



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM  
DALI**

**ÇIYANIN FARKLI VÜCUT KISIMLARINDAN ORJİNAL YAPI  
KORUNARAK BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN İKİ  
VE ÜÇ BOYUTLU NANO KİTİN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Esra BULUT**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Murat KAYA**

**AKSARAY, 2016**





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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM  
DALI**

**ÇIYANIN FARKLI VÜCUT KISIMLARINDAN ORJİNAL YAPI  
KORUNARAK BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN İKİ  
VE ÜÇ BOYUTLU NANO KİTİN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Esra BULUT**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Murat KAYA**

**AKSARAY, 2016**

## AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330403 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, "ESRA BULUT", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "ÇIYANIN FARKLI VÜCUT KISIMLARINDAN ORJİNAL YAPI KORUNARAK BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU NANO KİTİN ÜRETİMİ" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Murat KAYA**      .....

**Aksaray Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Doç.Dr. İlgaz AKATA**      .....

**Ankara Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Doç.Dr. Abbas MOL**      .....

**Aksaray Üniversitesi**

**Teslim Tarihi: 19 Nisan 2016**

**Savunma Tarihi: 13 Mayıs 2016**

## **DOĞRULUK BEYANI**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullandığımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitű tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

**Esra BULUT**



*Canım Annem ve Babama...*

## ÖNSÖZ

Biyopolimerler sahip oldukları nontoksik, antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal gibi önemli özelliklerinden dolayı biyoteknolojide geniş kullanım alanına sahiptirler. Kitin de bu özelliklere sahip doğada genellikle atık ürünlerden elde edilen önemli bir biyopolimerdir ve biyoteknolojik uygulamalarda (tıp, eczacılık, gıda, ziraat ve tekstil) en çok tercih edilen polimerlerden biridir. Dünyada yıllık kitin üretiminin  $150 \times 10^3$  ton civarında olduğu bilinmektedir. Elde edilen bu kitinlere biyoteknolojik bakış açısıyla yaklaşılmalı ve bu biyopolimerler geleceğe yönelik daha farklı uygulama alanlarında kullanılmalıdır. Bu tez çalışması kitin biyopolimerine yeni bir uygulama alanı ekleyerek, kitinin ticari değerinin artmasına katkı sağlamaktadır.

Dünya genelinde ticari olarak üretilen kitin ve onun türevi olan kitosan örnekleri toz veya granül şeklindedir. Kitin ve türevlerinin üç boyutlu olarak elde edilmesi, sahip oldukları önemli özelliklerden dolayı bu biyopolimerlerin üç boyutlu hücre kültürü çalışmaları gibi spesifik alanlarda kullanılmasına olanak sağlar. Kitinin sahip olduğu fizikokimyasal özellikler, uygulama alanı belirlenirken oldukça önem arz eder. Bu özelliklerin kitinin izole edildiği kaynağa göre değiştiği bilinmektedir. Mevcut çalışmada dünya genelinde ilk kez bir canlının farklı vücut kısımlarından oval, silindirik ve segmentli yapılara sahip iki ve üç boyutlu kitinler üretilmiş ve bu kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri araştırılmıştır. Bu kitinlerin farklı fizikokimyasal özelliklere (kristalinite, termal kararlılık ve yüzey morfolojisi) sahip olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, izole edilen iki ve üç boyutlu kitinler ileriye yönelik farklı biyoteknolojik alanlarda kullanılabilir.

Bu yüksek lisans tezinin deneysel çalışmaları Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan Genel Biyoloji ve Kromatografik Analiz Laboratuvarlarında yürütülmüştür ve Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce 2016-003 Nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmasını başarıyla tamamlamam için bana güç veren Allah'a hamdolsun.

Yüksek Lisans Bitirme Tezi olarak hazırladığım bu çalışmanın yürütülmesinde, çalışmama danışmanlık eden hocam Doç. Dr. Murat KAYA'ya, yüksek lisansım süresince bana öğretmiş olduğu değerli bilgileri, her zaman göstermiş olduğu sabrı, hoşgörüsü, yardımları ve fikirleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca ortak çalışmalar yürüttüğümüz post doktora öğrencisi İdris SARGIN'a manevi desteği ve öğrettiği bilgileri için teşekkür ederim.

Protein adsorpsiyonu uygulamasının yapılmasında ve deneylerin yorumlanmasında yardım eden Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI ve yüksek lisans öğrencisi Özlem ARSLAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans süresince aynı laboratuarı paylaştığım ve ortak çalışmalar yürüttüğüm yüksek lisans arkadaşlarım Bahar AKYÜZ, Ivan AL-JAF, Muhammad MUJTABA ve Karwan SOFİ'ye çalışma azimleri ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Hayatımda değerli yerleri bulunan dostlarım Esra CESUR, Kübra GÜNAY ve Mehtap TARHAN ve dayım Yusuf DURSUN'a, her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Her zaman ve her konuda maddi ve manevi olarak beni destekledikleri ve sahip oldukları her şeylerini benimle paylaştıkları için babam Erdal BULUT, annem Zöhre BULUT, ablam Ebru BULUT, abim Ömer Faruk BULUT ve kardeşlerim Kübra BULUT ve Muhammed Furkan BULUT'a gönülden teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ</b> .....	<b>4</b>
2.1 Kitin İçin Alternatif Kaynakların Bulunması.....	4
2.2 Farklı Fizikokimyasal Özelliklere ve Formlara Sahip Kitinlerin İzolasyonu.....	7
2.3 Üç Boyutlu Kitinlerin Farklı Uygulama Alanlarında Kullanılması..	9
2.4 Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kitin ve Kitosanların Lizozim Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	11
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....	<b>14</b>
3.1 Örnek Toplanması.....	14
3.2 Kitin İzolasyonu.....	14
3.2.1 Demineralizasyon.....	14
3.2.2 Deproteinizasyon.....	14
3.2.3 Beyazlatma.....	15
3.3 Karakterizasyon.....	15
3.3.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR).....	15
3.3.2 Termogravimetrik analiz (TGA).....	15
3.3.3 Taramalı electron mikroskopu (SEM).....	15
3.3.4 X-ışını kırınımı (XRD).....	16
3.4 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından Elde Edilen Kitinlerin Lizozim Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	16
3.4.1 Uygun pH'nın belirlenmesi.....	18
3.4.2 Uygun protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	18
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>19</b>
4.1 Kitin İçeriği ve Her Bir Aşamadan Sonra Kaybedilen Ağırlık.....	19
4.2 FT-IR.....	20
4.3 TGA.....	22
4.4 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından İzole Edilen Kitinlerin Şekil ve Yüzey Morfolojileri.....	24
4.5 XRD.....	29
4.6 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından Elde Edilen Kitinlerin Lizozim Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	31
4.6.1 Uygun pH'nın belirlenmesi.....	32
4.6.2 Uygun protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	32
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	<b>36</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>44</b>

## ÖZET

### ÇIYANIN FARKLI VÜCUT KISIMLARINDAN ORJİNAL YAPI KORUNARAK BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU NANO KİTİN ÜRETİMİ

Daha önceki çalışmalarda izole edilen kitinler toz ya da granül haldedir. Literatür taraması sonucu sadece süngerlere ait birkaç türden ve bir böcekten üç boyutlu kitin izole edildiği görülmüştür. Mevcut çalışmada ise bir canlının (çıyanın) farklı vücut kısımlarından (anten, kafa, kısıkaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) orijinal yapı ve şekli koruyarak iki ve üç boyutlu kitin örnekleri elde edilmiştir. Bu kitinlerin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, TGA, SEM ve XRD analizleri ile belirlenmiştir. Yine daha önceki çalışmalarda, kitinin fizikokimyasal özelliklerinin kaynağa göre değiştiği ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada ise bir organizmanın farklı vücut kısımlarından aynı metod ile yapı ve şekil korunarak elde edilen kitinlerin fizikokimyasal özelliklerinin (kristalinite, termal kararlılık ve yüzey morfolojisi) kaynağa göre önemli değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasitelerinde farklılık olup olmadığı da araştırılmıştır. Çıyanın farklı vücut kısımlarından aynı metod ile elde edilen kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasitelerinde oldukça önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında, bir canlının farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin fizikokimyasal özelliklerinin de farklı olduğu ve bu farklılığın da uygulama alanını oldukça etkilediği ortaya konmuştur. Bu çalışma ileriye yönelik, farklı organizmalardan daha farklı şekiller ve fizikokimyasal özelliklere sahip kitinlerin elde edilmesine olanak sağlayacak ve elde edilecek iki ve üç boyutlu bu örnekler biyoteknoloji alanına yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyopolimer, Kitin, Lizozim, Adsorpsiyon, Çıyan.

## **ABSTRACT**

### **TWO AND THREE DIMENSIONAL CHITIN EXTRACTION FROM CENTIPEDE BODY PARTS BY KEEPING THE ORIGINAL SHAPE OF THE RAW MATERIAL FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS**

In earlier studies, the isolated chitin is in powder or granule form. In literature, only few studies can be seen about three dimensional chitin production from sponges and insect. In present study two and three dimensional chitin was isolated from different body parts (antennae, head, forcipule, collum, trunk, trunk legs and last pair of legs) of centipedes by keeping the original structure and shape. Isolated chitins were physicochemically characterized via FT-IR, TGA, XRD and SEM analysis. In previous studies it was revealed that physicochemical properties of chitin varies according to the source. In present study chitin was isolated from different body parts of organism using the same method and keeping the original shape and structure and big differences were observed among chitin obtained from each separate body parts in terms of physicochemical characterizations. On the other hand, it was also investigated whether the chitins isolated from different body parts of centipede have differences in their adsorption capacities of lysozyme. Significant differences were observed in the adsorption capacities by chitin isolated from different body parts of centipede using the same isolation method. In this study it was revealed that the chitin isolated from different body parts of centipedes is physicochemically different and has been shown that these physicochemically different chitins greatly has influence the application areas. In addition, this study will also allow the isolation of two and three dimensional chitin with different physicochemical properties from different organisms and this two and three dimensional samples will bring a new perspective in area of biotechnology.

