



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*ACULEPEIRA CEROPEGIA* (WALCKENEAR, 1802) (ARANEAE: ARANEIDAE)  
TÜRÜNDE KİTİN VE KİTOSAN İZOLASYONU VE FİZİKOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU

ZEHRA DEMİR

Eylül 2017



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*ACULEPEIRA CEROPEGIA* (WALCKENEAR, 1802) (ARANEAE: ARANEIDAE)  
TÜRÜNDE KİTİN VE KİTOSAN İZOLASYONU VE FİZİKOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU

ZEHRA DEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Osman SEYYAR

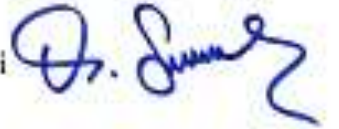
Eylül 2017

Zehra DEMİR tarafından Doç. Dr. Osman SEYYAR danışmanlığında hazırlanan "*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) (Araneae: Araneidae) Türünde Kiti ve Kitosan İzolasyonu ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu" isimli bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Tuncay TÜRKES Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Osman SEYYAR Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Musa KAR Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi



#### ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.../.../20...

Doç. Dr. Murat BARUT  
MÜDÜR V.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Zehra DEMİR

## ÖZET

*ACULEPEIRA CEROPEGIA* (WALCKENEAR, 1802) (ARANEAE: ARANEIDAE)  
TÜRÜNDE KİTİN VE KİTOSAN İZOLASYONU VE FİZİKOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU

DEMİR, Zehra

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Osman SEYYAR

Eylül 2017, 32 sayfa

Kitin ve kitosan son zamanlarda endüstri alanında oldukça dikkat çekmektedir ve ilaç endüstrisi, eczacılık, gıda mühendisliği, biyokatalizör, atık su temizliği gibi pek çok alanlarda kullanılmaktadır. Kitin endüstriyel olarak yengeç, karides ve istakoz gibi deniz ürünlerinden yan sanayi olarak üretilmektedir. Kitosan kitinin deasetilasyonundan yüksek sıcaklıkta sodyum hidroksit konsantrasyonun da üretilmektedir. Son yıllarda böcekler, mantarlar, mercan ve kabukluların yumurtaları kitin kaynağı olarak önerilebilmektedir. Bu amaçla yeni kitin kaynakları önerebilmek için bir örümcek türü olan *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)'nin SEM, FTIR, TGA ve XRD değerleri çalışılmıştır. Bu çalışma sonunda bu türde bulunan kitinin alfa formunda olduğu, yüzeyinin nanofiber ve nanoporlardan oluştuğu, termal kararlılığının yüksek olduğu ve alternatif kitin kaynağı olarak önerilebileceği görülmüştür.

*Anahtar sözcükler:* Örümcek, Kitin, Kitosan

## SUMMARY

ISOLATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHITIN  
AND CHITOSAN FROM *ACULEPEIRA CEROPEGIA* (WALCKENEAR, 1802)  
(ARANEAE: ARANEIDAE)

DEMİR, Zehra

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor

: Assoc. Prof. Osman SEYYAR

September 2017, 32 pages

Chitin and chitosan are currently receiving a great deal of interest industry areas which are medical and pharmaceutical, food applications, biocatalysis, waste water treatment, and new applicaitons for chitin and chitosan. Chitin is industrially extracted from crab and shrimp shells obtained as a byproduct in the sea food industry. Chitosan is produced by deacetylation of chitin with hot concentrated sodium hydroxide. In recent years, some studies have emphasized that insects, mushrooms, coral and crustacean resting eggs can be alternative sources of chitin. In order to purpose a new chitin and its derivatives resource, we studied *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) which has common distribution in Turkey. These chitins characterized with SEM, FTIR, XRD and TGA. The dry weight of the chitin content of this species determined and compare with the chitin content of other groups of organisms, and we found that it has alpha form and nonofibers/nanopors, also TGA higher than some chitin specimens and and may purpose a new chitin resource for using commercially.

*Keywords:* Spider, Chitin, Chitosan

## ÖN SÖZ

Kitin, doğada selülozdan sonra ikinci en yaygın amino polisakkarittir. Kabuklu su canlılarının ve karasal eklembacaklıların dış iskeletinde, planktonlarda ve mantarların hücre duvarlarının yapısında bulunmaktadır. Kitinin deasetilasyonu sonucu başlıca türeği olan kitosan elde edilmektedir. Kitin ve kitosan günümüzde tıp, gıda, ziraat, kozmetik, eczacılık, atık su arıtımı, fotoğrafçılık ve tekstil sektörleri gibi sayısız alanda kullanılabilir. Bu çalışmada kitin ve kitosanın daha önce izolasyonu yapılmamış bir örümcek türünden eldesi yapılmış ve bu biyomateryallerin fizikokimyasal özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu şekilde daha önceden kitin izolasyonu yapılmamış canlılardan daha üstün özellikli kitin ve kitosan eldesinin araştırılması, bu alandaki çalışmalara yön verecek ve farklı bakış açıları kazandıracaktır.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, FEB2016/02- BAGEP nolu projeye destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, analiz işlemlerinde yardımlarını gördüğümüz üniversitemiz Merkezi Araştırma Laboratuvarı uzmanlarına, tez çalışmamın yürütülmesi esnasında yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Osman SEYYAR'a ve maddi, manevi her türlü desteği sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	iv
ÖN SÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR .....	iv
BÖLÜM I GİRİŞ .....	1
1.1 Kitin ve Kitosan Nedir? .....	1
1.2 Kitinin Kimyasal Formülü ve Kimyasal Özellikleri .....	2
1.3 Kitin ve Kitosanın Biyolojik Özellikleri ve Kullanım Alanları .....	3
1.4 Örümceklerin Genel Özellikleri .....	6
BÖLÜM II LİTERATÜR ÖZETİ .....	10
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD .....	15
3.1 FTIR Analizi .....	17
3.2 Termogravimetrik Analizi (TGA) .....	17
3.3 XRD .....	18
3.4 SEM .....	18
BÖLÜM IV BULGULAR, SONUÇ VE TARTIŞMA .....	20
4.1 FT-IR .....	20
4.2 TGA .....	21
4.3 XRD .....	23
4.4 SEM .....	24
KAYNAKLAR .....	27
ÖZGEÇMİŞ .....	32

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.1. Kitin ve kitosanın kullanım alanları ve bazı uygulamalarda kullanım şekilleri .....	6
---	---



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitin ve Kitosan bileşiklerinin kimyasal yapıları .....	2
Şekil 1.2 Bir yengeç örümceğinin dorsal ve ventralden görünüşü .....	7
Şekil 1.3. Örümceklerde genel anatomik yapılar .....	8
Şekil 1.4. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünün genel bir görünüşü .....	8
Şekil 3.1. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünün dış iskeletinden kitin ve kitosan eldesi.....	16
Şekil 3.2. Bruker Marka Vertex 70 model FTIR Spektrometresi .....	17
Şekil 3.3. Linseis STA PT1600 marka TGA cihazı.....	17
Şekil 3.4. Panalytical Marka empyrean model XRD .....	18
Şekil 3.5. Zeiss Marka evo 40 model SEM .....	19
Şekil 3.6. EDX Marka Edax .....	19
Şekil 4.1. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve üretilen kitosanın FT-IR spektrası (a. kitin, b. kitosan) .....	21
Şekil 4.2. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitininden üretilen kitosanın TGA analizi (a. kitin ve b. kitosan) .....	22
Şekil 4.3. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın XRD analizi (a. kitin ve b. kitosan).....	24
Şekil 4.4. <i>Aculepeira ceropegia</i> (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın SEM ile elde edilmiş yüzey görüntüleri (a,b. kitin; c,d. kitosan).....	25

## SİMGE VE KISALTMALAR

### Simgeler

°	Derece
%	Yüzde

### Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
D	Doğu
Fe	Femur
İTÇ	İntermedial Tibial Çıkıntı
K	Kuzey
Km	Kilometre
Mt	Metatarsus
M	Metre
Mm	Milimetre
Pa	Patella
RTÇ	Retrolateral Tibial Çıkıntı
Ta	Tarsus
Ti	Tibia
VTÇ	Ventral Tibial Çıkıntı

# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Son zamanların en çok çalışılan biyolojik makromolekülleri kitin ve bunun bir türevidir olan kitosandır (Aranaz vd. 2009). Doğada çok yaygın olarak bulunan ve bir aminopolisakkarit olan kitinin, ticari amaçlar için yıllık selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir. Kitin ve kitosanın; doğal bir kaynak olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve çevre kirliliğine neden olmaması, hem bitki hem hayvan dokuları için uyumlu olması ve toksik etkisinin olmaması, biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olması, molekül yapısının değiştirilebilir olması nedeniyle endüstriyel alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Tharanathan ve Kittur 2003; Dutta vd., 2004; Aranaz vd., 2009).

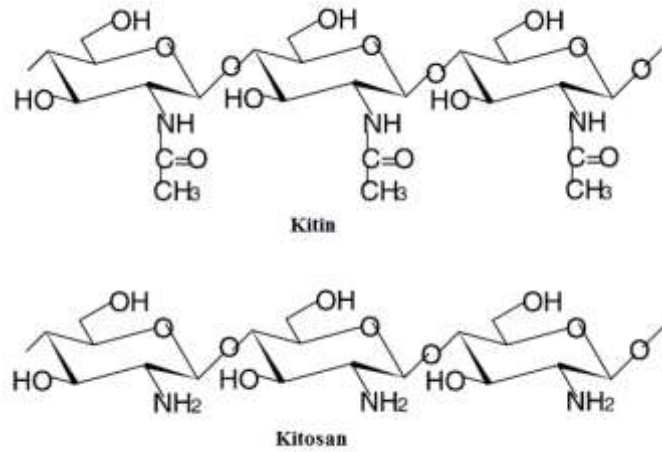
### 1.1 Kitin ve Kitosan Nedir?

