T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENİZ ÖRÜMCEKLERİNDEN İLK KEZ KİTİN YAPININ İZOLASYONU VE DETAYLI KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mohammed Munir Shamsan Naji AL-DUBAI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2020

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, yardım ve desteğini her zaman hissettiğim çok kıymetli Danışman hocam Prof. Dr. Murta KAYA'ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca ve bu tez çalışmasında, bana öğretmiş olduğu bilgilerini, tecrübelerini, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım süresince beraber ortak çalışmalar yaptığımız, birbirimizden desteğimizi, bilgilerimizi ve yardımlarımızı esirgemediğimiz grup arkadaşlarım Bahar YILMAZ ve Behlül KOÇ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımını hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Betül ÇAKMAK ve Abdulsalam REDHWAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca her konuda bana güvenen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, büyük sabır gösteren ve bugünlere gelmemi sağlayan aileme çok teşekkür ederim.

Mohammed Munir Shamsan Naji AL-DUBAI

AKSARAY, 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iii
ABSTRACT iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 3
3. MALZEME VE YÖNTEM 7
3.1 Malzeme Temini 7
3.2 Kitin İzolasyonu 7
3.2.1 Demineralizasyon işlemi 7
3.2.2 Deproteinizasyon işlemi 7
3.2.3 Dekolarizasyon işlemi 8
3.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 8
3.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskobu (FT-IR) 8
3.5 Thermogravimetrik Analiz (TGA) 8
3.6 X-Işını Difraktometresi (XRD) 8
3.7 Elemental Analizi (EA) 8
3.8 Kitin İçeriği 9
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMALARI 10
4.1 Kitin İçeriği 10
4.2 FT-IR 11
4.3 TGA 13
4.4 XRD 15
4.5 SEM 17
4.6 Elemental Analizi 18
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 20
KAYNAKLAR 21
EKLER 26
Ek A. *B. abyssorum* bacak kısımlarının üç boyutlu kitini. 26
ÖZGEÇMİŞ 27

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ ÖRÜMCEKLERİNDEN İLK KEZ KİTİN YAPININ İZOLASYONU VE DETAYLI KARAKTERİZASYONU

Mohammed Munir Shamsan Naji AL-DUBAI

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

ÖZET

Selülozdan sonra doğada en bol bulunan biyopolimer olan kitin, biyolojik faaliyetleri, endüstriyel (tekstil, kâğıt yapmak vd.) ve biyomedikal (ilaç ve gen salımı, yara iyileşmesi vd.) uygulamaları nedeniyle ekonomik bir değere sahiptir. Literatürdeki bulunan çalışmalarda deniz örümceklerinden kitin elde edilmesi ile ilgili hiçbir çalışmada bulunmamaktadır. Bu çalışmada, kitinin eklem bacaklılar şubesine ait olan *Pycanogonid littorale* ve *Borenymphon abyssorum* deniz örümceklerinden ilk kez izole edilmiştir. Yapılan çalışmada, asit ve alkali konsantrasyonlarının çeşitli kombinasyonlarını kullanarak *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan kitin izole edilmiştir. Ekstrakte edilen kitin örnekleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını difraktometresi (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elemental analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon sonuçları, deniz örümceklerinden elde edilen kitinlerin de diğer Crustacea sınıfı gibi alfa forma sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak bu çalışma ile ilk kez deniz örümceklerinden kitin elde edilerek detaylı karakterizasyonu yapılmıştır. Kitin içerikleri *P. littorale* için %50.42 ve *B. abyssorum* için %40.23 olarak belirlenmiştir. Bu canlıların kitin içeriği diğer canlılara göre oldukça yüksek olarak kaydedilmiştir. Literatürde böcek ve kabukluların (yengeç, kerevit, ıstakoz) kitin içerikleri genellikle %20 civarında (%10 ila %40) rapor edilmiştir. SEM sonuçları, elde edilen kitinlerin yüzey morfolojisi hem fiberli hem de porlu ve pürüzlü bir yüzeye sahip olduğunu göstermiştir. Elemental analizi sonucu *B. abyssorum* ve *B. abyssorum* %N değerleri (%5.88 ve %6.77) olarak hesaplanmış ve değerlerin birbirine yakın olduğu gösterilmiştir. Elde edilen N değerleri ticari kitinine yakın olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, deniz örümceklerinden elde edilen kitinin gıda, ilaç, atık su arıtımı vb. endüstride alternatif bir kitin kaynağı olarak kullanılabilirliği ön görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deniz Örümceği, Kitin, *Pycnogonum littorale, Boreonymphon abyssorum,* Karakterizasyonu.

Ağustos, 2020; 27 sayfa

M.Sc. THESIS

ISOLATION AND DETAILED CHARACTERIZATION OF CHITIN STRUCTURE FROM SEA SPIDERS FOR THE FIRST TIME

Mohammed Munir Shamsan Naji AL-DUBAI

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA

ABSTRACT

Chitin which is the most found biopolymer in nature after cellulose, has an economic value due to its biological activities, industrial (textil, paper etc.) and biomedical (drug ve gene delivery etc.) applications. There are no studies in the literature on obtaining chitin from sea spiders. In this study, chitin was isolated for the first time from *Pycnogonida littorale* and *Borenymphon abyssorum* belonging to the arthropod phylum. In present study, chitin was isolated from *P. littorale* and *B. abyssorum* using various combinations of acid and alkali concentrations. The samples of the extracted chitin were characterized by Fourier transform ınfrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffractometer (XRD), scanning electron microscope (SEM) and Elemental analysis techniques. These characterization results revealed that chitins from sea spiders have an alpha form as the other Crustacea class. As a result, with this study for the first time, the chitin was obtained from sea spiders and its detailed characterization was determined. The contents of the chitin were determined as 50.42% for *B. littorale* and 40.23% for *B. abyssorum*. The chitin contents of these organisms were recorded to be higher than other organisms. In the literature, chitin contents of insects and crustaceans (crab, crayfish, lobster) are generally reported around 20% (10 to 40%). SEM results showed that the obtained chitins had a surface morphology with a fiber and porous and rough surface. A result of elemental analysis, *B. littorale* and *B. abyssorum* N% values were calculated as 5.88% and 6.77%, respectively and their values were shown to be close to each other. The obtained N values are reported to be close to the commercial chitin. In this study, the chitin isolates that obtained from sea spiders can be used as an alternative source in food, medicine, wastewater treatment etc.

Keywords: Sea Spider, Chitin, *Pycnogonum littorale*, *Boreonymphon abyssorum*, Characterization.

August, 2020; 27 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinin ışık mikroskop görüntüleri: (a) *B. abyssorum* orijinal yapısı (b) *B. abyssorum* üç boyutlu kitini (c) *P. littoral*e orijinal yapısı ve (d) *P. littorale* üç boyutlu kitini..... 10
Şekil 4.2. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum*. 12
Şekil 4.3. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum*. 14
Şekil 4.4. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitinin XRD analizi (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum*. 16
Şekil 4.5. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin SEM Görüntüleri (A)(B)(C) *P. littorale* ve (D)(E)(F) *B. abyssorum*..... 18

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.2. Kitinin FTIR spektrum verileri. 13
Çizelge 4.3. İki tür deniz öneklerinden elde edilen kitinin TG – DTA analizlerinin sonuçları 15
Çizelge 4.6. Asetilasyon (%DA) ve kitin içeriği derecesi ile deniz örümceklerinden elde edilen kitinin element analizi sonucu. 19

SİMGELER VE KISALTMALAR

C	Karbon
cm	Santimetre
CrI	Kristallinite
DA	Asetilasyon Derecesi
EA	Elemental Analizi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H	hidrojen
HCl	Hidroklorik Asit
M	Mol
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Nitrojen
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ºC	Santigrat
Ph	Hidrojen Potansiyeli
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termal Gravimetrik Analizi
XRD	X-ışını Kırınımı Yöntemi
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Kitin, kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen fakat azot içeriğiyle selülozdan ayrılan doğal bir polimerdir (Mohan vd., 2019; Kaya vd., 2015a). β [1,4] bağlı N Asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan kitin; kabuklular, böcekler, mantarlar, yumuşakçalar ve süngerler gibi canlıların yapılarında bulunmaktadır (Mohan vd., 2019). Kitin klasik metotlar kullanılarak demineralizasyon (1-4 saat), deproteinizasyon (16-24 saat) ve dekolorizasyon (1-2 saat) işlemleri ile izole edilmektedir (Kaya vd., 2015a). Kitin ve türevleri; toksik olmayan, biyo-uyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilir, anti-mikrobiyal, anti-oksidan ve adsorpsiyon gibi özellikleri sayesinde tıp, eczacılık, biyoteknoloji, gıda mühendisliği, kozmetik, tekstil, ziraat ve su arıtma gibi alanlarda kullanılmaktadır (Kabalak vd., 2020; Mohan vd., 2019; Kaya vd., 2015a). Literatürdeki bulunan birçok farklı çalışmada karides (Srinivasan vd., 2018), böcek (Ibitoye vd., 2018), mantar (Hassainia vd., 2018) ve alg (Rahman ve Halfar, 2014) gibi canlılardan kitin izole edilerek fiziko-kimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Literatürde kitin üzerinde gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar, kitinin üç alomorfik formda (α-kitin, β-kitin ve γ-kitin) bulunduğunu göstermiştir (Mohan vd., 2019). Karides ve yengeç kaynakları yüksek kitin içeriğinden dolayı ticari olarak en çok kullanılırken bazı mantar, böcekler, süngerler gibi canlıların kitinleri alternatif bir kaynak olarak kullanılabilmektedir (Kaya vd., 2015c).

