeyer 1998).

2.8. Nanopartiküllerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Nanopartiküller, büyüklükleri 0.1-100 nm arasında değişen, çözünmüş, enkapsüle edilmiş ve adsorbe olan etken maddeyi kontrollü olarak serbestleştiren katı, kolloidal sistemlerdir. Etken madde, makromoleküler yapı içerisinde çözünmüş, adsorbe olmuş, eklenmiş halde veya enkapsüle edilmiş olarak yer alabilir. Nanopartiküller, nanoküre veya nanokapsül olarak da hazırlanabilen, polimerik yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanokürede etken madde matriks sistem içerisinde homojen olarak dağılmış halde bulunur. Nanokapsülde ise etken madde bir polimerik membran ile çevrili halde yer alır (De Smedt *et al.* 2000; Gaur *et al.* 2000; Mao *et al.* 2001; Niidome *et al.* 2002).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılabilir. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan başlıca doğal polimerler; lipidler, proteinler (albumin, jelatin, kollajen gibi) ve polisakkaritler (aljinat, kitosan, dekstran gibi) olmak üzere üç grup altında toplanabilir. Sentetik polimerler arasında ise poli(laktik asit)-PLA, poli(laktik-ko-glikolik asit)-PLGA, poli(alkilsiyanoakrilat)-PACA, poli(vinil alkol)-PVA, poli(etilen glikol)-PEG, poli(etilen oksit)-PEO, poli(etilen imin)-PEI sayılabilir.

Protein esaslı polimerlerin en önemli dezavantajı antijenik yanıt oluşturma ihtimali iken sentetik polimerlerin dezavantajı ise biyolojik olarak parçalanamamaları ve kronik toksisite oluşturma riskleridir. Son yıllarda terapötik amaçlı taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında polimerik taşıyıcıların kullanımı, sağladıkları bazı üstünlükleri nedeniyle tercih edilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilen bu polimerlerle hazırlanan partiküler taşıyıcı sistemler içerisinde nanopartiküller yaygın şekilde kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan doğal polimerlerden biri olan kitosanın, biyogeçimli olması, biyolojik sistemlerde yıkıma uğrayabilmesi ve düşük toksisitesi, epitelial yüzeylerde absorpsiyon artırıcı özelliği nedeni ile mukozal immünite ve gen taşıyıcı sistem olarak kullanım potansiyeli üzerine yoğun bir şekilde araştırmalar yapılmaktadır (Aral *et al.* 2000; Borchard *et al.* 2001; Akbuğa *et al.* 2002; Guliyeva *et al.* 2006; Stamford *et al.* 2013).

2.9. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında İzlenen Yöntemler

Nanopartikül hazırlamak için kullanılan yöntemler, formülasyonda kullanılan polimerin tipine göre çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte, genel olarak 6 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; polimerizasyon (misel polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu, yüzeylearası polimerizasyon), koaservasyon, iyonotropik jelleşme, püskürterek kurutma, çözücü buharlaştırma yöntemi ve çok katlı emülsiyon yöntemidir. Belirtilen nanopartikül hazırlama yöntemlerinin temel prensipleri;

Misel polimerizasyonu yönteminde, polimerize edilecek monomerler ve kaplanacak etken maddeler su içerisinde çözündürülür ve yüzey etken maddelerin yardımıyla hidrofobik fazda dağıtılarak miseller elde edilir. Polimerizasyon başlatıcı ajan olarak x-ışını, IR kullanılabilir ve ultrasantrifügasyon yöntemi ile ayrılan partiküller yaklaşık olarak 50-100 nm büyüklüğünde küresel yapılardır (Aral *et al.* 2000; Akbuğa *et al.* 2002).

Emülsiyon polimerizasyonunda, sulu ortamda gerçekleştirilen polimerizasyon işlemi, emülgatör maddelerin oluşturduğu misel yapı içerisinde de devam etmektedir. Dispersiyon ortamındaki monomerlerden misel yapı içerisine diffüze olanlar başlatıcı moleküllerin de etkisi ile polimerleşirler (De Smedt *et al.* 2000; Mansouri *et al.* 2006).

Yüzeylearası polimerizasyon ise temelde monomerin ara yüzeyde polimerizasyonu sonucunda nanopartiküllerin meydana gelmesidir. Biri yağda diğeri suda çözünen iki ayrı monomerin kullanımı sonucu polimerizasyon işleminin damlacık yüzeyinde meydana gelmesi şeklinde de açıklanabilir (Aral *et al.* 2000; Mansouri *et al.* 2006).

Koaservasyon yönteminde, nanopartiküller faz ayrımı, sıcaklık, çözücü olmayan çözelti, tuz veya geçimli olmayan polimer eklenmesi ve polimer-polimer etkileşimi sonucu oluşurlar. Etken madde, karakteristik özelliklerine uygun olarak yöntemin herhangi bir aşamasında formülasyona ilave edilebilir. Suda çözünmeyen veya güç çözünen etken maddelerin kullanımı halinde formülasyona yüzey etken maddeler ve stabilizasyonu

arttırmak, salım özelliklerini düzenlemek amacı ile çapraz bağlayıcı ajanlar eklenebilir (Akbuğa *et al.* 2002; Mansouri *et al.* 2006).

İyonotropik jelleşme yönteminde, organik çözücü içerisinde hazırlanmış karışmakta olan polimer çözeltisine farklı konsantrasyonlardaki tripolifosfat vb. eklenir. Oluşan nanopartiküller santrifügasyon yöntemi ile ayrılır (Aral *et al.* 2000; Akbuğa *et al.* 2002; Mansouri *et al.* 2006).

Püskürterek kurutma yönteminde, polimerin çözündürüldüğü fazda etken madde dağıtılır veya etken madde polimer içerisinde emülsifiye edilir. Emülsiyonun püskürtülerek kurutulması ile partiküller elde edilir (De Smedt *et al.* 2000; Mansouri *et al.* 2006).

Çözücü buharlaştırma yönteminde, polimer ve etken madde organik çözücüde çözündürülür ve sulu fazda çözündürülen süspansiyon ajanının ilavesi ile homojenize edilir. Hazırlanan su/yağ emülsiyonundan çözücünün buharlaştırılarak uzaklaştırılması sonucu elde edilen partiküller santrifügasyon yöntemi ile ayrılır (Aral *et al.* 2000; Mansouri *et al.* 2006).

Çok katlı emülsiyon yönteminde ise üç aşamalı bir emülsifikasyon zinciri vardır. Birinci aşamada sulu fazda çözündürülmüş etken madde çözeltisi ile yağ fazı, emülsiyon stabilizörleri kullanılarak su/yağ emülsiyonu hazırlanır. İkinci aşamada hazırlanan su/yağ emülsiyonuna polimer çözeltisi ilave edilir. Son aşamada ise çözücü düşük basınç altında ortamdan uzaklaştırılır ve partiküller ayrılır (Aral *et al.* 2000; Akbuğa *et al.* 2002; De Smedt *et al.* 2000; Mansouri *et al.* 2006).

2.10. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nanopartiküller, uzun etkili farmasötik form olarak veya lipozomlar gibi, hedef hücrelere ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler. Çapları 1 - 500 nm arasında değiştiğinden ve vücuttaki en küçük kapıların çapı 4 µm dolaylarında olduğundan,

herhangi bir emboli riski olmaksızın parenteral olarak uygulanabilirler. Parenteral amaçla kullanılacak nanopartiküller, filtrasyon, otoklavlama veya γ -radyasyonu ile sterilizasyon yöntemi kullanılarak steril edilebilirler. Nanopartikül formülasyonları, parenteral uygulama dışında oral, transdermal ve oküler olarak da uygulanabilmektedirler (Akbuğa 1995; Kaş 1997; Cui and Mumper 2001).

Nanopartiküllerden etken madde salımı, polimer degradasyonu yolu ile meydana gelir. Polimer yüzeyinde meydana gelen bu degradasyon fiziksel, kimyasal veya enzimatik olabilir.

2.11. Nanokitosan

Nanokitosan, Kitosan biyopolimerinin en önemli türevlerindendir. Bu nanopartiküller morfolojik olarak, beyaz ve yuvarlak ve pürüzsüzdür ve hazırlama yönetimi çok basit bir yöntemdir. Nanokitosan farklı yöntemlerle sentezlenip çalışmaların amaçlarına yönelik hazırlanmaktadır.

Kitin çoğu çözücülerde çözülmez ve kitosan ise pH 6.5'dan daha düşük pH değerlerinde organik asidik çözeltiler içinde (formik, asetik, tartarik) çözülebilir buna karşın kitosan, kitosan nanopartiküllere dönüştürüldüğünde çözülme özelliğine sahip olacaktır. Trimetil nanokitosan suda çözünmeyen ilaçlar için kullanılmaktadır. Bu nanopartiküller biyoyararlanımlılık ve düşük toksisite, özelliğine sahiptir. Kitosan nanopartiküller, kitosan solüsyonunun gibi tripolifosfat (TPP) ve polianyon, dahil sürekli karıştırma koşulu altında oluşur. Bu nanopartiküller sonra toplanır ve hedef özgül ilaç uygulamalarında ve gen terapisinde kullanılmaktadır (Guerra *et al.* 2009; Stamford *et al.* 2013; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014).

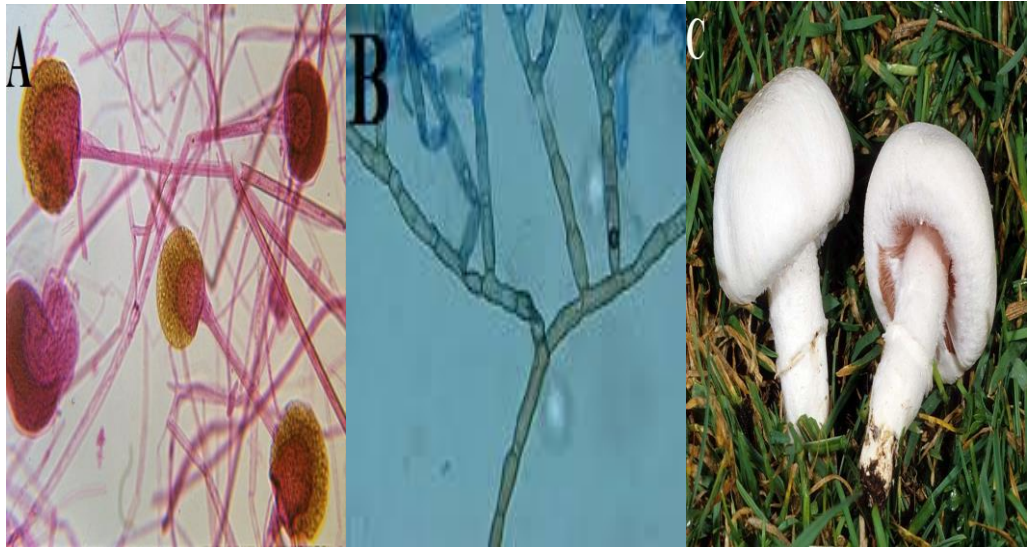
2.12. Nanokitosanın Uygulama Alanları

- 1- Antibakteriyel maddeler olarak, gen transferi ve protein ve ilaçların yayımı için taşıyıcı.
- 2- Potansiyeli yardımcı madde olarak aşılarda, örneğin grip, hepatit B ve domuz yavrusu paratifüs de kullanılır.
- 3- Aşılar için verimli bir dağıtım sistemi olarak kullanılır. Bu nanopartiküller mukozal lenfoid dokular tarafından antijen alımını artırmak ve antijenlere karşı kuvvetli bir bağışıklık karşılıkları artırır.
- 4- Kitosan yara iyileşmesi hızlandırmak için, yaraların deri hücrelerinin büyümesini geliştirmek ile ve enfeksiyonun önlenmesi ile kanıtlanmıştır.
- 5- Kitosan nanopartiküller koruyucu amaçlar için besinleri ambalajlamak ve diş hekimliğinde diş çürüğü ortadan kaldırmak için kullanılabilir.
- 6- Sağlık hizmeti ve diğer tekstil profesyoneller için giyim üretiminde antimikrobiyal bir katkı maddesi olarak kullanılabilir.
- 7- Kitosan nanopartiküller *Staphylococcus saprophyticus* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite etkisi gösterir.
- 8- Nanopartiküller malzemeleri laboratuvarında cilt hücresi için kanıtlanmıştır ve fibroblastlar ve keratinositler üzerinde testleri cilt rejeneratif özellikleri göstermiştir (Suna 2006; Guerra *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010; Chatterjee and Guha 2014).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada, biyokütle oluşturma niteliği yüksek ve çeşitli materyaller üzerinde bozucu olarak bulunan 2 küf mantarı (*Rhizopus* sp. ve *Rhizoctonia* sp.) izole edilerek ve ticari olarak satılan kültür mantarı türü olan *Agaricus bisporus* kullanılmıştır. Fungal örneklerin izolasyonu için gereken genel ve özel besiyerleri, izole edilen örneklerden kitin izolasyonu, kitosan-nanokitosan eldesi ve karakterizasyonu işlemlerinde kimyasallar ve sarf malzemeleri kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A- *Rhizopus* sp.; B- *Rhizoctonia* sp.; C- *Agaricus bisporus* resimleri (Macleod et al. 2008; Koyyalamudi et al. 2009; Abe et al. 2010).

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullandığım alet ve cihazlar:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
 Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
 Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)
 Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
 Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
 Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
 pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
 Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)
 Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)
 Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
 Su Banyosu (Mettmert WNB14, GERMANY)
 Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
 Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
 Santrifüj (Beckman Culture - Allegra 64R, U.S.A.)
 Spektrofotometre (IR) (Perkin-Elmer, Llantrisant, U.K.)
 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss EVO LS 10, GERMANY)

3.2. Yöntem

Bu çalışmada nanokitosan elde edilmesi için üç tür mantar incelenmiştir ve yöntemler, mantarların kitosan polimerlerinin çıkarımı, kitosan karakteristikleri belirlenmesi, kitosanın verim, kül içeriği ve deasetilasyon derecesi hesaplanması aşağıdaki sırasayla yapılmıştır.

3.2.1. Mantar izolatlarının elde edilmesi

Bozulan materyaller üzerinden izole edilen çeşitli küfler saflaştırılarak çalışmalar için geliştirilmiştir. Özellikle yoğun bir şekilde biyokütle oluşturan örnekler ile çalışmalar başlatılmıştır. İzolasyonların eldesinde Patato Glucose Agar kullanılmış, geliştirmek için ise Sabroud's Dexrose Broth kullanılmıştır.

3.2.2. Küf mantarın hazırlanması

Bu çalışmada Küf mantarlardan *Rhizopus* sp. ve *Rhizoctonia* sp. bozulan gıda ve çürüyen bitki kalıntıları üzerinden saflaştırılmış ve morfolojik veriler kullanılarak cins seviyesinde tanıları yapılmıştır. Elde edilen saf kültürler sıvı besiyerlerinde yoğun olarak geliştirilmiştir.

3.2.3. Şapkalı mantarın hazırlanması

Çalışmanın özellikle yöntem optimizasyonu için kullanılan şapkalı mantar (*Agaricus bisporus*) Erzurum sebze ve meyve mağazalarından alınmış ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarında Doç. Dr. Özlem BARIŞ tarafından türü teyit edilmiştir. Çalışmada kullanılan mantarlar verimi arttırmak için iyice öğütülerek işlemlere devam edilmiştir.

3.2.4. Biyokütlenin elde edilmesi

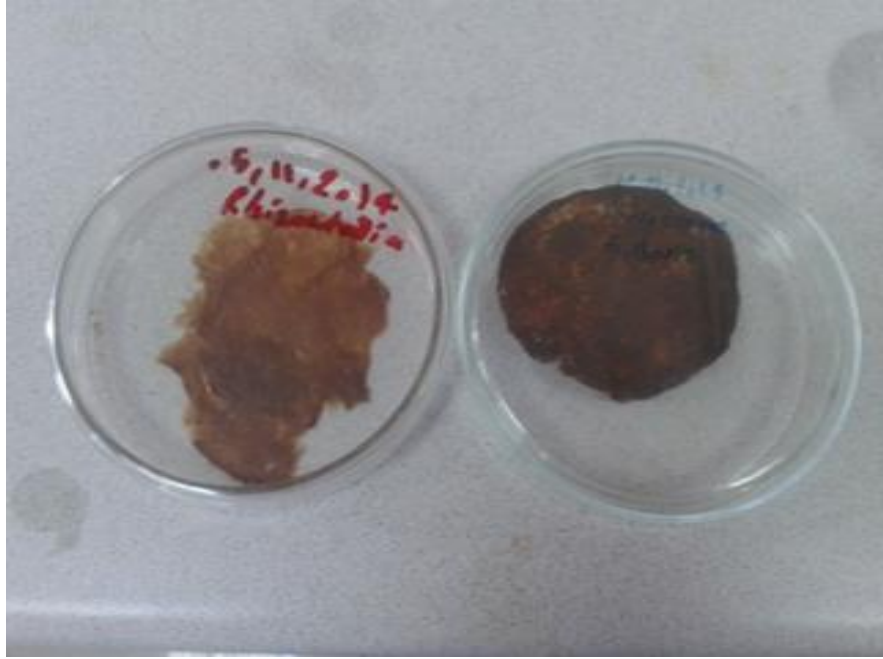
165 rpm çalkalamada ve oda ısısında geliştirilen biyokütle filtre kağıtlarından vakum yardımı ile süzülerek alınmış, steril su ile yıkandıktan sonra etüvde kurutulmuştur. Elde edilen biyokütle verimi arttırmak için öğütülmüş ve diğer uygulamalar için hazır hale getirilerek verim hesapları için tartıldıktan sonra oda ısısında muhafaza edilmiştir (Cardoso *et al.*2012; Asachi and Karimi 2013), (Şekil 3.1 - 5).



