

Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi

Chitosan and its antimicrobial activity

Kamil Bostan, Tuba Aldemir, Ali Aydın

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim / Correspondence: Kamil Bostan Adres / Address: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 34320, Avcılar, İstanbul Tel: 0212 473 70 70/17185 Fax: 0212 473 72 41 E-mail: bostank@istanbul.edu.tr

ÖZET

Kimyasal koruyucu madde içermeyen gıda maddelerine olan talep yeni doğal katkı maddelerinin araştırılmasını teşvik etmiştir. Bunlardan birisi olan kitosan, çok geniş bir uygulama alanı olması nedeniyle son zamanlarda ilgi odağı haline gelmiştir. Kitosan, kitinden deasetilasyon yoluyla elde edilir. Bir aminopolisakkarit olan kitin ise kabuklu deniz ürünlerinin kabuklarında bulunur. Kitosan sindirim yoluyla alındığında bitkisel diyetetik lifler gibi işlev görebilir. Gıda endüstrisinde ise başta gıda maddelerinin kalitesinin ve raf ömrünün artırılması olmak üzere çeşitli uygulama alanlarına sahiptir. Gıda maddelerinin raf ömrünün uzatılmasında kitosanın antimikrobiyal etkisinin önemli bir rolü vardır. Yapılan çalışmalarda kitosanın çoğu mikroorganizmanın gelişimini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Bu makalede kitosanın antimikrobiyal etkisi ve çeşitli gıda uygulamaları özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, kabuklu deniz ürünleri, kitosan

SUMMARY

The growing consumer demand for foods without chemical preservatives has focused efforts in the discovery of new natural additives. Chitosan, which is one of these, have been of interest in the past few decades due to their potential broad range of industrial applications. Chitosan is obtained from chitin by a deacetylation process. Chitin is an aminopolysaccharide that comes from the shells of shellfish. Deacetylated chitin, or chitosan, is comprised of chains of D-glucosamine. When ingested, chitosan can be considered a dietary fibre. These biopolymers offer a wide range of unique applications such as enhancing of quality and storability of foodstuffs. The antimicrobial activity of chitosan has an important role in increasing of shelf-life of foods. Various studies showed that chitosan prevents microbial activity, targeting the different groups of microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts This review summarizes the antimicrobial activity and food applications of chitosan.

Key words : Antimicrobial activity, chitosan, shellfish

GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri genel anlamda tek başına gıda olmayan, gıda maddesinin yapısında doğal olarak bulunmayan ancak gıdalara üretim, işleme, depolama veya ambalajlama gibi aşamalarda gıda maddesinin tat, koku, görünüm, yapı ve diğer niteliklerini düzeltmek, kalitesini uzun süre muhafaza etmek, besleyici değerini korumak, raf ömrünü artırmak, güvenli hale getirmek gibi amaçlarla katılan madde veya madde karışımlarıdır. Gıda üreticileri bu ve benzeri amaçlarla izin verilen, bazı hallerde izin verilmeyen oranlarda ve çeşitlilikte katkı maddesi kullanmaktadırlar. Gerçekten de katkı maddesi kullanılması durumunda ürünün istenen özelliklerinde önemli dü-

zeyde iyileşme sağlanmakta, raf ömründe belirgin bir artış elde edilmektedir. Bu sayede ürünün piyasadaki rekabet şansı artmakta ve bozulmalardan dolayı ekonomik kayıplar azalmaktadır. Diğer taraftan katkı maddesi kullanılarak düşük kaliteli hammaddelerden ürün üretmek söz konusu olduğundan tüketicinin aldatılmasına; daha da önemlisi izin verilen limitlerin üzerinde veya izinsiz kullanımlarda tüketicinin sağlığının bozulmasına yol açılabilmektedir. Özellikle yapay nitelik taşıyan katkı maddelerinin bazılarının sonradan yan etkileri belirlendiğinden izin verilen kullanım miktarları azaltılmış veya kullanımı yasaklanmıştır. Bu nedenlerle son yıllarda gıda üretiminde yapay yerine toksik olmadığı bilinen doğal kay-

naklardan elde edilmiş katkı maddeleri tercih edilmekte ve her geçen bunlara yenileri eklenmektedir. Gıda katkı maddeleri arasında antimikrobiyal etkili olanlar ayrı bir öneme sahiptir. Doğal antimikrobiyal maddelerle ilgili ilk çalışmalar sarımsak, kırmızı biber, kekik, tarçın, karanfil vb belli bitki ekstraktları ile gerçekleştirilmiştir. Bunların çoğuyla ilgili laboratuvar koşullarında başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak bunların katıldıkları gıda maddelerinde laboratuvar şartlarındaki kadar etkili olmamaları, fazla miktarlarda katıldıklarında ise gıda maddelerinde istenmeyen lezzet ve aroma oluşumlarına sebep olmaları gibi çeşitli olumsuzlukları tespit edildiğinden kullanımları sınırlı kalmıştır. Yeni nesil katkı maddeleri arasında yer alan kitosan, günümüzde üzerinde araştırmalar yapılan önemli bir katkı maddesi olmuştur. Bakteri, mantar ve maya gibi farklı mikroorganizma gruplarına karşı antimikrobiyal etkiye sahip olması ve diğer birçok fonksiyonel özellikleri nedeniyle dikkat çekmiş ve gıda endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır (1).