**Keywords:** Biopolymer, Chitin, Lysozyme, Adsorption, Centipede.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 3.1:</b> Lizozim adsorpsiyonu deneyleri için hazırlanan jel (a), bu jelin bir gece -12 °C 'de bekletilerek dondurulması (b) ve donan jelden hazırlanan kesitler (c,d).....	17
<b>Şekil 4.1:</b> İzole edilen kitinlerin FT-IR spektrumlarının standart ortalamaları.(a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.....	21
<b>Şekil 4.2:</b> Kitin örneklerinin TGA sonuçları. (a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.....	23
<b>Şekil 4.3:</b> Çıyanın anten kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	24
<b>Şekil 4.4:</b> Çıyanın kafa kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	25
<b>Şekil 4.5:</b> Çıyanın kısıkaç kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	26
<b>Şekil 4.6:</b> Çıyanın boyun kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	27
<b>Şekil 4.7:</b> Çıyanın gövde kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	28
<b>Şekil 4.8:</b> Çıyanın ayak kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	28
<b>Şekil 4.9:</b> Çıyanın kuyruk kısmının orijinal yapısı(a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).....	29
<b>Şekil 4.10:</b> Çıyanın farklı vücut kısımlarından elde edilen kitin örneklerinin XRD pikleri. (a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.....	30
<b>Şekil 4.11:</b> Gövde kitininin lizozim adsorpsiyon kapasitesinin farklı pH larda araştırılması.....	32
<b>Şekil 4.12:</b> Bakır bağlı olan ve olmayan gövde kitinlerinin lizozim adsorpsiyon kapasitesinin farklı protein konsantrasyonlarında araştırılması.....	33
<b>Şekil 4.13:</b> Cu <sup>2+</sup> ve lizozimin olası etkileşimi.....	34
<b>Şekil 4.14:</b> Çıyanın farklı vücut kısımlarında izole edilen kitinlerin pH 6 ve 0.25 mg/ml protein konsantrasyonundaki lizozim adsorpsiyon kapasiteleri...	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 4.1:</b> Kitin içeriği ve herbir aşamadan sonra kaybedilen ağırlık.....	19
<b>Çizelge 4.2:</b> Çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin X- Işını Kırınımı verileri ve bu kitinlerin CrI değerleri.....	23



## SİMGELER DİZİNİ

<b>cm</b>	Santimetre
<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>g</b>	Gram
<b>I<sub>am</sub></b>	2θ daki Amorf dağılma yoğunluğu
<b>I<sub>110</sub></b>	2θ daki en yüksek yoğunluk
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>mA</b>	Miliamper
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>μl</b>	Mikrolitre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gama
<b>%</b>	Yüzde

## KISALTMALAR DİZİNİ

A375	İnsan Melanoma Hücre Hattı
APS	Amonyum persülfat
BİS	N,N'-Metilen bisakrilamid
BSA	Bovın Serum Albumin
CCNG	Kurkumin Kitin Nanojel
CNT	Kitin Karbon Nanotüp
CO	Kitin Oligosakkarit
CrI	Kristalin İndeks
CS	Kitosan
DTG <sub>max</sub>	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
EC	Enzim Kodu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu
HCl	Hidroklorik Asit
HDF	İnsan Fibroblast Hücresi
HeLa	Kanser Hücre Hattı
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HSA	İnsan Serum Albumini
IC <sub>50</sub>	Radikalin %50'sini İnhibe Eden Konsantrasyon
IR	Kızılötesi
L929	Fibroblast Hücre Hattı
mag-pHEMA	Manyetik poli (2-hidroksietil metakrilat)
MBC	Minimal Bakterisit Konsantrasyonu
MFC	Minimal Fungisidal Konsantrasyonu
NaCl	Sodyum Klorür
NaClO	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NEXAFS	Yakın Kenar X-ışını Soğurma İnce Yapısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
pHEMA	Poli (hidroksietil metakrilat)/kitosan
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGA	Termogravimetrik Analiz
XRD	X-ışını Kırınımı
UV-vis	Mor Ötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi

## 1. GİRİŞ

İlk olarak 1811 yılında Braconnot tarafından mantarın hücre duvarında tespit edilerek tanımlanan kitin, *N*-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin rezidülerinin  $\beta$ -1, 4 glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşur ve doğada selülozdan sonra en bol bulunan doğal bir biyopolimerdir. Bu biyopolimerinin 3 formu mevcuttur. Bunlar;  $\alpha$ -kitin (anti-paralel zincirlerden oluşur),  $\beta$ -kitin (paralel zincirlerden oluşur) ve  $\gamma$ -kitindir (paralel ve anti-paralel zincirlerin kompozitinden oluşur) (Rinaudo, 2006). Genel olarak yengeç, karides ve istakoz gibi canlıların dış kabuklarında bulunan kitin; mantar ve bazı alglerin hücre duvarında, mercan (Al Sagheer vd., 2009), sünger (Ehrlich vd., 2010a) ve böceklerin (Liu vd., 2012) ise dış iskelet yapısında bulunmaktadır. Genellikle bir canlının % kitin içerikleri araştırılırken izole edilen canlının tamamı ele alınmıştır. Bu genellemeden farklı olarak, *Periplaneta americana*'nın kanat ve vücut yapılarından aynı metod kullanılarak kitin izolasyonu yapılmış ve sonuçta farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin farklı yüzey morfolojisine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Kaya ve Baran, 2015). Başka bir çalışmada Kaya vd., (2015a), kitin izolasyonu için bal arısını 5 farklı vücut bölgelerine (kafa, gövde, karın, ayak ve kanat) ayırmış ve izole edilen kitinlerin farklı fizikokimyasal özelliklere (yüzey morfolojisi, termal kararlılığı ve kristalinite) sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Bu zamana kadar izole edilen kitinler toz veya granül halindedir. İki veya üç boyutlu kitin izolasyonu üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Şimdiye kadar sadece sünger Ehrlich vd., (2010a) ve bir böcekten Kaya vd., (2016b) üç boyutlu kitin izolasyonu yapılmıştır. İki ve üç boyutlu kitinler sahip oldukları yapılarından dolayı toz forma göre daha spesifik kullanım alanlarına sahiptir. Süngerlerden izole edilen üç boyutlu kitinler; doku mühendisliği, kondrosit hücrelerinin gelişmesi için hücre kültür ortamı Ehrlich vd., (2010b), zirkonyum depolama Ehrlich vd., (2013) ve uranyum adsorpsiyonu Schleuter vd., (2013) gibi oldukça farklı alanlarda



kullanmıştır. Geniş kullanım alanına sahip olması, doğal üç boyutlu kitin biyopolimerlerine ihtiyaç olduğunu ve bu biyopolimerlerin ileride çok daha geniş kullanım olanakları bulabileceklerini göstermektedir.

Kitin ve türevleri, nontoksik, antioksidan, antitümör, biyolojik olarak bozulabilen, antimikrobiyal ve biyolojik olarak uyumlu olmak gibi önemli özelliklere sahiptir (Aranaz vd., 2009). Sahip olduğu özellikleri sayesinde bu biyopolimerler tıp, kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği, biyoteknoloji, biyomedikal, atık su arıtımı, besin katkı maddesi gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir (Rinaudo, 2006). Kitinin kullanım alanları bazı fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bunlar; asetilasyon derecesi, kitinin sahip olduğu kristalin yapı, yüzey morfolojisi ve termal kararlılığıdır (Wang vd., 2013). Aranaz vd., (2009), düşük kristalin indekse sahip olan kitin ve kitosanın özellikle su arıtımında oldukça etkin bir şekilde kullanıldığını belirtmektedir. Kitin ve türevlerinin fizikokimyasal özellikleri çözünürlük, kimyasal reaktivitesi, biyolojik aktivite ve biyolojik olarak parçalanabilme gibi fonksiyonel özellikleri etkiler (Aranaz vd., 2009). Bu sebeple izole edilen kitinlerin fizikokimyasal özelliklerinin oldukça iyi anlaşılması gereklidir ve bu kitinlerin sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerine göre uygun kullanım alanları belirlenmelidir.

Lizozim (EC 3.2.1.17) ticari olarak değerli bir enzimdir ve birçok bitkisel ve hayvansal kaynaklarda varlığı bilinmektedir. Lizozimin; hücre parçalama ajanı olarak bakteriyel hücre içi ürünlerin ekstraksiyonunun yapılması, gıda katkı maddesi Odabaşı ve Denizli, (2004), çeşitli yara ve enfeksiyonların tedavisi Çorman, M., (2010) ve antikanser ilacı olarak hayvan ve *in vitro* hücre kültürü deneylerinde kullanılması Warren vd., (1981) gibi farklı uygulama alanları vardır. Uygulama alanlarının fazla olması sebebiyle farklı metodlar geliştirilerek lizozim adsorpsiyonu yapılması ile ilgili literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır (Ghosh ve Cui, 2000). Birçok proteinin fizyolojik pH'ta negatif yüklü olması ve kitinin de düşük pH larda pozitif yüklü olması (NH<sub>2</sub> gruplarının protonlanmasıyla) nedeniyle kitin ve türevlerinin protein tutma kapasitesi üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda artmıştır. Biyolojik olarak uyumluluk ve nontoksik özelliklerine sahip olan kitin ve türevlerinin direkt organizma üzerine kullanımını neticesinde birçok protein ile etkileşime girmesi mümkündür (Mondal vd., 2015). Daha önceki çalışmalarda: poli (hidroksietil metakrilat)/kitosan (pHEMA/kitosan) kompozit membranın Bayramoğlu vd., (2003) ve Cibacron Blue F3GA boyası ile birleştirilen mag-pHEMA'nın lizozim

tutma kapasitesi araştırılmıştır (Odabaşı ve Denizli, 2004). Ancak şimdiye kadar saf kitinin lizozim adsorpsiyon kapasitesiyle ilgili araştırma yapılmamıştır.