Deniz örümcekleri (Pycnogonida: Pantopoda) deniz eklem bacaklılara ait küçük bir grup ve tropik alandan kutup bölgelerine, kıyıdan derinliğe kadar dünya çapında bulunmakta ve özellikle kutupsal bentik bölgelerde yaygındır (Sabroux vd., 2017; Ballesteros vd., 2020). Deniz örümceklerinin dünya çapında 1500 türü vardır (Brenneis vd., 2017). Deniz örümcekleri, tipik olarak örümceklere benzemektedir (Sabroux vd., 2017). Çeşitli yapışık (sessile) ve yavaş hareket eden omurgasızların yırtıcıları olarak bilinmektedir. Deniz örümceklerinin vücut yapısı tipik olarak küçük gövde ve bu gövdeye bağlı farklı sayıda ayaklara (uzunluğu 1-700mm aralığında) sahiptir. Baş bölgesinde; chelifores, palps ve ovigers olmak üzere üç çift uzantıları vardır. Yumurtanın taşınmasını sağlayan ovigers denilen yapılarından oluşmaktadır (Sabroux vd., 2017; Sabroux vd., 2019).

Ayrıca üreme ve sindirim sistemlerinin bir parçası olan ayaklar içerisinde bulunmaktadır. Çoğu familyadaki erkekler, döllenmiş yumurtaların oviger ayaklar üzerinde taşınmaktadır (Sabroux vd., 2017). Deniz örümcekleri sapsız veya yavaş hareket eden hayvan ve bazen ölü hayvanlardan beslenmektedir (Dolejš, 2016). Literatürdeki deniz örümcekleri üzerine gerçekleştirilmiş çalışmalar, bu gurubun moleküler biyolojisi (Ballesteros vd., 2020), taksonomisi (Dolejš, 2016), ekolojisi (Mochizuki ve Miyazaki, 2017), morfolojisi (Fornshell ve Harlow, 2018), genetiği (Arango vd., 2011), gelişimsel biyolojisi (Brenneis vd., 2017), biyolojik çeşitlilik ve filogenetiği üzerinedir (Sabroux vd., 2017). Daha önce deniz örümceklerinin kitini ile ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Kitosan kitin türevlerinden biri ve kitininin deasetilasyon yolu ile elde edilmekte ve doğada selülozdan sonra en çok bulunan biyopolimerdir. Kitosan tekrarlanan 2-amino-2-deoksi-d-glukopiranoz ve 2-asetamido-2-deoksi-d-glukopiranoz birimlerinden oluşmaktadır (Negm vd., 2020). Kitosan, su ve birçok çözeltilerle çözünmesi zordur, kitosan en yaygın olan asetik asitle çözünmektedir (Li vd., 2020). Kitosan, biyolojik parçalanabilirlik, biyo-uyumluluk, düşük toksisite, sulu ortamda çözünmez gibi önemli özelliklere sahip ve 200'den fazla uygulamada (adsorpsiyon, biyo-mineralizasyon ve ilaç salınımı gibi) kullanılmaktadır (Knidri vd., 2019; Sebastian vd., 2019; Salama vd., 2020). Ancak, kitosanın mekanik, kimyasal ve biyolojik özellikleri kimyasal yapılarının modifikasyonu ile arttırılabilir (Negm vd., 2020). Kitosanın avantajlarıyla birlikte dezavantajları da vardır. Bunlardan birisi; pH 6'nın altındaki çözeltilerde çözünmektedir. Suyu sevmeyen bir yapıya sahip olduğundan dolayı hidrofobik ilaçların kapsüllenmesi gibi uygulamalarda kullanılamamaktadır (Liv d., 2020).

Bu tez çalışmasının amacı, deniz örümcekleri olan *P. littorale* ve *B. abyssorum* türlerinden ilk kez kitin izolasyonu yapmak ve elde edilen kitini FT-IR, TGA, XRD, SEM ve EA analizleri kullanılarak karakterize etmektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kitin ve türevleri; biyoloji, tarım, tıp, endüstri gibi alanlarda uygulamalara sahip önemli bir biyopolimerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde yeni kitin kaynakları ve kitinin yeni uygulama alanlarını üzerine çalışmalar yapıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, kitin *Bombus terrestris* böcek türünden izole edilmiştir. Bu canlıdan kitin eldesi için HCl ve NaOH kimyasalları ile muamele edilmiştir. Elde edilen kitin elemental analiz, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), NMR ve konfokal mikroskopi teknikleri uygulanarak karakterize edilmiş ve ticari olarak alınan karides kitini ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır. Elemental analiz sonucu *B. terrestris*'in nitrojen oranı (%5.95) olarak kaydedilmiştir. FT-IR sonucu ise, *B. terrestris* kitini karides kitinindeki gibi alfa formda olduğunu ortaya konulmuştur (Majtán vd., 2007).

Literatürdeki bir diğer çalışmada *Agaricus bisporus* mantar türünün dört farklı parçasından kitin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen kitinden kitosan üretilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen kitin SEM, FT-IR, XRD, TGA ve NMR ile karakterize edilmiştir. Elde edilen kitinlerin analiz sonuçlarına göre ticari α-kitine benzer yapıda olduğu bildirilmiştir. Kitin içeriği ise, sap, pileus ve alt (gills) kısımları için sırasıyla %7.4, %6.4 ve %5.8 olarak kaydedilmiştir. DA değerleri ise %70 civarında bulunmuş ve herhangi bir glukan kalıntısı içermediği bildirilmiştir (Hassainia vd., 2018).

Bu çalışmada, *Brachytrupes portentosus*'tan (ev cırcırı) kitin izole edilerek kitosan üretilmiştir. Elde edilen kitin ve kitosan FT-IR, XRD, Elemental analiz ve SEM analizleri kullanılarak ticari kitin ile karşılaştırılmış ve benzer özellikler sergilediği görülmüştür. Sonuçlara göre ev cırcırı ve ticari karidesten elde edilen kitin ve kitosanının aynı asetilasyon ve deasetilasyon derecelerine sahip olduğu görülmüştür. Asetilasyon dereceleri %108.1 ve deasetilasyon dereceleri ise %80.5 olarak belirtilmiştir. *B. portentosus*'tan elde edilen kitin ve kitosanın içeriği (%4.3-7.1 ve %2.4-5.8) karidesten elde edilen ticari kitin ve kitosanlara göre daha düşüktür. Elde

edilen verilere göre ev cırcırı kitin ve kitosanı, ticari karides kitin ve kitosanından daha kaliteli ve saf formda olduğu belirtilmiştir (Ibitoye vd., 2018).

Morio kurdu (*Zophobas morio*) larvalarından kitin izolasyonu gerçekleştirilen bir çalışmada izolasyon sırasında farklı alkali konsantrasyonlar uygulanmıştır. Kitin izolasyonundan sonra kitosan elde edilmiştir. Karakterizasyon için FT-IR, elemental analiz, SEM, TGA, DSC ve XRD analizleri gerçekleştirilmiştir. Numuneye yüksek NaOH konsantrasyonu ile muamele edilmiş ve kitin veriminin azaldığı görülmüştür. Kitine daha yüksek NaOH konsantrasyon ile muamele edildiğinde yüksek DA değere sahip olduğu tespit edilmiştir. SEM sonucu kitin ve kitosanın küçük gözenekli ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen kitinin TGA ve FT-IR sonuçlarına göre α-formda olduğu rapor edilmiştir. XRD sonucunda ise kitinin düşük kristal derecesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Soon vd., 2018).

Bu çalışmada, molluska (mide ve istiridye kabuğu), kabuklu (karides ve yengeç) ve balık pulu (panga, gümüş pulları) gibi deniz ürünlerinin atık kısımlarından kimyasal metot uygulanarak kitin izole edilmiştir. İstiridye ve yengeç kabuğunun kitin içeriği (%69.65, %60.00) diğer canlıların kitin içeriğine göre daha yüksek çıkmıştır. DA değerini belirlemek için asit-baz titrasyon yöntemleri ve moleküler ağırlıkları için Brookfield viscometer yöntemi kullanılmıştır. DA değerleri midye için %91.00, istiridye için %85.62, karides için %51.61, yengeç için %69.40, balık (panga) pulu için %62.35 ve gümüş pulu için ise %56.12 olarak kaydedilmiştir (Alabaraoye vd., 2018).

Deniz salyangozudan (*Conus inscriptus*) ilk kez kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitin XRD, FT-IR, EDAX, SEM ve TG/TGA teknikleri ile karakterize edilmiş ve bu sonuçlardan elde edilen bilgilere göre kitinin α-formda olduğu bildirilmiştir. Moleküler ağırlık analizinin sonuçları, deniz kabuğundan izole edilen kitinin düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu göstermiştir. Kitin içeriği %21.65 olarak bulunmuştur (Mohan vd., 2019).

Dört farklı böcek türünden ilk kez kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitin FT-IR, TGA, XRD, elemental analizi ve SEM teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Polyphylla fullo, Polyphylla cervus, Gryllotalpa gryllotalpa* ve *Bradyporus (Callimenus) sureyai* türlerin kitin içeriği sırasıyla %11.3, %10.9, %10.1

ve %9.8 olarak rapor etmiştir. XRD ve FT-IR sonuçlarından elde edilen bilgilere göre kitinin α formda olduğu bildirilmiştir. XRD sonuçlarında ise tüm türler için kristallik indeksinin %80'den yüksek olduğu belirtilmiştir (Kabalak vd., 2020).