Şekil 3.2. Örneklerin çoğaltılmasında kullanılan çalkalamalı ve normal inkübatörler



Şekil 3.3. Filtrasyon işlemleri ve filtre edilmiş biyokütle örnekler



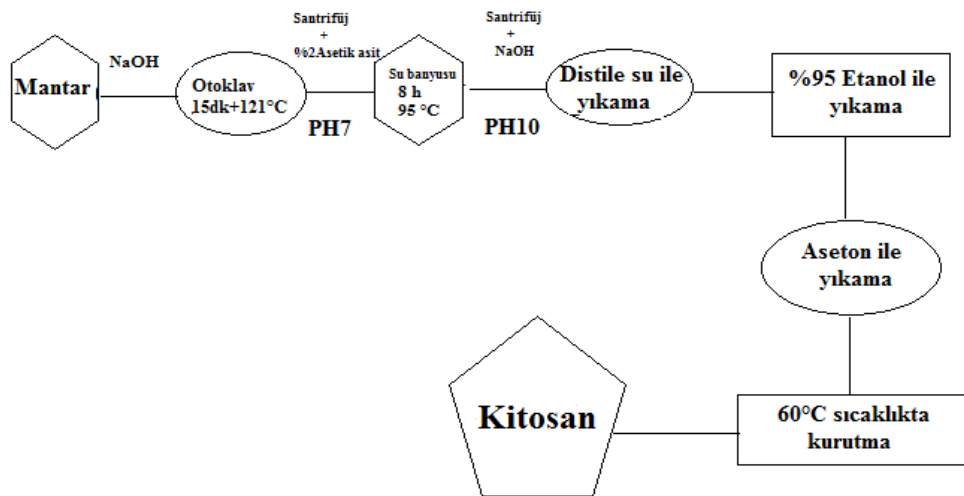
Şekil 3.4. Kurutulmuş biyokütle örnekleri



Şekil 3.5. Kurutulan biyokütlenin öğütülmesi ve kullanılan öğütücü

3.2.5. Kitosan eldesi (Deasetilasyon işlemleri)

Kurutulup öğütülen biyokütleden, kitosan ekstraksiyonu Rane ve Hoover, ile Crestini ve arkadaşlarının kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. (Rane and Hoover 1993b; Crestini *et al.* 1996). Bu yöntemde göre mantar miselleri ve kuru maya hücreleri, öğütülmüş ve 1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile süspansiyon haline getirilmiş ve 15 dakika 121°C'de otoklavda inkübe edilmiştir. Otoklavdan sonra süspansiyon 12.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve alkali ortamda çözünmeyen bileşenler toplanmıştır. Daha sonra distile su ile yıkanmış ve HCl ve NaOH kullanılarak çözelti nötral pH'ya (7.0'a) ayarlanmıştır. Bu işlemde sonra tekrar santrifüjlenmiş ve %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde (1:40 w/v) 8 saat boyunca 95°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosunda gerçekleşen inkübasyondan sonra 12.000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş, asidik ortamda çözülmeyen kısım atılmış ve geri kalan bulamaç toplanarak 2 M NaOH kullanılarak, pH 10'a ayarlanmıştır. Elde edilen yeni süspansiyon tekrar 12.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Böylece çöken kitosan, önce distile su ile yıkanmış, tekrar santrifüj edilmiş ve %95 etanol (1: 20 w/v) ile tekrar yıkama işlemi sonrası santrifüjlenmiştir. Son olarak aseton (1: 20 w/v), ile yıkama işlemi ve santrifüj yapılarak 60°C sıcaklıktaki inkübatöre yerleştirilmiş ve kurutulmuştur. Elde edilen kuru madde karakterizasyon işlemlerine kadar kuru ve serin ortamda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.6. Kitosan sentez aşamaları

3.2.6. Kitosanın verimi belirlenmesi

Kitosanın yüzde verimi belirlenmesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Üretilen kitosanın yüzdesi} = \frac{\text{Üretilmiş kitosan ağırlığı}}{\text{Primer materyal ağırlığı}} \times 100$$

3.2.7. Kitosanın minerallerinin belirlenmesi

Kitosan örneklerinin mineral özelliklerini ölçmek için, 4 mg örnek havan içine öğütülmüş ve 550°C'deki bir fırında 4 saat boyunca yakılmış ve elde edilen külün, birincil ve ikincil numuneler arasındaki ağırlık farkı alınarak hesaplanmıştır (Chen *et al.* 1998).

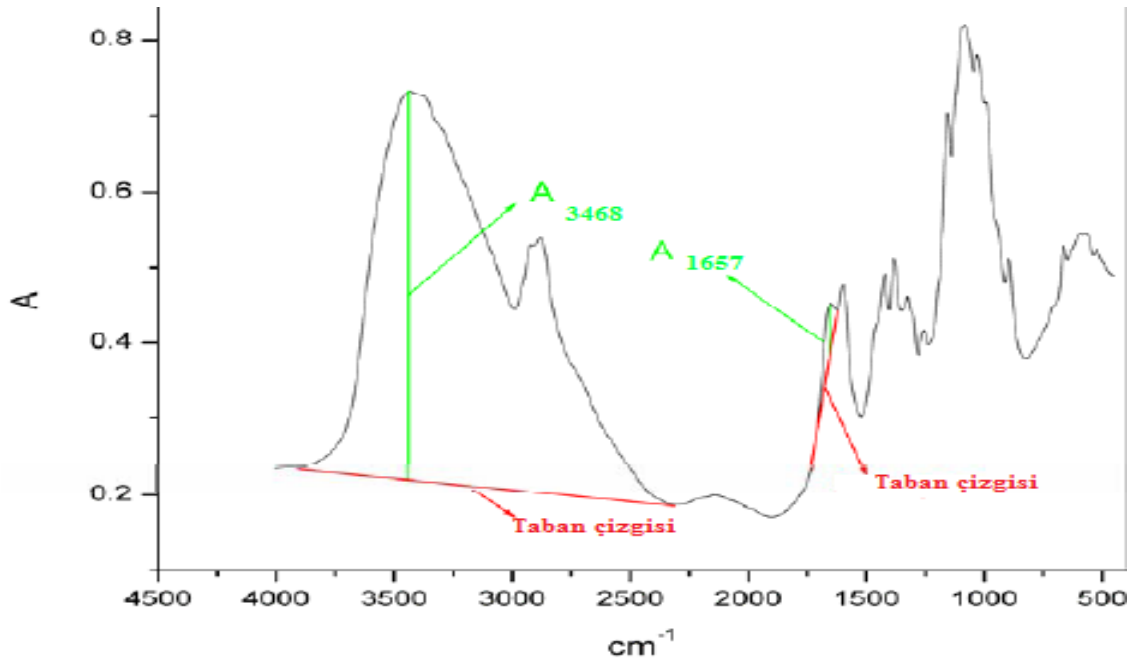
3.2.8. Kitosanın deasetilasyonunun belirlenmesi

Sentezlenmiş kitosanın deasetilasyon derecesi (DD), aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (Miya *et al.* 1980; Khan *et al.* 2002; Chatterjee *et al.* 2005).

$$DD = 100 - (A_{1657} / A_{3468}) \times 100 / 1.33$$

Genel olarak, Kitosan bantları 3000-3500 cm⁻¹ (NH bağı)'den 1400-1650 cm⁻¹ (C=O bağı) arasında görülmektedir (Chatterjee *et al.* 2005).

Bu çalışmada amid-I bandı absorbansı ve hidroksil grubu absorbansı hesaplanması için ana hatlar Şekil 3.2 gösterir. numunelerin deasetilasyon derecesi, taban çizgisi ve eşitliğini kullanarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.7. Kitosan FTIR spektrumu, Amid-I bandı absorbans ile hidroksil grubu absorbans hesaplanması için taban çizgileri.

3.2.9. Nanokitosan sentezi

Nanokitosan sentezi iki adımlı bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. İlk adımda kitosanın moleküler ağırlığının düşürülmesi için 2 gram kitosan, 100 mL; 0.1 M, hidroklorik asit (HCl) içinde çözülmüş, 30 dakika karıştırılmış ve %10'luk konsantrasyonda hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti 2 saat boyunca $60^\circ C$ 'de ısıtılarak karıştırılmış ve vakumda süzümüştür.

İkinci adımda 0.5 g düşük molekül ağırlıklı kitosan (LWCS), bir litre %2'lik asetik asit çözeltisi içinde çözülmüş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltiden 100 mL alınmış ve sodyum tripolifosfat (TPP, 0.5 g/L) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırıldıktan sonra da yüksek hızda santrifüj edilmiştir. En son olarak çökelti olarak elde edilen nanokitosan saf su ile yıkanmış, liyofilize edilmiş karakterizasyon işlemlerine kadar kuru ve serin ortamda muhafaza edilmiştir (Wu *et al.* 2005; Huang *et al.* 2008) (Şekil 3.7).



Şekil 3.8. Nanokitosan sentezinin çözeltisi

3.2.10. Elde edilen materyallerin karakterizasyon işlemleri

FTIR analizi: Kitosan ve Nanokitosan deasetilasyon derecesi belirlemek için Infrared Spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. Numuneler vakumla 48 saat boyunca 55°C kurutuldu ve 2 mg numune, 198 mg kuru ve saf potasyum bromür (KBr) ile karıştırılmış ve ince bir diski (10mm çap) hazırlanmıştır. Diskler 48 saat süreyle 38°C’de bekletilmiş ve karakterize etmek için hazırlanmış disklerinin 600–6000 cm^{-1} ve 400–4000 cm^{-1} dalga boyları arasında spektrumu alınmıştır. FTIR analizi Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında (Perkin-Elmer, Llantrisant, UK) ile yapılmıştır (Şekil 3.8 -10).



Şekil 3.9. FTIR analizi için disk hazırlamada kullanılan pres



Şekil 3.10. Kitosandan hazırlanan ince diskler (10mm çap)



Şekil 3.11. FTIR analizi için kullanılan cihaz (Perkin-Elmer, Llantrisant, UK).

SEM analizi: Kitosan ve Nanokitosan yüzey karakterizasyonu ve farklılıkları incelemek için Zeiss EVO LS 10 mikroskop tekniğine uygun olarak vakum altında palladyum-altınla kaplanması suretiyle değişik büyütmelerde Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.12. SEM cihazı (Zeiss EVO LS 10 instrument microscope)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Agaricus bisporus*'dan Kitosan Eldesi

Laboratuvara getirilen kültür mantarları temizlenip tartılarak işleme başlanmıştır. 1 kg hazırlanan taze mantar örneği iyice doğrandıktan sonra blander ile daha küçük parçalara ayrılmıştır. Diğer çalışma türlerinden farklı olarak sadece *A. bisporus*'da kurutulmamış örnek ile çalışılmıştır. 1 kg homojenize edilen örnekler diğer örneklerden farklı olarak yoğun miktarda (~%95) su içermesi nedeniyle 2 M NaOH ile muamele edilmiştir. Yapılan diğer işlemlerde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Tüm işlem basamakları sonucunda *A. bisporus*'un kitosan verimi 27,2 mg/g olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1).



Sekil 4.1. *Agaricus bisporus*'dan elde edilen kitosan

Bu mantarda maksimum kitosan, aşağıdaki formüle göre:

$$\text{Üretilen kitosanın yüzdesi} = \frac{\text{Üretilmiş kitosan ağırlığı}}{\text{Primer materyal ağırlığı}} \times 100$$

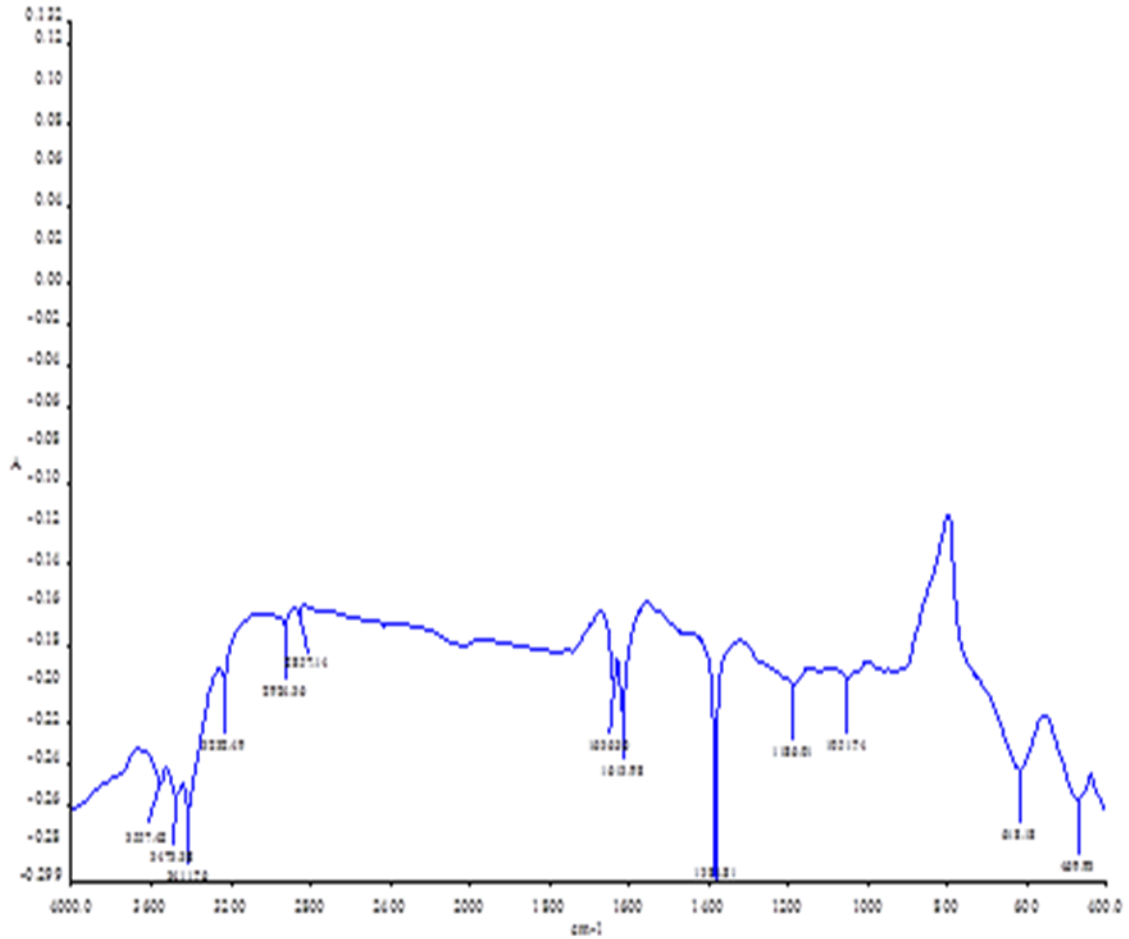
%21 verim kuru miselyumun içinde hesaplanmıştır. Kitosan örneklerinin mineralleri özelliklerini ölçmek için, 4 mg örnek havan içine öğütülerek 550°C'deki bir fırında 4 saat boyunca yakıldıktan sonra kül içeriği birincil ve ikincil numuneler arasındaki ağırlık farkına göre %27 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, maddelerin ayrılmasından sonra ticari kitosandan daha yüksek bir saflığa sahip olduğunu göstermektedir. Böyle bir durumlarda yeterli miktarda karıştırma işlemi ve malzemeleri uygun şekilde yıkama önemli arz etmektedir.

Kitosanın kimyasal yapıları incelenmesi ve deasetilasyon derecesi belirlemek için Infrared Spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. Numuneler saf potasyum bromür (KBr) ile karıştırıldı ve ince bir disk (10mm çap) hazırlanmıştır (Şekil 4.2).

Karakterize etmek için hazırlanmış disklerinin 6000–600 cm⁻¹ dalga boyları arasında spektrumu alınmıştır. Sonuçlar, FTIR analizine göre, *A. bisporus* için kitosan deasetilasyon derecesin, %75 olduğunu göstermektedir. Şekil 4.2 dikkate alındığında 3200-3600 cm⁻¹ aralığı içinde geniş bir absorpsiyon bandı O–H titreşimi tensional ile gösterilmiştir. Kitosan FTIR spektrumundaki 2857, 1636, 1613, 1381 ve 1186 cm⁻¹ çevresindeki pikler, sırasıyla bir alifatik C–H, amide I (NH deformasyonu–NHCOCH₃), amid II, amide III ve C–O C, titreşimi tensional bağlar ile kaynaklanmaktadır. Genel olarak, kitosanın varlığı 3000-3500 cm⁻¹ (NH bağı) ile 1400- 1650 cm⁻¹ (C=O bağı) bantlar arasındaki piklerde görünmektedir.

Yukarıda da belirtildiği gibi üretilen kitosan deasetilasyon derecesi %75'tir. Kitosan üretiminde %100 deasetilasyon derecesi nadirdir. Bu nedenle, yaygın olarak ticari kitosan %75-85 aralığındaki çeşitli deasetilasyon derecesi kullanılmaktadır.