Kitosanın tanımı, özellikleri ve kullanım alanları

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb bulunan doğal bir polisakkarit olan kitin'den kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen ve doğada selulozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir (2, 3).

Kitosan üretiminde kullanılacak su ürünlerinin kabukları öncelikle kum ve diğer yabancı maddelerinden iyice yıkanmak suretiyle arındırılır. Daha sonra kabuk üzerinde kalmış doku kalıntılarının uzaklaştırılması için deproteinizasyon işlemi uygulanır. Bu amaçla kabuklar % 3 NaOH ile 30 dakika kadar kaynatılır; süre sonunda soğutulur ve hiçbir alkali kalıntısı kalmayacak şekilde su ile iyice durulanır. Bir sonraki işlem demineralizasyon olup kabukların 30 dakika süreyle % 3 HCl ile muamele edilmesinden ibarettir. Bu işlemi takiben kabuklar iyice yıkanır ve ar-

dından su oranı % 6'ın altına düşecek şekilde preslenir. Bu şekilde kitin elde edilmiş olur. Kitin, asıl işlem olan deasetilasyon amacıyla kostik soda içinde 90-95°C' de 1.5 saat kadar ısıtılır; süzdürülür ve sonradan alkali kalmayacak şekilde iyice yıkanır. Fazla su preslenerek uzaklaştırılır. Bu aşamada kitosanın yaş formu elde edilmiş olur. Yaş kitosan nem oranı % 5'in altında olacak şekilde güneşte kurutulur veya bir kurutucu içinde bekletilir. İnce tabakalar halinde elde edilen kitosan toz haline getirilir ve paketlenir. Kuru ortamda 3 ay kadar saklanır. 1000 gram kuru kabuktan yaklaşık 140 gram kitin (% 14), 100 gram kitosan (% 10) elde edilebilmektedir. Ticari olarak pazarlanan kitosanların asetilasyon derecesi % 70' in üzerinde olup molekül ağırlıkları 100 000 ile 1.2 million Da arasında değişmektedir (3, 4).

Bir polisakkarit olan kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukoz (N-asetil glukozamin)'dan oluşmaktadır. Kitinin düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan ise (1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin) olarak bilinmektedir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-2, C-3 ve C-6 pozisyonlarında birinci ve ikinci hidroksil gruplarında birer amino grubu bulunmaktadır (3).

Beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olan kitosan sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Buna karşın bazı bakteriler tarafından parçalanır. Suda çözünmez. Sadece asidik çözücülerde (<6.0 pH) çözünür. Çözündürmek için asetik, formik, laktik gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir (5).

Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik,

tıp, tarım gibi çeşitli endüstrilerde sınırsız kullanım alanlarına sahiptir. Kitosanın bu fonksiyonlarında pozitif iyonik tabiata sahip olmasının önemli bir rolü vardır. Benzer fonksiyonları nedeniyle gıda endüstrisinde de kitosandan yararlanılmaktadır. Kitosan son yıllarda adından sıkça bahsedilen diyetetik yardımcı maddeler arasında yer almaktadır. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği vb nedenlerle bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir ve canlı organizmada benzer etkiler oluşturmaktadır. Bağırsak hareketlerinin ve sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesi, bağırsak mikroflorasının (bifidobakterilerin) desteklenmesi, kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi (LDL kolesterolün düşürülmesi, HDL kolesterolün artırılması), kan basıncının düşürülmesi, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi fonksiyonel etkilerinin yanı sıra sindirim yoluyla alındığında yağ emilimini azaltarak (pozitif yüklü bir bileşik olmasından dolayı negatif yüklü olan yağ asitlerine bağlanarak) kilo kaybını desteklemesi oldukça ilgi çekmiştir (6-10).

Japonya'da ve Avrupa'da ticari olarak üretilen kitosan uzun yıllardır bu amaçla pazara sunulmaktadır. Taşıdıkları güçlü pozitif yüklerden dolayı kitosanın uzun zincirli moleküllerinin sıvılardaki katı partikülleri sararak çöktürmesi özelliği nedeniyle şarap, meyve suyu, bira gibi içeceklerde bulanıklığı gidermek için etkili bir ajan olarak görev yapabilmektedir (11, 12).

Aynı özelliği nedeniyle atık suların arıtılmasında polikationik bir çöktürücü olarak da işlev görmektedir. Özellikle gıda işletmelerindeki atık suların proteinlerin, yağların ve metal iyonlarının arıtılmasında oldukça etkili olabilmektedir (13).