İlk kez yetişkin ve larva evresindeki siyah asker sineği (*Hermetia illucens*)'nin kitin yapısının fiziko-kimyasal özellikleri çalışılmıştır. SEM sonuçlarına göre yetişkin ve larva evrelerinin farklı yüzey morfolojilerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. XRD ve FT-IR sonuçları elde edilen kitinlerin α kristal forma sahip olduğu rapor edilmiştir. XRD sonuçları kristal indeksinin değerleri yetişkin ve larva siyah asker sineği sırasıyla %35 ve %24.9 olarak kaydedilmiş ve bu değerleri bugüne kadar belirlenen tüm böcek kitinleri arasında en düşük CrI'ye sahip olduğu gösterilmiştir (Waśko vd., 2016).

Mavi yengeç kabuğundan (*Portunus pelagicus*) kimyasal metot uygulanarak kitin izolasyonu ve ardından kitosan eldesi gerçekleştirilmiştir. Elemental analiz sonuçlarında bulunan kitin ve kitosan N değerleri (%9.62 ve %12) literatürde belirtilen N değerlerinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Kitin ve kitosan içerikleri %20.24 ve %13.56 olarak kaydedilmiştir. FT-IR sonucu kitinin α formda olduğu belirtilmiştir. *P. pelagicus* kabuğundan izole edilen kitin ve daha sonrasında elde edilen kitosanın gelecek çalışmalarda gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi için potansiyel bir indirgeyici ajan olarak kullanılabileceği önerilmektedir (Ahyat vd., 2017).

Hamam böceği'nin kabuğundan (*Periplaneta americana L.*) kimyasal metot (HCL, NaOH) uygulanarak kitin ve kitosan elde edilmiştir. Bu çalışmada kitin ve kitosan içerikleri, Kitosanın deasetilasyon derecesi, viskozitesi ve moleküler ağırlığı değerleri üzerine çalışılmıştır. Kitosan farklı NaOH değerleri A (%50 NaOH (w/v)), B (%50 NaOH (w/w)), C (%50 NaOH (w/w)) ve D (%50 NaOH (w/w)) ve farklı sıcaklık dereceleri A (95 C°), B (105 C°), C (95 C°) ve D (105 C°) ile dört grup şeklinde elde edilmiştir. Kitin içeriği, net ağırlık %3.36 ve kuru ağırlık %12.17 ve kitosanın ise net ağırlığı %2.08, kuru ağırlığı %7.28 olarak kaydedilmiştir. Kitosanın deastilasyonu C grubu %91.86, viskozitesi C grubu 69.6 ve moleküler ağırlığı 230,500 DA derecelerin en yüksek değerleri olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre, kitin ve kitosan hayvancılık için bir yem kaynağı ve tarım alanındaki fitopatojenlere karşı direnç arttırmak için bir elisitör kaynağı olduğunu göstermektedir (Kim vd., 2017).

Bu çalışmada, *Peripatoides novaezealandiae*'nin vücut kütikülünden kitin izole edilmiştir. Üretilen kitin SEM, TEM, FT-IR ve TGA ile karakterize edilmiştir. SEM ve TEM görüntülerinde yapının fiberli olduğu gözlemlenmiştir. FT-IR ve TGA verilerine göre kitin α formda olduğu belirtilmiştir (Greven vd., 2019).

Bu çalışmada dört çekirge türüne ait dişi ve erkek çekirgelerden (*Celes variabilis, Decticus verrucivorus, Melanogryllus desertus* ve *Paracyptera labiata*) kitin izole edilmiştir. FT-IR, EA, TGA, XRD ve SEM teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. FT-IR, EA, TGA ve XRD sonuçlarına göre kitinin α-formda olduğu rapor edilmiştir. SEM görüntülerinde kitinlerin yüzey morfolojisi birbirlerine benzer yapıda olduğu belirtilmiştir. Erkek çekirgeden elde edilen kitinin yüzey morfolojisinde hem nanofiber hem de nanopor gözlemlenirken *M. desrtus* hariç dişi çekirgeden elde edilen kitinin yüzey morfolojisin de ise nanofiber ve nanopor gözlemlenmemiştir. Kitin içeriği %4.71-%11.84 arasında kaydedilmiştir (Kaya vd., 2015c).

Chelonibia patula kabuğundan kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitin FT-IR, TGA, XRD, EA ve SEM teknikleri ile karakterize edilerek yengeç, karides ve böcek gibi canlıların kitinleri ile karşılaştırılmıştır. *C. patula*'dan ekstrakte edilen kitinin içeriği %3.11 olarak belirtilmiştir. FT-IR, XRD ve TGA verilerine göre ise önceki çalışmalarda yengeç ve karides kitininde olduğu gibi α-formda olduğu bildirilmiştir (Kaya vd., 2014b).

Altı farklı ağustos böceği türünden kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitinin verimi *Cicadatra atra* için %6.7, C. *hyalina* için %5.51, *C. platyptera* için %8.84, *Cicada lodosi* için %4.97, *C. mordoganensis* için %6.49 ve *C. mordoganensis* için %5.88 olarak rapor edilmiştir. FT-IR spektrumlarında altı tür için de amid I (1619 ve 1953 arası), amid II (1541 ve 1554 arası) ve amid III (1306 ve 1308 arası) bantlar gözlenmiş ve bu değerlere göre elde edilen kitinlerin α formunda olduğu bildirilmiştir (Mol vd., 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzeme Temini

Boreonymphon abyssorum ve *Pycnogonid littorale* örnekleri Danimarka'daki bulunan Kopenhag'ın zooloji müzesinden temin edilmiştir. Kitin izole etmek için kullanılan materyaller (HCL, NaCl, methanol, alkol ve kloroform) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. İzole edilen kitinin karakterizasyonu FT-IR, TGA, XRD, EA ve SEM analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Kitin İzolasyonu

B. abyssorum ve *P. littorale* örneklerinden saf bir kitin elde edilmek için demineralizasyon, deproteinizasyon ve dekolarizasyon aşamaları uygulanmış ve bu aşamalar uygulamadan önce ekstreler saf su ile yıkanmış ve analizler için alkole alınmıştır.

3.2.1 Demineralizasyon işlemi

Demineralizasyon, minerallerin canlının yapısından uzaklaştırılması işlemdir. Bu aşamada mineralleri uzaklaştırmak için hidroklorik asit kullanılmaktadır. Örnekler etüvde 40 °C'de 2 gün boyunca kurutulmuş sonra hassas terazi ile ilk ağırlıkları tartılmıştır. Kurutulmuş örnekler, 4 saat boyunca oda sıcaklığında 2 M 100 ml HCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra örnekler, pH nötr oluncaya kadar saf su ile yıkanarak filtre edilmiştir. Filtre edilmiş örnekler tekrar kurutularak tartılmış. Daha sonra kurutulmuş olan numuneler deproteinizasyon aşamasına alınmıştır.

3.2.2 Deproteinizasyon işlemi

Deproteinizasyon işlemi, kitinde bulunan proteinlerin uzaklaştırılması için uygulanmaktadır. Proteinleri uzaklaştırmak için genellikle NaOH çözeltisi kullanılmaktadır. Filtre edilen örnekler 24 saat boyunca ısıtmalı karıştırıcıda 2 M 100 ml hacimde NaOH ile muamele edilmiştir. Numuneler pH nötr oluncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler tekrar kurutularak tartılmıştır. Daha sonra kurutulmuş olan numunelere dekolarizasyon işlemi uygulanmıştır.

3.2.3 Dekolarizasyon işlemi

Renk giderme işlemine dekolarizasyon denilmektedir. Bu aşamada örneklere 1:2:4 oranlarında kloroform: metanol: saf su karışımı muamele edilerek ağartma işlemi uygulanmıştır. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra saf kitin örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen 3 boyutlu kitin etüvde 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulan kitin örnekleri tekrar tartılarak % kitin içerikleri belirlenmiştir.

3.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

B. abyssorum ve *P. littorale* örneklerinden izole edilen kitinin yüzey morfolojileri, Sputter Coater (Cressingto Auto 108) tarafından altın / paladyum ile kaplanarak SEM (Zeiss, Eco 40, Almanya) analiziyle SEM görüntüleri çekilmiştir.

3.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskobu (FT-IR)

B. abyssorum ve *P. littorale* örneklerinden izole edilen kitinin FT-IR spektrumlarını ölçülmek için 600-4000 cm^{-1} dalga boyunda Perkin Elmer Spektrum FT-IR Spektrometre (Universal Attenuated Total Reflectance) kullanılmıştır.

3.5 Thermogravimetrik Analiz (TGA)

İzole edilen kitinin termal özellikleri, N_2 atmosferi altında ve TGA / SDTA 851 Mettler Toledo cihazı kullanılarak 10 ° C/ dk'lık bir ısıtma hızında gerçekleşmiştir.