Kitin ilk olarak mantarların hücre duvarı keşfedilmiş ve daha sonra yengeç, karides, istakoz, kerevit gibi canlıların atık kabuklarında gözlenmiştir. Daha sonraki incelemelerde ise kitinin böceklerinde içinde yer aldığı tüm Arthropoda şubesinde, örümceklerde, süngerlerde, mercanlarda, tardigradlarda, nematodlarda ve alglerde bulunduğu ortaya konmuştur (Al Sagheer vd., 2009; Ehrlich vd., 2010a; Ehrlich vd., 2013; Ifuku vd., 2011; Kaya vd., 2014c; Rinaudo, 2006). Yeni yapılan bir çalışmada ise kitinin omurgalı canlılarda varlığı kaydedilmiştir (Tang vd., 2015). Yapılan bu çalışmalar göstermektedirki; dünyadaki tüm canlıların %70'inden fazlasının yapısında kitin bulunmaktadır.

Kitin ve kitinin zayıf asitlerde çözünür formu olan kitosan antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, biyouyumlu, biyolojik olarak doğada bozunur olması nedeniyle farklı bilim dalları tarafından büyük ilgi görmektedir (Aranaz vd., 2009; Brunner vd., 2009a; Ehrlich vd., 2010b). Özellikle tıp, eczacılık, gıda, kozmetik, su arıtımı, veterinerlik ve diğer birçok mühendislik dallarında uygulama şansı bulmaktadır (Aranaz vd., 2009; Arbia vd., 2013; Benhabiles vd., 2012; Brunner vd., 2009b; Chien vd., 2016; Coma vd., 2002).

## 1.2 Kitinin Kimyasal Formülü ve Kimyasal Özellikleri

Kitin karakterize edildiği zaman önce kitin ve kitosan bileşikleri oluşur. Kitin ve kitosanın fonksiyonel bir amino grubunun bulunması açısından ilginç polisakkaritlerdir. Çünkü fonksiyonel bir amino grubunun bulunması istenilen özelliklerin kazandırılması ve çözünürlükte dahil belirli biyolojik özellikler için modifiye edilebilir olması açısından önemlidir. Kitin ve kitosandaki amino grubunun fonksiyonelliği, asetilasyon, quaternizasyon, aldehit ve ketonlarla reaksiyona girme, alkillenme, açılma, metallerin kelatlanması vb. özelliklerinin artmasını ve antibakterial, anti-fungal, anti-viral anti-asit, anti-ülser, toksik olmayan, anti-allerjik, total biyolojik uyumlu, biyo parçalanabilirlik gibi ürün çeşitliliğini sağlar. Fonksiyonel hidroksil grubu, o-asetilasyon, polar atomlarla Hidrojen bağları, aşılama vb. farklı reaksiyonlara girmesini sağlar. Kristal yapısı nedeniyle düşük çözünürlükte olması, kitinin kullanım alanını sınırlayan en önemli faktör olduğunu rapor etmiştir. Kitinin elde edilen materyalin özelliğine göre  $\alpha$ -kitin,  $\beta$ -kitin ve  $\gamma$ -kitin olmak üzere üç polimorfik kristal yapısı olduğunu rapor etmişlerdir (Sashiva ve Aiba 2004, Pillai vd. 2009, Aranaz vd.2009). Şekil 1’de kitin ve kitosan bileşiklerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Kitin ve Kitosan bileşiklerinin kimyasal yapıları

Şekil 1’de açık yapısı verilen kitin bileşiği 2-asetamido-2deoksi-d-glikoz ya da N-asetil glikozamid birimlerinin 1-4 bağlanmasıyla uzun polimer zinciri oluşturan suda çözünmeyen, sert polimerik bir maddedir.

Kitosan ise kitinden elde edilen temel bileşendir. Kimyasal yapısında da anlaşılacağı üzere N-asetil glikozamin ve glikoz aminin kopolimeri şeklindedir. Her ne kadar suda çözünmese de yapısında bulunan amino gruplarından dolayı asidik çözeltileride çözünebilen bir bileşiktir. Her iki bileşik te glikozun bir türevidir.

### **1.3 Kitin ve Kitosanın Biyolojik Özellikleri ve Kullanım Alanları**

**Biyolojik olarak parçalanabilirliği:** Kitin ve kitosan memelilerde bulunmamakla birlikte; lizozim, papain, pepsin vb. enzimlerle canlı içinde parçalanabilmektedir. Lizozim, bütün memeli dokularında bulunan, spesifik olmayan bir proteazdır. Proteaz kitin ve kitosanın parçalanmasında önemli bir rol oynar ve moleküldeki asetil grupların dağılımı, zincirlerin uzunluğu biyolojik olarak parçalanabilirliğini etkileyen en önemli faktörlerden bir kaçıdır.

**Biyolojik Uyumluluk:** Kitin ve kitosan canlı dokuları için çok uyumludur fakat bu uyumluluk moleküllerin doğal olup olmamasına, preparasyon metoduna, molekül ağırlığına ve deasetilasyon derecesine bağlıdır.

**Haemostatik:** Kitosan ve kitosan-sülfat oligomerinin in vitro çalışmalarda antikoagulant aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir. Kitosanın antikoagulant aktivitesi pozitif elektrik yükü ile ilgilidir çünkü kırmızı kan hücresi membranları negatif yüklüdür ve kitosan daha çok etkilidir. Kitosanın moleküler ağırlığı aynı zamanda kırmızı kan hücreleriyle bağ yapmasını veya pıhtılaşmasında etkilidir.

**Ağrı kesici etkisi:** Kitin ve kitosanın her ikisi de ağrı kesici etkiye sahiptirler ve bazı araştırmacılara göre, kitosanın kitinden daha fazla ağrı kesici özelliği vardır ve kitosanın ağrı kesici özelliği yaralı bölgeye salınan iyonları absorbe etmesi ile ilgilidir.

**Antitumor aktivitesi:** Oligomerlerinin in vivo ve in vitro şartlarda antitümör aktivitesinin olduğunu rapor edilmiştir. Araştırmacılar farelerde yapılan deneylerde, düşük molekül ağırlıklı kitosanın akciğer karsinomasına karşı önemli derecede antimetastazik etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir.

**Mukoadezyon:** Fizyolojik değişiklikler ve fizikokimyasal özellikler kitosanın mukoadezyon özelliğini etkilemektedir. Ayrıca kitosan epitel hücreleri arasındaki bağları açarak bazı maddelerin dokulara nüfuz etmesini artırdığı belirtilmiştir.

**Antikolesterolemik:** Kitosanın yapısında amino grubunun bulunması, safra asidi ve yağ asitleri gibi, anyonik maddeler ile kitosan arasındaki elektrostatik çekim gücünü belirler. Kitosan ile anyonik yüzeye sahip safra asidi ve yağ asitleri gibi moleküller arasındaki etkileşim, bunların üç tane reaktif olan fonksiyonel gruplarına bağlıdır.

**Antimikrobiyal aktivite:** Kitin, kitosan ve bunların türevlerinin mantar, bira mayası, bakteri gibi mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyal aktiviteleri son zamanlarda önemli derecede dikkati çekmektedir.

**Antioksidatif aktivite:** Kitosan farklı oksijen radikallerine karşı, deasatilyasyon derecesine bağlı olmak üzere süperoksit, hidroksil ve alkalik radikallerde bulunan zararlı gazların dışarı atılmasında önemli oranda etkilidir.

Kitin ve kitosanın teknolojiye biyomedikal ve diğer sektörlerde birçok kullanım alanları mevcuttur. Bunlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır.

**Yaraların iyileştirilmesi:** Kitin ve kitosan immün hücreleri, angioendotel, fibroblast, makrofaj ve PMN gibi inflamatuvar hücreleri aktive eder. Kitosan hücrelerin aynı zamanda fibroblast büyüme faktörlerini etkileyerek fibroblast üretimini uyarması ile yaraları iyileştirmede etkili olduğu rapor edilmiştir.

**İlaç verme sistemleri:** Endüstride kitosanın önemli uygulamalarından biride nanopartükül, hidrojel, mikroküreler film ve tabletler olmak üzere hastaya ilaç verme sistemindeki uygulamalarıdır. Farmakolojik uygulamalar burun, oral, göz, paranteral, deri yoluyla verme gibi hastaya ilaç verme şekillerini içerir.

**Gen aktarımı:** Kitosanın sahip olduğu pozitif elektrik yük nedeniyle DNA gibi negatif yüklü moleküllerle bağ yapma özelliği vardır. Kitosanın viral olmayan vektör sistemi olarak kullanılması gen aktarım mekanizmasında viral vektör sistemlerine göre daha avantajlı olmuştur. Çünkü kitosan, içte rekombinasyona sebep olmaması, kanser etkisinin



olmaması, immünolojik reaksiyonların olmaması dahası kitosan/pDNA komplekslerinin daha ucuza mal edilmesi nedeniyle oldukça avantajlıdır.

**Doku Mühendisliği:** Düşük bağışıklık sistemi aktivitesi, biyo çözünürlüğü ve porlarının yapısı nedeniyle kitosan iskelet yapısı doku mühendisliği sistemlerinin dizayn edilmesinde umut verici bir maddedir. Kitin ve kitosan tüpleri sinir hücrelerinin regenerasyonu için bazı araştırmacılar tarafından hazırlanmıştır. Kitin ve kitosanın her ikisi de adhezyon ve öncelikle civcivde dorsal kök ganglion nöronlarında invitro şartlarda farklılaşmasına destek olduğu belirlenmiştir.

**Besin bileşenleri:** Kitosan, yağlar ile bağ yapabilme özelliği nedeniyle çok yönlü besinsel destek maddesi olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar ratlarda beslenme diyeti yüksek deasetile edilmiş kitosan içerdiğinde düşük plazma kolesterolü ve LDL-C ve artan HDL-C seviyesi rapor edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan yetişkin ratlarda vücut ağırlığını önemli oranda azalttığı rapor edilmiştir.

**Besinlerin korunması:** Kitosan, besin çürütme mikroorganizmalarına karşı antimikrobal aktivitesi ve antioksidan özelliği nedeniyle, doğal orijinli çok yönlü besin koruyucu olarak tanımlanmaktadır. Genellikle düşük ve orta molekül ağırlıklı ve yüksek deasetilasyon derecesindeki kitosan gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çoğalmasını durdurmaktadır.