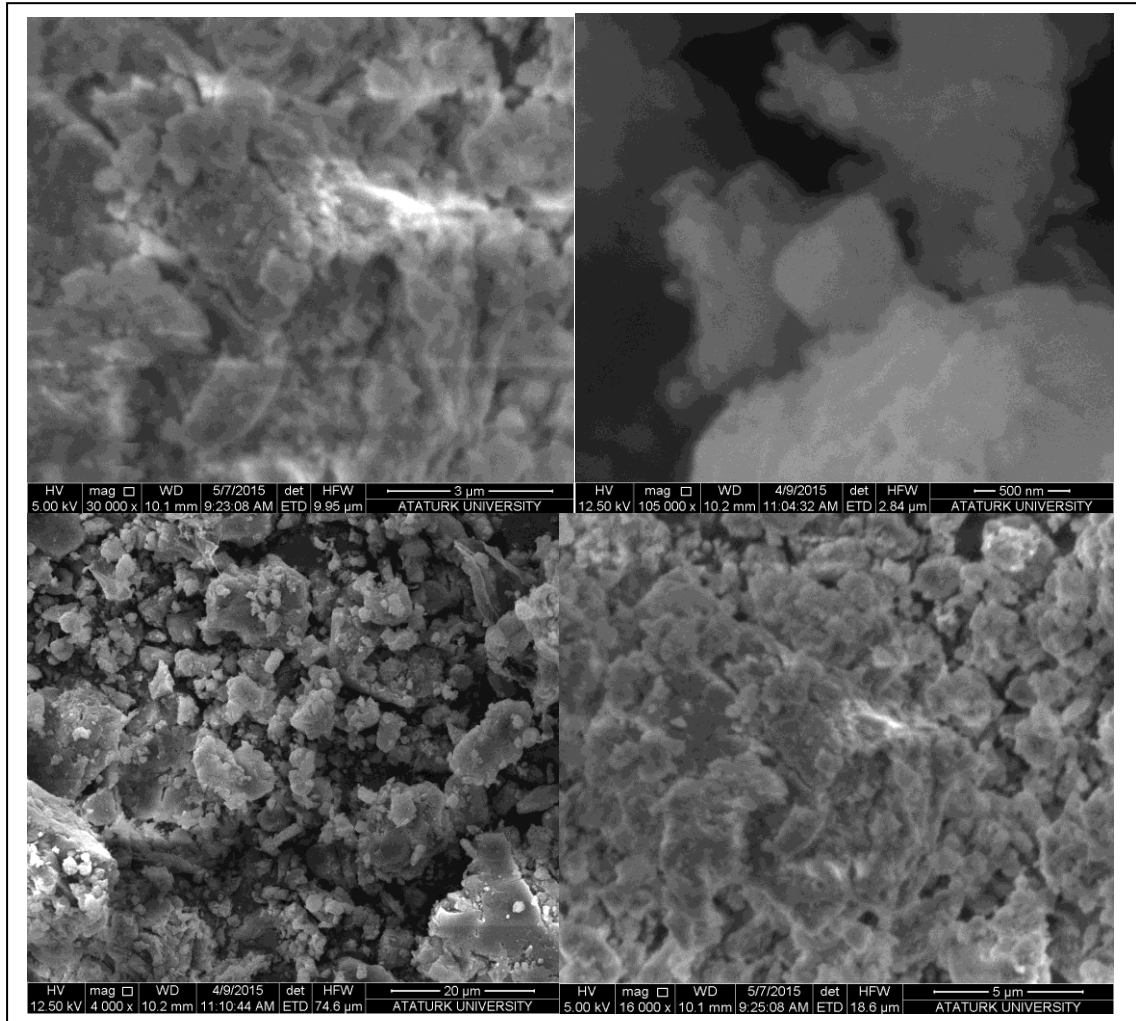
FTIR analizi Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında bulunan spektrometre (Perkin-Elmer, Llantrisant, UK) ile yapılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Agaricus bisporus*'dan izole edilen kitosanın FTIR spektrumu

Kitosan, paladyum-altınla kaplanarak SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.3'de kitosanın morfolojisine göre pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğunu göstermektedir. Kitosan katalog bilgilerine göre 154 mikron boyutundadır. Kitosanın SEM görüntüsü alındığında 150 mikron boyutunda yapraklar görülmüş ve kitosan yüzey morfolojisinin diğer önemli özelliği olarak amorf yapısı gözlemlenmiştir.

SEM analizi Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında Zeiss EVO LS 10 mikroskop ile tekniğine uygun olarak vakum altında alınmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Agaricus bisporus*'dan izole edilen kitosanın tarama elektron mikroskop fotoğrafları

4.2. *Rhizopus* sp.'dan Kitosan Eldesi

Rhizopus cinsi, kozmopolitan ve filamentli bir mantar olarak, toprak veya çürüyen meyve, sebze, hayvan dışkı ve gıdalarda bulunmaktadır.

Bu çalışmada *Rhizopus* sp. bozulan gıda materyalleri üzerinden izole edilmiş ve saflaştırılarak cins seviyesinde tanımlanmış ve kullanılmıştır. Özellikle yoğun bir şekilde biyokütle oluşturan örnekler ile çalışmalar yürütülmüştür. İzolasyonların eldesinde Patato Glucose Agar kullanılmış, geliştirmek için ise Sabroud's Dexrose Broth kullanılmaktadır. 165 rpm çalkalamada ve oda ısısında geliştirilen biyokütle filtre kağıtları yardımı ile süzülerek, steril su ile yıkandıktan sonra etüvde kurutulmuştur. Elde edilen biyokütleden kitin/kitosan verimini arttırmak için öğütülerek sodyum hidroksit uygulamaları, santrifüjleme ve saf su yıkamaları yapılarak kurutulmuştur. Kitosan polimerlerinin ekstraksiyonu, karakteristikleri belirlenmesi, verimi, kül içeriği ve deasetilasyon derecesi ilgili çalışmalar yapılmıştır (Şakil 4.4).



Şakil 4.4. Kurutulmuş ve öğütülmüş örnek (*Rhizopus* sp.)



Şekil 4.5. İşlemler sonunda *Rhizopus* sp.'den elde edilen kitosan

Rhizopus sp., mantarın kitosan ekstrakt miktarları 1.32 g elde edilmiştir (Şekil 4.5).

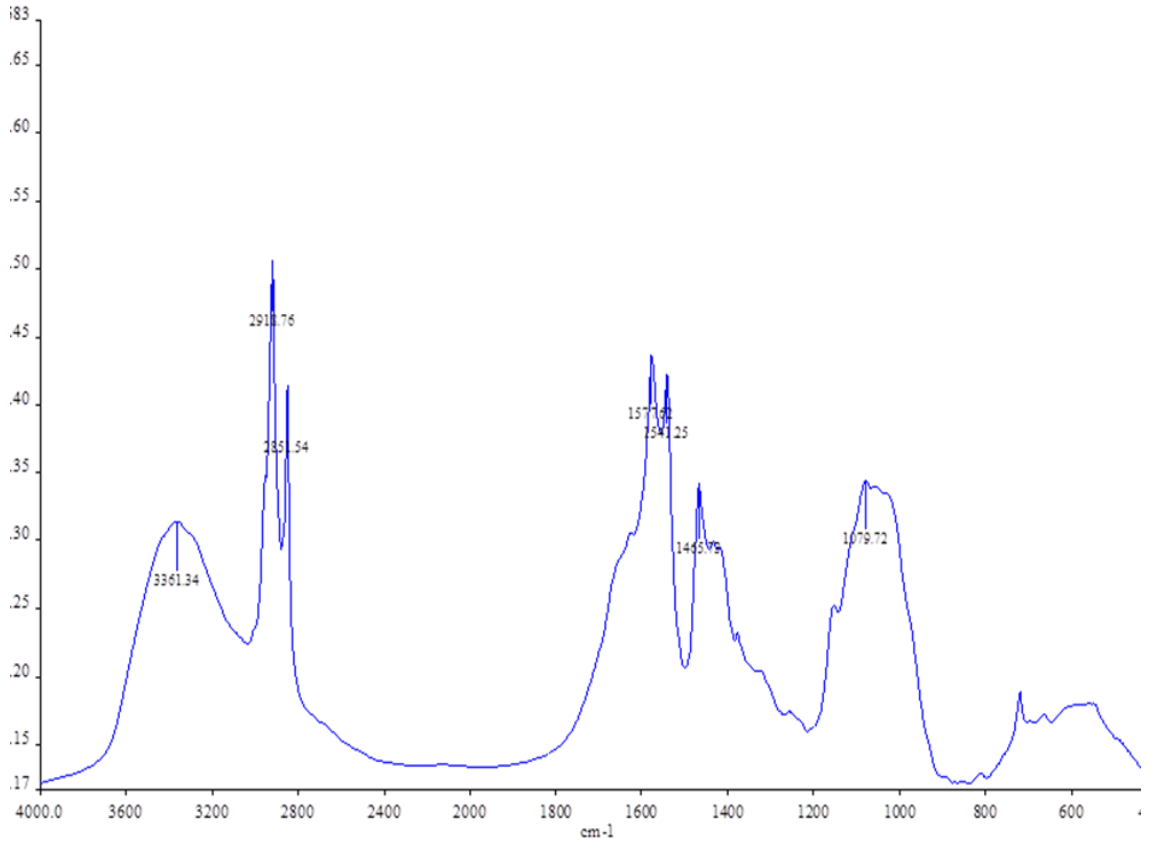
Bu mantarda maksimum kitosan, aşağıdaki formüle göre:

$$\text{Üretilen kitosanın yüzdesi} = \frac{\text{Üretilmiş kitosan ağırlığı}}{\text{Primer materyal ağırlığı}} \times 100$$

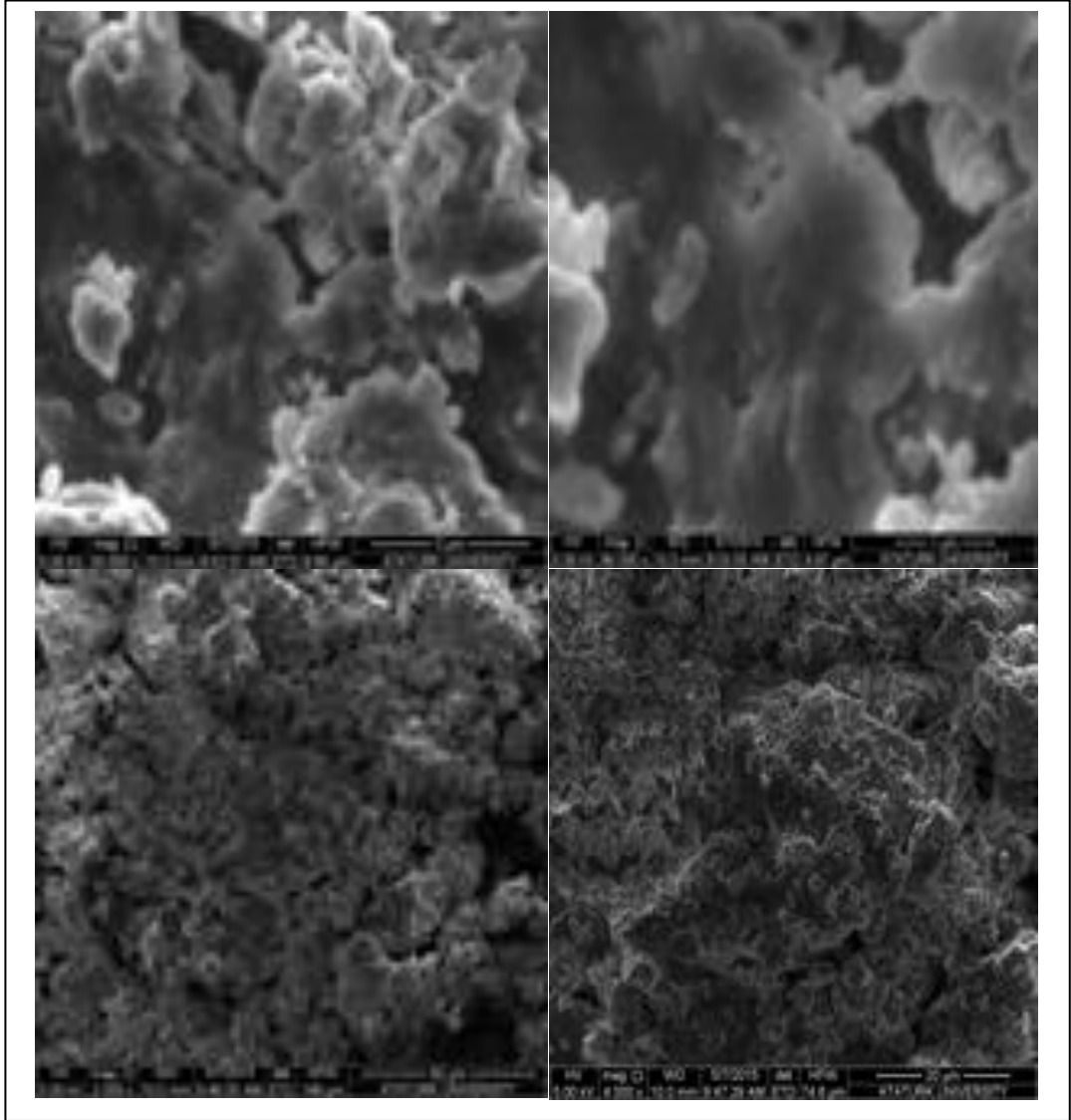
%10.07 verim kuru miselyumun içinde hesaplanmıştır. Kitosan örneklerinin mineralleri özelliklerini ölçmek için, 4 mg örnek havan içine öğütülerek 550°C'deki bir fırında 4 saat boyunca yakılmış ve sonra kül içeriği birincil ve ikincil numuneler arasındaki ağırlık farkına göre %19 olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar, FTIR analizine göre, *Rhizopus* sp.'den elde edilen kitosan deasetilasyon derecesinin %74 olduğunu göstermektedir. Şakıl 4.6 dikkate alındığında 3200-3600 cm⁻¹ aralığı içinde geniş bir absorpsiyon bandı O–H titreşimi tensional ile ilgilidir (Şekil 4.6). FTIR spektrumundaki 1649, 1577, 1541 cm⁻¹ çevresindeki pikler, kitosanin amide gruplarına aittir.

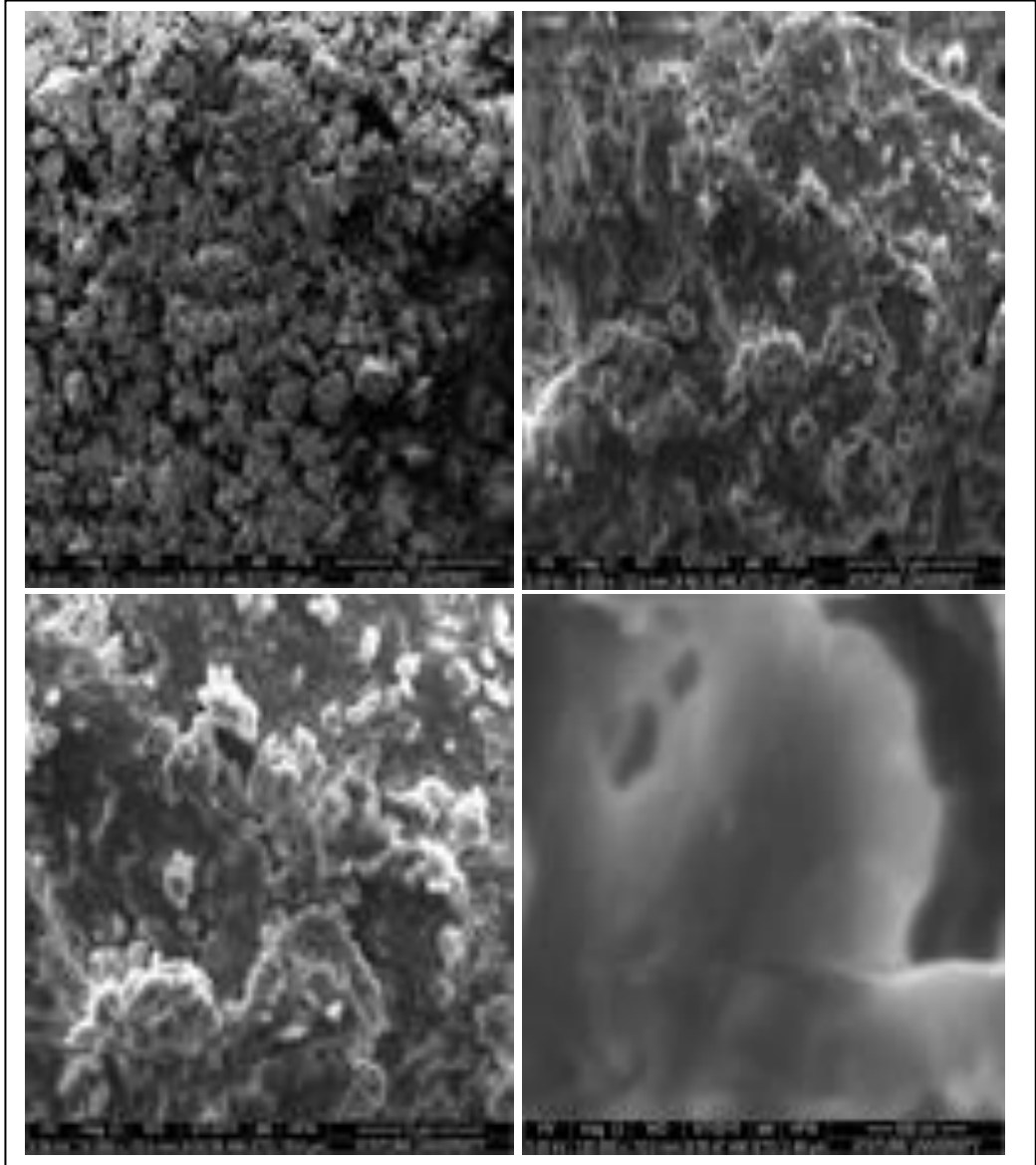
Kitosan, paladyum-altınla kaplanarak SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.7'de kitosanın morfolojisine bazı bölgelerinde yassı ve bazı bölgelerinde parça parça bir yüzey sahip olduğu görülmüş ve kitosan yüzey morfolojisinin diğer önemli özelliği olarak amorf yapısı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. *Rhizopus* sp.'dan elde edilen kitosanın FTIR spektrumu



Şekil 4.7. *Rhizopus* sp.'dan elde edilen kitosanın SEM görüntüleri



Şekil 4.7. (devam)

4.3. *Rhizoctonia* sp.'dan Kitosan Eldesi

Rhizoctonia sp. dünya çapında yaygın olan bitki patojeni bir mantardır. Genel olarak çökerten, kök ve kökboğazı çürüklüğü, yaprak ve gövde yanıklığına neden olmaktadır ve başlıca konukçuları patates, karanfil, vb. gibi kültür bitkileridir (Carling *et al.* 1994).