3.6 X-Işını Difraktometresi (XRD)

XRD spektrumlar, Rigaku D max 2000 X- ışını difraktrometresi kullanılarak 40 kV, 30 mA ve 5 º< 2θ < 45 den kırılma aralığında kaydedilmiştir. İzole edilen kitinin Kristallinite indeksi, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir.

$$CI\ (\%) = [(I_{110} - I_{am})/I_{110}] \times 100 \qquad (3.1)$$

3.7 Elemental Analizi (EA)

Elemental analizi, Kitin izolatlarının N, H, C ve O içerikleri belirlenmek için Thermo Flash 2000 kullanılmıştır. Kitin örneklerinin asetilasyon derecesi (DA), aşağıdaki formül izlenerek elemental analiz sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır.

$$DA = \frac{\mathrm{C/N} - 5.14}{1.72} \times 100 \quad (3.2)$$

3.8 Kitin İçeriği

Deniz örümceklerdeki bulunan kitin içeriği belirlemek için kuru dış iskelet kütlesi izolasyondan önce belirlenmiştir. Pigment ve protein ekstraksiyonundan sonra kurutulmuş kitin kütlesi tartılarak belirlenmiştir. Kitin içeriği, bu iki veri arasındaki farklara göre belirlenmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Kitin İçeriği (\%)} = (m_{ch}/m_m) \times 100 \quad (3.3)$$

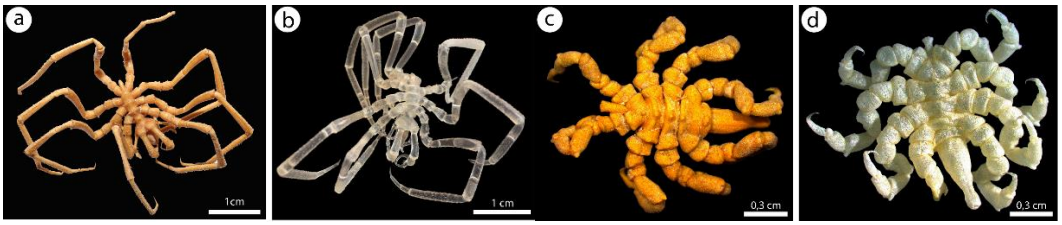
Burada: m_{ch}—kuru deniz örümcek kitinin kütlesi, g; m_m—kuru deniz örümceğinin kütlesi, g.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMALARI

P. littorale ve *B. abyssorum* örneklerden kitin eldesi yapılmış ve elde edilen kitinin FT-IR, TGA, XRD, SEM ve EA analizleri kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinin ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada deniz örümceklerden ve bu türlerden ilk kez kitin eldesi yapılmış ve bu kitin karakterize edilmiştir.

4.1 Kitin İçeriği

Bu çalışmada, *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinden ilk kez izole edilen kitinlerin kuru ağırlıkları sırasıyla %0.260±50.42 ve %0.275±40.23 olarak belirlenmiştir. Demineralizasyon, deproteinizasyon ve dekolorizasyon işlemlerinden sonra kütle kaybı sırasıyla %59.77 ve %39.58 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda *P. littorale* örneğinin, *B. abyssorum* örneğinden daha yüksek kitin içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalarda, farklı organizmaların kitin içeriğinin büyük ölçüde değiştiği bildirilmiştir. Ağustos böceği kitininin içeriği %36 olarak kaydedilmiştir (Sajomsang ve Gonil, 2009; Machałowski vd., 2019). Öte yandan, ağaç örümceğinin kitini üzerinde çalışılmış ve kitin içeriğinin %19 civarında olduğu bulunmuştur. Ayrıca kabuklularda kitin içeriği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Pembe Karides'in kitin içeriği, (Arrouze vd., 2019) tarafından %8 olarak belirtilmiştir. Tüm bu sonuçlar, *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinden izole edilen kitinin ticari kitin kaynakları olarak kullanılan kabuklu organizmalara göre daha yüksek kitin içeriğine sahip olduğu bulunmuştur.

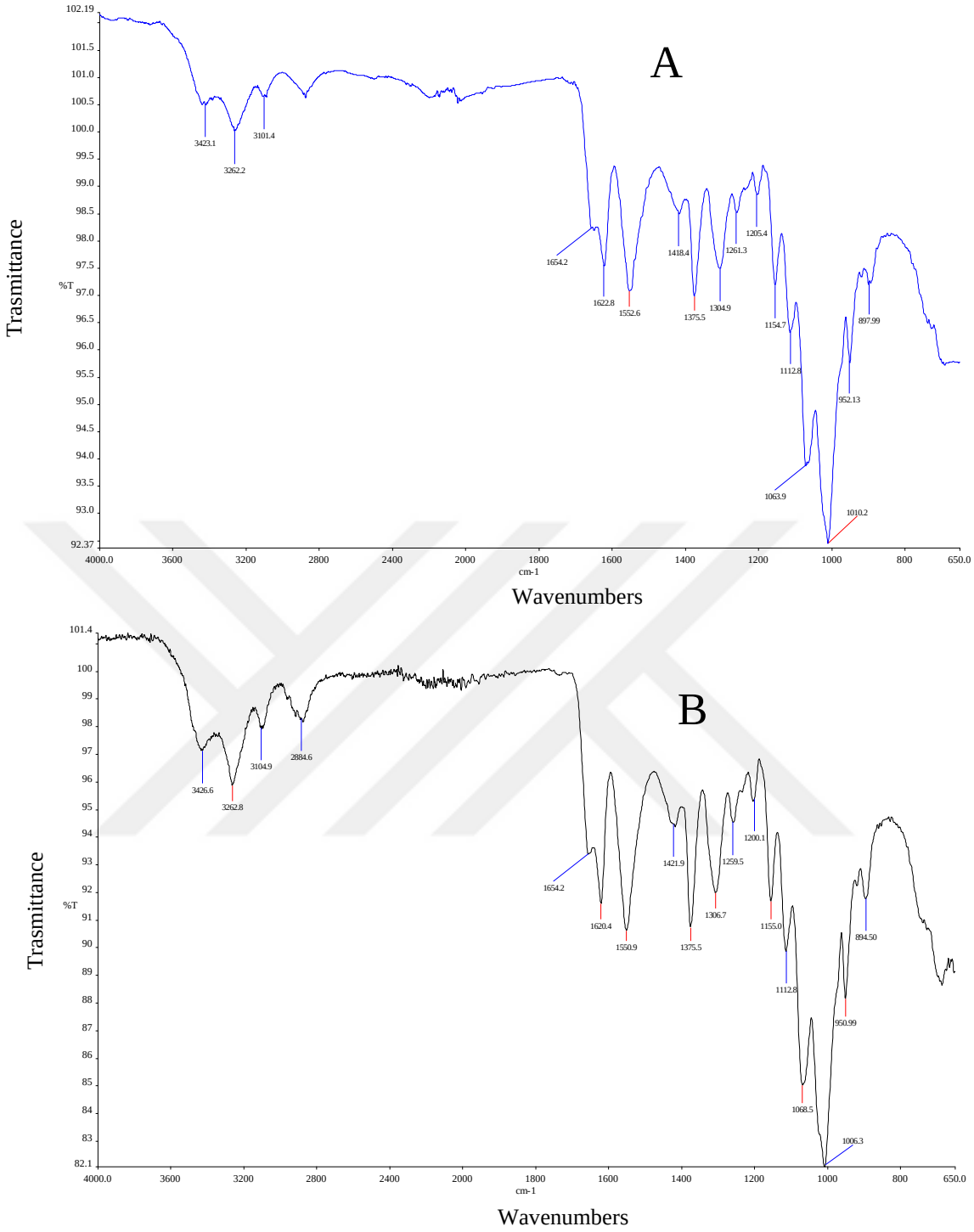


Şekil 4.1. *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinin ışık mikroskop görüntüleri: (a) *B. abyssorum* orijinal yapısı (b) *B. abyssorum* üç boyutlu kitini (c) *P. littorale* orijinal yapısı ve (d) *P. littorale* üç boyutlu kitini.

4.2 FT-IR

Kitin, doğada α, β ve γ olmak üzere üç kristal formda bulunmaktadır (Mol vd., 2018). FT-IR, kitinin kimyasal yapısını ve hangi allomorfik şekile ait olduğunu belirlemek için kullanılmaktadır (Şekil 4.2). Alfa (α) kitin; yengeç, ıstakoz, karides ve diğer eklembacaklılarda bulunmaktadır (Kaya vd., 2013). Doğada, fizyolojik rolü ve doku özellikleri kitinin moleküler düzenini belirlenmektedir. α kitinin aksine, saf β kitin daha az organizmada bulunmaktadır (Kaya vd., 2013). β formunda, kitin polimeri mono-klinik kristal formunu almakta ve bu formda zincirler, tabakalar arası hidrojen bağları ile sıkıca tutulduğu paralel tabakalar halinde paketlenmektedir. γ formunda polimer zincirleri bir paralel ve anti-paralel düzende sıralanmaktadır. γ formunun alfa ailesinin bir varyantı olduğu bildirilmiştir (Kaya vd., 2013). α ve β-kitinin FT-IR spektrumu ile ilgili bildirilen birçok çalışmadan bilindiği gibi, α formunun amid I bandı 1660 ve 1620 cm^{-1}'de iki keskin pik bulunurken β formu sadece 1640 cm^{-1} civarında tek bir pik bulunmaktadır, bunun nedeni moleküller arasındaki hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, γ-kitinin FT-IR spektrumu hakkında sınırlı bilgi bulunmuştur (Kaya vd., 2017). Molekül içi hidrojen bağları (C3 OH ⋯ C5) ve moleküller arası hidrojen bağları (NH ⋯ CO ve C6 OH ⋯ O C) kitin polimer kararlılığı vermektedir (Kaya vd., 2013).

Bu çalışmada *P. littorale* deniz örümcekten izole edilen kitinin FT-IR spektrumu, C=O ikincil amid gerilme (amid I), C=O ikincil amid gerilme (amid I) ve N - H bant ve C - N banda (amid II) karşılık gelen sırasıyla 1654.2, 1622.8 ve 1552.6 cm^{-1}'de amid bantları ile karakterize edilmiş. *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin için, C=O ikincil amid gerilme 1654.2 cm'de, C=O ikincil amid gerilme ve N - H bant 1620.4 cm^{-1}'de ve C - N gerinme (amid II) 1550.9 cm^{-1}'de ölçülmüştür. FT-IR spektrumlarındaki tüm bantlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Deniz örümcek türlerinden izole edilen kitinin tüm FT-IR spektrumlarının birbiriyle yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre deniz örümcekleri olan *P. littorale* ve *B. abyssorum* örneklerinden izole edilen kitinlerin α formunda olduğunu gösterilmiştir. Karideslerden ticari α-kitinin FT-IR spektrumlarını incelemiş ve 1654 cm^{-1} (amid I), 1627 cm^{-1} (amid II) ve 1560 cm^{-1} (CN gerilme) karakteristik bantları gözlemlenmiştir (2014-6). Bu bulgular, *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan elde edilen α-kitinin FT-IR spektrumları ile tutarlıdır (Kaya vd., 2013).