**Suyun arıtılmasında kitin ve kitosan kullanılması:** Kitin ve kitosan, uygun özellikleri nedeniyle enzim destekçisi ve hücre hareketlerini bloke etmek için yaygın bir kullanıma sahiptir. Suyun metaller, aromatik moleküller, toksik maddeler ve boya gibi maddeler nedeniyle kirlenmesi sonucu çevreye büyük zararlar vermektedir ve bu özelliği insanlar içinde potansiyel bir tehlike kaynağıdır. Kitin ve kitosan gibi ucuz elde edilen polimerler su kirleticilerini sudan uzaklaştırması nedeniyle çok dikkat çekmektedir (Fereidoon vd. 1999, Sashiva ve Aiba 2004, Aranaz et.al.2009, Demir ve Seventekin 2009). Kitin ve kitosanın ticari amaçla kullanılma sahasını etkileyen faktörlerden bazıları aşağıdaki Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.1.** Kitin ve kitosanın kullanım alanları ve bazı uygulamalarda kullanım şekilleri

Yara iyileştirmelerde	Yüksek DD kitosan kitin üzerinden tercih edilir	
İlaç verme sistemleri	Yüksek DD ve Mw	
Gene transferi	DD≤80	
İskelet (doku mühendisliğinde)	DD yaklaşık 85 (iyi yapı ve tomurcuklanma) Yüksek Mw	
Hücre hareketsizliği	Kitosan kitin üzerinden tercih edilir (yüksek DD)	
Enzim hareketsizliği	Enzime, hareketsizlik metoduna ve reaksiyona bağlıdır Düşük kül içeriği	
	Tutunma	Kitin nötr veya a yüklü proteinler
	Kovalent	Kitosan, - yüklü protein yüksek DD
	Kapsülleme	Kitosan-Yüksek Mw ve DD
Besin katkı maddesi	Yüksek DD VE Mw	
Besin koruma	Yüksek DD, Minimum-düşük Mw	
Emülsiyon ajanı	Düşük Mw, Yüksek vizikozite	
Atık su ile muamele	Kirlenmeye ve suyun pH, iyonik kuvveti gibi şartlara bağlıdır. Genellikle kitin üzerinden elde edilen kitosan tercih edilir. Yüksek DD ve düşük kristalite önemlidir	
Metal indirgenme	Metal indirgenme kitosanın karakterine bağlıdır Yüksek DD ve düşük Mw	
	Morfoloji ve Mw bağlı	

DD: Deasetilasyon derecesi; Mw: moleküler ağırlık

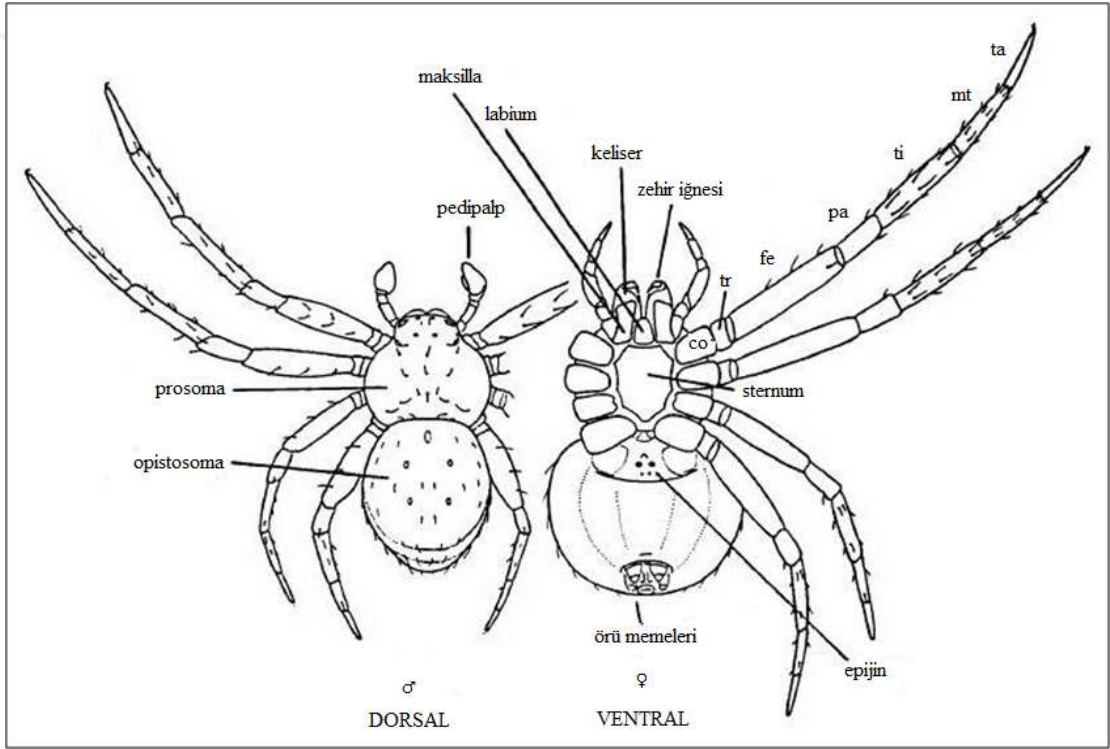
Kitin ve kitosan üzerine gerçekleştirilen çalışmaların artması ve bu alanda yeni uygulama alanlarının keşfedilmesiyle kitin ve türevlerine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı yeni kitin kaynaklarına yönelim artmaktadır.

#### 1.4 Örümceklerin Genel Özellikleri

Örümcekler, üç filogenetik gruba ayrılır. Bunlar; Mesothelae, Mygalomorphae ve Araneomorphae'dir (Kral, 1994; Araujo vd., 2005). Mesothelae yaklaşık 130 tür ile

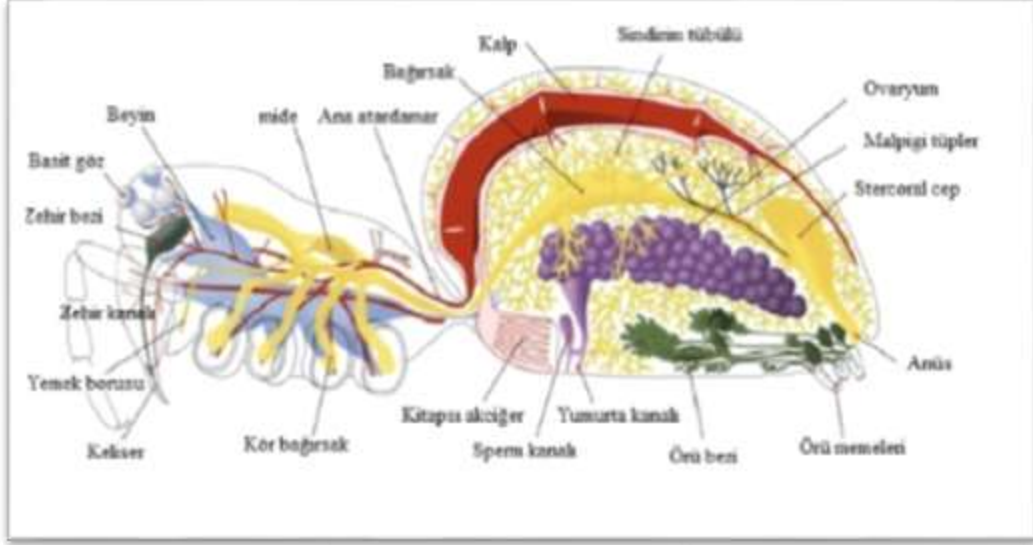
temsil edilirken Mygalomorphae 15 familyaya ait 2500 türe sahiptir. Araneomorphae ise 114 familya, 3933 cins ve 45143 tür ile temsil edilmektedir (Platnick, 2017).

Habitus yapısı örümcekler de (prozoma) ve karın (opistozoma) olmak üzere iki segmentli yapı göstermekte olup pedisel (bel) ile birbirine bağlanmıştır. Başgöğüs (sefalotoraks) karapas adı verilen kitinli bir yapıyla dorsal kısımda örtülmüştür. Ön bölgede basit yapılı gözler ile keliserler vardır. Genellikle örümceklerde göz sayısı 8 olup bazı gruplarda bu sayı 6, 4, 2 olabileceği gibi mağara türlerinde tamamen ortadan kalkmış olabilir. Gözlerin sayısı ve dizilimi sistematikte önemli bir yer tutar. Bazı türlerde orta gözler koyu renkli olup bunlara gece gözleri, bazılarında ise açık renkli olup bunlarada gündüz gözleri denir.



**Şekil 1.2** Bir yengeç örümceğinin dorsal ve ventralden görünüşü (Ono, 1988)

Genel olarak dişi örümcekler erkek bireylerden 2-3 kat daha büyük olup çiftleşme esnasında erkek bireyler için ölüm tehlikesi vardır. Erkek eşey bir böcek sunarak dişinin açlığını gidermeye çalışır bu davranışa “düğün dansı” denir. Döllenme sonrası yumurtalar ağ ipeği ile yapılan kese şeklindeki kozaların içine bırakılır. Güz döneminde bırakılan yumurtalardan yavru çıkışı ilkbaharda gözlenirken, yaz başlarında döllenmiş yumurtalardan 20-60 gün içinde yavru bireyler çıkar (Babaşoğlu, 1999).



**Şekil 1.3.** Örümceklerde genel anatomik yapılar (Foelix, 1996)

Bu proje kullandığımız *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türü Araneidae familyasına ait bir örümcek türüdür. Daha çok bitkiler üzerine tekerlek şeklinde ağlar kurarak genellikle böcekler üzerinden beslenir ve doğal dengenin korunmasına ekolojik açıdan büyük bir katkı sağlar. Ülkemizde geniş bir yayılış alanına sahiptir. Yaygın bir tür olması tez materyali olarak seçilmesinin en büyük faktörüdür.



**Şekil 1.4.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünün genel bir görünüşü

Bu tez çalışmanın amacı, bir örümcek türü olan *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)'da dünyada ilk kez bu proje ile kitin ve kitosan izolasyonu yapmak ve elde edilen bu biyomateryalin FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleriyle fizokimyasal özelliklerini belirlemektir.