Çıyanlar, Chilopoda sınıfına ait olan, çok hızlı hareket eden ve uzun vücuda sahip ekelmbacaklılardır. Antarktika dışında her yerde yaşarlar. Boyları 1 mm ile 30 cm arasında değişir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar; onların sistematik ilişkileri (morfolojik ve moleküler boyutta), çeşitlilik ve dağılımları, ekolojileri evrimsel ilişkileri ve fizyoloji veya anatomileri ile alakalıdır (Edgecombe ve Giribet 2007, Bonato vd. 2010).

Bu tez çalışması ile ilk defa *Scolopendra* sp.'nin vücut kısımlarından (anten, kafa, kıskaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) yapı ve şekil korunarak iki ve üç boyutlu kitin izole edilmiştir. Bu kitinlerin karakterizasyonu FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu), TGA (Termogravimetrik Analiz) , XRD (X-Işını Kırınımı) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizleri ile yapılmıştır. Son olarak, iki ve üç boyutlu kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri fizikokimyasal özellikleri (yüzey morfolojileri) ile kıyaslanarak araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Kitin İçin Alternatif Kaynakların Bulunması

Dünya genelinde yüzbinlerce kitin kaynağı olduğu bilinmektedir fakat bu canlıların sadece küçük bir kısmı literatüre kazandırılmıştır. Literatürdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlamak için Kaya vd.,(2014a), farklı canlılar ile çalışmışlardır. Bu çalışmada 6 farklı sucul omurgasız ile kitin izolasyonu yapılmış ve izole edilen kitinler kitosana dönüştürülmüştür. Çalışma kapsamında kitin kaynağı olarak kullanılan türlerin % kitin içeriklerinin % 5-20 aralığında ve bu kitinlerin kitosan verimliliğinin % 66-74 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Kitin ve kitosan yapıları FT-IR, TGA, SEM ve XRD cihazları ile karakterize edilmiştir. FT-IR analiz sonuçlarına göre izole edilen kitinlerin  $\alpha$  formda olduğu gözlenmiştir. İzole edilen kitinlerin termal kararlılıklarının türlere göre değiştiği ve yüzey morfolojilerinin nanofiber yapılarından oluştuğu gözlenmiştir. Kitinlerin kristalin index değerleri (CrI) % 76.4 ve 90.6 aralığında değişiklik göstermiştir.

Kaya vd., (2013), ilk defa *Daphnia magna* yumurtasından kitin izole ederek kitin kaynaklarına bir yenisini eklemiştir. Bu çalışma ile *D. magna* yumurtasının kuru ağırlının %18-22'sinin kitin içerdiği belirlenmiş ve bu biyopolimerin yapısal ve termal özelliklerine FT-IR, elementel analiz, TGA, XRD ve SEM teknikleri ile ulaşılmıştır. Termal kararlılığının 351.6 °C olduğu ve pürüzlü ve kalın yüzeye sahip olduğu belirlenerek izole edilen kitin detaylıca incelenmiştir.

Dünya genelinde 8000 den fazla türü olduğu bilinen Chilopoda (çıyngiller) sınıfının kitin içeriğiyle ilgili ilk çalışma Zelencova vd., (2015) tarafından yapılmıştır. Bir çıyan türü olan *Scolopendra cingulata* kitin izolasyonu ve izole edilen kitinin kitosana dönüştürülmesi ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için seçilmiştir. *S. cingulata*'nın vücut ağırlının % 8'inin kitinden oluştuğu ve % 66 oranında kitosan içerdiği bulunmuştur. Yapılan analiz sonuçları Chilopoda kitininin  $\alpha$  formda olduğunu ve yüzey morfolojisinin dağılmış halde bulunan nanopor ve

nanoliflerden oluştuğunu açığa çıkartmıştır. İzole edilen kitinden elde edilen kitosanın düşük moleküler ağırlığa (2.278 kDa) sahip olduğu belirlenmiştir.

Kaya vd., (2015b), başka bir çalışmada, 4 cinsden 7 Orthoptera'nın dış iskeletinden aynı metodu kullanarak kitin izolasyonu yapmışlardır. Yapılan analiz sonuçlarına göre bu kitinlerin termal kararlılıkları ve kristaliniteleri farklılık göstermemiştir. Ancak SEM sonuçlarına göre, aynı cins çekirgeden izole edilen kitinlerin yüzey morfolojileri farklılık gösterirken, farklı çekirge cinslerinin yüzey morfolojilerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Moleküler analiz sonuçları izole edilen kitinlerin düşük moleküler ağırlığına (5,2-6,8 kDa) sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışma öldürülüp atık duruma getirilen zararlı ve istilacı çekirge türlerinin, biyoteknolojik bir ürün olan kitin izolasyonu için alternatif bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Alternatif kitin kaynakları bulma arayışında olan Kaya vd., (2015c), likenin kitin içerip içermediğini belirlemek için başka bir çalışma daha yapmışlardır. Hücre duvarında kitin içerdiği bilinen mantar ile simbiyotik yaşadığı göz önünde tutularak, bu çalışmada kosmopolitan bir liken türü olan *Xanthoria parietina* seçilmiştir. Likenden izole edilen kitinin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, TGA, XRD, SEM ve elementel analiz teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. *X. parietina*'nın içerdiği kitin oranının % 4.3 olduğu, bu kitinin  $\alpha$  formunda ve düz bir yüzeye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca liken kitininin CrI değeri % 70.1 olarak hesaplanmıştır.

Özellikle tekstil alanında kullanılan kitin nanofiberler birbirinden farklı kaynaktan izole edilebilir. Ifuku vd., (2011), kitin nanofiber izolasyonu için 5 farklı mantar seçmişlerdir. Mantarların yapısında bulunan glukan, mineral ve proteinlerin asidik koşullar altında yapıdan uzaklaştırılmasıyla, birbirine benzer yapıda ve oldukça uzun nanofiberler elde edilmiştir. Elde edilen nanofiberlerin genişliği mantarın türüne göre 20-28 nm aralığında değişiklik göstermiştir. Kitin nanofiberler FT-IR ve XRD analizleri ile karakterize edilmiştir. Analiz sonuçları  $\alpha$  formundaki nanofiberlerin yapılarında bir miktar glukan kalıntısı olduğunu göstermiştir.

Kitin denildiğinde ilk olarak akla Mantarlar âlemi, Annelida, Mollusca, Porifera, Cnidaria ve en çok da Artropoda şubesi gelmektedir. Bilinenin aksine Bryozoa şubesinin de kitin içerdiği Kaya vd.,(2015d) tarafından ispatlanmıştır. Bu çalışmada Bryozoa şubesine ait bir tür olan *Plumatella repens* den ilk defa kitin izole edilmiş, bu kitinin fizikokimyasal özellikleri *Fomes fomentarius* (Mantarlar âlemi) ve *Palomena prasina* (Artropoda şubesi) kitinlerinin fizikokimyasal özellikleri ile

kıyaslanarak belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre üç kitinin de  $\alpha$  formda olduğu gözlenmiştir. Canlıların sahip oldukları % kitin içerikleri bryozoon, mantar ve böcek türleri için sırasıyla %13.3, %2.4 ve %10.8 olarak kaydedilmiştir. Böcek kitini en yüksek termal kararlılığa sahipken onu sırasıyla bryozoon ve mantar kitinlerinin takip ettiği gözlenmiştir. Yüzey morfolojileri bryozoon ve böcek kitinlerinin nanofiber ve nanoporlu yapılardan oluştuğunu, mantar kitininin fiber ve por içermediğini göstermiştir. Böcekten izole edilen kitinin kristalinitesinin (CrI=%84.9), bryozoon (CrI=%60.1) ve mantardan (CrI=%58.5) izole edilen kitinlerden daha yüksek olduğu kaydedilmiştir.

Liu vd., (2012), alternatif kitin kaynaklarına bir yenisini eklemek istemiş ve yetişkin *Holotrichia parallela*'yı asit (1 M HCl (hidroklorik asit)), baz (1 M NaOH (sodyum hidroksit)) ve 1% potasyum permanganat uygulamalarına maruz bırakarak kitin izolasyonu yapmışlardır. Canlının kuru ağırlığının % 15'nin kitin içerdiği hesaplanmıştır. Bu böcek kitini Kızılötesi (IR) Spektroskopisi, XRD, SEM, and elementel analiz kullanılarak ticari  $\alpha$ -kitin ile kıyaslanmıştır. Böcekten izole edilen ve ticari kitinin benzer kimyasal yapısının olduğu ve bu kitinlerin fizikokimyasal özelliklerinin de oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar *H. parallela*'nın alternatif kitin kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Literatür bilgisine bakıldığında, bu zamana kadar yapılan çalışmalarda kaynak organizma olarak yetişkin canlılar kullanılmıştır fakat canlının gelişimsel sürecinde daha önceki aşamalarda kitin içerip içermediği bilinmemektedir. Kaya vd., (2014b), ilk defa kitin kaynağı olarak bir canlının larvasını seçmişlerdir. Bu çalışmada larva ve yetişkin haldeki patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) kitin kaynağı olarak kullanılmış ve larva ve böceğin sırasıyla %7 ve %20 kitin içeriklerine sahip oldukları belirlenmiştir. FT-IR analiz sonuçları bu kitinlerin  $\alpha$  formda olduğunu, XRD analizi sonuçları kristalin indeks değerlerinin larva için % 72 ve böcek için %76 olduğunu, SEM analiz sonuçları nanofiberli yüzey morfolojilerine sahip olduklarını, elementel analiz sonucu yetiştikten izole edilen kitinin daha saf yapıya sahip olduğunu ve TGA sonucu ise yetişkin patates böceğinin larvaya göre daha kararlı olduğunu belirlemiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında canlı larvasının da alternatif kitin kaynağı olabileceği açıkça görülmüştür.