Yıllarca organik materyalde miselyum olarak, toprakta ise sklerot olarak canlı kalabilmesi nedeniyle mücadelesinde zorluklar yaşanmaktadır (Boosalis and Scharen 1959).

Bu çalışmada *Rhizoctonia* sp. mantarını elde etmek için bozulan bitkisel materyaller üzerinden saflaştırmalar yapılmıştır. Özellikle yoğun bir şekilde biyokütle oluşturan örnekler ile çalışmalar başlatılmıştır. İzolasyon, geliştirme ve diğer işlem basamakları *Rhizopus* sp.'de uygulanan prosedür ile aynıdır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kurutulmuş ve öğütülmüş örnek (*Rhizoctonia* sp.)



Şekil 4.9. İşlemler sonunda *Rhizoctonia* sp.'den elde edilen kitosan numunesi

Rhizoctonia sp. mantarının kitosan ekstrakt miktarları 1.52 g elde edilmiştir (Şekil 4.9).

Bu mantarda maksimum kitosan, aşağıdaki formüle göre:

$$\text{Üretilen kitosanın yüzdesi} = \frac{\text{Üretilmiş kitosan ağırlığı}}{\text{Primer materyal ağırlığı}} \times 100$$

%25.50 verimi kuru miselyumun içinde hesaplanmıştır. Kitosan örneklerinin mineralleri özelliklerini ölçmek için, 4 mg örnek havan içine öğütülerek 550°C'deki bir fırında 4 saat boyunca yakılmış ve sonra kül içeriği birincil ve ikincil numuneler arasındaki ağırlık farkına göre %17 olarak hesaplanmıştır.

Kitosanın kimyasal yapıları incelenmesi ve deasetilasyon derecesi belirlemek için Infrared Spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. Numuneler saf potasyum bromür (KBr) ile karıştırılmış ve ince bir diski (10mm çap) hazırlanmıştır. karakterize etmek için hazırlanmış disklerinin 400–4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında spektrumu alınmıştır (Şakıl 4.10).

Sonuçlar, FTIR analizine göre ve aşağıdaki formüle göre

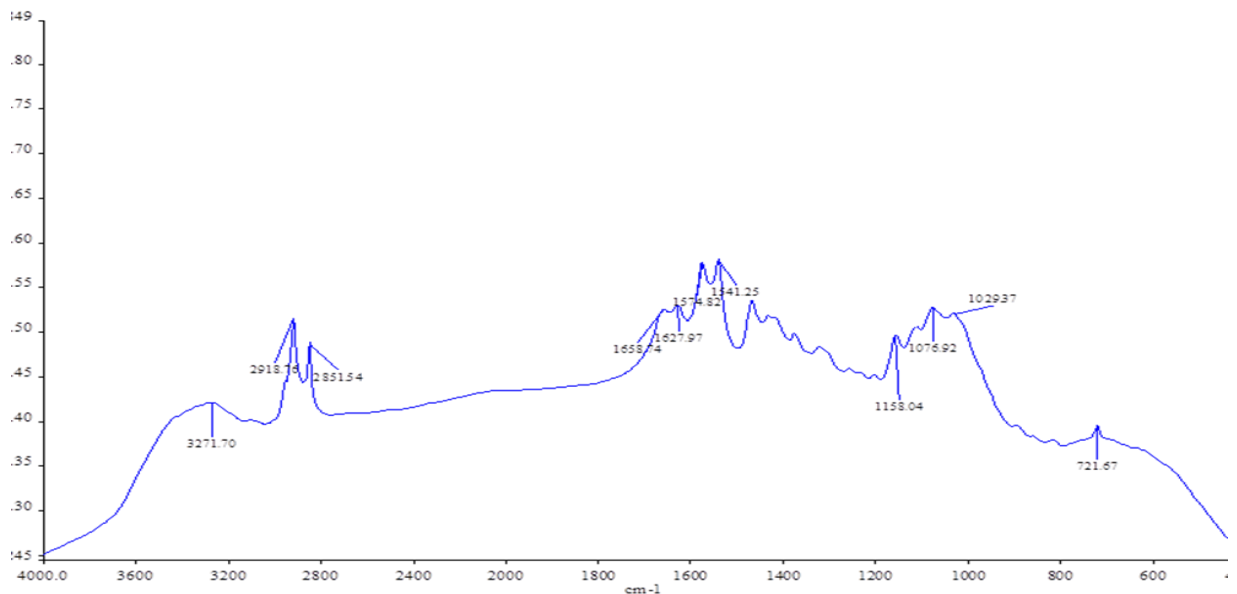
$$DD = 100 - (A_{1657} / A_{3468}) \times 100 / 1.33$$

Rhizoctonia sp, Kitosan deasetilasyon derecesi, %74 olduğunu göstermektedir. Şekil 4.10 dikkate alındığında 3200-3600 cm⁻¹ aralığı içinde geniş bir absorpsiyon bandı O–H titreşimi tensional ile ilgilidir.

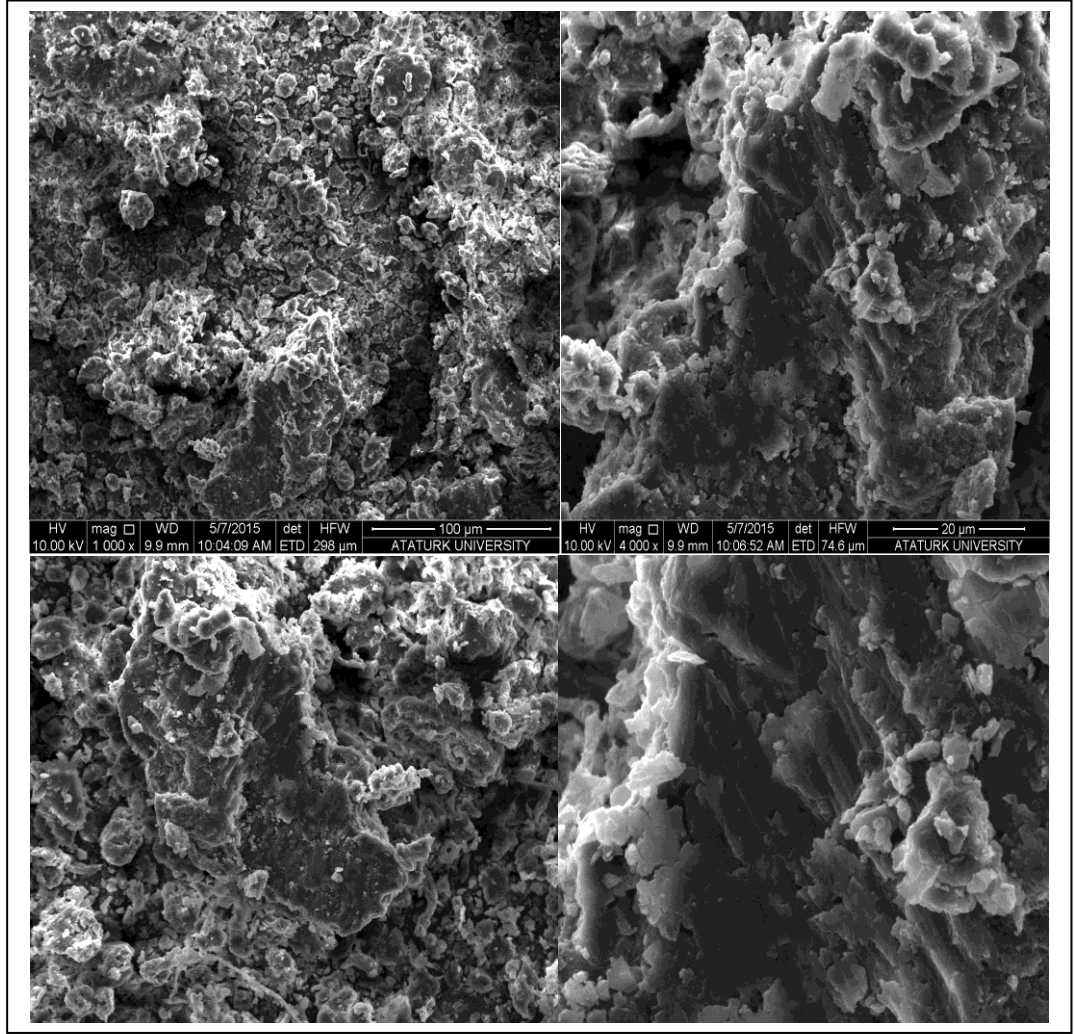
FTIR spektrumundaki 1658, 1627, 1574 cm⁻¹ çevresindeki pikler, kitosanın amide gruplarına aittir ve 3271 cm⁻¹'de -OH piki olarak saptamıştır.

FTIR analizi Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında bulunan spektrometre (Perkin-Elmer, Llantrisant, UK) ile yapılmıştır (Şekil 4.10).

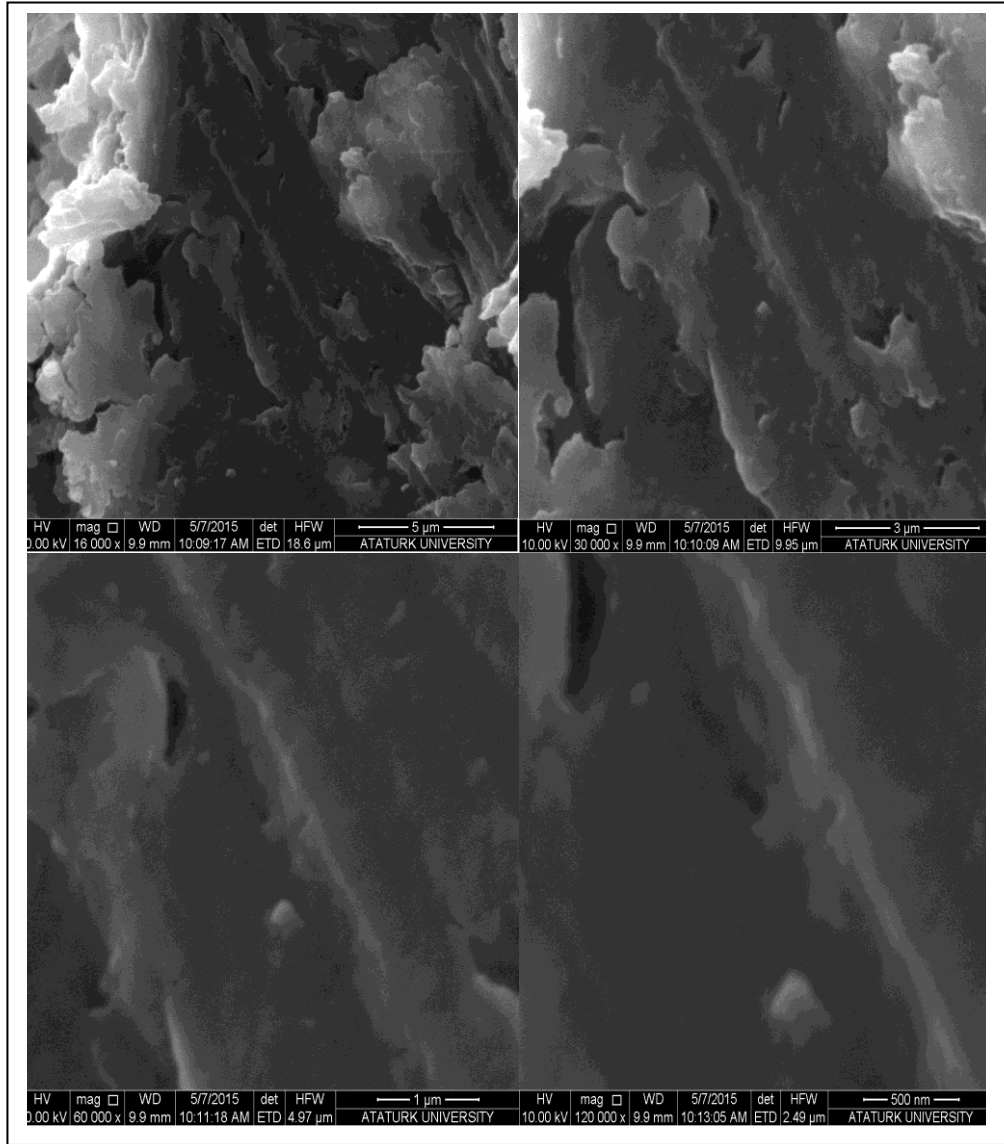
Kitosan, paladyum - altınla kaplanarak SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.11'den kitosanın morfolojisi çok düzgün bir yüzey sahiptir ancak bazı bölgelerinde pürüzlü bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. *Rhizoctonia* sp.'dan elde edilen kitosanın FTIR spektrumu



Şekil 4.11. *Rhizoctonia* sp.'dan elde edilen kitosanın SEM görüntüleri



Şekil 4.11. (devam)

4.4. Nanokitosan sentezi

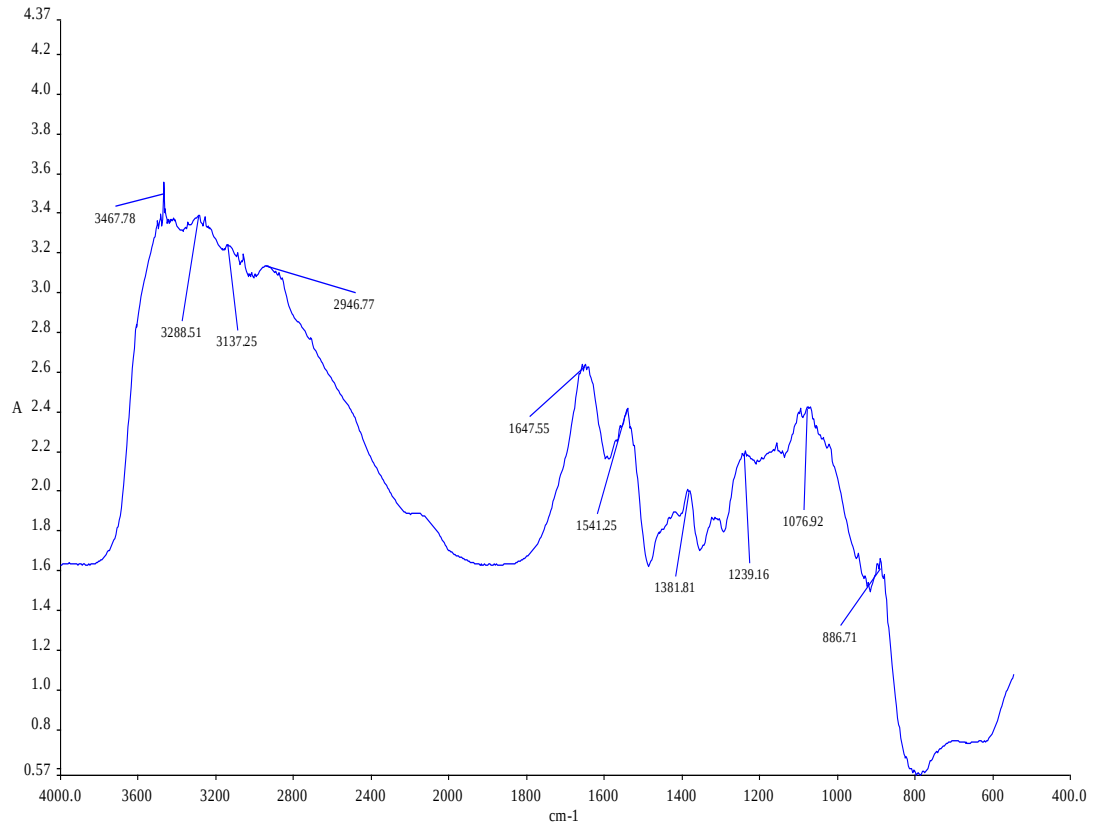
Nanokitosan sentezinde mantarlardan elde edilen kitosan kullanılarak işlemler tamamlanmış ve elde edilen malzemenin karakterizasyonu için FTIR analizi ve SEM analizleri kullanılmıştır.