## BÖLÜM II

### LİTERATÜR ÖZETİ

Son yıllarda kitin ve kitosan üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. 2000'li yıllardan günümüze doğru bu çalışmaları incelediğimizde yeni kitin kaynakları bulmak ve kitin ve kitosanın yeni uygulama alanlarını belirlemek üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

Kitinin klasik üretim yöntemi, deniz kabuklusu atıklarından kuvvetli asit ve baz uygulamalarına dayanan kimyasal yöntemdir. Kimyasal yöntemde en fazla kullanılan asit HCl ve baz da NaOH'dir. Bunların yüksek konsantrasyonlarda ve miktarlarda kullanılması çevre için bir tehlike oluşturmaktadır. Bu yüzden, kimyasal yönteme alternatif biyolojik metodlar üzerinde çalışılmaktadır. Biyolojik yöntemde enzim ya da doğrudan mikroorganizma aracılığı ile ekstraksiyon gerçekleştirilmek istenmektedir (Simpson vd., 1994; Synowiecki vd., 2003).

Kitin ve bunun türevleri olan kitosan, glukozamin ve N-asetil glukozamin; yapay deri ve yara iyileştirme elbiseleri, ilaç taşıma sistemleri, kozmetik, beslenme ve diyet ürünleri, enzim immobilizasyonu, ağır metal giderimi, tekstil boyalarının giderimi, kağıt üretimi, agronomik uygulamalar, oftalmoloji, fotoğrafçılık gibi çeşitli alanlarda kullanım yeri bulmuştur (Shahidi ve Abuzaytoun 2005; Rinaudo 2006).

Yen ve Mau (2006), tarafından yapılan çalışmada *Lentinula edodes* Pegler mantarından izole edilen kitinde üç farklı alkali renk giderme tekniğini kullanılmıştır. Renk giderme amacıyla sodyum hipoklorit, etanol ve potasyum permanganat çözeltileri kullanılmıştır. En fazla kitin verimi sırasıyla etanol, sodyum hipoklorit ve potasyum permanganat çözeltileri kullanılan tekniklerde bulunmuştur ve % 25.08-36.72 oranında kitin izole edilmiştir.

Aytekin vd., (2007), deniz kabuklularının atıkları kitin olarak bilinen ve doğada kendiliğinden oluşan biyopolimerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Kitin ve türevleri, fizikokimyasal özellikleri bakımından diğer biyopolimerlerden farklı olup, çok çeşitli alanda kullanılmaktadır. Bu çalışmada derin kültür yöntemi ile üç farklı mikroorganizma kullanılarak ve farklı stratejiler uygulayarak, karides kabuğundan kitin

ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve kimyasal yöntemle karşılaştırılmıştır. *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* mikroorganizmalarının kullanıldığı çalışmada farklı glukoz konsantrasyonlarındaki kitin ekstraksiyon veriminin nasıl değiştiği incelenmiştir. Ayrıca *Lactococcus lactis* ve *Teredinobacter turnirae* ile hazırlanan kokültür prosesleri ile de kitin ekstraksiyon verimi arttırılmaya çalışılmıştır. Kitin kalitesi düşük mineral (kalsiyum), kül ve protein değerleri ile belirlendiğinden, çalışmanın her aşamasında, proteaz aktivitesi, protein ve kül tayinleri ile pH değişimi ölçülerek her bir prosesi etkileyen parametreler optimize edilmeye çalışılmıştır.

Proses verimine ve son ürünlerdeki kitin yüzdesine göre, en yüksek biyolojik kitin ekstraksiyonu, önce *Teredinobacter turnirae*'nin sonra *Lactococcus lactis*'in inokülasyonunun yapıldığı K-2 prosesinde %5 (ağırlık/hacim) glukoz içeren ortamda elde edilmiştir.

George vd., (2011), tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus flavus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* spp. ve *Phoma* spp. mantar türleri seçilmiştir. NaOH ve asetik asit kullanarak mantarlardan kitosan ekstre edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre *Aspergillus flavus*'dan 57 mg/g, *Cladosporium cladosporioides*'dan 25.2 mg/g ve *Phoma* spp. türünden 31.1 mg/g kitosan izole edilirken, *Fusarium* spp. ve *Botryodiplodia theobromae* mantarlarından kitosan elde edilememiştir. Kitosan FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. FTIR spektrumlarında 3000 cm<sup>-1</sup> ve 3500 cm<sup>-1</sup> geniş bantlar gözlenirken, 2885 cm<sup>-1</sup>, 1650 cm<sup>-1</sup>, 1589 cm<sup>-1</sup>, 1326 cm<sup>-1</sup> ve 1080 cm<sup>-1</sup> değerleri civarında da zayıf pikler kaydedilmiştir.

Limam vd., (2011), tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Parapenaeus longirostris* ve *Squilla mantis* türlerinden izole edilen kitin daha yararlı çözünen olan kitosana dönüştürülmüştür. Bu ürünlerin, antimikrobiyal ve anti-fungal özellikleri gibi biyolojik aktiviteleri de belirlenmiştir. Üretilen kitin ve kitosanın FTIR ile karakterize edildiği çalışmada spektrumda 1552 cm<sup>-1</sup> ile 1652 cm<sup>-1</sup>'de pik verdiği gözlenmiştir.

Thirunavukkarasu vd., (2011), tarafından yapılan çalışmada *Oratosquilla quinquentata* ve *Oratosquilla nepa* türleri seçilmiştir. 20'Çer g örneğin kullanıldığı çalışmada *O. quinquentata*, *O. nepa* türlerinde sırasıyla 2.125 g ve 2.145 g kitin izole edilmiştir ve kitin verimleri % 10.625 ve % 10.725 olarak belirlenmiştir. FTIR spektrumlarında *O.*

*quinquedentata* 569.00 cm<sup>-1</sup>, 1070.77 cm<sup>-1</sup>, 1370.41 cm<sup>-1</sup>, 1555.02 cm<sup>-1</sup> ve 1656.82 cm<sup>-1</sup>'de, *O. nepa* ise 529.15 cm<sup>-1</sup>, 695.23 cm<sup>-1</sup>, 897.35 cm<sup>-1</sup>, 1028.95 cm<sup>-1</sup>, 1200 cm<sup>-1</sup>, 1324.28 cm<sup>-1</sup>, 1371.11 cm<sup>-1</sup> ve 1634.55 cm<sup>-1</sup>'de bantlar gözlenmiştir.

İsa vd., (2012), tarafından yürütülen çalışmada yengeç, kerevit, karides ve salyangozdan demineralizasyon ve deproteinizasyon aşamaları sonrasında kitin elde edilmiştir. En fazla kitin % 8.15 oranıyla karidesten, daha sonra yengeçten % 7.80, kerevitten % 2.88, salyangozdan ise % 0.44 oranında kitin izole edilmiştir. Yengeçte % 4.16 protein, % 1.30 yağ, % 74.12 karbonhidrat bulunduğu tespit edilmiştir. İzole edilen kitinler XRD ve SEM ile karakterize edilmiştir. SEM mikrofotografında karides ve yengeçten izole edilen kitinde fibriler ve granüler yapı gözlenmiştir. Kerevitin kitin yüzeyi paralel bir iplik oluşturacak şekilde liflerden oluştuğu belirlenmiştir. XRD analizi farklı kaynaklardan izole edilen kitinlerde, farklı tepe noktaları ve farklı kristal derecelerinin olduğunu göstermiştir.

Liu vd., (2012), tarafından yapılan çalışmada *Holotrichia parallela* türü böcekten kitin izolasyonu için 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltilerinin ardından renksizleştirme işlemi için % 1 potasyum permanganat çözeltisi kullanılmıştır. Bu türden % 15 oranında kitin izole edilmiştir. izole edilen kitin XRD, SEM ve elemental analiz teknikleri ile karakterize edilmiştir. Kitinin deasetilasyon derecesi % 93.1 olarak hesaplanmıştır. XRD sonuçlarında 9.2° ve 19.1° iki güçlü pik, 12.6°, 22.9° ve 26.2° üç zayıf pik kaydedilmiştir. Kitinin kristalitesi % 89.05 olarak belirlenmiştir. FTIR spektrumunda ise alfa kitin için karakteristik olan 1.654 cm<sup>-1</sup>, 1.560 cm<sup>-1</sup> ve 1.310 cm<sup>-1</sup> bantları kaydedilmiştir.

Kitin doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polimerdir. Deniz kabuklularının atıkları kitin olarak bilinen ve doğada kendiliğinden oluşan bu biyopolimerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Kitin ve türevleri, fizikokimyasal özellikleri bakımından diğer biyopolimerlerden farklı olup, çok çeşitli alanda kullanılmaktadır. Kitin deasetilasyon işlemi sonrasında kitosan adı verilen başka bir değerli polimere dönüşür. Bu çalışmada, deniz kabukluları atıklarından büyük ölçekte kitin ve kitosan elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sırasında önce demineralizasyon ve deproteinizasyon aşamaları sonucunda büyük ölçekte kitin elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen kitin, 90°C ve 120°C sıcaklıklarda 1 ve 3 saat boyunca gerçekleştirilen deasetilasyon işlemi sonucu kitosana dönüştürülmüştür. Ayrıca, büyük ölçekli üretimde kullanılan reaktörler, kurutucu gibi



ekipmanların tasarımları ve bunların yanısıra tesis yerleşim planı bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Kitosan üretimi sırasında 120 °C ve 1 saatlik işlemin kitosan üretimi için en uygun olduğu görülmüş ve süre arttırmanın sadece elde edilen kitosanın molekül ağırlığını etkilediği sonucuna ulaşılmıştır (Özel vd., 2013).

Abdulkarim vd., (2013)'nin yaptığı çalışmada midye kabuğunun kitin içeriği belirlenmiştir. Midye kabuğundan izole edilen kitin ve kitosan, FTIR ve elemental analiz ile karakterize edilmiştir. Kitosan için FTIR spektrumları 3447 cm<sup>-1</sup> ve 1477 cm<sup>-1</sup>'de karakteristik bant vermiştir. Midye kabuğunun, %51.62 mineral içeriğe, %21.32 kitin içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Deasetilasyon derecesi %60.66 olarak hesaplanmıştır.