Orthoptera türüne ait *Calliptamus barbarus* ve *Oedaleus decorus*' dan izole edilen kitinlerin türevi olan kitosanların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri Kaya vd., (2015e) tarafından test edilmiştir. İzole edilen kitin ve kitosanlar FT-IR, TGA, XRD

ve SEM teknikleri ile analiz edilmiştir. *C. barbarus* ve *O. decorus*' dan elde edilen kitosanların antimikrobiyal özellikleri insan ve balık patojenlerine karşı disk difüzyon ve mikrodilüsyon metodları kullanılarak araştırılmıştır. MBC (minimal bakterisit konsantrasyonu) ve MFC (minimal fungisidal konsantrasyonu) değerleri (0.16 ~ 2.50 mg/mL) kitosanların tüm mikroorganizmalara karşı önemli antimikrobiyal özellikler sergilediğini ve IC<sub>50</sub> (radikalın %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değerleri (*C. barbarus* için 10.68 ± 0.27 ve *O. decorus* için 10.91 ± 0.96 mg/mL) ise bu kitosanların antioksidan özelliğinin yüksek olduğunu belirlemiştir. Bu sonuçlar, aşırı ürediği için zararlı olarak düşünülen iki çekirge türünün alternatif kitin ve kitosan kaynağı olabileceğini ve bu biyopolimerlerin, sahip oldukları antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılabileceklerini göstermiştir.

## 2.2 Farklı Fizikokimyasal Özelliklere ve Formlara Sahip Kitinlerin İzolasyonu

Kaya vd., (2015f), kitinin fizikokimyasal özelliklerinin taksonomik ilişkiye göre nasıl değiştiğini açıklamaya çalışmışlardır. Bu çalışma kapsamında, Artropoda şubesine ait 16 canlıdan (13 tür Insecta sınıfına ait ve 3 tür Arachnida sınıfına aittir) aynı metod ile kitin izolasyonu yapılmıştır. Bu kitinlerin fizikokimyasal özelliklerinin taksonomik ilişkiye göre nasıl değiştiği FT-IR, TGA, SEM ve XRD cihazları kullanılarak tespit edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları ile kitin örneklerinin fizikokimyasal yapısının büyük oranda farklılık gösterdiği ve % kitin içeriği ve kristalin indeksin kısmen taksonlar arasında spesifiklik gösterdiği açığa çıkarılmıştır. Aynı sınıf içerisinde dahi kitinlerin yüzey morfolojilerinde önemli farklılık olduğu gözlenmiştir.

Kaya ve Baran, (2015), *Periplaneta americana* ile yaptığı çalışma sonucunda sadece oval nanoporlara (230–510 nm) sahip yeni bir kitin morfolojisi tanımlamışlardır. Bu çalışmada *P. americana* türünün sadece kanat yapısı kullanılmış ve geleneksel kitin izolasyon basamakları takip edilmiştir. Elde edilen kitinin yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiş ve nanoporların kitin yüzeyine rastgele dağılmadığı, merkezdeki porun etrafının altı veya yedi por ile kaplandığı gözlenmiştir.

Bir başka çalışmada Kaya vd., (2014c), bir böcek ve bir kabuklu deniz hayvanından izole edilen kitinlerin fizikokimyasal özelliklerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışma

kapsamında Insecta sınıfı (*Melolontha melolontha*) ve Crustacea sınıfına (*Oniscus asellus*) ait birer tür seçilmiştir. Kitin izolasyonu yapılırken aynı metod kullanılmıştır. *M. melolontha*'nın kitin içeriği % 13-14 ve *O. asellus*'un kitin içeriği ise % 6-7 olarak kaydedilmiştir. FT-IR, XRD ve TGA analiz sonuçları iki tür için benzerlik gösterirken, SEM analiz sonucuna göre türlerin yüzey morfolojilerinde nanopor ve nanofiberlerin farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Elementel analiz sonuçlarına bakıldığında, *M. melolontha*'dan izole edilen kitinin daha saf olduğu görülmüştür. Kitin daha saf olarak izole edildiği için *M. melolontha* türünün daha cazip kitin kaynağı olacağı düşünülmektedir.

Kitinin fizikokimyasal özelliklerinin izolasyon metoduna bağlı olduğu bilinmektedir. Ancak bu özelliklerin kaynağa göre değişip değişmediği bilinmemektedir. Kaya vd., (2015a), kitinin fizikokimyasal özelliklerinin bir organizmanın farklı vücut bölgelerine göre değişip değişmediğini belirlemek için bal arısını beş farklı bölgeye (kafa, boyun, karın, ayak ve kanat) ayırmış ve aynı metodu kullanarak kitin izolasyonu yapmışlardır. İzole edilen kitinlerin fizikokimyasal özellikleri birbirleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Kitin içeriğinin en yüksek olduğu bölge ayak (%13.25) iken en düşük olduğu bölgenin boyun (% 6.79) olduğu görülmüştür. Kitinlerin beş farklı yüzey morfolojisine sahip olduğu kaydedilmiştir. Sadece karın bölgesinde üç farklı yüzey morfolojisi gözlenmiştir. Boyun, karın, ayak ve kanat kısımlarından izole edilen kitinlerin maksimum bozunma sıcaklıkları ( $DTG_{max}$ ) 359 -367 °C aralığındayken, kafa kısmından izole edilen kitinin  $DTG_{max}$  değerinin 308°C olduğu kaydedilmiştir. Sonuç olarak, fizikokimyasal özelliklerin kaynağa göre değiştiği ispatlanmıştır.

Canlının farklı vücut kısımlarında izole edilen kitinin farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır. Ancak kitinin karakteristik özelliklerinin organizmanın gelişim süreci boyunca değişip değişmediği, eğer değişiyorsa bu değişimin nasıl olduğu konusu halen merak uyandırmaktadır. Kaya vd., (2016a), *Vespa crabro*' nun kitin matriksinin larva, pupa ve yetişkin sürecinde fizikokimyasal olarak nasıl değiştiğini araştırarak bu konuya ışık tutmuşlardır. Yapılan deneyler sonucunda organizmanın kitin içeriğinin, canlı büyüdükçe aşamalı olarak arttığı bulunmuştur; % 2.1, 6.2 ve 10.3. Larva sürecinden pupaya geçerken kitin miktarında yaklaşık 3 kat artış gözlenmiştir. Enzimatik yıkım testleri ile izole edilen kitinlerin yüksek oranda saf olduğu belirlenmiştir. Bu kitinlerin termal kararlılıklarının birbirlerine oldukça yakın olduğu ancak yüzey

morfolojilerinin oldukça farklı olduğu ve bu farklılığın ise böceğin gelişim sürecine göre değiştiği gözlenmiştir.

Kitin biyopolimeri farklı uygulama alanları için farklı formlarda kullanılmıştır. Singh vd., (2013), kök hücre kültürü alanında kullanmak için kitin karbon nanotüpler (CNT) ile çalışmışlardır. Biyoyumlu özelliğe sahip olan kitin yüksek elektrik iletkenliği olan karbon nanotüpler ile imidazole dayalı iyonik sıvı ortamında birleştirilmiştir. Kitin-karbon nanotüp materyalinin homojen şekilde dağıldığı SEM ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. FT-IR ve XRD analizleri ile bu nanokompozit malzemenin  $\alpha$ -kristal formda olduğu belirlenmiştir. Deney sonuçları insan mezenkimal kök hücrelerin farklı konsantrasyonlarda elde edilen hibrit materyale tutunmakta ve çoğalmakta olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma ile biyoyumlu ve elektrik geçirgenliği olan kitin-karbon nanotüplerin, mezenkimal kök hücrelerin fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için uygun ortam oluşturduğu da ispatlanmıştır.

Biyolojik uyumlu ve biyolojik olarak yıkılabilen kitinler antikanser ilaç olan kurkumin ile yüklenerek kitin nanojele (CCNG) dönüştürmüştür (Mangalathillam vd., 2012). Kitin ve kurkumin ilacı gibi kitin nanojeller de suda çözünmemiştir. SEM analizi ile küresel nanojel partiküllerin 70-80 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Bu nanojellerin sitotoksitesi insan fibroblast hücreleri (HDF) ve insan melanoma hücre hattı (A375) üzerinde analiz edilmiş ve HDF hücreleri için daha az toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. CCNGlerin apoptotik etkisi akım-sitomektik yöntemi ile test edilmiş ve fazla sitotoksik etki gösteren yüksek nanojel konsantrasyonundakine benzer sonuçlar gözlenmiştir. Histopatoloji çalışması sonuçlarına göre inflamasyon etki gözlenmemiştir. Sonuçlar dikkate alındığında, çalışma kapsamında hazırlanan kurkumin yüklü kitin nanojellerin melanoma -yaygın ve ciddi bir deri kanseri tipi- kanser tedavisi için umut vaat ettiği görülmektedir.

### **2.3 Üç Boyutlu Kitinlerin Farklı Uygulama Alanlarında Kullanılması**

Günümüze kadar sadece süngerlerden ve bir böcekten üç boyutlu kitin izole edilmiş ve bu kitinler farklı uygulama alanlarında kullanılmıştır.

Sucul omurgasız organizmalar arasında bulunan süngerler (Porifera) biyomimetik kompozit materyallerin biyomedikal, doku mühendisliği ve materyal bilimi alanlarında gelişmesi için ilham vermektedir. Ehrlich vd., (2010a), Verongida



sınıfında bulunan 6 farklı süngerden (*Aiolochoia crassa*, *Aplysina aerophoba*, *A. cauliformis*, *A. cavernicola* ve *A. fulva*) üç boyutlu kitin izolasyonu yapmışlardır. Süngerlerin ana iskelet yapısında bulunan kitinlerin fizikokimyasal ve yapısal özellikleri detaylıca incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu kitinlerin çok katmandan oluştuğu ve fiberli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. <sup>13</sup>C katı-faz NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) spektroskop, Yakın Kenar X-ışını Soğurma İnce Yapısı (NEXAFS), IR spektroskop teknikleri ve kitinaz yıkım testi, incelenen bütün kitinlerin  $\alpha$  formda olduğunu ispatlamıştır.