Sonuçlar, FTIR analizine göre, elde edilen numunelerin deasetilasyon derecesi, aşağıdaki formüle göre %75 olduğunu göstermektedir.

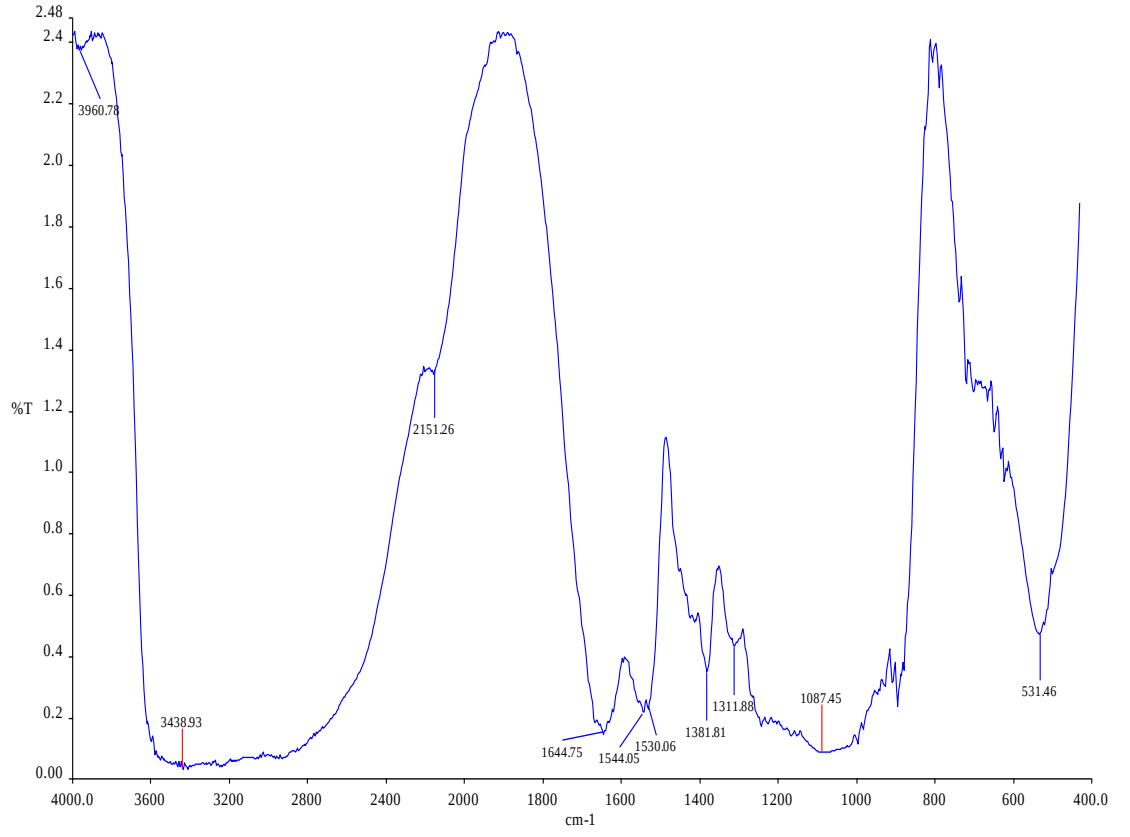
$$DD = 100 - (A_{1657} / A_{3468}) \times 100 / 1.33$$

Şekil 4. 12 dikkate alındığında 3288 - 3500 cm⁻¹ aralığı içinde geniş bir absorpsiyon bandı -O-H titreşimi tensional ile ilgilidir. 2946, 1647, 1541, 1381 ve 1239 cm⁻¹ çevresindeki pikler, sırasıyla bir alifatik C-H, Amide I (-NH deformasyonu-NHCOCH₃), Amide II, Amide III ve C-O C, titreşimi tensional bağlar ile kaynaklanmaktadır (Şekil 4.12 ve 4.13).

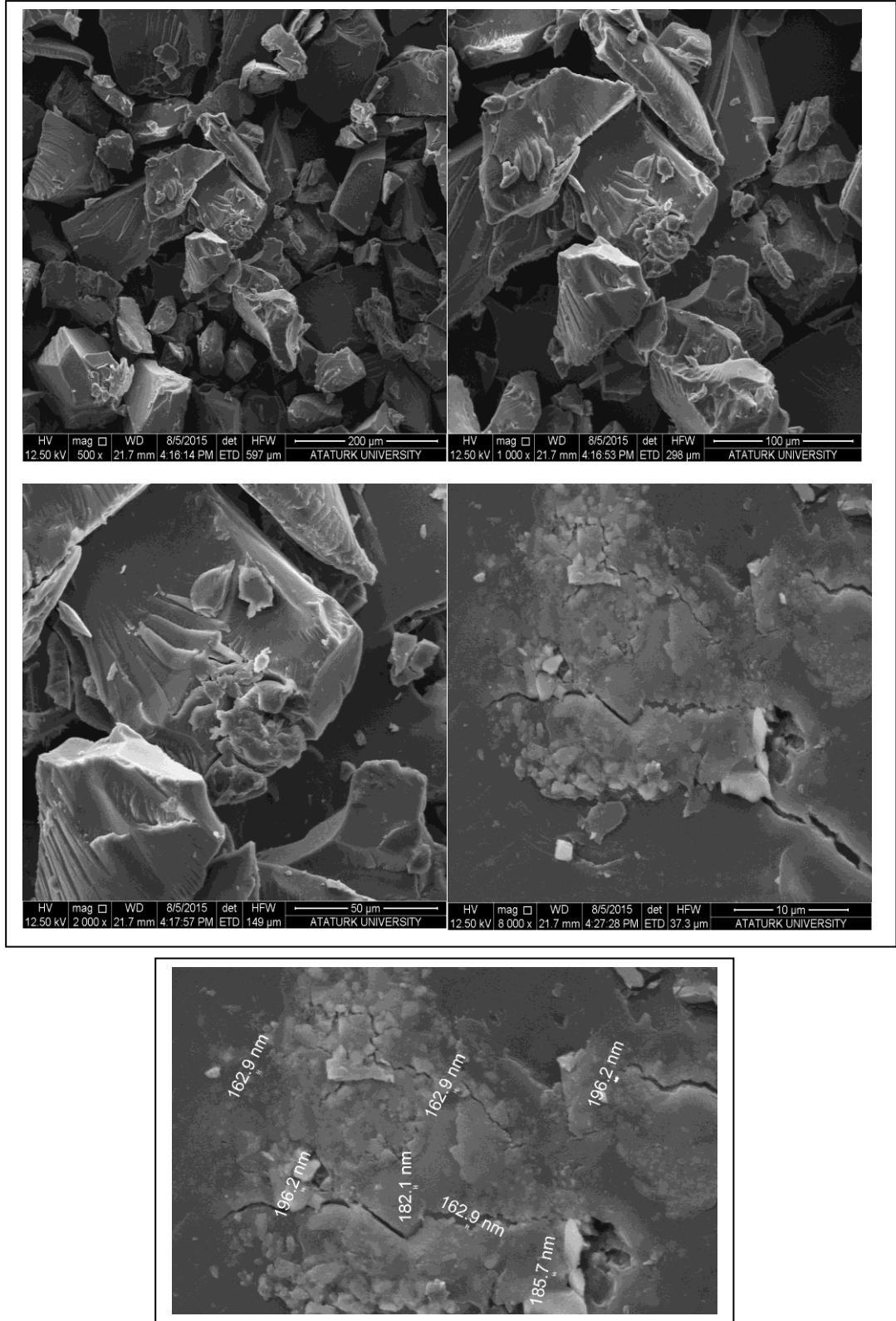
SEM incelemelerine göre; çalışılan yöntem ile istenilen özelliklerde, küresel kitosan nanopartiküller (Nanokitosan) elde edildiği belirlenmiştir. Şekil 4.14'de nanokitosanın morfolojisi ve boyutları gösterilmektedir. Aynı görüntü incelendiğinde bazı bölgelerin yassı ve bazı bölgelerin ise homojen olmayan bir yüzeye sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, nanokitosan partikülleri yassı bölgelerde 200 nm'den küçük olarak görünmektedir. Nanokitosanın büyüklüğüne bağlı olarak partiküllerin agregat oluşturma eğilimi nedeni ile taramalı elektron mikroskobu belirlenmesinde istenildiği gibi homojen bir görüntü alınmıştır ve yüzey özellikleri de tam olarak aydınlatılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. Mantarlardan'dan elde edilen nanokitosanın FTIR spektrumu (Absorbans)



Şekil 4.13. Mantarlardan'dan elde edilen nanokitosanın FTIR spektrumu (Transmisyon)



Şekil 4.14. Mantarlardan elde edilen nanokitosanın SEM görüntüleri (ölçeklendirme fotoğraflarda bulunmaktadır)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kitin bir biopolimer olarak $[\beta (1-4) \text{ bağılı N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukoz}]$ birimlerinden oluşmaktadır. Kitinin kimyasal yapısı selüloza oldukça yakındır. Selüloz ve kitinin arasındaki bu yapısal benzerliği yapısal ve savunma amacıyla canlılarda bol olarak bulunur. Bu biopolimer deniz kabuklular ve böceklerin kütiküllerinde bir ana oluşturuç olup ve mantar ve yosun hücre duvarlarının bir bileşenidir. Kitin, canlı organizmaların aleminde (hayvanlar ve bazı bitkiler) tarafından üretilen doğal bir polisakkarid biyopolimerdir. Yıllık üretimi ve biyosferdeki kararlı durum miktarı yaklaşık 10^{12} - 10^{14} kg'ı bulmaktadır (Pouliceck *et al.* 1998).

Literatür verilerine göre eklembacaklılar tarafından kitin üretimi, sucul ortamlarda yıllık toplamı sırasıyla, tatlısu ve deniz ekosistemleride 2.8×10^{10} kg ve 1.3×10^{12} kg / yıl olduğu tahmin edilmiştir (Cauchie 2002). Ticari olarak değerli kitin işlenerek yıllık sırasıyla tahmini 2000 ve 4000 ton kitosan ve glukozamin üretimi yapılmaktadır (Sandford 2003).

Kitin enzimatik ya da kimyasal olarak, daha esnek ve çözülebilir bir polimere, yani kitosana deasetile edilebilir. Ancak, deasetilasyon nadir olarak tam tamamlanarak yürütölmektedir; dolayısıyla kitosan polimer zinciri genellikle meydana gelen bir kopolimer yapısı olarak tarif edilir. Bazı araştırmacılara göre kitosan zincirin, D-glukozamin kalıntısı en az %60'a sahip olan bir polimerdir (Aiba 1992). Bununla birlikte, kitosan deasetilasyonu derecesi (DD) genellikle %80 üzerindedir (Wang *et al.* 2010).

Kitinin deasetilasyonu sonucu doğal materyalden elde edilen kitosan, (poli $[\beta-(1,4)$ -2-amino-2-deoksi-D-glukoz]), lineer bir polisakkarittir. Kimyasal olarak modifiye edilebilen reaktif amino ve hidroksil grupları içerir ve fiziksel olarak farklı gözenek yapıları vardır ve manipule edilebilir. Kitosan, kitin gibi fungusların hücre çeperinde

bulunur ve farklı olarak rastgele konumlanmış N-asetil-glikozamin ve D-glikozamin kalıntılarından oluşur.

Kitosanın biyolojik olarak yenilenebilir olması ve biyofonksiyonel, biyouyumlu, biyobozunur, nonantijenik, nontoksik özellikleri kitosanın ve bu polimeri kullanılarak elde edilen komplekslerin birçok alanlarda kullanılabilmesine (ilaç dağıtım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarda, yara örtü malzemesinde, vücut içinde lizozim ile parçalanması, makrofajları aktive eden oligomerlerin oluşması vb.) neden olur. Parçalanma, dermal dokuların önemli bir bileşeni olan N-asetilglikozaminlerin oluşumunu sağlayarak yara dokusunun iyileşmesine ve DNA ile kompleksler oluşturabilme özelliğinden dolayı da viral olmayan gen taşınım araçları ve özellikle osteouyumlu ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedir (Stamford *et al.* 2013; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014).

Kitosan, katyonik bir polimerdir, zayıf asitlerde çözülebilmektedir ve yüksek yük yoğunluğuna sahiptir bu nedenle kitosan, birçok anyonik polimerle polielektrolit kompleksler oluşturabilmektedir. Kitosanın dezavantajının ortadan kaldırılması amacıyla literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Dezavantajları içerisinde en önemlisi zayıf fiziksel özellikleridir. Literatürde kollajen/kitosan/heparin kompleksleri, kitosan-kalsiyum fosfat, kitosan/jelatin/hiyaluronik asit, kitosan kondroitin sülfat kompozitleri gibi yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2008).

Kitosan nanopartikülleri (Nanokitosan), kitin polisakaritinin deasetile türevidir ki çeşitli uygulamalarda örnek olarak tıpta, eczacılıkta ve biyoteknolojide kullanılabilir. Bu nanopartiküller önemli özelliklere sahiptir ve yüksek frekanslı, daha az immünojenik, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilir (Ravi 2000).

Nanokitosan çoğunlukla iyonik jelleşme tekniği ile hazırlanabilmektedir. İyonik jelleşme tekniği tripolifosfat anyonları ile katyonik trimetil kitosanın iyonik çapraz bağlanması temeline dayanan bir yöntemdir (Amidi *et al.* 2006).

Nanoteknoloji, yeni yollarla bu polimerlerin özelliklerini iyileştirmek ve onların maliyetleri azaltmak için kullanılabilir (Sorrentino *et al.* 2007; Arora and Padua 2009; Azeredo 2009).

Burada literatürde tarif edildiği üzere genel olarak kitosan ve ona ait türevleri (Nanokitozan), eklem bacaklılar şubesine dahil olan organizmalardan üretilmektedir. Bu yöntem avantajları yanında dezavantaja da sahiptir. Bu kaynaklar mevsimseldir ve üretim maliyeti yüksektir, büyük miktarlarda kimyasallar kullanılır ve kalsiyum karbonat kaldırmak için demineralizasyon uygulanması gereklidir. Yüksek molekül ağırlığı ve protein kirliliği için biyomedikal uygulamalarını sınırlandırır ve fazla işgücü gerektirir (Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

Kitin ve kitosan mantarların hücre duvarlarının bir bileşenidir ve son yıllarda bu canlılar üzerinde kitosan ekstraksiyonu için çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır (Kim *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2009; Cardoso 2012; Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

Mantarlar kitosan üretimi için eklem bacaklılara göre önemli avantajlara sahiptir, mantarların biyokütle kaynağı sınırsızdır ve bu canlılardan elde edilen kitosan orta ve düşük molekül ağırlığına göre birçok biyomedikal uygulamalar için uygundur hem de molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi fermantasyon koşulları değiştirilerek kontrol edilebilir. Eklembacaklılarda serbest proteinleri alerjik olmasına karşın mantar türlerinin çoğu için böyle bir risk bulunmamaktadır ve daha önemlisi biyolojik atıklar mantar kültürasyonu için ekonomik bir platform olarak kullanılabilir (Guerra *et al.* 2009; Berger *et al.* 2011; Fai *et al.* 2011; Cardoso 2012; Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

Mantarlar hem ekolojik hem ticari büyük önem taşımaktadırlar ve yaklaşık 1,5 milyon türe sahiptirler ve hayvansal ve bitkisel atıkların çürütülmesinde, bu yapılarda bulunan azot, fosfor, potasyum, sülfür, demir ve kalsiyum gibi elementlerin serbest bırakılmasında, bazı peynir tiplerinin (Rokufort, Kamembert) eldesinde, antibiyotik

(penisilin) eldesinde, tiamin, biyotin, riboflavin gibi bazı vitaminlerin, amilaz, pektolaz gibi enzimlerin ve gibberellin gibi hormonların eldesinde funguslardan yararlanılır. Bir fungus grubu olan mayalar ekmekçilikte ve şarap, bira gibi fermente ürünlerin eldesinde kullanılır. Bu canlıların habitatları oldukça büyük farklılıklar gösterir. Bazıları suculdurlar ve özellikle tatlı sularda yaşarlar. Birkaç fungus türü de denizlerde yaşarlar. Ancak büyük bir çoğunluğu toprakta ölü hayvanlar ve bitkisel atıkları üzerinde yaşamaktadırlar. Bunun yanında insan, hayvan ve bitkilerde parazit olanları da mevcuttur (Feofilova 2001; Guerra *et al.* 2009; Berger *et al.* 2011; Fai *et al.* 2011; Cardoso 2012; Stamford *et al.* 2013; Chatterjee and Guha 2014).

Bu çalışmada kitosan ekstraksiyonu ve elde edilen kitosandan iyonik jelleşme tekniği ile nanokitosan hazırlamak için bol bulunabilen ve iyi biyokütle oluşturan üç mantar türü (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp., *Rhizoctonia* sp.) seçilerek çalışmalar yürütülmüştür.

Agaricus bisporus

Dünyada ve Türkiye'de kültür mantarı olarak en çok bilinen ve kültür bakımından mevsimsel olmayan, her zaman yetiştirilme kabiliyeti olan bir mantar türüdür. *A. bisporus*'un yetişkin haline Portabello adı verilir. Bu mantar pastörizasyon işleminden geçirilmiş kompost üzerinde ticari olarak yetiştirilebilir.