Kaya vd., (2013) tarafından yapılan çalışmada alternatif kitin kaynağı olarak *Daphnia magna* yumurtasının (resting eggs) kitin içeriği tespit edilmiştir. Kitin verimi % 18-21 olarak belirlenmiştir. FTIR, element analizi, TGA, XRD ve SEM çalışmaları ile karakterize edilen kitinin alfa kitin karakterinde olduğu açığa çıkmıştır. Başka bir çalışmada, *Gammarus argaeus* kitin izolasyonu için araştırılmıştır. *G. argaeus*'dan izole edilen kitin FTIR, TGA, XRD ve SEM analiz teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Bütün bu analizler *G. argaeus*'dan izole kitinin alfa formunda olduğunu göstermiştir. *G. argaeus*'un kuru ağırlık üzerinden % 11-12 kitin içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. İzole edilen alfa kitinin SEM çekimleri nanofibriller (11-55 nm) ve gözenekli (yaklaşık 150 nm) bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir.

Mantarların hücre duvarları, böceklerin ve diğer artropodların dış iskeletleri, krustase kabuklarının temel yapısal bileşeni olan kitini parçalama yeteneğine sahip kitinaz enzimleri hem bitki patojeni olan mantarlara karşı fungusit hem de zararlı böceklere karşı insektisit olarak biyolojik amaçlı kullanılabilir. Bu çalışmada ülkemizdeki çeşitli kültür ve yabani bitkilerin toprak üstü aksamı veya kök rizosferinden izole edilen bakteri kültürlerinden, tütünde yapılan aşırı duyarlılık test sonuçlarında bitki patojeni olmadıkları teyit edilen 158 izolat seçilip patojen fungus olarak sebzelerde kök çürüklüğüne neden olan *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktivite testi yapılmıştır. Antifungal aktiviteye sahip olan 31 izolata kitinaz enzimi aktivitesi testi yapıp içlerinden en yüksek aktivite gösteren *Pseudomonas fluorescens* MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatu seçilmiştir. Bu iki izolata ürettikleri kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi

metoduyla kısmi saflaştırılmıştır. Kısmi saflaştırılan enzimlere optimum pH ve optimum sıcaklık analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatında %0-20 çöktürme aralığında %30,8 verimle 23,34 kat ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatından %0-20 çöktürme aralığında %15,7 verimle 22,34 kat kısmi saflaştırma yapılmış ve saflaştırılan enzimlerdeki optimum aktivite pH 4,0'de ve 50oC sıcaklıkta gözlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatı pH 11,0'de %36 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatı aktivitesinin %71'ini koruduğu saptanmıştır. Ayrıca *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatının 80oC'de %50 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatının ise %42 aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Şenol vd., 2014).

Kaya vd. (2014) yılında yeni bir kitin kaynağı olarak yarası gübresinden kitin elde etmişlerdir. Bu bilinen kitin elde etme yöntemlerinin dışında daha az masrafla kitin elde etme yöntemi olup bu alanda çalışan bilim insanlarının ilgisi çekmiştir.

Tüm bu çalışmalara bakıldığında kitin ve kitosanın günümüzde halen popüler bir konu olduğu ve çalışmaların bu alanda hızla devam ettiği söylenebilir. Ülkemizde özellikle son yıllarda Kaya ve vd., bu alanda çok sayıda değerli çalışmalar yaparak ülkemiz araştırmacılarının bu alana ilgisini çekme yönünde önemli katkılar sağlamışlardır.

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışmasının materyalini oluşturan *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türüne ait örnekler, daha önce Türkiye'nin farklı bölgelerinden, farklı zamanlarda toplanmış ve teşhis edilmiş örneklere dayanır. Elde edilen bu türe ait örnekler, laboratuvarında aşağıdaki aşamalardan geçirilerek kitin ve kitosan elde edilmiştir.

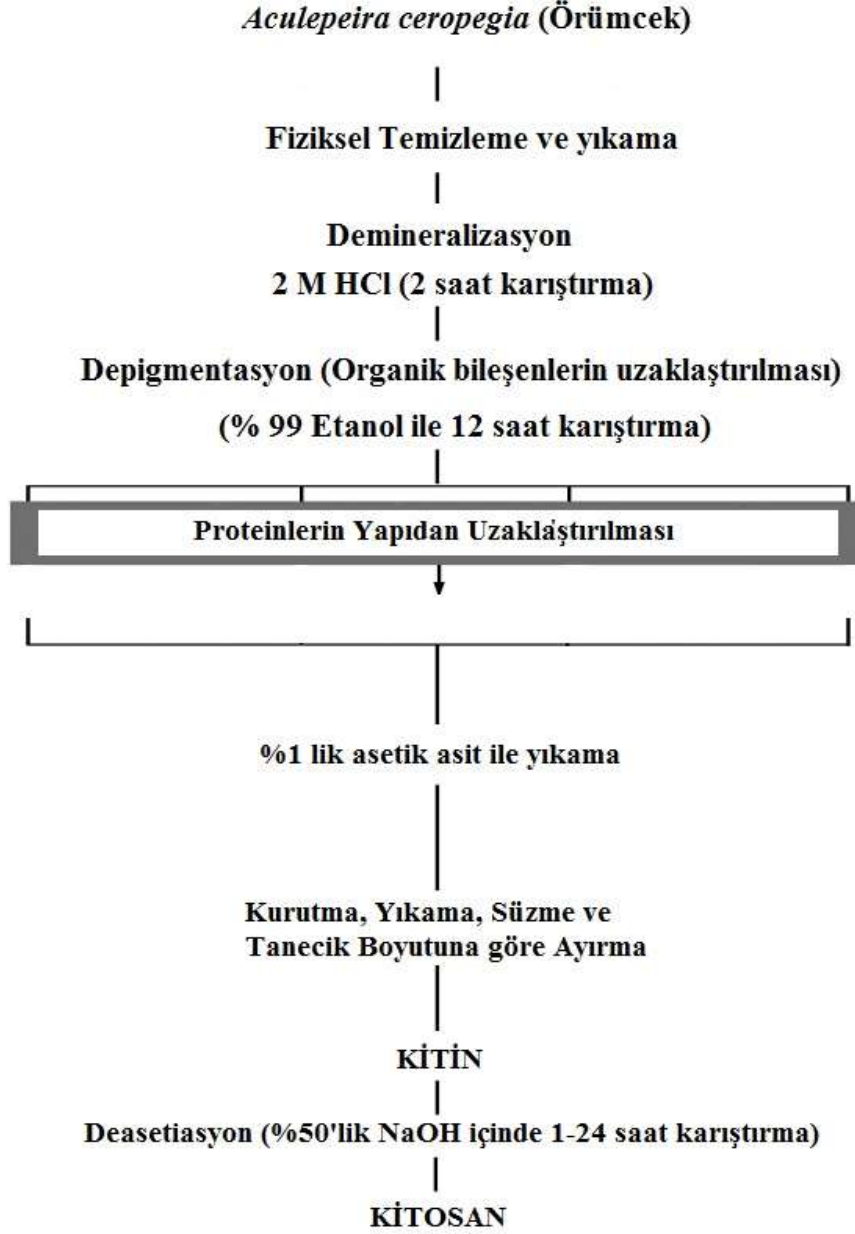
1. Materyal yıkandı, öğütüldü sonra HCl ile muamale edilerek demineralizasyonu sağlandı.

2. HCl çözeltisinden çıkarılan ve yıkanarak nötralleştirilen örnekler yapılarında bulunan organik bileşikler ve pigmentlerin uzaklaştırılması için etanol ile 12 saat karıştırıldı ve saf su ile yıkandı. Böylece beyaz renkli madde elde edildi.

3. Materyal daha sonra NaOH ile muamale edilerek deproteinizasyonu yapıldı, ardından aseton ile ekstraksiyonu yapıldı ve kurumaya bırakıldı.

4. Beyazlatılan materyal yıkandı, kurutuldu ve kitin elde edildi. Daha sonra materyal NaOH ile muamale edilerek deasetilasyonu sağlandı. Son olarak yıkanıp kurutularak kitosan elde edildi.

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden kitin eldesi için gerekli süreç Şekil 3.1'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünün dış iskeletinden kitin ve kitosan eldesi

Elde edilen kitin ve kitosanın fizikokimyasal karakterizasyonunu belirlemek için Ömer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri yaptırıldı.

### 3.1 FTIR Analizi

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden elde edilen kitinin infrared spektrumları, Bruker Marka Vertex 70 model FTIR Spektrometre 4000-625 cm frekans aralığında ölçülmüştür. Ayrıca asetilasyon derecesi denklem kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Bruker Marka Vertex 70 model FTIR Spektrometresi

### 3.2 Termogravimetrik Analizi (TGA)

TGA, Linseis STA PT1600 analiz cihazı kullanılarak 10 ° C/ dk'lık bir ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir. Kitinin termal bozulmasına bağlı olarak TG ve DTG eğrilerinin elde edilmesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Linseis STA PT1600 marka TGA cihazı

### 3.3 XRD

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden elde edilen kitin XRD spektrumlar, Rigaku D max 2000 sisteminde  $45^\circ$  için  $5^\circ$  2 0 aralığında ölçülmüş elde edilen kitin Kristal index değeri Crl hesaplaması yapılmıştır.



Şekil 3.4. Panalytical Marka empyrean model XRD

### 3.4 SEM

Numulardan elde edilen kitinden daha net görüntü elde etmek için örneklerin yüzeyi Sputter Coater (Cressingto Auto 108) marka altın kaplama cihazı ile altınla kaplanıp daha sonrasında yüzey morfolojisini incelemek için EVO LS 10 ZEISS marka cihaz kullanılarak fotoğraflar çekilmiştir.