Ancak kitosanın gıda teknolojisindeki en önemli kullanım şekli film halinde bilhassa sebze ve meyvelerin kalitelerinin korunması ve depolama süresinin artırılması olmuştur. Yarı geçirgen özellikteki kitosan filminin sert, dayanıklı, esnek ve kolayca yırtılmayan bir materyal olması önemli

avantajları olarak değerlendirilmektedir ve bu özellikleri çoğu ticari polimerle karşılaştırılabilir niteliktedir. Gıdaların kitosan filmi ile kaplanması ambalaj içindeki kısmi oksijen basıncının azaltmakta, gıda ile çevresi arasındaki nem transferi ile sıcaklığı kontrol altında tutmakta; su kaybını azaltmakta, meyvelerde enzimatik kahverengileşmeyi geciktirmekte, solunumu kontrol etmekte; meyvelerde olgunlaşmayı geciktirmekte vb etkiler göstermektedir (14-16).

Bunlara ilave olarak doğal aromanın artırılması, tekstürün ayarlanması, emülsifiye edici etkinin artırılması, rengin stabilizasyonu, deasidifikasyon gibi konularda da kitosandan yararlanılmaktadır (1).

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi

Gıda maddelerinin muhafazası ve raf ömrünün artırılmasında da bir alternatif olarak kitosandan yararlanılabileceği çeşitli kaynaklarda yer almıştır. Burada en önemli etki kitosanın antimikrobiyal aktivite göstermesinden ileri gelmektedir. Bu etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte pozitif yüklü kitosan moleküllerinin negatif yüklü hücre membranına bağlanarak fonksiyonunu bozması; intrasellüler içeriğin dışarı sızmasını teşvik etmesi ve aynı zamanda besin elementlerinin hücreye transportunun inhibe edilmesi; şelat yapıcı bir ajan olarak rol oynayarak iz elementlere bağlanması ve bu suretle mikrobiyel gelişme ile toksin üretiminin inhibe edilmesi; suyu bağlayarak enzimleri inhibe etmesi; DNA ile bağlanması ve mRNA sentezini engelleyerek üremenin durdurulması gibi çeşitli teoriler ileri sürülmüştür (1, 4, 17-20). Muzzarelli ve ark. (21) kitosana (N-Carboxybutyl) maruz bırakılan mikroorganizmalarda belirgin morfolojik değişimlerin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Helander ve ark. (19) da elektron mikroskobu ile yaptığı incelemede kitosanın hücrenin dış membranını ağ gibi sardığını ve hücrenin dış yüzeyinde hasarlar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Kitosanın antimikrobiyal etkinliği molekül ağırlığı, asetilasyon derecesi, sıcaklık, pH gibi faktörlerden az veya çok etkilenmektedir (4, 19, 20, 22-30).

Kitosanın patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından ele alınmıştır. Wang (30), yaptıkları in vitro çalışmada kitosanın %1-1,5 gibi yüksek konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus*, % 0,5-1 konsantrasyonlarda *Escherichia coli* üzerinde tam inhibisyon oluşturduğunu bildirmiştir. Zheng ve Zhu (31) kullanılan kitosanın molekül ağırlığı arttıkça Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkisinin arttığını; bunun sebebinin de yüksek molekül ağırlığına sahip kitosanın film tabakası oluşturarak bakterinin besin almasını engellemesi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar tam tersine molekül ağırlığı azaldıkça Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* için antimikrobiyal etkisinin arttığını ve bunun da düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın hücre duvarından daha kolay geçerek hücre metabolizmasını bozmasından ileri geldiğini iddia etmişlerdir. Ayrıca kitosan konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinin kuvvetlendiğini; % 1.0 konsantrasyonunda hem *E. coli* hem de *S. aureus* için % 100 inhibisyon oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşın Darmadji ve Izumimoto (32) *E. coli*'nin üremesini durdurmak için daha yüksek konsantrasyonlara gerek duyulduğunu rapor etmiştir. Jumaa ve ark. (24) iki farklı tip kitosanın (Tip I: molekül ağırlık 8.7×10^4 g/mol, deasetilasyon derecesi % 92 ve viskozite 14 mPa; Tip II: molekül ağırlık 5.32×10^5 g/mol, deasetilasyon derecesi % 73 ve viskozite 461 mPa) antimikrobiyal aktivitesini karşılaştırmış ve düşük molekül ağırlıklı, düşük viskoziteli ve yüksek deasetilasyon derecesine sahip olanın daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Jeon ve ark. (23) da kitosanın molekül ağırlığının bakterilerin inhibisyonunda önemli bir faktör olduğunu, etkili bir inhibisyon için molekül ağırlığının 10.000 Da ve üzerinde olması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Tsai ve ark. (29) da pH değeri 6.0 olan bir ortamda yaptıkları çalışmada kitosanın deasetilasyon derecesi arttıkça antimikrobiyal aktivitenin de arttığını bildirmişlerdir. Gerasimenko ve ark. (22), düşük molekül ağırlığına sahip % 85 deasetilas-