Şekil 4.2. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum.*

Çizelge 4.2. Kitinin FTIR spektrum verileri.

Fonksiyonel gruplar ve titreşim modları	Sınıflandırma	*P. littorale* cm^{-1}	*B. abyssorum* cm^{-1}
O-H gerilme		3423.1	3426.6
N-H gerilme		3262.2	3262.8
CH3 sim. gerilme ve asim. gerilme	Alifatik bileşikler	3101.4	3104.9
CH3 sim. gerilme	Alifatik bileşik	-	2884.8
C=O ikincil amid gerilme	Amid I	1654.2	1654.2
C=O ikincil amid gerilme	Amid I	1622.8	1620.4
N-H band, C-N gerilme	Amid II	1552.6	1550.9
CH2 sonu ve CH3 deformasyon	-	1418.4	1421.9
Son, CH3 sim. deformasyon	-	1375.5	1375.5
CH2 wagging	Amid III, protein bileşiği	1304.9	1306.7
Asimetrik köprü oksijen gerilmesi		1154.7	1155
Asimetrik faz içi halka gerilme modu		1112.8	1112.8
C-O-C asim. faz halkasında gerilme	Saddarid halkaları	1063.9	1068.5
C-O asim. faz halkasında gerilme		1010.2	1006.3
CH3 wagging	Along chain	952.13	950.99
CH halka gerilme	Saddarid halkaları	897.99	894.5

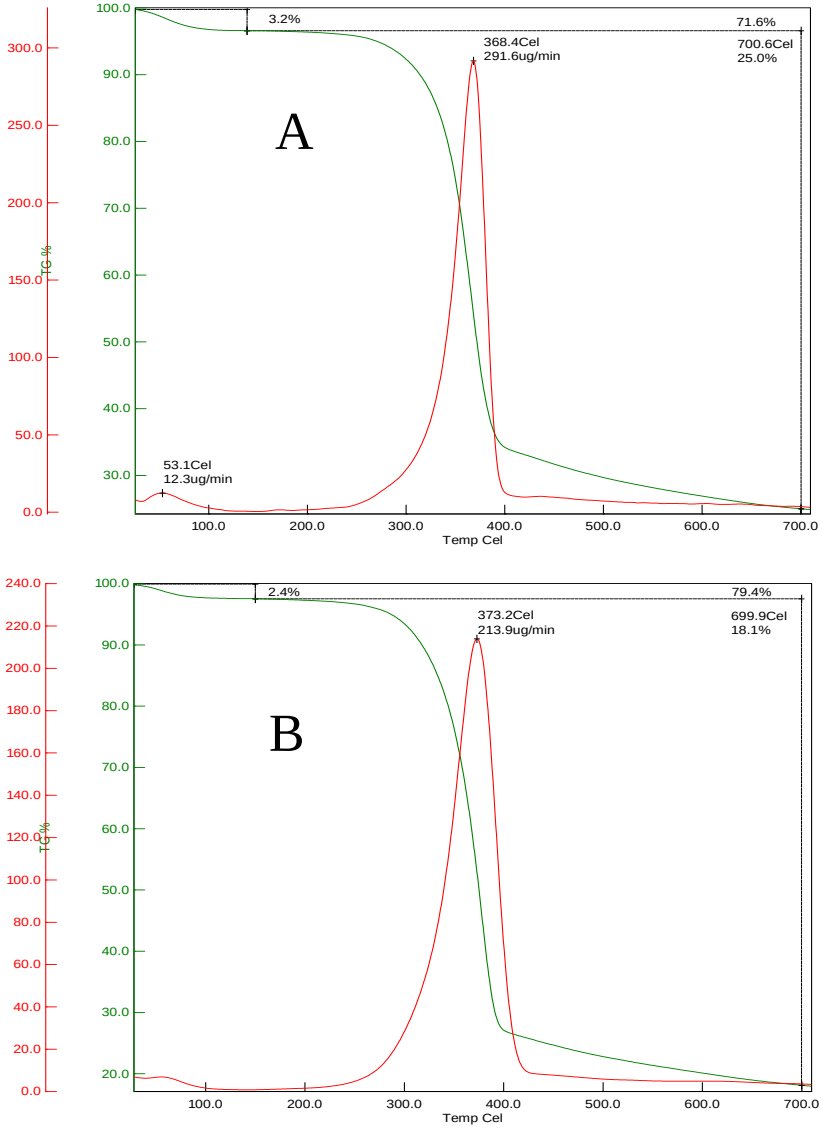
4.3 TGA

Kitinin saflığını ve hangi formda olduğunu belirlemek için TG / DTG analizleri kullanılmaktadır. *P. littorale* ve *B. abyssorum* deniz örümceklerinden elde edilen kitin sonuçları, Şekil 4.3'te gösterilmektedir. Literatürdeki bazı çalışmalara göre, alfa kitinin maksimum bozunma sıcaklığı 350 °C'den daha yüksek, beta kitin değeri ise 350 °C'den daha düşüktür. Kitinin genellikle 300 ve 400 ° C arasındaki maksimum bozunmasını göstermektedir (Greven vd., 2019).

Kitinin bozunması ile ilgili önceki literatür raporlarına göre, burada α, β ve γ kitinin iki farklı aşamada degradasyonunu gözlemlenmiştir. İlk ağırlık kaybı, kitin zincirlerindeki hidrofilik gruplardan suyun buharlaşmasından kaynaklanmıştır. İkinci

kütle kaybı ise polimerik yapının bozulmasına, sakkarit halka dehidrasyonuna ve asetillenmiş kitin birimlerinin bozulması şeklinde belirlenmiştir (Kaya vd., 2015c).

İzole edilen kitinlerin kütle kaybı ilk aşamada *P. littorale* için %3.2 ve *B. abyssorum* için %2.4 ve ikinci aşamada ise *P. littorale* için %71.6 ve *B. abyssorum* için %79.4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu canlılarda farklı kitin kararlılığı sahip olma, farklı türden gelen kitin yapısından kaynaklanmaktadır. Bu değerler (Kaya vd., 2014a; Mol vd., 2018; Kaya vd., 2016) tarafından yapılan çalışmalarının TG / DTG sonuçlarına yakın çıkmıştır.



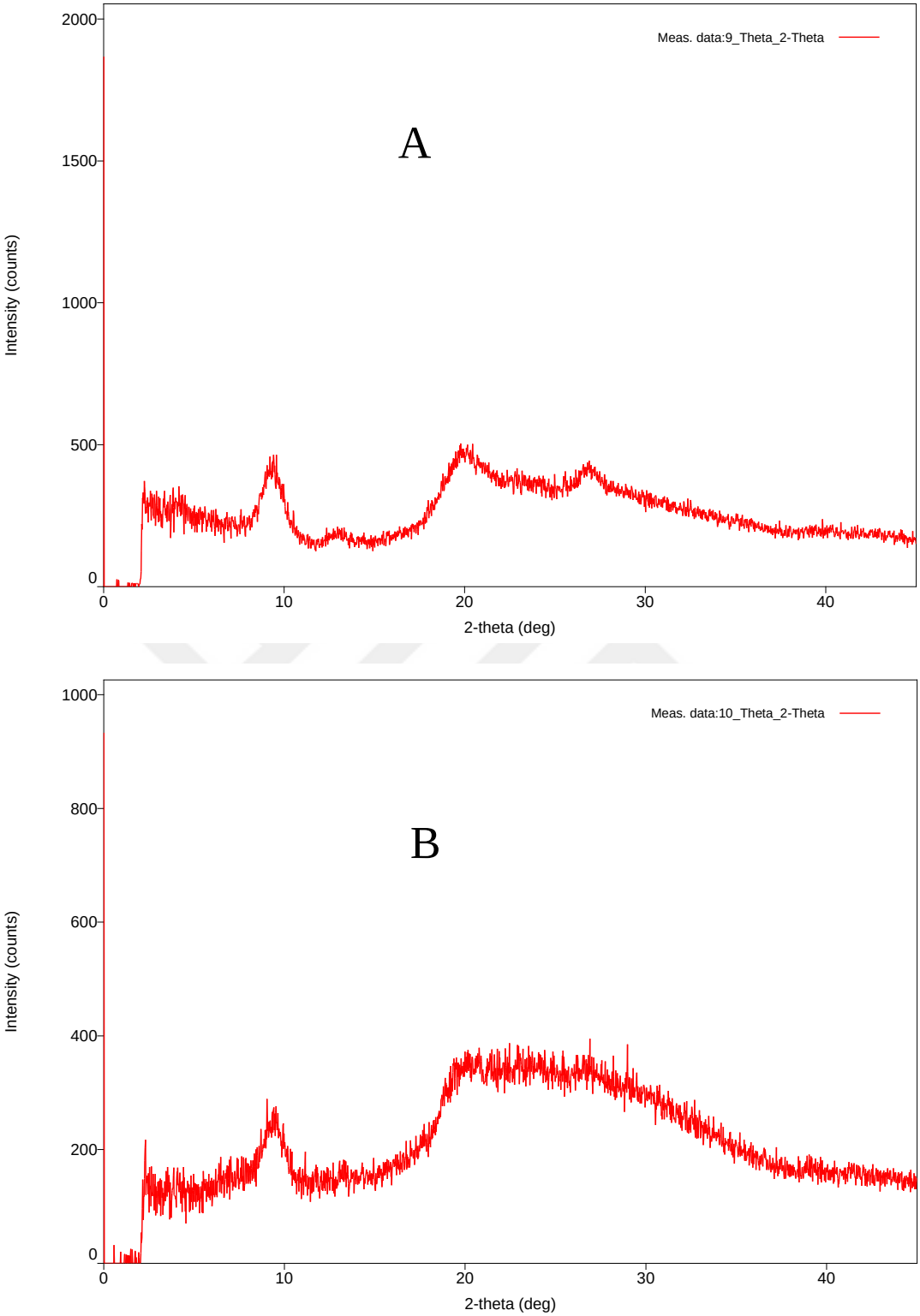
Şekil 4.3. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum*.