Bu kültür mantarının yetiştirilen kompostunon içerisinde sap-saman artıkları, at gübresi, buğday sapı bulunmaktadır. *A. bisporus*'un sebze ve meyve mağazalarında adı şapkalı veya kültür mantarlarıdır. Bu mantarlar eşeyli veya eşeysiz "sporlar" oluşturarak ürerler.

Bu çalışmada kullanılan şapkalı mantar (*Agaricus bisporus*), Erzurum ilinin sebze ve meyve mağazalarından alınmış ve laboratuvarlarımızda türü morfolojik olarak teyit edilmiştir. Seçilen mantarın sistematikteki yeri Çizelge 5.1'de belirtilmektedir.

Çizelge 5.1. *Agaricus bisporus* sistematigi

Alem	Fungi (Mantarlar)
Bölüm	Basidiomycota
Sınıf	Homobasidiomycetes
Alt sınıf	Homobasidiomycetidae
Takım	Agaricales
Familya	Agaricaceae
Cins	<i>Agaricus</i>
Tür	<i>A. bisporus</i>

***Rhizopus* sp.**

Rhizopus cinsi, doğada yaygın bir biçimde dağılmış olup birçok meyve türüne saldırarak, hasat sonrası kaybına neden olmaktadır. Bu mantar sızıntı olarak bilinen çok yumuşak meyvelerde çürümeye sebep olmaktadır. Fungus meyve içerisine yayıldıkça dokuları bozarak, sıvının açığa çıkmasına neden olduğundan dolayı buna sızıntı ismi verilmiştir. Son aşamalarında, hemen hemen bir mayalanma kokusu oluşur, bazı meyvelerde bu çürüme türünün bir özelliği olan bariz esmerleşme hiçbir zaman oluşmaz (Harvey *et al.* 1960; Günay 2011).

Rhizopus cinsi, hemen hemen karbonhidrat içeriği yeterli herçeşit materyal üzerinde oda ısısında, yoğun, beyaz bir küf oluşumu meydana gelmekte ve başlangıçta beyaz, parlak daha sonraları siyah, soluk bir hal alan küçük yuvarlak spor üreten başlar oluşturarak gelişebilmektedir (Harvey *et al.* 1960; Günay 2011). Seçilen bu mantarın sistematikteki yeri Çizelge 5.2’de belirtilmektedir.

Çizelge 5.2. *Rhizopus* sp. sistematigi

Alem	Fungi (Mantarlar)
Bölüm	Eumycota
Altbölüm	Zygomycota
Sınıf	Zygomycetes
Takım	Mucorales
Familya	Mucoraceae
Cins	<i>Rhizopus</i>

***Rhizoctonia* sp**

Rhizoctonia cinsi, toprak fungusu olarak bilinen en önemli özelliklerinden biri bitkilerin patojenidir ve patates ve diğer meyvelerde hastalığa sebep olan mantarlardır. Bitki kalıntıları üzerinde rahatlıkla geliştirilebilmektedir (Mordue *et al.* 1989).

Etkilenen meyvalar, genellikle tek taraftan bozulmakta ve toprağın yapıştığı yerde çürümüş bir lekecik oluşturmaktadır. Etkilenen dokular, kuru süngerimsidir ve koyu kahverengi siyah rengindedir. Çürük ve sağlam dokular arasında genellikle belirgin bir sınır vardır. Enfeksiyonun başlangıcı, meyvanın toprağa temas ettiği alt kısımda ve çoğunlukla kırmızılaşmadan önce bazen de üçüncü bir gelişimden önce olmaktadır. Erken enfeksiyon meyvaların deformasyonuna yol açmakta ancak çürük, yavaş yavaş ilerlediğinden dolayı, meyvanın üst kısmında bununla ilgili bir işaret görülmeyebilmektedir. Sonuçta, hastalıktan etkilenmiş meyvanın, diğer meyvalar içerisine girmesini engellemek güçleşmektedir (Harvey *et al.* 1960; Günay 2011). Bu mantarlar uniform yapıda sklerotlar oluştururlar ve canlı bitkilerin kökleri ile ilişki içerisinde görülmektedirler (Sneh *et al.* 1991; Gürkanlı 2005).

Seçilen bu mantarın sistematikteki yeri izelge 5.3’de belirtilmektedir.

Çizelge 5.3. *Rhizoctonia* sp. sistematigi

Alem	Fungi (Mantarlar)
Bölüm	Eumycota
Altbölüm	Basidiomycota
Sınıf	Basidiomycetes, Agaricomycetidae
Takım	Ceratobasidiales
Familya	Ceratobasidiaceae
Cins	<i>Rhizoctonia</i>

Bu çalışmada fungal kaynaklardan (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp., *Rhizoctania* sp.) elde edilen biyokütle kullanılarak kitosan saflaştırılması, karakterizasyonu ve diğerk taraftan elde edilen kitinin ticari olarak değerkendirilebilecek kitosana ve devamında nanoteknoloji için önemli bir ürün olan nanokitosan partiküllerinin üretilmesi ve karakterizasyonu Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında yapılmıştır. Elde edilen kitosan, FTIR ve SEM analizleri için hazırlanarak mantarların kitosan polimerlerinin ekstraksiyonu, kitosan karakteristikleri belirlenmesi, kitosan verimleri, kül içeriği ve deasetilasyon derecesi hesaplanmıştır.

Ayrıca elde edilen kitosan, iyonik jelleşme tekniği ile suda çözünen nanokitosan sentezlenmiştir. Elde edilen nanokitosan FTIR ve SEM analizleri için hazırlanmıştır. FTIR analizi (Perkin-Elmer, Llantrisant, UK) ile ve SEM analizi, (Zeiss EVO LS 10) mikroskope ile uygun olarak vakum altında, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Analitik Kimya Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre *A. bisporus*'undan elde edilen kitosan miktarları 27,2 mg/g'dır. Bu mantarın kuru miselyumun içinde kitosan, verimi ise %21 olarak hesaplanmıştır. Araştırılan diğer mantardan (*Rhizoctonia* sp.) elde edilen kitosan miktarları ise 1,52 gr'dır ve kuru miselyumun içinden elde edilen kitosan miktarı hesaplandığında %25.50 olduğunu belirlenmiştir. *Rhizopus* sp.'den elde edilen kitosan ekstrakt miktarları 1,32 gr ve kuru miselyumun için hesaplanan miktar ise %10.07 olduğu görülmüştür. *Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp. ve *Rhizoctania* sp., mantarların kitosan karakteristik özellikleri Çizelge 5.4'de verilmiştir (Çizelge 5.4).

Deneyler bu üç mantar türünün karşılaştırmasında *Rhizoctonia* sp.'nin kitosan verimi (1,52 gr) diğer iki örneğe göre (*Agaricus bisporus*, *Rhizopus* sp.) daha yüksektir. Bunun nedeni muhtemelen *Rhizoctonia* sp.'nin kuru miselyumun içinde kitosanın daha çok bulunmasından kaynaklandığı (%25.50) düşünülmektedir. Ayrıca, iyi ve uygun öğütme tekniklerinin kullanılması, prosesler esnasında sıcaklık kontrolü ve malzemelerin uygun kullanımı da elde edilen bu sonuçları olumlu yönde etkilemiştir. Kitosanın bu üç mantarda kül içeriği değerlendirilmesi için örnekler, 550°C'deki bir fırında 4 saat boyunca yakıldıktan sonra kül içeriği birincil ve ikincil numuneler arasındaki ağırlık farkına göre *Rhizoctania* sp.'nin %17, *Rhizoctonia* sp. %19 ve *A. bisporus*, %27 kül ve mineralına sahip oldukları belirlenmiştir. *Rhizoctania* sp. örnekleri en düşük kül ve mineral içeriğine sahip olduğu ve en yüksek kül oranı katı materyal üzerinde geliştirilen *A. bisporus* numunelerinde gözlemlenmiştir. Bu oranın oluşmasında besin materyalleri arasındaki farklılığın önemli olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Genellikle kitosan maddesin, kitinin deasetilasyonu %50'nin üzerinde olması ile bilinmektedir. Ticari kitosan genellikle deasetilasyonu %70'den fazla ve 10.000 - 1.2 milyon Da arasında bir molekül ağırlığına sahiptir (Nakamura *et al.* 1991; Reddy *et al.* 1991).

A. bisporus, *Rhizopus* sp, *Rhizoctania* sp, mantarlarından elde edilen kitosanın deasetilasyonu derecesi (%DD) yapılan bu çalışmada sırası ile %75, %74 ve %74 olarak

hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre *A. bisporus*, bu mantarlarının en yüksek deasetilasyon derecesine (%DD) sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.4. *A. bisporus*, *Rhizopus* sp., *Rhizoctania* sp., örneklerinden elde edilen kitosanın içeriğine ait karakteristik değerleri

Mantarın Adı	Kitosan Verimi	Kitosanın Kül İçeriği	Kuru Miselyumun İçerdiği Kitosan	Deasetilasyon Derecesi (%DD)
<i>Agaricus bisporus</i>	27,2 mg/g	%27	%21	%75
<i>Rhizoctonia</i> sp.	1,52 gr	%17	%25.50	%74
<i>Rhizopus</i> sp.	1,32 gr	%19	%10.07	%74

A. bisporus mantarından elde edilen kitosanın karakteristik değerleri literatürde yer alan sonuçlar ile tutarlıdır. Örneğin Wu ve Tao'nun, *A. bisporus* türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada maksimum kitin ve kitosan miktarını %19 olarak kaydetmişlerdir (Wu and Tao 2004). Başka bir araştırmada; George ve arkadaşları *Agaricus bisporus*'dan 25.2 mg/g kitosan elde etmişlerdir (George *et al.* 2011).

A. bisporus'un, kitosanın kimyasal yapıları incelenmesi ve deasetilasyon derecesi belirlemek için Infrared Spektrometresi yöntemi kullanılmış ve 6000–600 cm⁻¹ dalga boyları arasında FTIR spektrumu alınmıştır. Sonuçlar, deasetilasyon derecesinin (%DD) %75 olduğunu göstermekmiştir. Deasetilasyon derecesi kullanılan asitlere ve çözeltilere ve sıcaklıklar ve reaksiyonlarda kullanılan zamana göre farklı sonuçlar verebilmektedir. Hidroklorik asit, asetik asit ile karşılaştırıldığında kuvvetli bir asit olmalarına rağmen, kitosan polimerindeki monomerleri, ağı içinde ve ek olarak, asıl kısımlarında hidrolizine neden olabildiği literatürde belirtilmektedir (White *et al.* 1979).

Bu çalışmada kullanılan yönteme göre 1 M Sodyum hidroksit (NaOH) ve %2 asetik asit kullanılarak 8 saat'de mantarlardan kitosan elde edilmiştir. Marikani ve arkadaşları *Agaricus* sp. mantarının üzerinde yaptığı bir araştırmada farklı yöntemler ile farklı

sonuçlar almışlardır. Bu araştırmacı 1 M NaOH ve 121°C'de 15 dakikada %82 deasetilasyon belirlemiştir. Bunlara ilaveten maksimum deasetilasyon derecesini, %8 hidroklorik asit ile 12 saat 95°C'de %89 deasetilasyon ve minimum deasetilasyon derecesini ise %6 formik asit ile 6 saat 60°C'de %76.16 olarak kaydetmiştir (Marikani *et al.* 2010).

Kannan ve ark. (2010) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *Basidiomycetes* ailesine ait üç mantar üzerinde (*Agaricus* sp., *Pleurotus* sp. ve *Ganoderma* sp.) deneyler yapmışlar. Çalışmada; inkübasyon süresi, sıcaklık ve baz ile asit konsantrasyonu, ekstraksiyon işleminin önemli ölçüde kitosanın üretimini ve fizikokimyasal özelliklerini (deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı) etkilediği gösterilmiştir (Kannan *et al.* 2010).

Sentezlene kitosan ve nanokitosan numunelerinin IR spektrumları incelendiğinde ise; 3200-3600 cm⁻¹ aralığı içinde geniş bir absorpsiyon bandı O-H titreşimi tensional ile ilgili olduğu ve 2857, 1636, 1613, 1381 ve 1186 cm⁻¹ çevresindeki piklerin ise sırasıyla bir alifatik C-H, Amide I (NH deformasyonu-NHCOCH₃), Amide II, Amide III ve C-O C, titreşimi tensional bağlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Genel olarak, kitosanın karakteristik pikleri ise 3000-3500 cm⁻¹ (NH bağı) ile 1400- 1650 cm⁻¹ (C=O bağı) aralığındaki pikler olduğu görülmüştür.

Kitosana ait FTIR bulgularının Ding, *et al.* 2006'nın sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ding *et al.* 2006 yaptıkları çalışmada kitosanın FTIR spektumunda 3430 cm⁻¹'de OH, 1662 cm⁻¹'de amid I, 1598 cm⁻¹'de amin, 1380 cm⁻¹'de amid-III, 1156 cm⁻¹'de C-O-C, 1033 ve 1075 cm⁻¹'de C-O'nın piklerini saptamıştır (Ding *et al.* 2006).

Şekil 4.3'de kitosanın morfolojisine göre pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir. Kitosan katalog bilgilerine göre 154 mikron boyutundadır. Kitosanın SEM görüntüsü alındığında 150 mikron boyutunda yapraklar görülmüş ve bu arada kitosan yüzey morfolojisinin diğer özelliği amorf olmasıdır. Esam *et al.* 2010 yaptıkları

çalışmada kitosanın SEM analizinde bu malzemenin yüzeyinde bazı bantların olduğunu bildirilmişlerdir (Esam *et al.* 2010).

Yenilebilir mantar olan *Agaricus bisporus* mantarının diğerlerinden daha çok üretilmekte ve tüketilmektedir. Yenilebilir kısmını çıkardıktan sonra kalan atık miktarı (esas sapları ve düzensiz boyutlar) üretim hacminin toplam %5-20'ini oluşturmaktadır. ABD'de mantar üretiminde tek başına, yılda mantar atık malzemeleri yaklaşık 50.000 tondur ve ticari uygulamalar için daha uygundur (Wu *et al.* 2005).

Böylesine *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, ve *Volvariella volvacea* gibi yenilebilir mantarların, atıkları dikkate alındığında, yüksek katma değerli ürün olan kitosan ekstraksiyonu dahil olmak üzere potansiyel uygulamalar için gerekli olduğu görülmektedir. Günümüzde bu mantar atıklarının çeşitli alanlarda umut verici uygulamaları bulması, kitosan üretimi ve ekstraksiyon için patojen olmayan fungal suşlar odaklı çalışmaların artması gerektiğini göstermektedir (Guarro and Gene 1995; Cardoso 2012; Chatterjee and Guha 2014; Lúcia *et al.* 2014).

Bu çalışmada incelenen diğer bir mantar türü olan *Rhizopus* sp., kullanılarak elde edilen sonuçlarda , maddelerin ayrılmasından sonra ticari kitosandan daha yüksek bir saflığa sahip olduğu görülmüştür. Böyle bir durumlarda mlezemelerin uygun bir şekilde yıkanması ve kurutulması önemlidir .

Yukarıda bahsedildiği üzere bu mantarın kitosan verimin 1,32 gr ve kuru miselyumun içerdiği kitosan miktarı ise %10.07 olarak hesaplanmıştır. Kitosanın kimyasal yapıları incelenmesinde Infrared Spektrometresi yöntemi kullanılmış ve hazırlanmış disklerinin 400–4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında spektrumu alınmıştır. Deasetilasyonu derecesinin %74 olduğunu belirlenmiştir. Diğer literatürlerde bu mantar üzerinde yapılan çalışmalarda farklı verimler ve değişik deasetilasyon dereceleri kaydedilmiştir. Chatterjee ve Guha tarafından yapılan bir çalışmada, *Rhizopus oryza*'nın kitosan verimini 1,13 gr ve deasetilasyonu derecesini (%DD) %87 olarak kaydetmişlerdir (Chatterjee and Guha 2014).

Pochanavanich ve Suntornsuk ise *Rhizopus oryzae* türü üzerinde bir çalışmada elde edilen maksimum kitosan miktarını %14 olarak kaydetmişlerdir (Pochanavanich and Suntornsuk 2002).