yon dereceli, düşük molekül ağırlıklı kitosanların *S. aureus* ve *E. coli* gibi hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin üremelerini baskıladıklarını saptamışlardır. Devlieghere ve ark. (33) ise 43 kDa molekül ağırlıklı ve % 94 deasetilasyon dereceli kitosana karşı çalıştıkları bakteriler arasında Gram negatif olanların daha duyarlı olduğunu, Gram pozitif olan bakterilerin değişen derecelerde duyarlılık gösterdiklerini gözlemişlerdir. Omura ve ark. (34) ise Gram pozitif olanlar için minimum inhibe edici kitosan konsantrasyonunun Gram negatif olanlardan daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Jeon ve ark. (23) tarafından Gram negatif ile karşılaştırıldığında kitosanın Gram pozitif olanlara karşı daha etkili inhibisyon oluşturduğu bildirilmiş; *E. coli*, *E. coli* O 157, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* gibi çoğu bakteriler için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri % 0.1'in altında bulunmuş, aynı değer *Pseudomonas aeruginosa* için % 0.25 olarak belirlenmiştir. No ve ark. (26) farklı molekül ağırlıklı kitosanların antimikrobiyal etkinliğini dört Gram negatif bakteri (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus*) ve yedi Gram pozitif bakteri için (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* ve *L. bulgaricus*) araştırmışlardır. Bu çalışmada kitosanın test edilen bakterilerin çoğunun üremesini engellediği, % 0.1 konsantrasyonunda Gram pozitif olanlara karşı Gram negatif olanların daha güçlü bakterisidal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Choi ve ark. (35) ağız patojenleri üzerinde yaptıkları çalışmada % 0.1'lik kitosan konsantrasyonunun *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sayısında 120 dakikada 4.5 log kob/ml; *Streptococcus mutans* sayısında 0.5 log kob/ml düzeyinde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. No ve ark. (26) çözücü olarak asetik asit (% 1) kullanıldığında laktik asit bakterileri hariç test edilen bakterilerin çoğunun üremesinin inhibe edildiğini, laktik asit bakterilerinin çözücü olarak laktik asit veya formik asit kullanıldığında baskılandığını bildirmişlerdir. Ay-

nı araştırmacılar kitosanın etkinliğini pH 4.5-5.9 arasında da test etmişler ve daha düşük pH değerinde daha yüksek aktivite saptamışlardır. Jumaa ve ark. (24) da kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin *P. aeruginosa* için pH 5.0-5.1'de *S. aureus* için pH 5.3'de optimum olduğunu bildirmişlerdir. Azalan pH ile kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin artmasının pH 6.0 ve altında altında kitosanın amino gruplarının iyonize olması ve pozitif yük taşımasıyla ilişkisi vardır (25).

Pranoto ve ark. (36) ise değişik koruyucu maddelerle kombine ederek hazırladıkları kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkinliğini *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* üzerinde araştırmışlar ve 100 mg/g seviyesinde sarımsak yağı, 100 mg/g seviyesinde potasyum sorbat ve 51,000 IU/g seviyesinde nisin ile karıştırılarak hazırlanan kitosan filmlerinin antimikrobiyal etkinliğinin filmlerin fiziksel özelliğinde bir değişiklik olmaksızın arttığını bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, Lee ve ark. (37) antimikrobiyal ajan içeren ambalaj materyalinin süt ve portakal suyunun mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla karton ambalaj malzemesi antimikrobiyal ajan olarak nisin ve/veya kitosan içeren vinyl acetate ethylene copolymer ile kaplanmıştır. Daha sonra taze sıkılmış portakal suyu ile pastörize süt örnekleri karton ambalaj materyali ile temas edecek şekilde cam kaplar içine alınmış ve farklı sıcaklıklarda muhafaza edilmiştir. Muhafaza periyodu sırasında yapılan analizler sonucunda düşük sıcaklıklarda (3°C ve 10°C) saklanan ürünlerde mikrobiyal üremenin önemli derecede baskılandığını; buna karşın 20°C'de saklanan ürünlerde önemli bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar nisin ile kitosanın birlikte kullanılması durumunda ise mikrobiyel inhibisyon açısından daha iyi netice alındığını rapor etmişlerdir.

Bakteriler kadar küf ve mayalar da kitosandan etkilenmektedir. Çoğu küf türlerinin % 1.0'ın altındaki kitosana hassas oldukları, buna karşılık *Aspergillus flavus* gibi türlerin ise %1'in üstünde