Süngerlerden izole edilen üç boyutlu kitin iskelet malzemesinin biyomedikal alanında herhangi bir uygulamada kullanılıp kullanılmayacağı Ehrlich vd., (2010b) tarafından araştırılmıştır. *Aiolochoia crassa*, *Aplysina aerophoba*, *A. cauliformis*, *A. cavernicola* ve *A. fulva*'dan izole edilen kitinler kondrosit hücre kültürü çalışmasında kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, kondrosit hücrelerin üç boyutlu kitinlere iyi tutunduğu ve diğer kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılanlara benzer dış matriks sentezledikleri gözlenmiştir. *In vivo* deneyler sonucu, bu kitinlerin proteoglikanca zengin dış matriksin depolanmasını desteklediği de ispatlanmıştır. Boyama deneyleri sonucunda ise bu kitinlerin hücre kültürü için oldukça uygun olduğu tespit edilmiştir. Sünger kitininin biyomedikal uygulamalar haricinde filtre sistemi ve biyomineralizasyon için örnek bir yapı olabileceği öngörülmektedir.

Ehrlich vd., (2013), bir diğer çalışmada, süngerden izole ettikleri üç boyutlu kitin matriksi zirkonyum dioksit nanofazların oluşumunda şablon olarak kullanmışlardır. Bu çalışma ekstrem koşullar (150°C) altında gerçekleştirilmiştir ve kitin izolasyonu için *A. cauliformis* kullanılmıştır. Bu yeni oluşturulan zirkonyum-kitin kompozit materyali ilk defa hidrotermal sentez kullanılarak hazırlanmış ve analitik metodlar ile karakterizasyonu yapılmıştır. Üç boyutlu kitin matriksin termal kararlılığının oldukça yüksek olması, onun hidrotermal sentez çalışmasında kullanılmasını mümkün kılmıştır. Elde edilen zirkonyum-kitin kompoziti, biyoyumlu materyal olarak kemik ve diş implantı gibi alanlarda kullanılabilir.

Süngerden izole edilen üç boyutlu kitinin diğer bir kullanım alanı ise uranyum adsorpsiyonudur. Schleuter vd., (2013), Verongida sınıfında bulunan süngerden fiberli ve esnek özelliklere sahip kitin izolasyonu yapmışlardır. Bu üç boyutlu kitinin uranyum adsorpsiyonu için oldukça etkin (288 mg/g) olduğu ve uranil miktarının % 90'ının absorblandığı gözlenmiştir. Kitin ve uranil arasındaki zayıf bağlar, Katı-faz

NMR, Raman ve IR spektroskopileri ile belirlenmiştir. Uranil adsorpsiyonu ve desorpsiyonu kitin matrikse zarar vermemiştir.

Süngerden izole edilen kitinlerin bir diğer uygulama alanı boya adsorpsiyonudur. Norman vd., (2014), *Hippospongia communis*' den izole edilen üç boyutlu kitin fiberli yüzeyini, karmen boyasının (C.I. natural red 4) adsorpsiyonu için kullanmışlardır. Bu çalışma esnasında, boya konsantrasyonunun etkisi, adsorpsiyon zamanı ve solüsyon pH'sı parametreleri araştırılmıştır. Sonuçlar bu uygulama alanı için kullanılabilir yeni bir boya-biyopolimer hibrid materyalinin etkinliğini göstermiştir. Adsorpsiyon kinetik sonuçlarının ( $r^2=0.979-0.999$ ), yalancı ikinci dereceden kinetik modeline tamamen uyduğu görülmüştür. Elde edilen hibrid materyalin boya (adsorbat) ve kitin (adsorban) ilişkisi birkaç farklı analiz (FT-IR, Raman,  $^{13}\text{C}$  katı-faz NMR spektroskopisi) ile incelenmiştir. Boya ve kitin arasındaki ilişkinin hidrojen bağları ve elektrostatik etki ile sağlandığı düşünülmektedir. Çalışmanın sonuçları, bu hibrid materyalin ilaç salınım sistemleri ve biyoaktif uygulamalar için kullanılmasını teşvik etmektedir.

Bu çalışmalardan farklı olarak, Kaya vd., (2016b), ilk defa bir diplopod türü olan *Julus terrestris*'in yüzük şeklindeki vücut kısımlarından yapı ve şekli koruyarak üç boyutlu kitin ve kitosan elde etmişlerdir. Bu biyopolimerler FT-IR, SEM, XRD, TGA ve elementel analiz teknikleri kullanılarak karakterize edilmiş ve ticari kitin ve kitosan ile kıyaslanmıştır. Üç boyutlu kitosan örneklerinin antimikrobiyal özelliği 12 mikroorganizmaya karşı araştırılmış ve maksimum inhibisyonun ( $15.6 \pm 1.154$  mm) yaygın bir insan patojeni olan *Staphylococcus aureus*'a karşı olduğu gözlenmiştir. Yüzük formundaki kitosanın antitümör aktivitesi L929 (fibroblast hücre hattı) ve HeLa (kanser hücre hattı)'ya karşı araştırılmış ve bu kitosanın düşük sitosoksisite gösterdiği ve hücre çoğalmasını yüksek oranda engellediği tespit edilmiştir. Elde edilen kitosanın plazmid DNA sı ile etkileşimi ise farklı kitosan konsantrasyonları ile (0.04, 0.4 ve 4 mg/mL) incelenmiştir.

## **2.4 Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kitin ve Kitosanların Lizozim**

### **Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi**

Farklı kaynaklardan izole edilen kitinlerin çeşitli proteinler ile olan etkileşimi üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlar şöyle açıklanmıştır;

Ledesma-Osuna vd., (2010), ticari kitini asit ile muamele ettikten sonra ultrafiltrasyon membran sistemi ile parçalarına (1-3 kDa) ayırarak kitin-oligosakkarid (CO) formuna dönüştürmüşlerdir. CO'nun Bovin Serum Albumin (BSA) ile etkileşimi Maillard Reaksiyonu ile test edilmiştir. Bu reaksiyon donmuş haldeki BSA ve CO partiküllerinin 60°C'de 6 ve 12 saat ısıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir. BSA-CO etkileşimi amino grup içermeleri, jel elektroforezi, İçsel Triptofan Emisyon Spektrumu ve Kütle Spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Kütle spektrometrisi analizi sonucuna göre, BSA ile etkileşime geçen kitin-oligomerlerinin monomer ve dimer yapılarının moleküler kütlelerinin zamanla arttığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile protein-karbohidrat etkileşimini onaylayan glikokonjugat elde etmenin basit bir yöntemi denenmiştir.

Protein etkileşimi çalışmaları kitin ile sınırlı kalmamış kitosanın (CS) da protein tutma kapasitesi araştırılmıştır. Mondal vd., (2015), ticari kitosandan Faz İncisyon Yöntemi ile CS hidrojel boncuklar hazırlamışlardır. Boncukların karakterizasyonu FT-IR, TGA ve SEM ile yapılmıştır. Elde edilen boncukların BSA adsorpsiyonu farklı pH ve glutealdehit miktarlarında test edilmiştir. Çapraz bağlamak için kullanılan glutealdehit miktarı arttıkça hidrojel boncukların kimyasal ve yapısal kararlılığı artmıştır. En iyi adsorpsiyon kapasitesi pH 5,5 ve çapraz bağlama oranı 0,2 olduğunda gözlenmiştir. Çünkü düşük pH da kitosanın çok sayıdaki amin grupları protonlanır ayrıca BSA'nın izoelektrik noktası 4.7'dir. pH nötral değerine yaklaştıkça kitosanın protein ile elektrostatik bağ yapma potansiyeli artar. Diğer yandan, glutealdehit, kitosanın üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlandığı için, çapraz bağlanma oranının artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi azalmıştır. Bu çalışma sonucunda en yüksek kapasite değerinin 96,4 mg.g<sup>-1</sup> olduğu gözlenmiştir.

Denkbas vd., (2002), glutealdehit ile çapraz bağladıkları kitosan mikro kürelerin (170±81 µm) insan serum albumini (HSA) tutma kapasitelerini araştırmışlardır. Mikro kürelerin adsorpsiyon kapasitesi farklı HSA derişimi (0.5–2.0 mg/mL) ve farklı ortam pH'sı (4.0–7.0) parametrelerinde çalışılmıştır. Maksimum HSA adsorpsiyonuna (11.35 mg HSA/g kitosan mikro küre), pH 5 ve 1.5 mg/mL HSA derişiminde ulaşılmıştır.

Bayramoğlu vd., (2003), sentezlediği kitosan kompozitin lizozim adsorpsiyon kapasitesini araştırmışlardır. Sentezlenen pHEMA/kitosan kompozit membranın ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) 'ın lizozim tutma kapasiteleri sonuçları sırasıyla

şöyledir; 121.5 ve 83 mg/mL<sup>-1</sup>. Bu sonuçlar kitosan eklenen membranın lizozim tutma kapasitesini artırdığını göstermiştir.



### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1 Örneklerin Toplanması**

Çıyanlar (*Scolopendra* sp.), Aksaray Üniversitesi Kampüsü'nden 2015 yılında toplanmıştır. Toplanan örnekler ilk olarak üzerlerinde bulunan toz ve diğer istenmeyen partiküllerden uzaklaştırmak için distile su ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra çıyan örnekleri yapının muhafaza edilmesine dikkat edilerek farklı vücut bölgelerine (anten, kafa, kısıkaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) ayrılmıştır. Bütün örnekler birkaç defa daha distile su ile yıkanmış ve etüv içerisinde 50°C de 48 saat kurutulmuştur. Son olarak kuruyan örnekler ilk kuru ağırlıklarını belirlemek için hassas terazide tartılmış ve bulunan değerler not edilmiştir.