Çizelge 4.3. İki tür deniz öneklerinden elde edilen kitinin TG – DTA analizlerinin sonuçları.

Türler	Sıcaklık oranı	Kütle kaybı (%wt)	Toplam kütle kaybı (%wt)	DTGmax (°C)
P. littorale	0-700	3.2 71.6	74.8	368.4
B. abyssorum	0-700	2.4 79.4	81.8	373.2

4.4 XRD

X ışını kırınım (XRD) analizi, kitin kristali derecesi için kullanılmaktadır. XRD analizi ile örneklerden elde edilen pikleri *P. littorale* için %9.28, %13.32, %20.17, %22.4 ve %26.91 ve *B. abyssorum* için %9.38, %13 ve %19.50 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca ticari kitin pikleri için %9.5, %13.08, %19.36, %20.42, %23.6 ve %26.5 olarak kaydedilmiştir (Kaya vd., 2014c). Deniz örümcekleri *P. littorale* ve *B. abyssorum* kitinlerin kristal indeksi (CrI) değeri sırasıyla %58.4 ve %51.4 olarak hesaplanmış ve birbirlerine çok yakın olduğu gözlemlenmiştir. Literatürdeki yapılan bazı çalışmalarda, farklı canlılardan elde edilen kristal indeksi değerleri birbirlerine farklılık göstermektedir. Sajomsang ve Gonil 2010 yılındaki çalışmasında, ağustosböceğinden elde edilen kitinin CrI değerleri %80 ve %90 arasında değiştiğini gözlemlenmiştir. Mantardan kitin nanofiber izole etmesi çalışmasında Crl değerleri %47.6 ve %80 arasında gözlemlenmiştir (Ifuku vd., 2011). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre deniz örümceklerinden elde edilen kristal indeksi değerleri ticari kitin Crl'den daha düşük olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 4.4. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitinin XRD analizi (A) *P. littorale* ve (B) *B. abyssorum*.

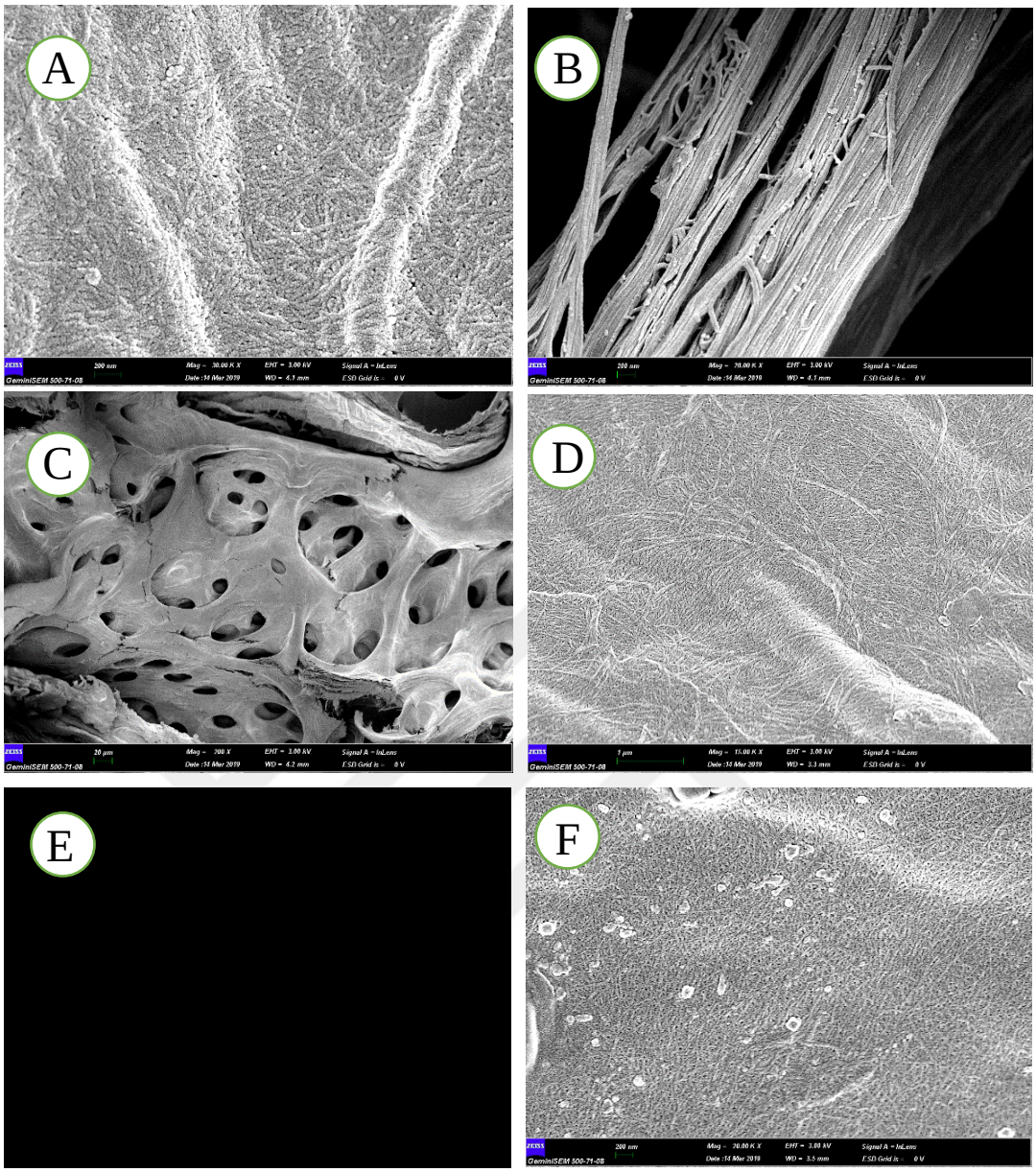
4.5 SEM

İki farklı deniz örümceği türünden izole edilmiş kitinlerin yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiş ve şekil 4.5'te verilmiştir. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'den elde edilen kitinin yüzey morfolojisi incelendiğinde hem nanofiber hem de mikropor yapıları görülmüştür (Şekil 4.5).

Kitinin yüzey morfolojisi genel olarak dört farklı formda gruplandırılabilir. İlk form, nanofiberleri ve gözenekleri olmayan pürüzsüz bir yüzey morfolojisidir. İkinci form sadece nanofiberlerden oluşur, gözenek görülmez. Üçüncü form nanofiber ile birlikte porlara da sahiptir. Dördüncü form da ise, nanofiberle birlikte farklı boyutlarda iki tip por yapısı (biri büyük, diğeri küçük) görülmektedir (Kaya vd., 2015b).

Literatürdeki yapılan çalışmalarda kitin yüzeyinin canlı grubuna göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. *Ceriodaphnia quadrangula'* den elde edilen kitin yüzeyinin düz ve nanofiberlerden oluştuğu gözlenmiş fakat por yapıları gözlenmemiştir (Kaya vd., 201 a). Bazı canlı gruplarından elde edilen kitin yüzeyinde hem nanofiber hem de nanopor görülürken, bazı grup canlıların ise sadece nanofiberler yapılarını içerdiği görülmüştür (Mol vd., 2018). Fungi aleminden olan *Fomes fomentarius* mantar türünün yüzey morfolojisi ise pürüzsüz bir yapıya sahiptir ve fiber/por yapılarına sahip değildir (Kaya vd., 2015b). Bu çalışma elde edilen kitinlerin yüzey morfolojisi ticari kitin yüzeylere benzer olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, *P. littorale* ve *B. abyssorum* türünden elde edilen kitinlerin yüzeyi 30.000 ve 15.000 büyütmede incelenmiştir ve pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu tespit edilmiştir. Por yapılarının 20 µm boyutlarında, fiber yapılarının ise 100 nm boyutlarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *P. littorale* ve *B. abyssorum*'dan izole edilen kitin örneklerinin SEM Görüntüleri (A)(B)(C) *P. littorale* ve (D)(E)(F) *B. abyssorum*.

4.6 Elemental Analizi

P. littorale ve *B. abyssorum* örneklerinden elde edilen kitinler azot (N), karbon (C), ve hidrojen (H) değerlerinin yanı sıra asetilasyon derecesinin (DA) belirlenmesi için elemental analiz yapılmıştır. *P. littorale* ve *B. abyssorum* türlerinden elde edilen kitinin elemental analiz sonuçları Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Azot içeriği ve asetilasyon derecesi (DA), Ekstrakte edilen kitinin saflığını vermektedir. Herhangi bir canlıdan elde edilen saf kitinin %N teorik değeri (6.89) olarak bilinmiş (Liu vd., 2012) ve kitinin DA değeri ise %100 olduğu varsayılmıştır (Gonil ve Sajomsang, 2012).

Bu çalışmada, *P. littorale* ve *B. abyssorum* 'dan elde edilen kitinin N değeri ve DA sırasıyla %6.77 ± %113.6 ve %5.88 ± %114.4 olarak kaydedilmiştir. *P. littorale* kitinin N içeriği (%6.77) *B. abyssorum* kitininden (%5.88) biraz daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. *P. littorale'*nin kitininin azot içeriği teorik değere çok yakın bulunurken *B. abyssorum'*nun daha düşük bulunmuştur.