konsantrasyonlarda bile kitosana karşı dirençli oldukları rapor edilmiştir (4). Fang ve ark. (38) ise ortama (pH 5.4) 0.1-5 mg/ml. kitosan ilavesinin *Aspergillus niger*'in üremesini durdurduğunu; fakat 2 mg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda *A. flavus*'un üremesini ve aflatoksin üretimini inhibe etmede etkisiz olduğu sonucuna varmışlardır. Cuero ve ark. (18) da kitosanın (N-carboxymethyl) *A. flavus* ve *A. parasiticus* üremesini yarı yarıya; bu küflerin toksin üretimini ise % 90'ın üzerinde bir oranda azalttığını rapor etmişlerdir. Park ve ark. (39) da kitosanın küfler (*Cladosporium* sp. ve *Rhizopus* sp.) üzerine etkisini hem çileklerde hem de in vitro olarak araştırmışlardır. Yapılan çalışmada kitosan (% 2) ile kaplamanın küf üremesini kontrol altında tuttuğunu ve bu nedenle meyvelerin raf ömrünü artırmak için kullanılabileceğini; kitosan ile potasyum sorbat (% 0.3) beraber kullanıldığında in vitro testlerde kombine bir inhibisyon aktivitesi görülmesine rağmen taze çileklerde böyle bir etkinin görülmediğini; kitosan uygulamasının sadece küf üremesini değil depolama sırasında aerop mezofil toplam bakteri ve koliform sayısını da azalttığını bildirmişlerdir. Tsai ve ark. (29) kitosanın mantarlar üzerine etkisinin bakterilerden daha düşük olduğunu; yüksek deasetilasyon dereceli kitosanın minimal letal konsantrasyonunun *B. cereus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, ve *V. parahaemolyticus* gibi bakteriler için 50-200 ppm iken *Candida albicans* ve *Fusarium oxysporum* için sırasıyla 200 ppm. ve 500 ppm olarak belirlendiğini, buna karşın 2000 ppm konsantrasyonunda bile *Aspergillus fumigatus* ve *A. parasiticus*'a karşı antifungal aktivitenin görülmediğini rapor etmişlerdir. Roller ve Covill (40) kitosanın gıda bozulmalarından sorumlu 7 küf türüne karşı antimikrobiyal özelliğini besi ortamında araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada 1 g/l konsantrasyonundaki kitosanın *Mucor racemosus* üremesini yavaşlattığı; 5 g/l'lik konsantrasyonun *Byssoschlamys* üremesini tamamen engellediği, buna karşın bazı flementöz küf türlerinin 10 g/l

konsantrasyonunda bile kitosana karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kitosanın elma suyundaki mayalara karşı etkisi de incelenmiştir. Elma suyundaki kitosan (0.1-5 g/l) varlığının 25°C'de incelenen bozulma yapıcı maya türlerinin hepsinin üremesini inhibe ettiği; incelenen mayalar arasında en duyarlısının *Zygosaccharomyces bailii* en dayanıklısının *Saccharomyces ludwigii* olduğu rapor edilmiştir. Buna karşın Sagoo ve ark. (41) kitosanın mayalar üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında % 0.05 konsantrasyonunda *Saccharomyces ludwigii* sayısında önemli redüksiyon sağladığını; *Torulospira delbrueckii*'nin ise test edilen en yüksek konsantrasyona (% 0.5) dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Ayna araştırmacıların benzer bir çalışmasında (42) kitosanın *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces ludwigii* ve *Torulospira delbrueckii* gibi mayalara karşı sodyum benzoattan daha etkili olduğunu; birlikte kullanıldıklarında ise etkinin daha da arttığını rapor etmişlerdir. Savard ve ark. (43) *Saccharomyces unisporus*'un üremesini inhibe etmek için 1 g/l konsantrasyonunda kitosan yeterli olurken *Saccharomyces bayanus* için 5 g/l konsantrasyonunda kitosan gerektiğini bildirmişlerdir. Jung ve ark. (44), 5.75 pH'da yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkisinin yüksek olduğunu belirtmişler; buna sebep olarak da mantar ve graft kopolimerleri arasındaki özel etkileşimi göstermişlerdir. Gerasimenko ve ark. (22), *Candida albicans*'ın kitosana karşı oldukça duyarlı olmasına karşın *Candida kruisei*'nin dirençli olduğunu; bunun da kitosanın mantarlar üzerine olan antimikrobiyal etkisinin türe özel olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Devlieghere ve ark. (33), kitosanın antimikrobiyal aktivitesine gıda bileşenlerinin (nişasta, peynir altı suyu, NaCl ve yağ) etkisini *Candida lambica* ile inoküle edilmiş ortamda incelemişler; yağ hariç diğerlerinin aktiviteyi olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır. Kenawy ve ark. (45), amino gruplarına vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, p-chlorobenzaldehyde, anisaldehyde, methyl 4-hydroxybenzoate, methyl

2,4-dihydroxybenzoate, propyl 3,4,5-trihydroxybenzoate ve 2-hydroxymethylbenzoate gibi biyolojik aktif maddeler bağlayarak elde ettiği modifiye kitosanların *Candida albicans* SC5314, *A. flavus* ve *Fusarium oxysporium* şuslarına karşı test edilen bakterilerden (*B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus*) daha aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Kitosanın gıda uygulamalarındaki antimikrobiyal etkinliği