#### **3.2 Kitin İzolasyonu**

##### **3.2.1 Demineralizasyon**

Kuruyan örnekler 2 M HCl çözeltisi içerisinde 40°C de 4 saat muamele edilmiştir. Bu aşamanın amacı yapıdan minerallerin uzaklaştırılmasıdır. Süre sonunda HCl ile muamele edilen örnekler kurutma kağıdı kullanılarak distile su ile nötral pH ya ulaşana kadar süzülmüştür. Ardından mineralleri uzaklaştırılan örnekler etüv içerisinde 60°C de 48 saat kurutulmuştur. Son olarak kuruyan örnekler mineral içeriklerinin belirlenmesi için hassas terazide tartılmış ve bulunan değerler not edilmiştir.

##### **3.2.2 Deproteinizasyon**

Proteinlerin uzaklaştırılması için demineralize olan örnekler 2M NaOH çözeltisi içerisinde 50°C de 24 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda NaOH ile muamele edilen örnekler kurutma kağıdı kullanılarak distile su ile nötral

pH'a ulaşana kadar süzülmüştür. Ardından proteinleri uzaklaştırılan örnekler etüv içerisinde 60°C de 48 saat kurutulmuştur. Son olarak kuruyan örnekler protein içeriklerinin belirlenmesi için hassas terazide tartılmış ve bulunan değerler not edilmiştir.

### **3.2.3 Beyazlatma**

İzole edilen kitinlerin kahverengi olan renginin beyazlatmak için *Scolopendra* sp. nin farklı vücut bölgelerinden iki ve üç boyutlu olarak elde edilen kitin örnekleri % 0.4 NaClO (sodyum hipoklorit) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında yarım saat muamele edilmiştir. Süre sonunda kitin örnekleri kurutma kağıdı kullanılarak distile su ile nötral pH ya ulaşana kadar süzülmüştür. Ardından örnekler etüv içerisinde 60°C de 48 saat kurutulmuştur. Son olarak kitinler bu aşamada gözlenen kütle kaybının belirlenmesi için hassas terazide tartılmış ve bulunan değerler not edilmiştir.

## **3.3 Karakterizasyon**

### **3.3.1 FT-IR**

Çıyan örneklerinin sahip olduğu FT-IR bantları Perkin Elmer cihazı ile belirlenmiştir. Bu cihaz 4000–625 cm<sup>-1</sup> aralığında bant vermektedir. Bu yöntem ile kitin örneklerinin fonksiyonel grupları belirlenmiştir.

### **3.3.2 TGA**

Elde edilen kitinlerin TG analizleri EXSTAR S11 7300 sistemi ile yapılmıştır. Bu cihaz her 10 dakikada bir sıcaklığı artırarak 25 ve 650°C aralığında ölçüm yapar. TGA ile kitinlerin sıcaklığa bağlı olarak (25-650°C) bozunma derecesi ölçülmüştür.

### **3.3.3 SEM**

Çıyanın yedi farklı vücut bölgesinden elde edilen kitinlerin yüzey morfolojileri QUANTA- FEG 250 marka taramalı elektron mikroskopu kullanılarak belirlenmiştir. Gatan Precision Etching Coating Sistemi ise örneklerin yüzeyini altın ile kaplamak için kullanılmıştır.

### 3.3.4 XRD

Çalışma dahilinde elde edilen kitin örneklerinin XRD spektrumlarını belirlemek için Rigaku D max 2000 sistemi kullanılmıştır. Bu sistem 40 kV, 30 mA ve  $2\theta$  da  $5^\circ$ - $45^\circ$  aralığında tarama açısı ile ölçüm yapar ve kitinin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  formlarından hangisine sahip olduğunu belirler. Örneklerin sahip olduğu CrI değeri Denklem (3.1)'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{CrI}_{110} = [(I_{110} - I_{\text{am}})/I_{110}] \times 100 \quad (3.1)$$

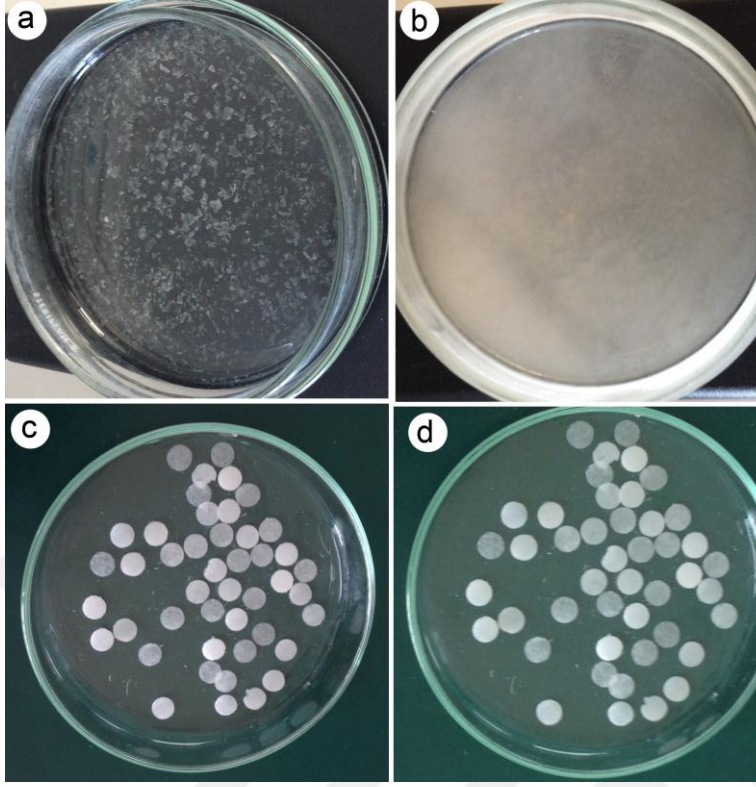
$I_{110}$  =  $2\theta$  daki en yüksek yoğunluk  $\cong 20^\circ$

$I_{\text{am}}$  =  $2\theta$  daki amorf dağılma yoğunluğu  $\cong 13^\circ$ .

### 3.4 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından Elde Edilen Kitinlerin Lizozim Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Yedi farklı vücut bölgesinden elde edilip fizikokimyasal özellikleri belirlenen kitinlerin altı tanesi (kafa, kısaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) lizozim adsorpsiyonu için kullanılmıştır. Lizozim adsorpsiyonu yapılmadan önce kitin polimerlerine  $\text{Cu}^{+2}$  metali bağlanmıştır. Bunun için, her bir kitin örnekleri ayrı ayrı 100 mg/mL  $\text{Cu}^{+2}$  çözeltisi içerisinde 2 saat kadar karıştırılmış ve süre sonunda kitin örnekleri yıkanmıştır.  $\text{Cu}^{+2}$  bağlanan kitinlerin lizozim ile etkileşimi farklı pH (5.0-8.0) ve protein konsantrasyonu (0.01-0.25 mg/mL) koşulları altında değerlendirilmiştir (Odabaşı ve Denizli, 2004).

Lizozim adsorpsiyonu deneylerine başlamadan önce kitin örneklerinin boyutlarını aynı seviyeye getirmek için jel hazırlanmıştır. 5 mL jel hazırlamak için öncelikle 4430  $\mu\text{L}$  saf su içerisinde çözülmüş 80 mg BİS (*N,N'*-metilen bisakrilamid), 350  $\mu\text{L}$  HEMA, toz halindeki 50 mg kitin örnekleri ve 250  $\mu\text{L}$  saf su içerisinde çözülmüş 10 mg APS (amonyumpersülfat) sırasıyla eklenmiştir. APS eklendikten sonra karışım 2-3 dakika soğutucuda bekletilmiş sonrasında karıştırılmış ve bu işlem kitin örnekleri homojen dağılına kadar tekrarlanmıştır. Son olarak 20  $\mu\text{L}$  TEMED (tetrametiletildiamin) eklenir eklenmez karışım vortekslenmiş ve cam petri kabına dökülüp  $-12^\circ\text{C}$  de bir gece jel haline gelmesi için bekletilmiştir. Süre sonunda jelleşen karışım küçük şeritler halinde kesilmiş ve lizozim adsorpsiyonlarını incelemek için bu kesitlerden 6 tane alınmıştır. Jelin hazırlanması ve kesitlerin oluşturulması şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 1:**Lizozim adsorpsiyonu deneyleri için hazırlanan jel (a), bu jelin bir gece  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  'de bekletilerek dondurulması (b) ve donan jelden hazırlanan kesitler (c,d).

Kesitlerin lizozim adsorpsiyonu kesikli sistem ile incelenmiştir. Bu sistemde, kesitlerin her biri tampon çözeltisi (pH 5,6,7 ve 8) içerisinde absorbans değeri 0.005 den düşük olana kadar şartlandırılmıştır. Tampon ile şartlandırılan kesitler 0.05-0.25 mg/mL konsantrasyon aralığındaki lizozim çözeltileri içerisinde rotorda (Stuart® SB3) karıştırılmıştır. Karıştırma başlamadan önce lizozim çözeltisinin absorbans değeri 280 nm'de UV-vis (Mor Ötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi) cihazında (GENESYS 10S) okutulmuştur. Bu değer  $A_0$ 'ı vermektedir. Kesitlerle karıştırılan lizozim çözeltisinin absorbans değeri 15 dakikada bir ölçülmüştür. Kesitler doygunluğa ulaşana kadar ölçüm alma işlemi devam etmiştir. Doygunluğa ulaşıldığı an alınan son değer  $A_f$ 'ı vermektedir. Okumalar alındıktan sonra, kesitler tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Protein çözeltisine maruz kaldığı süre kadar yıkama işlemi devam etmiştir. Tampon çözeltisi ile yıkama yapılmasının sebebi non-spesifik bağlanmaların uzaklaştırılmasıdır. Yıkama yapıldıktan sonra, desorpsiyon yapılması için kesitler 0.5 M NaCl (Sodyum Klorür) çözeltisi içerisinde yarım saat



bekletilmiştir. Bu aşamanın amacı spesifik bağlanmaların ayrılmasıdır. Son olarak 1 saat saf su ile yıkama yapılmıştır.

Kesitlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri ( $Q$ ) Denklem (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q=(C_i- C_f) V/m \quad (3.2)$$

$Q$  g başına tutunan mg madde miktarını,  $C_i$  çalışılan çözeltinin başlangıç derişimini (mg/mL),  $C_f$  çalışılan çözeltinin son derişimini (mg/mL),  $m$  çalışılan peletlerin miktarını (g) ve  $V$  çalışılan protein çözeltisinin hacmini (mL) belirtmektedir.

#### **3.4.1. Uygun pH'nın belirlenmesi**

Örneklerin (kafa, kısaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) maksimum adsorpsiyon kapasitesi analizi pH 5-8 aralığında 0.05 M konsantrasyondaki tamponda çalışılmıştır. Örnekler pH 5 için sodyum asetat tamponunda ve pH 6,7 ve 8 için sodyum fosfat tamponunda incelenmiştir.

#### **3.4.2 Uygun protein konsantrasyonunun belirlenmesi**

0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 mg/mL konsantrasyonlarındaki protein çözeltileri tampon içerisinde hazırlanmıştır. Fluka marka lizozim (Lot#BCBG4804V) kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Kitin İçeriği ve Her Bir Aşamadan Sonra Kaybedilen Ağırlık

Çıyan örneklerinin ilk ağırlıkları ve her bir basamaktan sonra geriye kalan miktar Çizelge 4.1’de listelenmiştir. Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi kuyruk kısmının sahip olduğu mineral içeriği en yüksek iken onu sırasıyla kısaç, kafa, anten, ayak, boyun ve gövde takip etmektedir. En yüksek protein içeriğine sahip kısım gövde iken onu sırasıyla anten, boyun, ayak, kafa, kısaç ve kuyruk takip etmektedir. Bunlardan farklı olarak kuyruk kısmının en yüksek kitin içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir ve kitin içeriği yönünden yapılan sıralama şöyledir: ayak, kafa, kısaç, boyun, gövde ve anten (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1:** Kitin içeriği ve herbir aşamadan sonra kaybedilen kütle.

Vücut kısımları	Kuru ağırlık (g)	herbir aşamadan sonra kalan miktar(g)			Kitin Yüzdesi (%)
		demineralizasyon	deproteinizasyon	depigmentasyon	
Anten	0.403	0.302	0,039	0.037	9.18
Kafa	1.172	0.792	0,158	0.152	13.02
Kısaç	0.936	0.582	0,121	0.115	12.31
Boyun	1.744	1.438	0,191	0.187	10.77
Gövde	34.153	31.231	3.324	3.319	9.72
Ayak	7.916	6.189	1.059	1.051	13.28
Kuyruk	2.461	1.452	0.398	0.391	15.91

Her bir aşamadan sonra kaybedilen ağırlık sonuçları, çıyanın vücut kısımlarının sahip olduğu kitin içeriği ile mineral içeriği arasında pozitif; kitin içeriği ile protein içeriği arasında ise negatif bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Farklı vücut kısımlarının herbiri farklı miktarda kitin içermektedir. Kitin miktarındaki bu farklılığın ve kitin ile

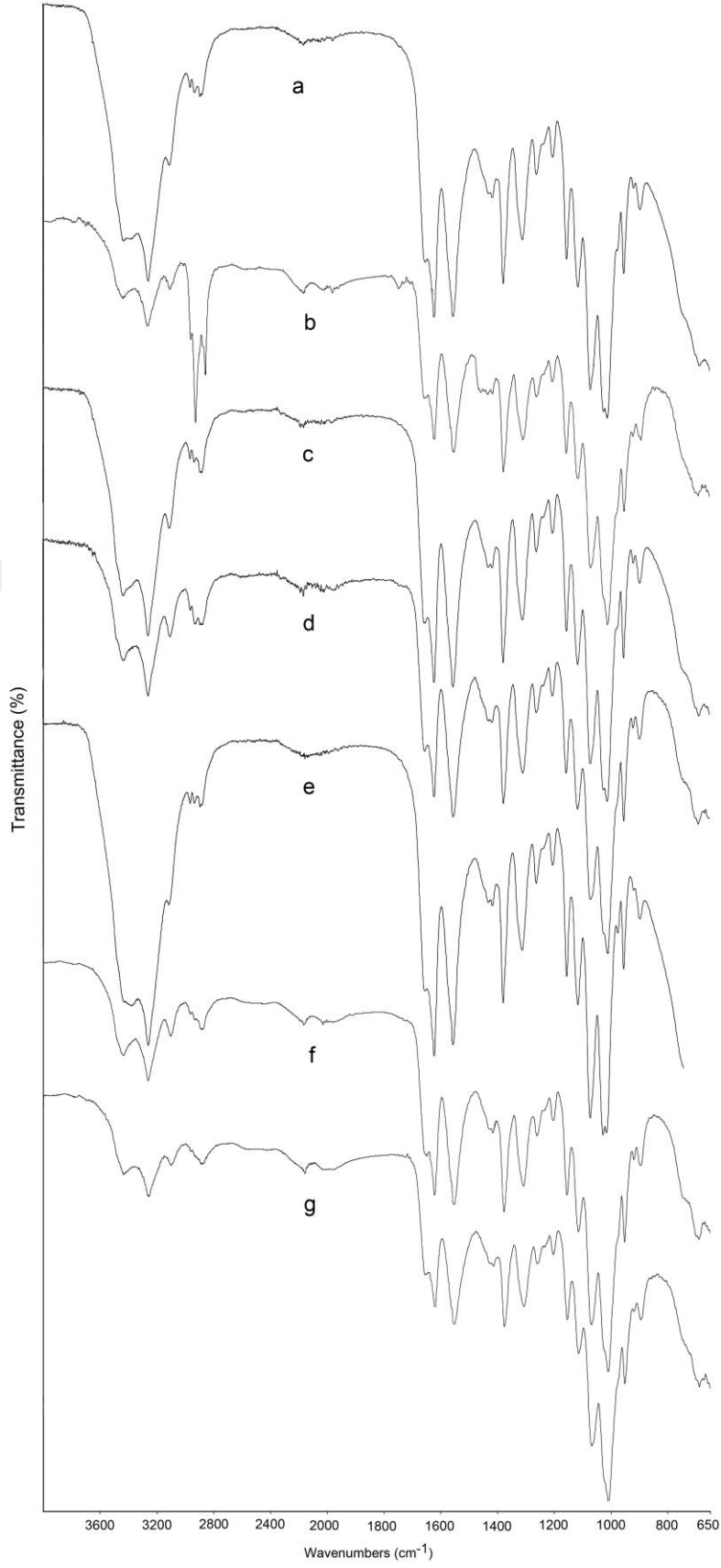
diğer bileşenler (protein, mineral vs.) arasındaki oranın vücut kısmının işlevi ile ilişkili olduğu söylenebilir ancak bu verinin daha detaylı açıklanması gerekmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalar ile bir canlının vücut kısımlarının işlevi ile sahip olduğu kitin içeriği arasındaki ilişki detaylı olarak incelenebilir.

## 4.2 FT-IR

Çıyanın farklı vücut kısımlarından elde edilen kitinlerin FT-IR spektrumlarının standart ortalamaları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bütün kitin örnekleri için amid I bandı  $1653.4 \pm 0.79 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1620.3 \pm 0.49 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmiştir. Diğer önemli pikler olan Amid II ve Amid III bantları sırasıyla  $1553.6 \pm 0.53 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1308.3 \pm 1.38 \text{ cm}^{-1}$  olarak kaydedilmiştir.  $\alpha$  kitin için önemli olan diğer pikler şöyledir;  $3434.9 \pm 3.89 \text{ cm}^{-1}$  (O–H gerilme),  $2881.4 \pm 15.3 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$  alifatik bileşiğinin simetrik gerilmesi),  $1069.4 \pm 1.27 \text{ cm}^{-1}$  (C–C sakkarit zincirindeki asimetrik gerilme) (Şekil 4.1).

FT-IR spektroskopu sonucuna göre, kitinin  $\alpha$ ,  $\beta$  veya  $\gamma$  formlarından hangisine sahip olduğu belirlenir.  $\alpha$  ve  $\beta$  kitin arasındaki en belirgin bant  $1660\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$  aralığındaki Amid I bantıdır.  $\beta$  kitin  $1650 \text{ cm}^{-1}$  civarında pik veren bir molekül içi banta sahiptir. Diğer yandan  $\alpha$  kitin  $1660$  ve  $1620 \text{ cm}^{-1}$  civarında 2 pik veren bir molekül içi ve bir molekül arası banta sahiptir. Bu zincirler arası bantların varlığı  $\alpha$  kitinin yüksek kimyasal stabilitesinden sorumludur (Minke ve Blackwell,1978).  $\alpha$  kitin için Amid II bandı  $1560 \text{ cm}^{-1}$  ve Amid III bandı  $1315\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$  dir.  $897\text{-}896 \text{ cm}^{-1}$  aralığında gözlenen  $\beta$ -glikozidik bant sadece  $\alpha$ -kitinde gözlenir (Brugnerotto vd., 2001). Bu bantlar elde edilen tüm  $\alpha$  kitinler için aynıdır ve karakteristiktir.

Şimdiye kadar farklı kaynaklarından izole edilen kitinlerin FT-IR sonuçları şöyledir: Liu vd., (2012) böcekten (*H. parallela*) izole ettiği  $\alpha$  kitinin karakteristik piklerini  $1654 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1627 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1560 \text{ cm}^{-1}$ , Wysokowski vd., (2013) süngerden (*Aplysina fistularis*) izole ettiği  $\alpha$  kitinin karakteristik piklerini  $1660 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1630 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1550 \text{ cm}^{-1}$  ve Kaya vd., (2015c) likenden (*X. parietina*) izole ettiği  $\alpha$  kitinin karakteristik piklerini  $1654 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1624 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1560 \text{ cm}^{-1}$  olarak kaydetmiştir.  $\alpha$  kitin için bulunan karakteristik pikler bu çalışma kapsamında izole edilen kitinlerin hepsi için de aynıdır.