**Şekil 3.5.** Zeiss Marka evo 40 model SEM



**Şekil 3.6.** EDX Marka Edax

## BÖLÜM IV

### BULGULAR, SONUÇ VE TARTIŞMA

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünde kitin ve kitosan izolasyonu yapılmış olup elde edilen kitin ve kitosanın FTIR, TGA, XRD ve SEM kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada kullanılan türde kitin ve kitosan eldesi ve bunun karakterizasyonu ilk kez yapılmış olup türün sistematik bilgileri aşağıda verilmiştir:

**Şube:** Arthropoda (Eklembacaklılar)

**Altşube:** Chelicerata (Keliserli Hayvanlar)

**Sınıf:** Arachnida (Örümceğimsiler)

**Takım:** Araneae (Örümcekler)

**Aile:** Araneidae (Tekerlek Ağ Yapan Örümcekler)

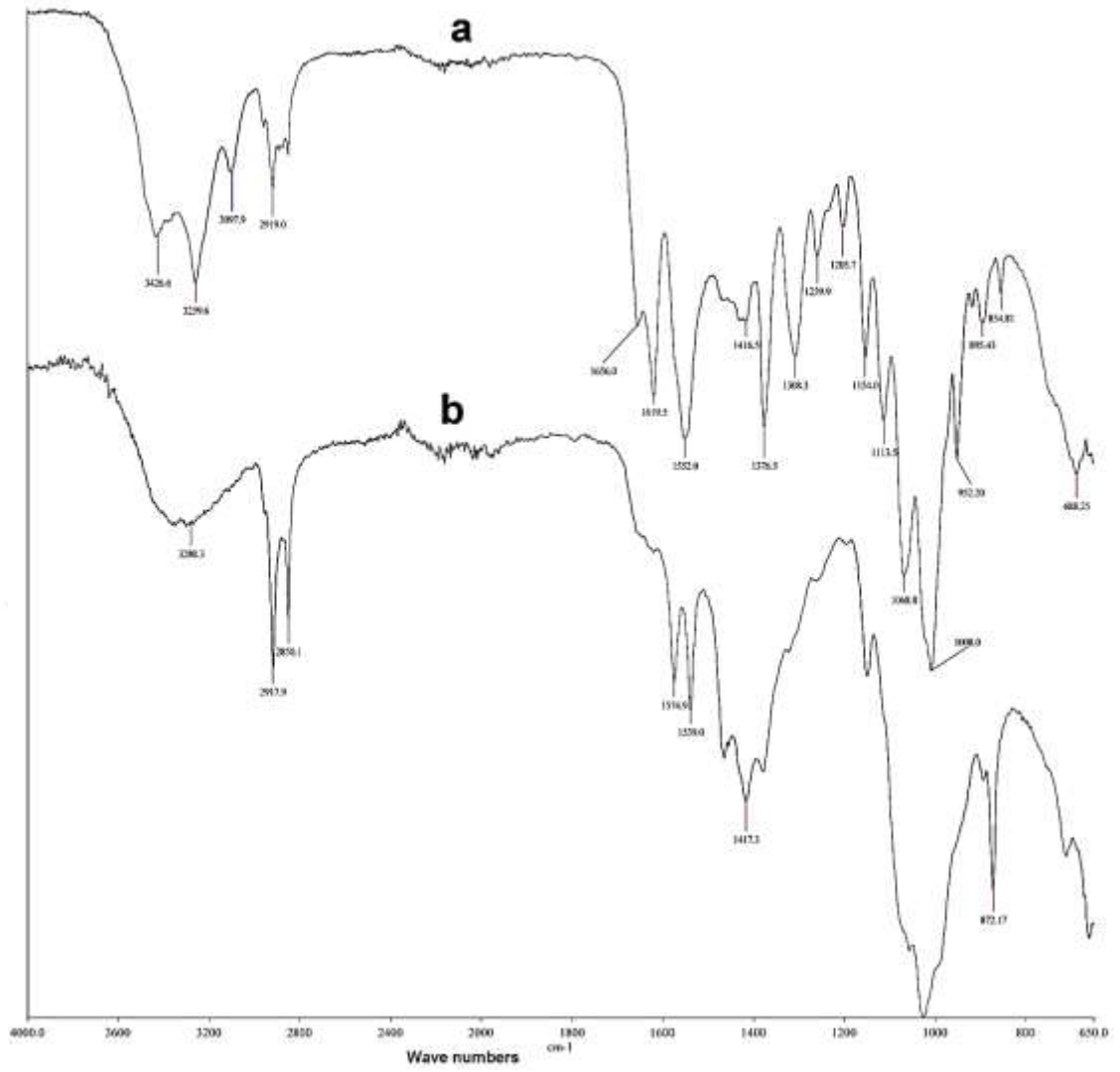
**Tür:** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)

#### 4.1 FT-IR

Örümcek kitini ve kitosanın FT-IR analizi sonuçları Şekil 4.1' de verilmiştir. Canlıdan üretilen kitinin FT-IR analizi sonucu amide I bandının  $1656\text{ cm}^{-1}$  ve  $1619.5\text{ cm}^{-1}$  (C=O ikinci amide gerilimi) olmak üzere ikiye ayrıldığı görülmüştür. Literatüre göre ikiye ayrılmış amide I bandı kitinin alfa formda olduğunu işaret etmektedir. Bölünmemiş (tek) amide I bandı ise kitinin beta formda olduğunu gösterir (Jang vd., 2004a). Amide II (N-H bend, C-N stretch)  $1552\text{ cm}^{-1}$ 'de ve amide III (CH<sub>2</sub> wagging) ise  $1308.3\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir.  $3426.2\text{ cm}^{-1}$ 'de O-H gerilmesi görülmüştür. Tüm bu sonuçlar örümcekten kitinin oldukça başarılı bir şekilde elde edildiğini kanıtlamaktadır. Kitin için kaydedilen diğer tüm bandlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Kitinin yüksek baz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklıkta deasetile edilmesi sonucu kitinde  $1552\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen amide II bandı  $1574.9\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  (NH<sub>2</sub>) in NHCOCH<sub>3</sub> group)'e kaymıştır. Kitinde ikiye ayrılmış amide I bandı kitosana dönüşünce tek band olarak gözlenmiştir. Kitosana ait gözlenen diğer FT-IR bandları Şekil 4.1'de verilmiştir.



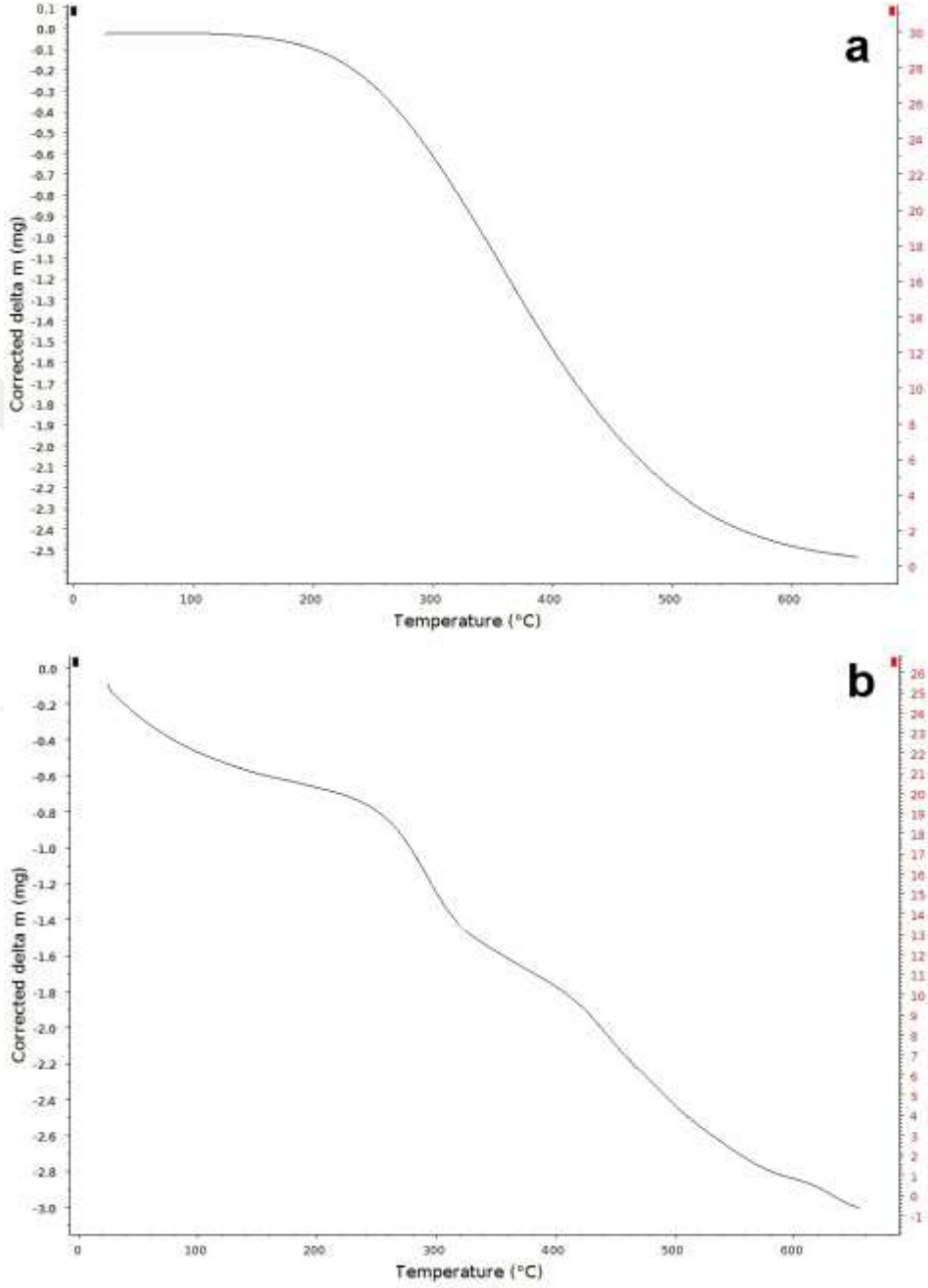


**Şekil 4.1.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve üretilen kitosanın FT-IR spektrası (a. kitin, b. kitosan)

## 4.2 TGA

Termogravimetrik analiz elde edilen malzemenin sıcaklığa olan dayanımını öğrenmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Dutta vd., 2004). Mevcut çalışmada da örümcekte elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin sıcaklıkla olan bozulmalarını ortaya koymak için TGA analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar kitinin kitosana göre daha kararlı olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.2). Hem kitin hemde kitosan için iki basamakta yapıdan kütle kaybı olduğu gözlemlendi. İlk basamakta 100°C civarındaki kütle kayıpları yapıdan uzaklaşan sudan kaynaklanmaktadır. İkinci basamakta gözlenen önemli kütle kayıpları ise ilk örnekte kitinin bozulmasına (Şekil 4.2a) ve ikinci örnekte ise kitosanın bozulmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.2b). Literatür taraması sonucu farklı organizmalardan izole

edilen kitinlerin ve üretilen kitosan örneklerinin de mevcut çalışmadaki gibi iki farklı basamkata kütle kaybı gözlenmiştir (Jang vd., 2004b., Juarez-de la Rosa vd., 2011; Sajomsang ve Gonil 2010). Bu sonuçlarda mevcut çalışmada örümcekte kitin ve kitosanın başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.