Kitosanın antimikrobiyal etkinliği bizzat gıda maddelerinde de denenmiştir. Et ve et ürünleri bu kapsamda en çok çalışılan grubu oluşturmuştur ve bunlarda kitosanın mikrobiyal üremenin engellenmesi veya mikroorganizmaların neden olduğu bozulmaların geciktirilmesi ile ilgili etkinliği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Sagoo ve ark. (41) % 0.3-0.6 konsantrasyonlarında domuz eti kıymasına katılan kitosanın 4°C'de yapılan muhafazanın ilk günü içinde toplam aerob mezofil mikroorganizma, küf-maya ve laktik asit bakteri sayısında 3 log kob/g azalmaya yol açtığını; mikroorganizma sayısının 18 günlük muhafaza periyodu boyunca kitosan içermeyen kontrol grubunda diğerlerinden daima daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer bulgular % 1.0 konsantrasyonundaki kitosan solüsyonlarına daldırılmış domuz sosislerinde de görülmüş ve mikroorganizma sayılarında 7°C'de 18 gün yapılan muhafaza sonunda 1-3 log kob/g azalma kaydedilmiştir. Youn ve ark. (46) ise baharat katılmış etlerle yaptıkları çalışmada % 0.1'den yüksek konsantrasyonlarda kitosanın raf ömrünü arttırdığı ve oksidasyonda belirgin bir azalmaya neden olduğu sonucuna varmışlardır. Darmadji ve Izumimuto (32), kitosanın % 0.5-1.0'lik konsantrasyonlarının köftelerde *B. subtilis*, *Pseudomonas* gibi bozulma yapıcı bakterilerin sayısını 1-2 log azalttığını ve kokuşmayı yavaşlattığını bildirmişlerdir. Bu çalışma % 0.1'in üzerindeki konsantrasyonlarda ise *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Micrococcus varians* gibi fermente et ürünlerinde önemli kültür bakterilerinin de üremelerinin engellediğine işaret edilmiştir. Roller ve ark. (47) kitosanın domuz sosislerinin mikrobiyolojik kalite

tesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, % 1.0 konsantrasyonunda kitosan ilave edilmiş sosislerde 7°C'de 18 günlük muhafaza periyodu sonunda toplam bakteri, küf-maya ve laktik asit bakterileri sayısında 1-3 log kob/g azalma görüldüğünü, daha düşük konsantrasyonda (% 0.5) ise etkinin olmadığını rapor etmişlerdir. Zivanovic ve ark. (48) kitosan filmlerini hem tek başına hem de kekik yağı ile birlikte *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş bologna adı verilen et ürününde denemişlerdir. Filmle kaplanan ürünler 10°C'da 5 gün muhafaza edilmiştir. Muhafazanın sonunda yapılan mikrobiyolojik analizlerde kitosan filminin *L. monocytogenes* sayısını 2 log kadar; % 1 ve % 2 kekik esansiyel yağı içeren kitosan filmlerinin ise 3.6 ve 4 log kadar azalttığı saptanmıştır. Tsai ve ark. (29) kitosanın etkisini balık etleri üzerinde araştırmışlardır. Yapılan çalışmada balık fletolarının % 1 kitosan (yüksek deasetilasyon derecesine sahip) ile muamelesinin uçucu bazik nitrojen içeriğindeki artışı geciktirdiği; mezofil, psikrotrof, koliform, *Aeromonas* ve *Vibrio* üremesini yavaşlattığı; raf ömrünü 5 günden 9 güne uzattığı sonucuna varmışlardır. Taha ve Swailam (28) kitosan ile (% 0.04) *Aeromonas hydrophila*'nın üremesinin ve hemolizin üretiminin baskılandığını; baskılayıcı etkinin artan sıcaklık ve azalan pH ile arttığını saptamışlardır.

Kitosanın depolama sırasındaki koruyucu etkisi meyve ve sebzelerde de çalışılmıştır. El Ghaouth ve ark. (49) çilekler üzerinde yaptığı çalışmada kitosan ile kaplamanın (15 mg/mL) küf üremesinin ve bunlardan ileri gelen çürümenin önemli derecede geciktirildiğini rapor etmişlerdir. Chien ve ark. (50) ise dilimlenmiş mangonun kalitesi ve raf ömrü üzerine yenilebilir kitosan ile kaplamanın etkisini araştırmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda kitosan solüsyonları ile (% 0, 0.5, 1.0 ve 2.0) muamele edilen dilimlenmiş meyveler PVCD ile kaplandıktan sonra 25°C'de muhafaza edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda kitosanın su kaybını geciktirmesi ve duyu kalitesini korumasının yanı sıra mikroorganizma gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. Savage ve Sava-

ge (51) kitosan ile kaplanmış elmalarda 12 haftalık depolama periyodunda küflenme oranını azalttığını bildirmişlerdir. Cheah ve Page (52) % 2-4 kitosan ile kaplanan havuçlarda çürüme oranının önemli derecede azaldığını (% 88'den % 28'e) saptamışlardır. Du ve ark. (53) şeftali, armut, kiwi gibi meyvelerin saklanması sırasında kitosan ile kaplamanın benzer yararlarını gözlemlemişlerdir.