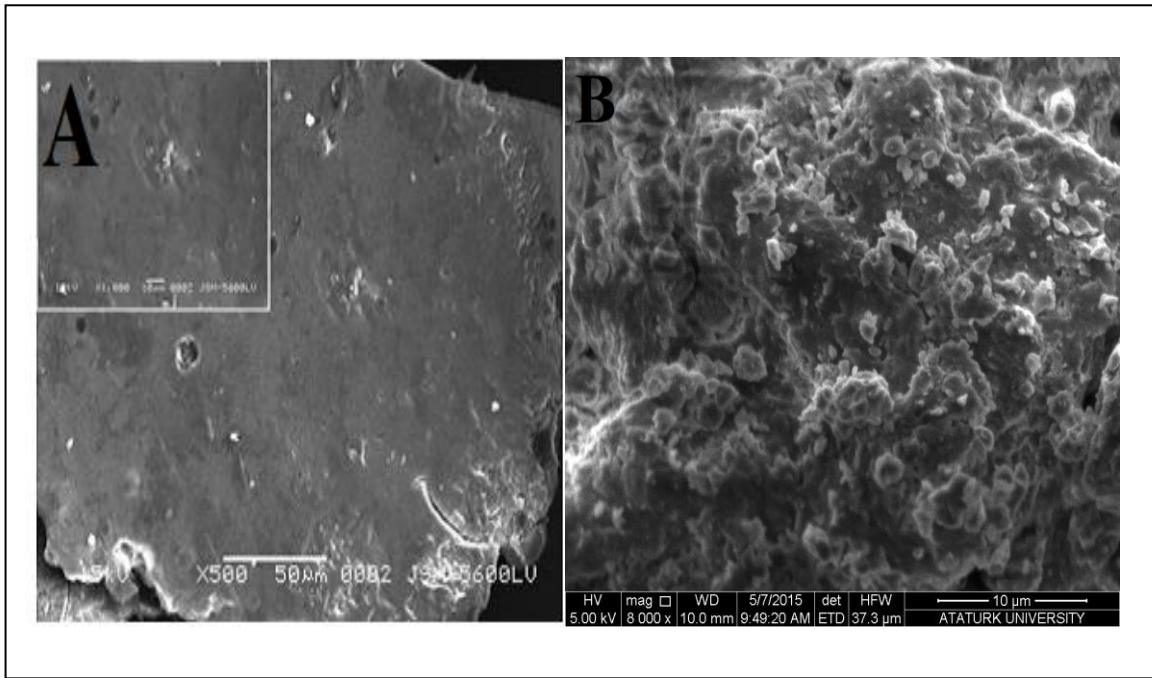
Gözlemlenen bir çok kaynaklarda *Rhizopus arrhizus*'un FTIR incelenmesinde, 1,683, 1,596 ve 1,455 cm^{-1} , pikler arasında deasetilasyonu derecesini %83 olarak kaydetmişlerdir (Jennessen *et al.* 2008; Chaves *et al.* 2009; Lins *et al.* 2010; Cardoso *et al.* 2010). Pochanavanich ve Suntornsuk aynı yöntemi kullanılarak 87.9 ± 2.1 deasetilasyon derecesine (%DD) sahip kitosan elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz kitosan molekülümüz deasetilasyon derecesi 75'tir. Kitosan üretiminde %100 deasetilasyon derecesi nadirdir. Bu nedenle, yaygın olarak ticari kitosan %75-85 aralığındaki çeşitli deasetilasyon derecesine sahiptir.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar literatürlerdeki çalışmalar ile kıyaslandığında aynı mantar üzerinde yapılan diğer çalışmalara göre elde edilen kitosan veriminin daha iyi olduğunu ve deasetilasyon derecesinin bazı kaynaklara göre biraz düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar muhtemelen deasetilasyon işlemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu duruma kurutma, öğütme işlemlerindeki yetersizlik, asitler ve bazıları uygun miktarda kullanmamak, optimum sıcaklığa uymamanın, bu sorunlara neden olabileceği bilinmektedir.

Elde ettiğimiz kitosana molekülüne ait FTIR bulgularının Antonio *et al.* 2006'nın sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu mantarın kitosan FT-IR spektrumundaki 1649, 1577, 1541 cm^{-1} çevresindeki pikler, kitosan molekülünde yer alan amit gruplarına aittir. Antonio vd. 2012 yaptıkları çalışmada kitosanın FTIR spektumunda 1658, 1581 ve 1468 cm^{-1} da amid gruplarının piklerini saptamıştır (Antonio *et al.* 2012).

Şekil 5.1.'de verilen SEM görüntüsü ile Lúcia ve arkadaşları *R. arrhizus* mantarı üzerinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri SEM görüntüsü karşılaştırıldığında bazı benzerlikler görülmektedir (Şekil 5.1.A *Rhizopus* sp. Şekil 5.1.B *R. arrhizus*).

Bu tezde elde edilen SEM görüntüsünde, kitosanın bazı bölgelerinde yassı ve bazı bölgelerinde parça parça bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir . Bu arada kitosan yüzey morfolojisinin diğer özelliği amorf olmasıdır. Lúcia ve arkadaşları bu mantarın kitosanın SEM analizinde, daha çok kompakt ve daha yoğun bir yapıya sahip olan bir malzeme, yüzeyinde gözeneklilik olmadan ve ölçekleme katmanları olan özelliklerini kaydetmişlerdir. Bu sonuçlar literatürlerdeki diğer sonuçlar ile uyumludur (Yen *et al.* 2007; Yen *et al.* 2009; Lúcia *et al.* 2014).



Şekil 5.1. A) *R. arrhizus*'un kitosanın SEM görüntüsü (Lúcia *et al.* 2014), **B)** *Rhizoctonia* sp.'den izole edilen kitosanın SEM görüntüsü

Yaptığımız çalışmada *Rhizoctonia* sp. mantarı bozulan materyaller üzerinden izole edilerek saflaştırılarak geliştirilmiştir. Özellikle yoğun bir şekilde biyokütle oluşturan örnekler ile çalışmalar başlatılmıştır.

Rhizoctonia sp.'nin kuru miselyumu içerisindeki maksimum kitosan verimi %25.50 olarak hesaplanmıştır. Kitosan örneklerinin kül ve mineral içeriği %17 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen Kitosanın deasetilasyon derecesinin, %74 olduğunu belirlenmiştir. FTIR analizinden elde edilen 3200-3600 cm^{-1} aralığında geniş absorpsiyon bandı O–H titreşimi tensiyonel ile ilgilidir ve deasetilasyon derecesi ile ilgili bilgi vermektedir. Şekil 4.10.'de FTIR spektrumundaki 1658, 1627, 1574 cm^{-1} çevresindeki pikler ise kitosan molekülü yapısında yer alan amid gruplarına aittir ve 3271 cm^{-1} 'de de OH piki saptanmıştır.

Bu çalışmada; fungal kaynaklardan kitosan ve devamında da nanokitosan elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada tercih edilen örneklerden *Agaricus bisporus* mantarının bol olarak elde edilebilmesi, kullanılan tekniklerin optimizasyonu için çok ideal bir örnek olarak seçilmiştir. İyi biyokütle oluşturan ve birçok atık materyal üzerinde rahatlıkla gelişebilen *Rhizopus* sp.'nin literatürde yer aldığı ancak her tür ve izolata verimlerinin ve deasetilasyon değerlerinin farklı olduğu görülmektedir. Çalışmanın literatür ile kıyaslamaya en uygun örneği olarak *Rhizopus* sp. tercih edilmiştir. Çalışmanın orijinal kısmı ise birçok bitki ve bitki kalıntısı üzerinde rahatlıkla gelişebilen ve literatürlerde kitosan eldesi amacıyla veri bulunmayan *Rhizoctonia* sp. olarak belirlenmiştir. Üç örnek ile farklı fungal kaynaklardan kitosan eldesi ile ilgili yöntemleri basit ve anlaşılır bir şekilde optimize edilmesi ve ticari nitelikleri ile ilgili değerlerin araştırılması açısından yardımcı kaynak olacağı düşünülmektedir.

Nanokitosan sentezi

Çalışmanın ikinci kısmında ise fungal kaynaklardan elde edilen en yüksek deasetilasyon seviyesine sahip örneğin kitosanı kullanılarak nanokitosan sentezi ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. İlk aşamada nanokitosan elde edebilmek için literatürde öncelikle kitosanın moleküler ağırlığının düşürülmesi amacıyla yapılan denemeler bu çalışmada da uygulanmıştır. İkinci adımda elde edilen düşük molekül ağırlıklı kitosan (LWCS) kullanılarak suda çözünebilir nanoboyutlu partiküller elde edilmeye çalışılmıştır. Calvo ve arkadaşları nanokitosan eldesi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada Kitosan nanopartiküllerin konsantrasyonu ve TPP (sodyum tripolifosfat) arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu araştırmacılar değişik konsantrasyonda, TPP uygulamışlar ve farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan en iyi doz tercih edilerek kurulan reaksiyon sonucunda daha önce yapılan ve ticari kalitede Nanokitosan elde edilebilmiştir (Calvo *et al.* 1997).

Bu tezde mantarlardan hazırlanan nanokitosanın morfolojisinde, yüksek molekül ağırlığına sahip kitosana göre nanokitosanın bazı bölgelerinde yassı ve bazı bölgelerinde homojen olmayan bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür.

Bu arada nanokitosan partikülleri yassı bölgelerde 200 nm'den küçük olarak görünmektedir (Şekil 4.14).

Bu çalışmada partikül büyüklüğü bakımından diğer bir doktora tezinde aynı yöntemi kullanılarak, 189.08 ± 12.56 nm ile 371.22 ± 15.07 nm arasında değişen kitosan nanopartikülleri elde edilmiştir. Bu verilerde benzer çalışmalar ile paralel nitelik taşımaktadır (Suna 2006; Zhang *et al.* 2010; Chattopadhyay and Inamdar 2012; Ain *et al.* 2014).

Kitosan ile ilgili çalışmalar dikkate alındığında iyonik jelleştirme yöntemi ile 800 nm ile 500 nm arasında değişen boyutlarda elde edilen kitosan nanopartiküller ile kan lipitleri ve plazma viskozitesini azaltmak için kullanıldığı ve büyük ölçüde serum süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri arttığını gösterilmiştir. Bunlar, suda-çözünür kitosan nanopartiküller olarak hiperkolesteroleminin tedavisinde kullanılabileceğini

göstermişlerdir (Zhang *et al.* 2010; Chattopadhyay and Inamdar 2012; Ain *et al.* 2014). Bu anlamda çalışmamız sonucunda elde edilen partikül boyutunun nanoteknolojiye aktararak kullanım alanı bulabileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak son yıllarda, mantarlar, kitin ve kitosan üretimi için ucuz ve çevre dostu olmaları nedeniyle alternatif kaynak olarak oldukça dikkat çekmektedirler. Bol miktarda üretilen kültür mantarlarının yanında çeşitli endüstrilerde biyoteknolojik proseslerin sonucu olarak atık biyokütle olarak ortaya çıkan mantar ve misel atıkları önemli bir kaynak oluşturabileceği hesaplanabilmektedir. Geleneksel kaynaklarla (Kabuklular gibi) kıyaslandığında kitosan ve nanokitosan üretimi umut verici bir kaynağı temsil etmektedir. Mantarların hücre duvarlarının önemli miktarlarını ihtiva eden kitin, kitosanın ekonomik ve düşük maliyetli üretimi için değerlendirilebilir.

Atık mantar miselyumundan kitosan ekstraksiyonu (ve devamında nanokitosan sentezi) yeşil sentez yöntemi olarak kabul edilebilir. Geleneksel yöntemlerin dezavantajlarına (asit ve alkali açısından zengin olan atıklar) sahip olmamaları nedeniyle bu alternatif sentez, mevcut sentez yöntemlerinin yerini alma imkanına sahiptir.

Mantar kaynaklarından elde edilen kitosan birçok fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir ve önceden tanımlanan özellikler (yetiştirme ortamının dikkatli manipülasyonu, fermentasyon işlemi, ekstraksiyon parametreleri) ile çeşitli özel uygulamalar için (ilaç taşıma üniteleri, biyosorbantlar vb.) uyarlanabilir. Kitosan, sulu çözeltiler içinde çözülebildiğinde birçok alanlarda örneğin, tıp, atıksu tedavileri, tekstil ve tarımda büyük ölçüde kullanılmaktadır. Buna karşın nanokitosan, solüsyonlar, jeller, membranlar- film ve lif gibi farklı uygulamalarda kullanılabilecektir.

Mantarlardan elde edilen kitosan ve nanokitosan, daha çok fonksiyonel malzeme, daha yüksek biyoyum, %100 biyolojik olarak parçalanma ve daha düşük veya olmayan toksisite gibi iyi özelliklere sahip olduğu için araştırmalar geliştirilerek devam edebilir.

KAYNAKLAR

- Abe, A., Asano, K. and Sone T., 2010. A Molecular Phylogeny-Based Taxonomy of the Genus *Rhizopus*. Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 74 (7) 1325–1331.
- Agboh, O.C. and Qin Y., 1997. Chitin and Chitosan Fibers, Polymers for Advanced Technologies, 8, 355-365.
- Aiba, S., 1992. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans, Int. J. Biol. Macromol 14: 225–228.
- Ain, N.B.R., Suk, F.C., Suh, C.P. and Lesley M.B., 2014. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles-Doped Cellulose Films with Antimicrobial Property, Hindawi Publishing Corporation, Journal of Nanomaterials, 710459-10.
- Akbuga, J., 1995. A biopolymer: Chitosan. International Journal of Pharmaceutical Advances 1,3 -18
- Akbuğa, J., Kabasakal L. and Özbaş-Turan S., 2002. Physical and transfectional properties of aged DNA-chitosan microspheres. 10th Annual Meeting Eurpean Society Gene Therapy., Antibes-France. 122, 97 –136.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J.D., 2003. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York, 1619-4.
- Amidi, M., Romeijn, S. G., Verhoef, J. C., Junginger, H. E., Bungener, L., Huckriede, A., Crommelin, D. J. A. and Jiskoot W., 2007. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse. Vaccine, 25, 144–153.
- Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E. and Jiskoot W., 2006. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. Journal of Controlled Release, 111, 107 –116.
- Amorim, R.V.S., Pedrosa, R.P., Fukushima, K., Martinez, C.R., Lendingham, W.M. and Campos-Takaki G.M., 2006, Alternative carbon source from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. Food Technol. Biotechnol. 44, 519–523.
- Antonio, C., Clarissa, I.M.L., Ednaldo, R., Marta, C., Freitas, S and Galba M.C.T., 2012. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. Journal of Molecules, 17, 4904-4914.
- Aral, C., Özbaş-Turan S., Kabasakal, L., K.U, M. and Akbuğa J., 2000, Studies of effective factors of plasmid DNA-loaded chitosan microspheres I. plasmid size, chitosan concentration and plasmid addition techniques. S.T.P. Pharm. Sci., 10(1), 83-88.
- Arora, A. and Padua G., 2009. Review, Nanocomposites in Food Packaging. Journal of Food Science, 75(1), 43-49.
- Asachi, R. and Karimi, K., 2013. Enhanced ethanol and chitosan production from wheat straw by *Mucor indicus* with minimal nutrient consumption. Process Biochemistry, 48,1534 – 1541.

- Austin, P.R., Brine C.J., Castle J.E. and Zikakis J.F., 1981. Chitin new facets of research. *Science*, 212,749-753.
- Azeredo, H., 2009. Nanocomposites for food packaging applications, *Food Research International*, 42(9),1240-1253.
- Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A.K., Sharma, R.K. and Maitra A., 2002. Preparation, Characterization and Biodistribution of Ultrafine Chitosan Nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 243. 93-105.
- Berger, L.R.R., Cardoso, A., Stamford, T.C.M., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O. and Campos-T.G.M., 2011. Agroindustrial waste as alternative medium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus*—A factorial design. *Asian Chitin Journal*, 7, 83–90.
- Bhatia, S.C. and Ravi N., 2003. A Mossbauer Study of the interaction of chitosan and dglucosamine with iron and relevance to other metalloenzymes. *Biomacromolecules*, 4, 723-727.
- Boosalis, M.G. and Scharen A.L., 1959. Methods for microscopic detection of *Aphaanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris, *Journal of Phytopathology*, 49,192-198.
- Borchard, G., 2001. Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev*, 52: 145-150.
- Bowman, S.M. and Free S.J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28, 799–808.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. and Silverman S.J., 1988. Fungal cell Wall synthesis: The construction of a biological structure. *Microbiological Science*, 5, 370–375.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso M.J., 1997. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Journal of Appl. Polym. Sci.*, 63, 125-132.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., and Alonso, M.J., 1997. Novel Hydrophilic Chitosan - Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132.
- Capbell, N.A. and Reece J.B., 2008. *Biology* (Gündüz, E., Demirsoy, A. ve Türkan, İ.), Palme yayıncılık, Ankara.342.
- Cardoso, A., Freitas, S.M.C., Batista, A.C.L., Santos, V.A. and Campos T.G.M., 2010, Submerged fermentation for chitin and chitosan production by *R. arrhizus*. *Journal of Asian Chitin* . 6, 1–8.
- Cardoso, A., Lins, C.I.M., Santos, E.R., Silva, M.C.F., and Campos, T.G.M., 2012. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. *Molecules*,17, 4904-4914.
- Carling, D.E., Rothrock, G.C., Macnish, M.W., Brainard, T. and Winters S.W., 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*, *Phytopathology*. 84, 1387-1393.
- Cauchie, H.M., 2002. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Journal of Hydrobiologia*, 470, 63–96.
- Chattopadhyay, D.P. and Inamdar M.S., 2012. Studies on Synthesis, Characterization and Viscosity Behaviour of Nano Chitosan. *Research Journal of Engineering Sciences*, 1(4), 9-15.
- Chaves, J.A.P., Bezerra, C.W.B., Silva, H.A.S. and Santana, S.A.A., 2009. Characterization and Application of chitosan biopolymer as Textile dye