Literatürdeki bazı çalışmalarda %N ve DA değerleri sırasıyla karides kabuğu kitin için %6.24 ve %112.2, böceği kitin için %6.45 ve %101.2, yengeç kitin için %6.20 ve %118 ve ticari kitin için %6.13 ve %112 olarak kaydedilmiştir (Majtán vd., 2006). Bu çalışmada, iki tür deniz örümceklerinden elde edilen kitin için ölçülen %N değerleri literatürde kullanılan ticari kitinlere çok yakın olduğu bulunmuştur. Ayrıca elde edilen saf kitin DA'si, birçok endüstriyel işlemde çözünürlüğü, Kimyasal reaktifliği ve biyo-bozunabilirliğini etkilemiştir (Kaya vd., 2015b).

Çizelge 4.6. Asetilasyon (%DA) ve kitin içeriği derecesi ile deniz örümceklerinden elde edilen kitinin element analizi sonucu.

Deniz örümceğinden izole edilen kitin	N (%)	C (%)	H (%)	DA (%)
P. littorale	6.77	48.12	6.78	114.4
B. abyssorum	5.88	41.81	5.86	113.6

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ticari olarak üretilen ve çeşitli firmalarda satılan kitin örnekleri genellikle yengeç, karides, kerevit ve ıstakoz gibi canlıların gıda olarak tüketildikten sonraki atık kısımlarından elde edilmektedir. Son yıllarda mantarlardan da kitin üretimi gerçekleştirilerek ticari olarak satışı yapılmaktadır. Özellikle mantar kitini bitkisel kaynaklı olarak görüldüğü için gıda kaplamada vejeteryanlar için önerilmektedir. Literatürde Artropoda şubesine ait çok farklı canlı türünden kitin izolasyonu yapılmıştır fakat yine bir artropod grubu olan Pycnogonida sınıfına ait bir türden ilk kez kitin izolasyonu ve karakterizasyonu mevcut çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Deniz örümceklerinden kitin izolasyonu sırasında hem asit hem de baz uygulamalarında örnekler balon içerisinde karıştırılmamış ve üç boyutlu vücut kısımları korunarak elde edilmiştir. Özellikle canlıların bacak kısımlarından izole edilen ve hortum şeklinde üretilen kitin izolatları ileriye yönelik biyomedikal alanda uygulama şansı bulabilir. Fiberlerden oluşması ve küçük gözenekleri sayesinde, biyo uyumlu ve vücutta bozunur olması (biyo bozunur) nedeniyle kılcal damarların açılması amaçlı stent olarak geliştirilebilir/değerlendirilebilir. Medikal amaçlı kullanılabilmesini destekleyen başka bir avantajı da gözenekli yapısına ilaç yüklenerek kontrollü salınım yapan bir stent niteliği de taşıyabilir. Stent uygulamasının yanı sıra ilaç taşıma, DNA, RNA, amino asit, protein, ağır metal gibi materyallerin adsorbsiyon çalışmalarında kullanılabilir. Gözenekli yapısı sayesinde doku mühendisliğinde uygulama şansı bulabilir.

Bu tez çalışmasında Pycnogonida sınıfına ait iki farklı türün de kitin içeriğinin yüksek oranda olduğu kaydedilmiştir. Özellikle *P. littorale* türünün vücut ağırlığının yaklaşık %50'si kitinden oluşmaktadır. Yukarıda da tartışıldığı gibi bu oran diğer artropod grubu canlıların kitin içeriğinden oldukça yüksektir. Aynı şekilde Pycnogonida sınıfında çalışılan bu iki türün, mantar, Bryozoa, Anthozoa, Porifera gibi canlı gruplarından daha fazla kitin içeriğine sahip olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Deniz örümceklerinden kitin izolasyon metodu diğer artropod grubuna ait canlılarla tamamen aynıdır ve aynı maliyeti gerektirmektedir. Bu nedenle ileride doğaya zarar vermeden bu canlıların büyük oranda toplanması ya da kültüre edilebilmesi sonucu deniz örümcekleri önemli bir kitin kaynağı olabilir.

KAYNAKLAR

Ahyat, N. M., Mohamad, F., Ahmad, A. ve Azmi, A. A., 2017. Chitin and chitosan extraction from portunus pelagicus, Malaysian Journal of Analytical Sciences, 21, 770-777.

Alabaraoye, E., Achilonu, M. ve Hester, R., 2018. Biopolymer (Chitin) from Various Marine Seashell Wastes: Isolation and Characterization, Journal of Polymers and The Environment, 26, 6, 2207-2218.

Almeida, A., Araújo, M., Novoa-Carballal, R., Andrade, F., Gonçalves, H., Reis, R. L., Lúcio, M., Schwartz Jr, S. ve Sarmento, B., 2020. Novel amphiphilic chitosan micelles as carriers for hydrophobic anticancer drugs, Materials Science and Engineering: C, 112, 110920-110920.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. ve Heras, A., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan, Current Chemical Biology, 3, 203-230.

Arango, C. P., Soler-Membrives, A. ve Miller, K. J., 2011. Genetic differentiation in the circum—Antarctic sea spider Nymphon australe (Pycnogonida; Nymphonidae), Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 58, 1-2, 212-219.

Arrouze, F., Desbrieres, J., Rhazi, M., Essahli, M. ve Tolaimate, A., 2019. Valorization of chitins extracted from North Morocco shrimps: Comparison of chitin reactivity and characteristics, Journal of Applied Polymer Science, 136, 30, 47804.

Ballesteros, J. A., Setton, E. V., Santibanez-Lopez, C. E., Arango, C. P., Brenneis, G., Brix, S., Cano-Sánchez, E., Dandouch, M., F.Dilly, G. P., Eleaume, M., Gainett, G., Gallut, C., McAtee, S., McIntyre, L., Moran, A.L., Moran, R., López-González, P. J., Scholtz, G., Williamson, C., Woods, H. A., Wheeler, W. C. ve Sharma, P. P., 2020. Phylogenomic resolution of sea spider diversification through integration of multiple data classes, bioRxiv, 1-28.

Brenneis, G., Bogomolova, E. V., Arango, C. P. ve Krapp, F., 2017. From egg to "no-body": an overview and revision of developmental pathways in the ancient arthropod lineage Pycnogonida, Frontiers in Zoology, 14, 1, 6.

Dolejš, P., 2016. A collection of sea spiders (Pycnogonida: Pantopoda) in the National Museum, Prague (Czech Republic), Arachnologische Mitteilungen, 51, 12-15.

Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O. V., Tsurkan, M. V., Ereskowsky, A., Tabachnick, K. R., Stelling, I. A., Galli, R., Petrova, O. V., Nekipelov, S. V., Sivkov, V. N., Vyalikh, D., Born, R., Behm, T., Ehrlich, A., Chernogor, L. I., Belikov, S., Janussen, D., Bazhenov, V. V. ve Wörheide, G., 2013. First report on chitinous hold fast in sponges (Porifera), Proceedings of the Royal Society, 280, 1762, 03-39.

Fornshell, J. A. ve Harlow, A. P., 2018. Mechanoreceptors and chemoreceptors in pycnogonids (Arthropoda: Pycnogonida), Journal of Crustacean Biology, 38, 3, 385-387.

Gonil, P. ve Sajomsang, W., 2012. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin from insect cuticles, International Journal of Biological Macromolecules, 51, 4, 514-522.

Greven, H., Kaya, M., Sargin, I., Baran, T., Krıstensen, R. M. ve Sørensen, M. V., 2019. Characterisation of chitin in the cuticle of a velvet worm (Onychophora), Turkish Journal of Zoology, 43, 5, 416-424.

Hassainia, A., Satha, H. ve Boufi, S., 2018. Chitin from Agaricus bisporus: Extraction and characterization, International Journal of Biological Macromolecules, 117, 1334-1342.

Ibitoye, E. B., Lokman, I. H., Hezmee, M. N. M., Goh, Y. M., Zuki, A. B. Z. ve Jimoh, A. A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket, Biomedical Materials, 13, 2, 025009.

Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M. ve Saimoto, H., 2011. Preparation of chitin nanofibers from mushrooms, Materials, 4, 8, 1417-1425.

Juárez-de La Rosa, B. A., Quintana, P., Ardisson, P. L., Yáñez-Limón, J. M. ve Alvarado-Gil, J. J., 2012. Effects of thermal treatments on the structure of two black coral species chitinous exoskeleton, Journal of Materials Science, 47, 2, 990-998.

Kabalak, M., Aracagök, D. ve Torun, M., 2020. Extraction, characterization and comparison of chitins from large bodied four Coleoptera and Orthoptera species, International Journal of Biological Macromolecules, 145, 402-409.

Kaya, M., Sargin, I., Tozak, K. Ö., Baran, T., Erdogan, S. ve Sezen, G., 2013. Chitin extraction and characterization from Daphnia magna resting eggs, International Journal of Biological Macromolecules, 61, 459-464.

Kaya, M., Baran, T., Saman, I., Ozusaglam, M. A., Çakmak, Y. S. ve Menteş, A., 2014a. Physicochemical characterization of chitin and chitosan obtained from resting eggs of ceriodaphnia quadrangula, Journal of Crustacean Biology, 34, 2, 283-288.

Kaya, M., Karaarslan, M., Baran, T., Can, E., Ekemen, G., Bitim, B. ve Duman, F., 2014b. The quick extraction of chitin from an epizoic crustacean species (Chelonibia patula), Natural Product Research, 28, 2, 2186-2190.