Oh ve ark. (54) kitosanın antimikrobiyal etkisini deneysel olarak kontamine edilmiş mayonezlerde araştırmışlar; 25°C'de *Lactobacillus fructivorans* ve *Zygosaccharomyces bailii* sayısını önemli derece azalttığını saptamışlar ve bu nedenle mayonezde bozulma yapıcı mikroorganizmaların üremesini inhibe etmek için bir koruyucu olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Mayonezle ilgili bir başka çalışma Roller ve Covill (27) tarafından gerçekleştirilmiştir. Asetik asit (% 0.16) veya limon suyu (% 1.2 ve % 2.6) ile kombinasyon halinde kitosan (3 g/l) ilave edilerek hazırlanan mayonezlere deneysel olarak *S. enteritidis*, *Z. bailii* ve *Lactobacillus fructivorans* inoküle edilmiştir. İki farklı sıcaklıkta (5 ve 25°C) 8 gün süreyle yapılan depolama sırasında asetik asit ve kitosan içeren mayonezlerde *L. fructivorans* ve *Z. bailii* üremesinin baskılandığı; *S. enteritidis* sayılarında ise önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. Limon suyu ve kitosan içeren örneklerde ise önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Aynı çalışmada 5°C'de depolanan ve kitosan ile kaplanmış (9 mg/g) karideslerde bozulma yapıcı mikroorganizma sayısının önemli derecede azaldığı; ancak 25°C'de muhafaza edilen örneklerde ise kitosanın bir koruyucu madde olarak etkili olmadığı da bildirilmiştir. Araştırmacılar kitosanın asetik asit ve soğuk depolama ile kombine edildiğinde bir koruyucu olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Kitosanın denendiği bir başka ürün pizza olmuştur. Rodriguez ve ark. (55) pizzalarda kitosanın hem yenilebilir film olarak hem de bir hamur ingredientisi olarak kullanıldığında antifungal kapasitesini araştırmışlardır. Yenilebilir film şeklinde

kitosan kullanımının (0.079 g/100 g pizza) *Alternaria*, *Penicilliu* ve *Cladosporium* üremesini yavaşlattığını, *Aspergillus* üzerine aynı derecede etki göstermediğini ve kitosanın hamur içine ilave edildiğinde ise hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Bira üretiminde laktik asit bakterilerin gelişimi bozulmalara neden olduğundan arzu edilmemektedir. Gil ve ark (56) bira üretimi sırasında izole ettikleri dört laktik asit bakterisinin gelişiminin inhibisyonu için 0.1 g/L kitosanın yeterli olduğunu; bira üretiminde kullanılan yedi farklı maya türü için 1.0 g/L kitosan gerektiğini saptamışlardır. Araştırmacılar kitosanı bira üretiminde de denemişler, 0.1 g konsantrasyonunda kullanıldığında mayaların canlılığını ve fermantasyonu etkilemeksizin bakteriyel üremeyi inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Gıda maddelerinin uzun süre bozulmadan muhafaza edilmesi ve bu esnada kalitelerini korumaları günümüzde hala katkı maddesi kullanımı ile başarılabilir. Ancak kullanılan katkı maddelerinden birçoğunun tüketici sağlığına olumsuz etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Buna alternatif olarak da zararlı etkisinin olmadığı bilinen bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde doğal koruyucu maddeler önerilmiş, hatta bunlardan bazıları ticari olarak üretilip piyasaya sürülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda bunlardan bazılarının iddia edildiği gibi beklenen performansı göstermediği sonradan anlaşılmıştır. Makale içinde de ifade edildiği gibi çok yönlü kullanım alanına sahip olan kitosanın çok çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ve gıda maddelerin raf ömrünü artırdığı çeşitli bilimsel çalışmalarda ifade edilmiştir. Bununla birlikte konunun daha çok araştırılmasında fayda vardır. Özellikle et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine kitosanın etkisi yapılacak çalışmalarla bu anlamdaki açığı kapatacaktır. İddia edildiği gibi bu üründe istenen etkiyi gösterirse et teknolojisinde koruyucu katkı maddesi kullanımı ile ilgili sorunun çözülmesine önemli katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci Tech 1999; 10: 37-51.
2. Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. Glycoconjugate Journal 1997; 14: 535-542.
3. Terbojevich M, Muzarelli RA A. Chitosan. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press., 2000.
4. Roller S. Chitosan: New food preservative or laboratory curiosity. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press., 2003.
5. No HK, Kim SH, Lee SH, Park NY, Lee SH, Prinyawiwatku W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. Carbonhy Polym 2006; 65: 174-178.
6. Han LK, Kimura Y, Okuda H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999; 23: 174-179.
7. Lee JK, Kim SU, Kim JH. Modification of chitosan to improve its hypocholesterolemic capacity. Biosci Biotechnol Biochem 1999; 63: 833-839.
8. Pittler MH, Abbot NC, Harkness EF, Ernst E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. Eur J Clin Nutr 1999; 53: 379-381.
9. Razdan A, Pettersson D. Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. Br J Nutr 1994; 72: 277-288.
10. Wuolijoki E, Hirvela T, Ylitalo P. Decrease in LDL-cholesterol with microcrystalline chitosan. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1999; 21: 357-361.
11. Chen Y, Li C. Studies on the application of chitosan to clarification of grapefruit Juice. Food Sci Taiwan 1996; 23: 617-628.
12. Soto-Perlata NV, Muller H, Knorr D. Effect of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. J Food Sci 1989; 54: 495-496.
13. Volesky B. Biosorbents for metal recovery. Trends Biotech 1987; 5: 96-99.
14. Butler BL, Vergano PJ, Testin RF, Bunn JN, Wiles JL. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. J Food Sci 1996; 61: 953-955, 961.
15. El Ghaouth A, Arul J, Ponnampalam R, Boulet M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. J. Food Sci., 1991b; 56: 1618-1620.
16. Kittur FS, Kumar KR, Tharanathan RN. Functional packaging properties of chitosan films. Z Lebensm Unters Forsch A 1998; 206: 44-47.
17. Chen C, Liao W, Tsai G. Antibacterial effects of N-Sulfonated and N-Sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J Food Protect 1998; 61: 1124-1128.
18. Cuero RG, Osuji G, Washington A. N-Carboxymethyl

- chitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. *Bio-technol Letters* 1991; 13: 441-444.
19. Helander IM, Nurmiaho-Lassila E-L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 235-244.
20. Sudharshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotech* 1992; 6: 257-272.
21. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2019-2023.
22. Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, Zueva OYu, Varlamov VP. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microb* 2004; 40: 253-257.
23. Jeon Y-J, Park P-J, Kim S-K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym* 2001; 44:11, 71-76.
24. Jumaa M, Furkert FH, Müller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan, *European J Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2002; 53: 115-123.
25. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci* 2001; 79: 1324-1335.
26. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 65-72.
27. Roller S, Covill N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. *J Food Protect* 2000; 63: 202-209.
28. Taha SMA, Swailam HMH. Antibacterial activity of chitosan against *Aeromonas hydrophila*. *Nahrung* 2002; 46: 337-340.
29. Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Sci* 2002; 68: 170-177.
30. Wang GH. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J Food Protect* 1992; 55: 916-919.
31. Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbonhy Polym* 2003; 54: 527-530.
32. Darmadji P, Izumimoto M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Sci* 1994; 38: 243-254.
33. Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol* 2004; 21: 703-714.
34. Omura Y, Shigemoto M, Akiyama T, Saimoto H, Shigemasa Y, Nakamura I, Tsuchido T. Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocont Sci* 2003; 8: 25-30.
35. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimic Agents* 2001; 18: 553-557.
36. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT- Food Sci Technol* 2005; 38: 859-865.
37. Lee CH, Park HJ, Lee DS. Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. *J Food Eng* 2004; 65: 527-531.
38. Fang SW, Li CF, Shih DYC. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low sugar candied kumquat. *J Food Prot* 1994; 56: 136-140.
39. Park SLA, Stan SDB, Daeschel MAA, Zhao YA. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *J Food Sci* 2005; 70: 197-201.
40. Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 67-77.
41. Sagoo S, Board R, Roller S. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *J Food Mic* 2002a; 19: 175-182.
42. Sagoo S, Board R, Roller S. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. *Letters Appl Microbiol* 2002b; 34/3: 168.
43. Savard T, Beaulieu C, Boucher I, Champagne CP. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *J Food Prot* 2002; 65: 828-833.
44. Jung BO, Kim CH, Choi KS, Lee YM, Kim J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J Applied Polymer Sci* 1999; 72: 1713-1719.
45. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Magd AA, Mahmoud Y. Biologically active polymers: Modification and anti-microbial activity of chitosan derivatives. *J Bioact Compat Polym* 2005; 20: 95-111.
46. Youn SK, Her JH, Kim YJ, Choqi JS, Park SM, Ahn DH. Studies on the improvement of shelf-life in spicy beef meat using chitosan. *J Korean Soc Food Nutr* 2004; 33: 207-211.
47. Roller S, Sagoo S, Board R, O'Mahony T, Caplice E, Fitzgerald G, Fogden M, Owen M, Fletcher H. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Sci* 2002; 62: 165-177.
48. Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci* 2005; 70: 45-51.
49. El Ghaouth A, Arul J, Asselin A, Benhamou N. Anti-

fungal activity of chitosan on two post-harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 1992; 82: 398-402.

50. Chien PJ, Sheu F, Yang FH. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf-life of sliced mango fruit. *J Food Eng* 2007; 78: 225-229.

51. Savage PJ, Savage GP. The effect of coating apples on the quality of stored apples. *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* 1994; 19: 129-133.

52. Cheah LH, Page BBC. Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zealand J Crop Hort Sci* 1997; 25: 89-92.

53. Du J, Gemma H, Iwahori S. Effect of chitosan coating

on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit. *J Japan Soc Hort Sci* 1997; 66: 15-22.

54. Oh HI, Kim YJ, Chang EJ, Kim JY. Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 2378-2383.

55. Rodriguez MS, Ramos V, Agullo E. Antimicrobial action of chitosan against spoilage organisms in precooked Pizza. *J Food Sci* 2003; 68: 271-274.

56. Gil G, Del Mónaco S, Cerrutti P, Galvagno M. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts. *Biotechnol Letters*, 2004; 26: 569-574.