- Remover in aqueous environme. Journal of Cad. Pesqui, 16, 36–44.
- Chen, F., Zhang, Z. and Huang, Y., 2007. Evaluation and modification of N trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. International Journal of Pharmaceutics, 336, 166–173.
- Chen, R.H. and Tsaih M.L., 1998. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution. Int. Journal of Biol. Macromol., 23: 135- 141.
- Cui Z. and Mumper R.J., 2001. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. Journal of Control. Release., 75, 409-419.
- Çalimli, A., Aktaş, Z., Yıldız, N., Gökçe Y. and Cengiz B., 2008. Nano yapıdaki kitosan, hidroksiapatit ve kompozitlerinin sentezi ve parçacık karakterizasyonu, Proje no: 104M412 Proje Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Ankara, 90.
- De Smedt, S.C., Demeester, J. and Hennink W.E., 2000. Cationic polymer based gene delivery systems. Journal of Pharm. Res., 17, 113-126.
- Deacon, J.W., 2006. Fungal Biology. 4th Ed. Blackwell Publishing.
- Demir, A., Öktem, T. ve Seventekin N., 2008. Kitosanın tekstil sanayinde antimikrobiyal madde olarak kullanımının araştırılması, Tekstil ve konfeksiyon, 2, 94-102.
- Demir, A. ve Seventekin N., 2009. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları, Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3, 92-103.
- Ding, Y., Xia, X. and Zhang, C., 2006. Synthesis of metallic nanoparticles protected with N,N,N-trimethyl chitosan chloride via a relatively weak affinity. Journal of Nanotechnology, 17, 4156–4162.
- Dix, N.J., Webster, J., 1995. Fungal Ecology. London, Chapman and Hall.
- Duman, S.S. ve Şenel S., 2004. Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları, Veteriner Cerrahi Dergisi, 10, 62-72.
- Dutta, P.K., Ravikumar, M.N. and Dutta J., 2002. Chitin and chitosan for versatile applications. Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews, 42(3), 307-354.
- El Hadrami, A., Adam, L.R. and El Hadrami I.D.F., 2010. Chitosan in plant protection. Journal of Mar. Drugs, 30, 8(4), 968-87.
- Elibol, M., 2008. Kabuklu Katı deniz ürünleri artıklarından kitin, kitosan ve türevlerinin üretimi, TÜBİTAK Proje No: 106M241, İzmir.
- Esam, A.El-H., Mohamed, M.N. and Abdul H.A., 2010. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blended Films: Mechanical, Thermal and Surface Investigations. Journal of Chemistry, 7(4), 1212-1219.
- Fai, A.E.C., Stamford, T.C.M., Stamford, A.T.M., Santa, C.P.A., Silva, M.C.F., Campos, T.G.M. and Stamford T.L.M., 2011. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. Journal of Molecules 16, 7143–7154.
- Feofilova, E.P., 2001. The kingdom fungi: heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (review). Journal of Appl. Biochem. Microbiol., 37, 124–37.
- Gaur, U., Sahoo S.K., De T.K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K., 2000. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. Int. Journal of Pharm., 202, 1-10.

- Geçer, A., 2010. Suda Çözünen Nanokitosan Sentezi., Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi.195.
- Gordon, D., 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. *Journal of Cell Microbiol*; 7, 471-479.
- Guang, W.Y., 2002. The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, PhD. Thesis, Hong Kong Polytechnic University. 273,1-56.
- Guarro, J. and Gene J., 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Journal of Clin Microbiol. Infect. Dis.*, 14,741–754.
- Guerra-Sanchez, M.G., Vega-Perez, J., Velazquez-del, V.G.M. and Hernández-Lauzardo A.N., 2009. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 18 – 22.
- Guliyeva, Ü., Öner F., Özsoy Ş. and Hazirolu R., 2006. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *Journal of Pharm. Biopharm.* 62,17-25.
- Günay, Ç., 2011. Çilekler (*Fragaria* L. spp.)’in Pazar Hastalıkları, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4 (2), 59-62.
- Gürkanlı, C.T., 2005. Samsun _linde Yetistirilen Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisinden izole Edilen *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Karakterizasyonunun Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürsoy, N., Sarikurkcu, C., Cengiz, M. and Solak M.H., 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Journal of Food Chem. Toxicol.*, 2381-2388.
- Hallen, H.E., 2002. Studies in amatoxin-producing genera of fungi: phylogenetics and toxin distribution. *Journal of UMI Microform ProQuest*. 3075013.
- Hamman, J.H., Stander, M. and Kotze A.F., 2002. Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 235–242
- Hamman, JH. and Kotze A.F., 2001. Effect of the Type of Base and Number of Reaction Steps on the Degree of Quaternization and Molecular Weight of N-Trimethyl Chitosan Chloride. *Journal of Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(5), 373–380.
- Harvey, J.M. and Pentzer W.T. 1960. “Market Diseases of Grapes and Other Small Fruits” U.S. Dept. Agr. Agricultural Marketing Service. USA. Agriculture Handbook No. 189, 22-50.
- He, P., Davis, S.S. and Illum L., 1998. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharm.* 166,75- 88.
- Huang, K.S., Wu, W.J., Chen, J.B. and Lian H.S., 2008. Application of low-molecularweight chitosan in durable press finishing. *International Journal of Carbohydrate Polymers*, 73, 254–260.
- Illum, L., 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *International Journal of Pharm. Res.*, 15, 1326-1331.
- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N. and Davis, S.S., 2001. Chitosan as a novel delivery system for vaccines. *Journal of Drug Deliver. Rev*, 51, 81-96.
- Jennessen, J., Schnurer, J., Olsson, J., Samson, R.A. and Dijksterhuis J., 2008. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus*

- oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. Journal of Mycol. Res. 112, 547–563.
- Jintapattanakit, A., Mao, S., Kissel, T. and Junyaprasert V.B., 2008. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 70,563-571.
- Jonathan, Z., Knaul, S.M., Hudson, F.M, Katherine, A.M. and Creber E.S, 1999, Crosslinking of Chitosan Fibers with Dialdehydes: Proposal of a New Reaction Mechanis, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics. 37, 1079–1094.
- Junginger, H.E. and Verhoef J.C., 1998. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs a fiction. Journal of PSTT, 1,370-376.
- Kalac, P., 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. Journal of Food Chem. 113,9–16.
- Kalac, P. and Svaboda L., 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. Journal of Food Chem. 69,273–281.
- Kalkancı, A., 2008. Mantar-Kanser İlişkisi İçinde. Editörler. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabı.Türkiye. İstanbul: Birmat Matbaacılık. 21-25
- Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K. and Ranjit Singh A.J.A., 2010. Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation. Journal of Biology Res.4,10–13.
- Kaş, H.S., 1997. Chitosan properties, preparations and application to microparticulate systems. Journal of Microencapsul.14,689-711.
- Kaş, H.S., 2002. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. Ed: Gürsoy, A. Z, Kontrollu Salım Sistemleri. 65-102, Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul.
- Kavanagh, K., 2005. Fungi Biology and Applications. John Wiley & Sons, England.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. and Zinkernagel R.M., 2002. Tıbbi Mikrobiyoloji. Küçüker M, Tümbay E, Anđ Ö, Erturan Z. (Çev), 9. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 352-356.
- Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C. and Cho C.S., 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Journal of Biotechnology Advances, 26, 1-21.
- Knittel, D. and Schollmeyer, E.,1998, Chitosan und seine Derivate für die Textilveredlung Teil 1: Ausgangsposition, Textilveredlung, 33, Nr.3-4
- Kockisch, S., Reese, G.D., Yung, S.A., Tsiabouklis, J. and Smart, J.D., 2003. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity an in vitro evelation of mucoadhesive potential. Journal of Pharm. Scie. 92,1614- 1623.
- Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Song, C.H., Cho, K.Y. and Pang G., 2009. Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. Journal of Agricultural and Food Chemistry,57 (8), 3351–5.
- Kumar, R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. Journal of Reactive and Functional Polymers, 46, 1-27.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. Prog. Journal of Polym. Sci., 26,1921-1971.
- Langer, R., 1990. New methods of drug delivery. Journal of Science, 249,1527-1533.

- Lee, D.W., Powers, K. and Baney, R. 2004. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Journal of Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377.
- Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, H.E. and Junginjer H.E., 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. Journal of Pharm.* 78,43-48.
- Lins, C.I.M., Cardoso, A., Freitas Silva, M.C., Batista, A.C.L., Jara, A.M.A.T., Berger, L.R.R., Santos, E.R., Marques S.A. and Campos-Takaki G.M., 2010. Evaluation of the chitin and chitosan by different extractions methods from biomass of Mucoralean fungi. *Journal of Asian Chitin*, 6, 10–16.
- Lúcia, R.B., Thayza C.M.S., Thatiana M.S., Sergio, R.C., Antonio, C., Adamares, M., Aline, E. and Galba M., 2014. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains, *Journal of Mol. Sci.*, 15, 9082-9102.
- Luis, C.M., Carmen, A.M. and De L.G.M., 2003. Removal of heavy metals by using adsorption on alumina or chitosan. *Journal of Anal Bioanal Chem*, 375,820-825.
- Macleod, B., Vanstone, V., Khangura, R., and Beard C., 2008, Root disease under intensive cereal production systems. Bulletin 4732, Department of Agriculture and Food, Western Australia.
- Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour, M., Beaumont E. and Fernandes J.C., 2006. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Journal of Biomaterials*, 27,2060-2065.
- Manzi, P., Aguzzi, A. and Pizzoferrato L. 2001. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Control. Release*, 70,399-421.
- Marikani, K., Maliga, N.K., Rajarathinam, and A.J.A. Ranjit Singh., 2010. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions, *Journal of Advances in Biological Research* 4 (1),10-13.
- Mordue, J.E.M., Currah, R.S., Bridge, P.D., 1989. An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques, *Journal of Mycol. Res*, 92 (1): 78-90.
- Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi N., 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *Journal of Agric. Food Chem.* 39(2),647-650.
- Needleman, I.G., Smales, F.C., 1995. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Journal of Biomaterials*, 16, 617- 624.
- Niïdome, T. and Huang, L., 2002. Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors. *Journal of Gene Ther*, 9: 1647-1652.
- Ofori-Kwakye, K. and Fell J.T., 2003. Biphasic drug release from film-coated tablets. *Journal of Pharm.*, 250,431-440.
- Okuyama, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa, T., Osawa, K. and Ogawa K., 2000. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Journal of Carbohyd. Polym.* 41,237- 247.
- Oshita, K., Oshima, M., Gao, Y.H., Lee, K.H. and Motomizu S., 2002. Adsorption behavior of mercury and precious metals on cross-linked chitosan and the removal of ultratrace amounts of mercury in concentrated hydrochloric acid by a column treatment with cross-linked chitosan. *Journal of Anal. Sci.*, 18,1121-1125.

- Peniche, C., Argüelles-Monal, W. and Goycoolea, F.M., 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications, In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Belgacem, MN. and Gandini, A. Eds. 518-542, Elsevier.
- Poulicek, M., Gaill, F. and Goffinet G., 1998. Chitin biodegradation in marine environments, in stankiewicz B A and vanbergen P F (eds) Nitrogen-containing Macromolecules in the Bio-nad Geosphere. Washington DC: American Chemical soeity, 163- 210.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou X., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, Carbohydrate Research, 339, 2693-2700.
- Ravi, Kumar MN., 2000. A review of chitin and chitosan applications. Journal of Reactive and functional polymers 46(1), 1-27.
- Reddy, M., Aral, G., Angress, P. and Coutare L., 1991. Chitosan treatment of wheat seed induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. Journal of Agric. Food Chem. 47930, 1208-1216.
- Rillosi, M. and Buckton G., 1995. Modelling mucoadhesion by use of surface energy terms obtained from the Lewis acid-Lewis base approach. II. Studies on anionic, cationic and unionisable polymers. Journal of Pharm. Res, 12, 669-675.
- S. Chatterjee. and A.K. Guha., 2014. A study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. Letters in Applied Microbiology, The Society for Applied Microbiology. 59, 155-160.
- Saklar, A., 2009. Nanoteknolojinin Gıda Ambalajında Uygulanması. Journal of Infovet, 101, 61-98.
- Sandford, P.A., 2003. Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization. In: Varum M, Domard A, Smidsrod O (eds). Journal of Advances in chitin sciences, Trondheim, Norway: NTNU Trondheim, p. 35.
- Sezer, E., 2007. Investigation of Parameters Effecting Drug Release From Chitosan Microspheres, , MMS. Thesis, Ankara University.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon Y.J., 1999. Food Applications of chitin and chitosans, Journal of Trends in Food Science and Technology, 10, 37-51.
- Shimoda, J., Onishi, H. and Machida Y. 2001. Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine. Drug Dev. Ind. Journal of Pharm. 27, 567-576.
- Shu, X Z. and Zhu K.J., 2002. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. Journal of Pharm., 233: 217-225,.
- Sieval, A.B. Thanou, M. Kotze, AF. Verhoef, JC. Brussee, J. and Junginger, HE. 1998. Preparation and NMR characterization of highly substituted *N*-trimethyl chitosan chloride. Journal of chemistry. 36(2-3), 157-165.
- Singla, A.K. and Chawla M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. Journal of Pharm. Pharmacol., 53, 1047-1067.
- Skaugrud, A., 1989. Chitosan makes the grade. Journal of Manuf. Chemist, 31-35.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* species, APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. 133.

- Snyman, D., Hamman, J.H., Kotze, J.S., Rollings, J.E. and Kotze A.F., 2002. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride. *Journal of Carbohydrate Polymers*, 50 (2), 145-150.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G. and Vittoria V., 2007. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Journal of Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 84-95.
- Sözer, N. and Kokini J.L. 2009. Nanotechnology and Its Applications in the Food Sector, *Journal of Trends in Biotechnology*, 27(2), 82-89. doi: 10. 1016/j. tibtech. 10.010.
- Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O. and Campos-Takaki GM., 2013. Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. In *Practical Applications in Biomedical Engineering*, 1st ed.; Andrade, AO. Pereira, AA. Naves, ELM. Soares, AB. Eds. 9, 229–244, InTech: Rijeka, Croatia.
- Suna, Ö.T., 2006. Kitosan esaslı taşıyıcı sistemler ile deriden gen transferinin araştırılması, Doktora tezi; İstanbul, Marmara üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü; 229.
- Sümer, S., 2006. Genel mikoloji, Nobel Basımevi, Ankara.
- Thanou, M., Verhoef, J.C., Romeijn, S.G., Nagelkerke, J.F., Merkus, F.W.H.M and Junginger H.E., 1999. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics*, 185, 73–82
- Ting, D.R. and Shen, Y. 2005. Antibacterial finishing with chitosan derivatives and their Nanoparticles. *International Journal of Dyeing Finishing*. 14, 12–14.
- Tortora, GJ., Funke, B.R. and Case C.L., 2004. *Microbiology an introduction*. 8th Ed. International Journal of Pearson and Benjamin Cummings Publishing.
- Tümbay, E., 1999. Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflandırılması. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Günes Kitabevi; s.1015-1021.
- Ueno, H., Yamada H., Tanaka, W., Kaba, N., Matsuura, M., Okumura, M., Kadosawa T. and Fujinaga T., 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *International Journal of Biomaterials*, 20,1407-1414.
- Varum, K.M., Ottøy, M.H. and Smidsrod O., 2001. Acid hydrolysis of chitosans. *International Journal of Carbohyd. Polym.* 46,89-98.
- Vetvicka, V., 2001. b-glucans as immunomodulators. *International Journal of JANA*; 3, 4-7.
- Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Jato, J.L.V. and Alonso M.J., 2004. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 123–131.
- Vilchez, S., Jovancic, P., Manich, A.M., Julia M.R. and Erra P., 2005, Chitosan Application on Wool Before Enzymatic Treatment, *Journal of Applied Polymer Science*,98, 1938-1946.
- Wang, X., Strand, S.P., Du, Y. and Varum K.M., 2010. Chitosan-DNA-rectorite nanocomposites: Effect of chitosan chain length and glycosylation. *International Journal of Carbohydr Polym.* 79, 590–596.

- Webster, J. and Weber R., 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, New York, widely consumed in Italy. International Journal of Food Chem. 73, 321-325.
- White, S.A., P.R, Farina. and Fulton I., 1979. Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*. International Journal of Applied and Environmental Microbiol., 38, 323-328.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S and Sams C.E., 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. International Journal of Agric Food Chem. 53, 3888–3894.
- Wu, Z.Y., Chen, Z. and Huang U., 2005. The conditions and sign if the preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation. Journal of Nantong University (Medical Sciences), 25, 20–22.
- Yen, M.T. and Mau, J.L. 2007, Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. International Journal of LWT–Food Sci. Technol. 40, 472–479.
- Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau J.L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. International Journal of Carbohydr. Polym, 75, 15–21.
- Zhang, H., Wu, S., Tao, Yi, Zang, L. and Su, Z., 2010, Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. Journal of Nanomaterials, 898910.

ÖZGEÇMİŞ

1984'de İran'da Ardebil şehrinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Ardebil ilinde bitirdi. 2002-2003 yılında Ardebil Azad üniversitesinin Deneysel Bilimler öğretmenliği bölümünü kazandı. Lisans dönemini iyi notlarla 2007 yılında bitirdi. 2008-2009 yılında yüksek lisansa devam etti ve bir kaç yayın, ISI dergilerde, ulusal ve uluslararası konferanslarda yayınladı. 2011 yılında yüksek lisansını bölüm ikincisi olarak tamamladı. 2012 yılında Peyamnur Üniversitesinde Öğretim Elemanı olarak çalıştı. 2012'de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanomalzeme Bilim Dalı'nda Doktora programına yerleşti ve halen bu programda doktora öğrencisi olarak devam etmektedir.