Kaya, M., Baran, T., Erdogan, S., Menteş, A., Özüsağlam, M. A. ve Çakmak, Y. S., 2014c. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), Materials Science and Engineering: C, 45, 72-81.

Kaya, M., Baran, T. ve Karaarslan, M., 2015a. A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp, Natural Product Research, 29, 15, 1477-1480.

Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. ve Tubelytė, V., 2015b. First chitin extraction from Plumatella repens (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin, International Journal of Biological Macromolecules, 79, 126-132.

Kaya, M., Lelešius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. ve Bitim, B., 2015c. Differentiations of Chitin Content and Surface Morphologies of Chitins Extracted from Male and Female Grasshopper Species, Plos One, 10, 1.

Kaya, M., Sargin, I., Al-jaf, I., Erdogan, S. ve Arslan, G., 2016. Characteristics of corneal lens chitin in dragonfly compound eyes, International Journal of Biological Macromolecules, 89, 54-61.

Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I. ve Labidi, J., 2017. On chemistry of γ-chitin, Carbohydrate Polymers, 176, 177-186.

Kim, M. W., Song, Y. S., Seo, D. J., Han, Y. S., Jo, Y. H., Noh, M. Y., Jang, Y. C., Park, Y. K., Kim, S. A., Choi, C. ve Jang. W. J., 2017. Extraction of chitin and chitosan from the exoskeleton of the cockroach (Periplaneta americana L.), Academic Society Journal, 22, 2, 76-81.

Knidri, H. E., Dahmani, J., Addaou, A., Laajeb, A. ve Lahsini, A., 2019. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight, International Journal of Biological Macromolecules, 139, 1092-1102.

Li, B., Kam, D., Wang, J., Gui, Q. ve Yang, H., 2020. Drug-loaded chitosan film prepared via facile solution casting and air-drying of plain water-based chitosan solution for ocular drug delivery, Bioactive Materials, 577-583.

Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. ve Yang, Q., 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle Holotrichia parallela Motschulsky, Molecules, 17, 4, 4604-4611.

Machałowski, T., Wysokowski, M., Tsurkan, M. V., Galli, R., Schimpf, C., Rafaja, D., Brendler, E., Viehweger, C., Aksamitowska, S. Z., Petrenko, I., Czaczyk, K., Kraft, M., Bertau, M., Bechmann, N., Guan, K., Bornstein, S. R., Voronkina, A., Fursov, A., Bejger, M., Antosiak, K. B., Rypniewski, W., Figlerowicz, M., Pokrovsky, O., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2019. Spider Chitin: An Ultrafast Microwave-Assisted Method for Chitin Isolation from Caribena versicolor Spider Molt Cuticle, Molecules, 24, 20, 3736.

Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G. ve Šimúth, J., 2006. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (Bombus terrestris), International Journal of Biological Macromolecules, 40, 3, 237-241.

Mochizuki, Y. ve Miyazaki, K., 2017. Postembryonic development of the sea spider Ammothella biunguiculata (Pycnogonida, Ammotheidae) endoparasitic to an actinian Entacmaea quadricolor (Anthozoa, Stichodactylidae) in Izu Peninsula, Japan, Invertebrate Reproduction & Development, 61, 3, 189-199.

Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Rajeevgandhi, C., Rajan, D. K. ve Seedevi, P., 2019. Extraction and characterization of chitin from sea snail Conus inscriptus (Reeve, 1843), International Journal of Biological Macromolecules, 126, 555-560.

Mol, A., Kaya, M., Mujtaba, M. ve Akyuz, B., 2018. Extraction of high thermally stable and nanofibrous chitin from Cicada (Cicadoidea), Entomological Research, 48, 6, 480-489.

Negm, N. A., Hefni, H. H., Abd-Elaal, A. A., Badr, E. A. ve Abou Kana, M. T., 2020. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications, International Journal of Biological Macromolecules, 152, 681-702.

Rahman, M. A. ve Halfar, J., 2014. First evidence of chitin in calcified coralline algae: new insights into the calcification process of *Clathromorphum compactum*, Scientific Reports, 4, 6162.

Sabroux, R., Audo, D., Charbonnier, S., Corbari, L. ve Hassanin, A., 2019. 150-million-year-old sea spiders (Pycnogonida: Pantopoda) of Solnhofen, Journal of Systematic Palaeontology, 17, 22, 1927-1938.

Sabroux, R., Corbari, L., Krapp, F., Bonillo, C., le Prieur, S. ve Hassanin, A., 2017. Biodiversity and phylogeny of Ammotheidae (Arthropoda: Pycnogonida), European Journal of Taxonomy, 286.

Sajomsang, W. ve Gonil, S., 2009. Preparation and characterization of α-chitin from cicada sloughs, Materials Science and Engineering: C, 30, 3, 357-363.

Salama, A., Hasanin, M. ve Hesemann, P., 2020. Synthesis and antimicrobial properties of new chitosan derivatives containing guanidinium groups, Carbohydrate Polymers, 116363.

Sebastian, J., Rouissi, T., Brar, S. K., Hegde, K. ve Verma, M., 2019. Microwave-assisted extraction of chitosan from Rhizopus oryzae NRRL 1526 biomass, Carbohydrate Polymers, 219, 431-440.

Soon, C. Y., Tee, Y. B., Tan, C. H. ve Rosnita, A. T., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from Zophobas morio larvae in varying sodium hydroxide concentration, International Journal of Biological Macromolecules, 108, 135-142.

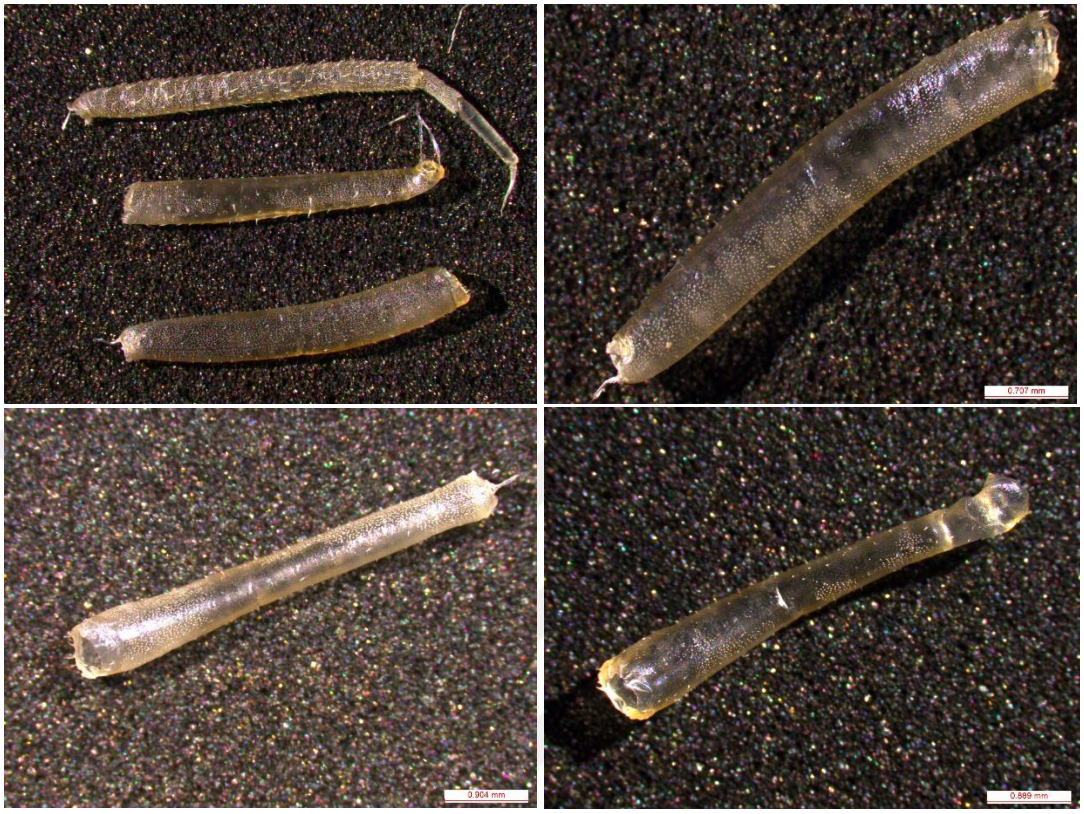
Srinivasan, H., Kanayairam, V. ve Ravichandran, R., 2018. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells Penaeus monodon and its human ovarian cancer cell line, PA-1, International Journal of Biological Macromolecules, 107, 662-667.

Waśko, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C. ve Bieganowski, A., 2016. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from Hermetia illucens, International Journal of Biological Macromolecules, 92, 316-320.

Zelencova, L., Erdoğan, S., Baran, T. ve Kaya, M., 2015. Chitin extraction and chitosan production from Chilopoda (Scolopendra cingulata) with identification of physicochemical properties, Polymer Science Series A, 57, 4, 437-444.

EKLER

Ek A. *B. abyssorum* bacak kısımlarının üç boyutlu kitini.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mohammed AL-DUBAI

Adres : Taşpazar Mah.835 Sk. Çavanlar Apt. Sitesi B-Blok No:3-1 İç Kapı No:4 Merkez/Aksaray

E-posta adresi : ynak93@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2014-2018

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, biyoteknoloji ve Moleküler ABD, 2018-2020

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Erasmus Staj Programı (16.09.2019-16.11.2019), Vytautas Magnus Üniversitesi, Kaunas /LİTVANYA

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Al-dubai, M. ve Kaya, M., 2020. *Pycnogonum littorale* ve *Boreonymphon abyssorum* deniz örümceklerinden kitin elde etmesi ve fizikokimyasal özelliklerini karakterizasyonu, Ankara II. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, 6-8 Mart 2020, Ankara, Özet Kitabı, 260-261.