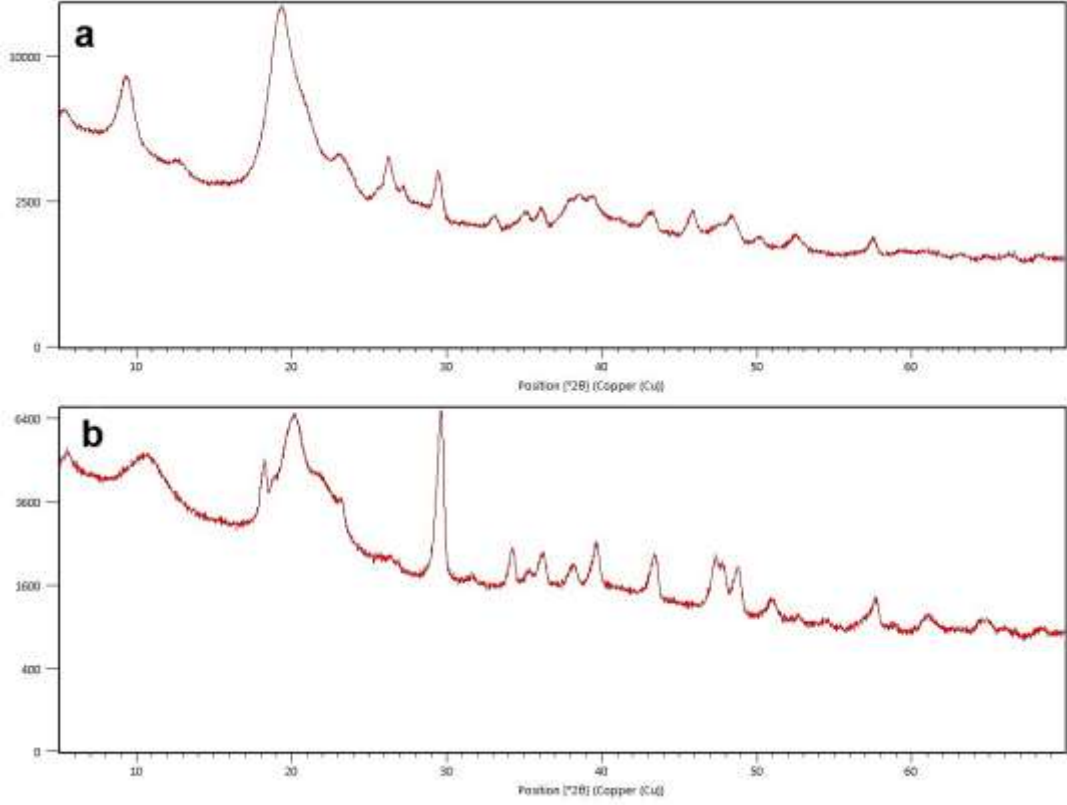
**Şekil 4.2.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitininden üretilen kitosanın TGA analizi (a. kitin ve b. kitosan)

### 4.3 XRD

Örümcekten izole edilen kitinin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın XRD analiz sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Literatüre bakıldığında kitin ve türevlerinin XRD analizleri sonucu  $9^\circ$  ve  $19^\circ$  civarında iki keskin pik gözlenmiştir (Jang vd., 2004a., Liu vd., 2012; Sajomsang ve Gonil 2010). Bu piklerden  $19^\circ$  civarında olan  $9^\circ$  civarında olana göre daha şiddetlidir. Bunlar kitin ve türevlerinin anlaşılmasında kullanılan karakteristik XRD pikleridir.

Kitinin XRD analizi sonucu  $9.31^\circ$  ve  $19.38^\circ$ 'de iki keskin pik ile birlikte  $12.78^\circ$ ,  $23^\circ$  ve  $26.2^\circ$ 'de üç de zayıf pik gözlenmiştir. Bu pikler literatürde tanımlanan kitin pikleri ile oldukça benzerlik göstermektedir (Jang vd., 2004b). Kitosanın için de yine  $10.7^\circ$  ve  $20.13^\circ$  de iki keskin pik gözlenmiştir. Fakat bu iki keskin pik ile birlikte  $29.6^\circ$ 'da farklı bir keskin pik gözlenmiştir. Bu istenmedik keskin pik kitosanın saf olmadığını ve içerisinde bazı kalıntıların olduğunu göstermektedir.

Kitin ve kitosanın kristaline indeks değerleri hesaplanmış ve kitin için %69.6, kitosan için %51.6 olarak bulunmuştur. Literatürde de açıklandığı üzere kitinin kitosana dönüşmesi esnasında (deasetilasyonu sırasında) kristal yapısı ve termal kararlılığı düşmektedir (Rinaudo 2006). Mevcut çalışmada da kitinin kitosana dönüşmesi sırasında kristalin indeksinin düşmesi kitosan oluşumunu desteklemektedir. Yine şekilden de anlaşılacağı gibi, kitinde gözlenen  $9^\circ$  ve  $19^\circ$  daki keskin pikler deasetilasyon sonrası  $10^\circ$  ve  $20^\circ$ 'ye kaymıştır. Bu kaymada kitinden kitosan elde edildiğini desteklemektedir (Dutta vd., 2004b).



**Şekil 4.3.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın XRD analizi (a. kitin ve b. kitosan)

#### 4.4 SEM

Örümcekte saflaştırılan kitin ve bu kitinden elde edilen kitosan örneklerinin yüzeyleri SEM ile araştırılmıştır (Şekil 4.4). Kitinin yüzeyinin ince nanofiberlerden oluştuğu ve kitosanın yüzeyinin ise yine zayıf ve çok net olarak görülemeyen fiberlerden oluştuğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.4a'da görüldüğü gibi kitinin yüzeyinde nanofiberler ile birlikte azda olsa nano porların (gözeneklerin) varlığı da görülmektedir.

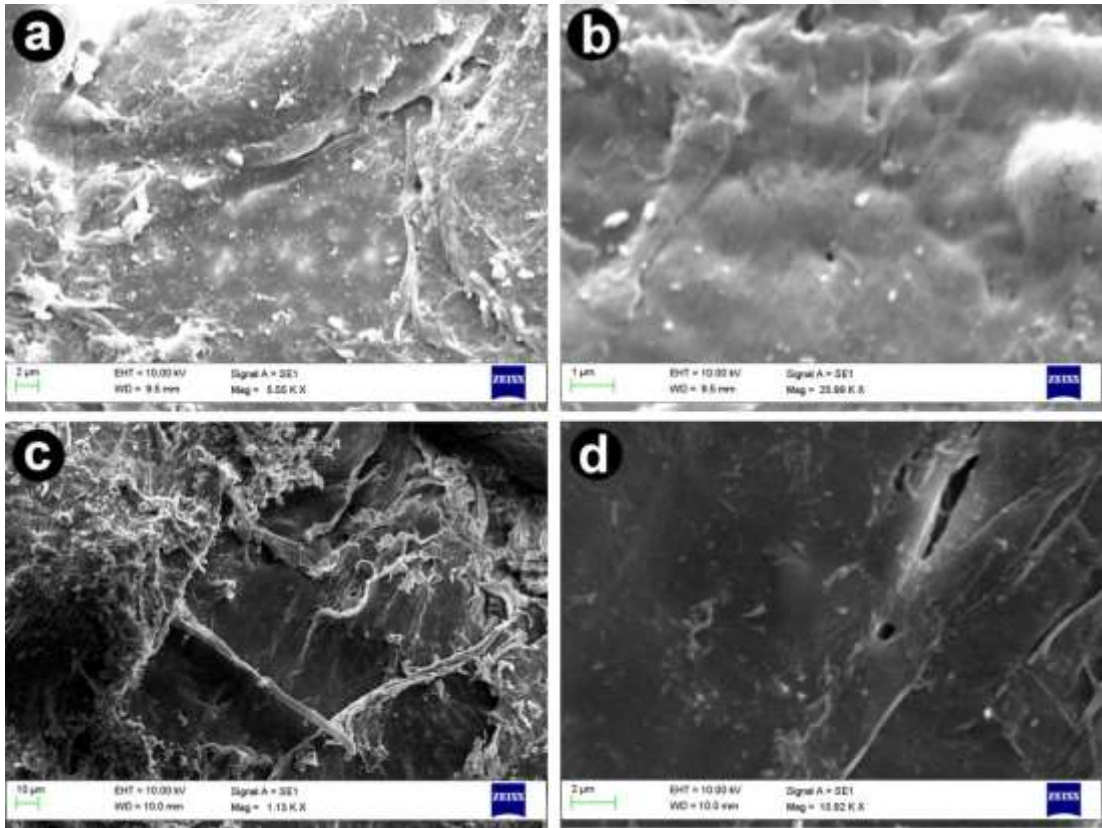
Daha önceki yapılan çalışmalara bakıldığında kitinin yüzeyinin izole edilen canlı grubuna göre oldukça farklılık gösterdiği ortaya konmuştur (Kaya vd., 2015a; Kaya ve Baran 2015; Kaya vd., 2014a, b, 2014b, 2015b, 2016). Şuana kadar kaydedilen kitin yüzeylerine bakıldığında;

- nanofiber ve porların görülmediği düz bir yüzey. Bu tür kitin yüzeyi genellikle mantarlardan elde edilen kitin ve kitosanda gözlenmiştir (Yen ve Mau 2007a, b).
- Yalnızca nanofiberlerden oluşan yüzey (Kaya vd., 2014a).

- Nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzey (Kaya vd., 2013).
- Nanofiberler ile birlikte nanopor ve mikro porların birlikte görüldüğü yüzey (Kaya vd., 2014c).
- Yalnızca nanoporlardan oluşan yüzey, gibi çeşitlilikler gözlenmiştir (Kaya ve Baran 2015).

Mevcut çalışmada ise kitin için nanofiber ve nanoporların birlikte bulunduğu bir yüzey gözlenmiştir. Kitosan da ise kısmen liflerin bulunduğu düz bir yüzey görülmüştür.

Şuana kadar iki farklı örümcek türünden (*Geolycosa vultuosa* ve *Hogna radiata*) kitin izolasyonu yapılmıştır (Kaya vd., 2014c). Bu iki türden de izole edilen kitinlerin farklı yüzey morfolojilerine sahip olduğu ortaya konmuştur. *G. vultuosa*'dan elde edilen kitinin yüzeyinin nanofiberler ile birlikte nanopor ve mikro porların birlikte bulunduğu yüzey gözlenmiştir. *H. radiata* kitininin nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzeyden oluştuğu ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada da *H. radiata*'da olduğu gibi nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzey gözlenmiştir.



**Şekil 4.4.** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın SEM ile elde edilmiş yüzey görüntüleri (a,b. kitin; c,d. kitosan)

Sonuç olarak bu çalışma, *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünün kitin ve kitosan içeriği ve onun FTIR, XRD, TGA ve SEM analizleriyle fizikokimyasal özelliklerini ortaya koyan bir çalışmadır. Yapılan analizler sonucunda bu örümcek türünde alfa formda kitin yapısının olduğu, kitinin ve kitosanın ince nanofiber ve az da olsa nanopor yapıda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kitinin ayrıca termal kararlılığı bilinen çoğu böcek ve kabuklularınkinden yüksektir. Elde edilen ve karakterizasyonu yapılan kitin ve kitosan bu örümcek türünde ilk kez yapılmış olup elde edilen biyomateryaller eczacılık, tıp, tekstil ve ziraat v.b. gibi endüstrinin pek çok alanına alternatif kitin kaynağı olarak önerilebilir.



## KAYNAKLAR

Abdulkarim, A., Tijani, M.I., Abdulsalam, S., Muhammad, A.J. and Ameh, A.O., “Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell”, *Civil and Environmental Research* 3(2), 108-114, 2013.

Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S. and Elsabee, M.Z., “Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf”, *Carbohydrate Polymers* 77, 410-419, 2009.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., “Functional Characterization of Chitin and Chitosan”, *Current Chemical Biology* 3, 203-230, 2009.

Arbia, W., Arbia, L., Adour, L. and Amrane, A., “Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - A Review”, *Food Technology and Biotechnology* 51, 12-25, 2013.

Babaşoğlu, A., “Örümcekgiller (Arachnida)”, *Niğde Kültür Yayınevi*, Niğde, 1999.

Benhabiles, M., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. and Mameri, N., “Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste”, *Food Hydrocolloids* 29, 48-56, 2012.

Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M., Machill, S., Paasch, S., Bazhenov, V.V., Kurek, D.V., Arnold, T., Brockmann, S., Ruhnnow, M. and Born, R., “Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*”, *Journal of Structural Biology* 168, 539-547, 2009a.

Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S. and van Pee, K.H., “Chitin-Based Organic Networks: An Integral Part of Cell Wall Biosilica in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*”, *Angewandte Chemie-International Edition* 48, 9724-9727, 2009b.

Chien, R.-C., Yen, M.-T. and Mau, J.-L., “Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells”, *Carbohydrate Polymers* 138, 259-264, 2016.

Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. and Deschamps, A., “Edible antimicrobial films based on chitosan matrix”, *Journal of Food Science* 67, 1162-1169, 2002.

Dutta, P.K., Dutta, J. and Tripathi, V., “Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications”, *Journal of Scientific and Industrial Research* 63, 20-31, 2004.

Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J., Schiaparelli, S., Ereskovsky, A. and Schupp, P., “Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida sponges* (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin”, *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 132-140, 2010a.

Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J.L., Schiaparelli, S., Ereskovsky, A., Schupp, P., Born, R., Worch, H., Bazhenov, V.V., Kurek, D., Varlamov, V., Vyalikh, D., Kummer, K., Sivkov, V.V., Molodtsov, S.L., Meissner, H., Richter, G., Steck, E., Richter, W., Hunoldt, S., Kammer, M., Paasch, S., Krasokhin, V., Patzke, G. and Brunner, E., “Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida sponges* (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin”, *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 132-140, 2010b.

Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O.V., Brunner, E., Tsurkan, M.V., Ereskovsky, A., Ilan, M., Tabachnick, K.R., Bazhenov, V.V., Paasch, S., Kammer, M., Born, R., Stelling, A., Galli, R., Belikov, S., Petrova, O.V., Sivkov, V.V., Vyalikh, D., Hunoldt, S. and Worheide, G., “Identification and first insights into the structure and biosynthesis of chitin from the freshwater sponge *Spongilla lacustris*”, *Journal of Structural Biology* 183, 474-483, 2013.

Foelix, R. F. “Biology of Spiders (2 ed.)”. *Oxford University Press* 330s., 1996.



Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M. and Saimoto, H., "Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms", *Materials* 4, 1417-1425, 2011.

Isa, M.T., Ameh, A.O., Gabriel, J.O. and Adama, K.K., "Extraction and Characterization of Chitin from Nigerian Sources", *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies* 73-81, 2012.

Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H. and Nah, J.W., "Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 3423-3432, 2004.

Juarez-de la Rosa, B.A., Quintana, P., Ardisson, P.L., Yanez-Limon, J.M. and Alvarado-Gil, J.J., "Effects of thermal treatments on the structure of two black coral species chitinous exoskeleton", *Journal of Materials Science* 47, 990-998, 2011.

Kaya M., Seyyar, O., Baran T. and Türkeş, T., "Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source", *Frontiers in Zoology*, 11:59 doi:10.1186/s12983-014-0059-8, 2014.

Kaya, M., Bağrıaçık, N., Seyyar, O. and Baran, T., "Comparison Of Chitin Structures Derived From Three Common Wasp Species (*Vespa crabro* Linnaeus, 1758, *Vespa orientalis* Linnaeus, 1771 and *Vespula germanica* (Fabricius, 1793))", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 89, 204-217, 2015a.

Kaya, M. and Baran, T., "Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*)", *International Journal of Biological Macromolecules* 75C, 7-12, 2015.

Kaya, M., Baran, T., Menten, A., Asaroglu, M., Sezen, G. and Tozak, K.O., "Extraction and Characterization of  $\alpha$ -Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates", *Food Biophysics* 9, 145-157, 2014a.

Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Satkauskiene, I., Bitim, B., Tubelyte, V. and Baran, T., "Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect

(*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*)”, ***Zoomorphology*** 133, 285-293, 2014b.

Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Satkauskiene, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelyte, V., Baran, T. and Seyyar, O., “How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin”, ***Food Biophysics*** 11, 10-19, 2016.

Kaya, M., Lelesius, E., Nagrockaite, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. and Bitim, B., “Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species”, ***PloS One*** 10, e0115531, 1-14, 2015b.

Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Erdogan, S. and Kar, M., “A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology”, ***International Journal of Biological Macromolecules*** 65, 553-558, 2014c.

Kaya, M., Tozak, K. Ö., Baran, T., Sezen, G. and Sargin, I., “Natural porous and nano fiber chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea)” ***EXCLI Journal*** 12, 503–510, 2013.

Limam, Z., Selmi, S., Sadok, S. and Abed, A., “Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties”, ***African Journal of Biotechnology*** 10(4), 640-647, 2011.

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

Ono, H., A Revisional Study of the Spider Family Thomisidae (Arachnida, Araneae) of Japan, ***National Science Museum***, Tokyo, 1988.

Rinaudo, M., “Chitin and chitosan: Properties and applications”, ***Progress in Polymer Science*** 31, 603-632, 2006.

Shahidi, F. and Abuzaytoun, R., "Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects", *Advances in Food Nutrition Research* 49, 93-135, 2005.

Simpson, B., Gagne, N. and Simpson, M., "Bioprocessing of chitin and chitosan", *Fisheries Processing: Biotechnological applications, (Ed. A.M. Martin) Chapman and Hall, London* 155-203, 1994.

Synowiecki, J., Al-khatteb, A. and Nadia, A., "Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 145-171, 2003.

Sajomsang, W. and Gonil, P., "Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs", *Materials Science and Engineering: C* 30, 357-363, 2010.

Tang, W.J., Fernandez, J.G., Sohn, J.J. and Amemiya, C.T., "Chitin is endogenously produced in vertebrates", *Current Biology* 25, 897-900, 2015.

Thirunavukkarasu, N., Dhinamala, K. and Inbaraj, R.M., "Production of chitin from two marine stomatopods *Oratosquilla* spp. (Crustacea)", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3(1), 353-359, 2011.

Yen, M.-T. and Mau, J.-L., "Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes", *LWT - Food Science and Technology* 40, 472-479 (2007a).

Yen, M. and Mau, J., "Preparation of fungal chitin and chitosan from shiitake stipes", *Fungal Science* 21(1, 2), 1-11, 2006.

Platnick, N.I., "The World spider catalog", Version 18.0, American Museum of Natural History, <http://wsc.nmbe.ch>, 2017.

## ÖZ GEÇMİŞ

Zehra DEMİR, 13.01.1981 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara ili Keçiören ilçesinde tamamladı. 2001 yılında girmeye hak kazandığı Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılının Haziran ayında mezun oldu. 2015 yılının Eylül ayında başladığı Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.