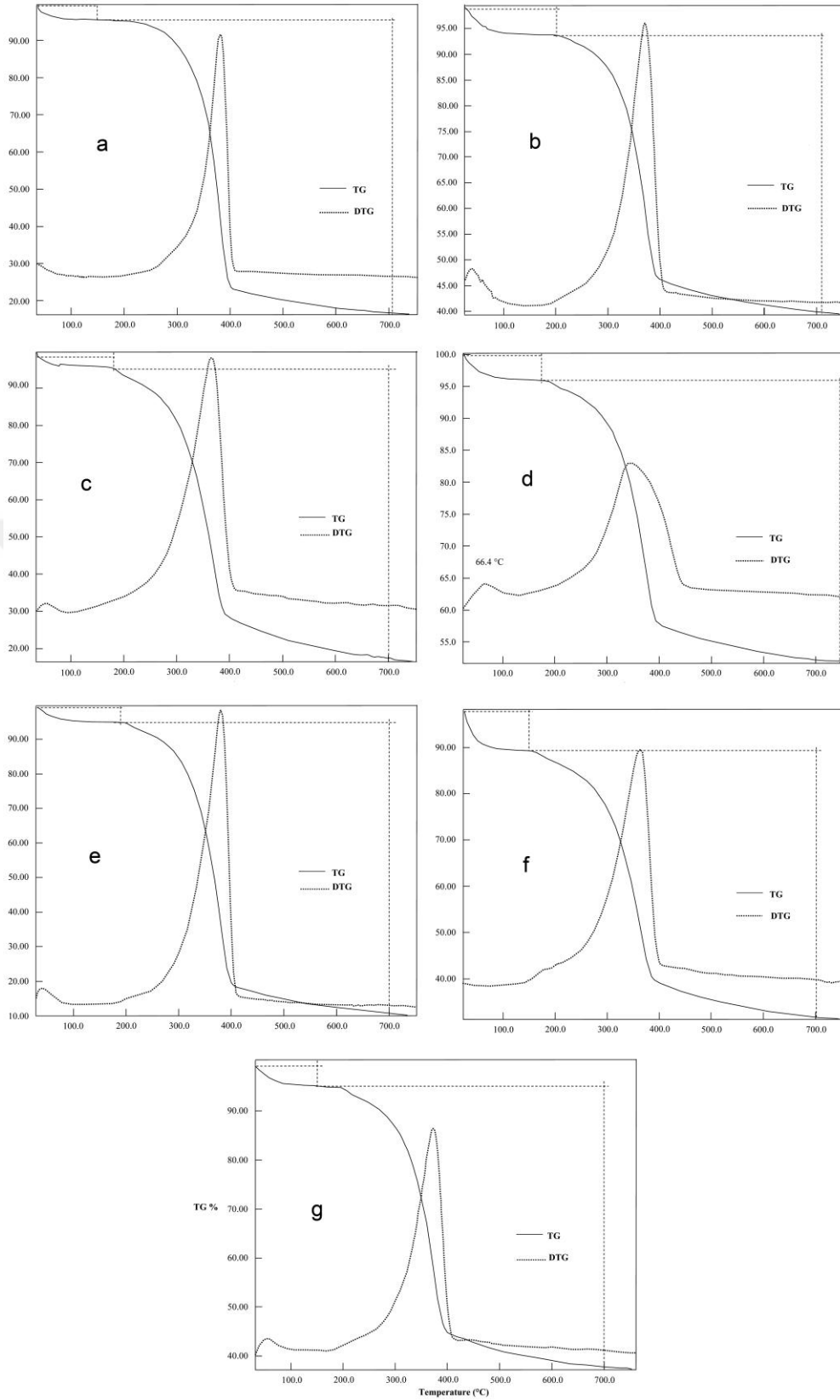


**Şekil 4. 1:** İzole edilen kitinlerin FT-IR spektrumlarının standart ortalamaları. (a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.

### 4.3 TGA

Her bir kitin örneklerinin TG analizi sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, bütün kitin örneklerinin iki termal yıkılma fazı olduğu görülmüştür. İlk yıkılma fazında (150°C’ ye kadar) % 3 ve 5 aralığında kütle kaybı gerçekleşmiştir. Bu aşama kitin örneklerinden suyun buharlaşması olarak bilinir. İkinci kütle kaybı bütün örnekler için 150 ve 750°C arasında gerçekleşir. Bu aşama ise polisakkarit moleküllerinin yıkılması olarak bilinir. İkinci kütle kaybında yıkılan polisakkaritlerin yüzdesi şöyledir; anten: 79, kafa: 64, kısıkaç: 78, boyun: 61, gövde: 84, ayak: 67 ve kuyruk: 67. Bütün kitinlerin sahip olduğu DTG<sub>max</sub> değerleri ise anten:382°C, kafa:371°C, kısıkaç: 368°C, boyun: 348°C, gövde: 379°C, ayak: 365°C ve kuyruk: 374°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).

Mevcut çalışmada gözlenen karakteristik faz ve oranlar, önceki çalışma sonuçlarına çok yakın bulunmuştur. Önceki çalışmalarda deniz kabuklusu (Wang vd., 2013) ve böcekten (Paulino vd., 2006) izole edilen kitinlerin DTG<sub>max</sub> değerleri 360-390°C arasında olarak bulunmasına rağmen, mantardan (Ospina vd, 2014) izole edilen kitinin DTG<sub>max</sub> değeri 314°C olarak kaydedilmiştir. Mevcut çalışma kapsamında bir böcek türünün farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin DTG<sub>max</sub> değerleri ise 348-382°C aralığında kaydedilmiştir. Anten kitininin en yüksek ve boyun kitininin en düşük termal kararlılığa sahip olduğu gözlenmiştir. Bilindiği gibi, termal kararlılık kitinin uygulama alanı seçilirken dikkat edilen en önemli parametrelerden biridir (Wysokowski vd., 2015). Çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin sahip olduğu farklı DTG<sub>max</sub> değerleri, bu kitinler için uygulama alanı seçilirken yardımcı olabilir. Örneğin sadece yüksek termal kararlılığa sahip kitinlerin kullanılabileceği bir alan için anten kitini önerilebilmektedir.

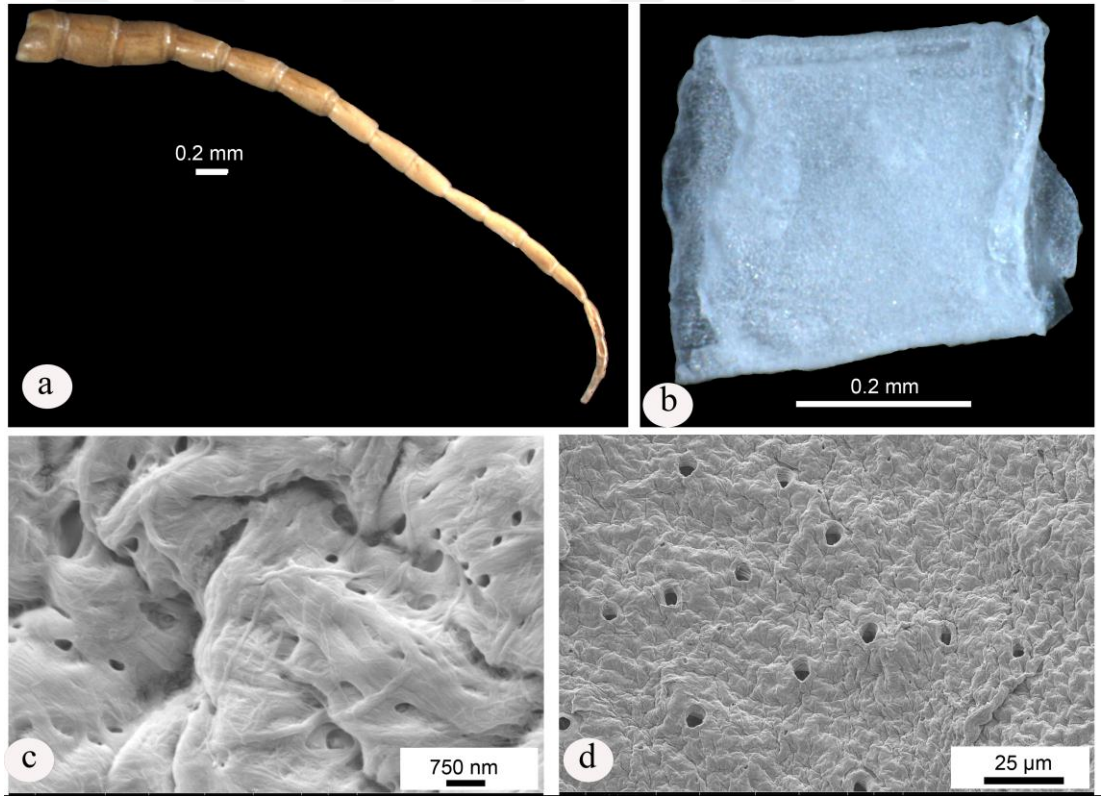


**Şekil 4. 2:**Kitin örneklerinin TGA sonuçları. (a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.

#### 4.4 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından İzole Edilen Kitinlerin Şekli ve Yüzey Morfolojileri

Çıyanın anten, kafa, kısaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk kısımlarından yapı korunarak izole edilen kitinlerin yüzey morfolojileri SEM ve şekilleri ışık mikroskobu (Leica Z6 APO) aracılığıyla detaylıca incelenmiştir. Her bir vücut kısımlarının yapısı ve yüzey morfolojileri ayrı ayrı belirlenmiştir.

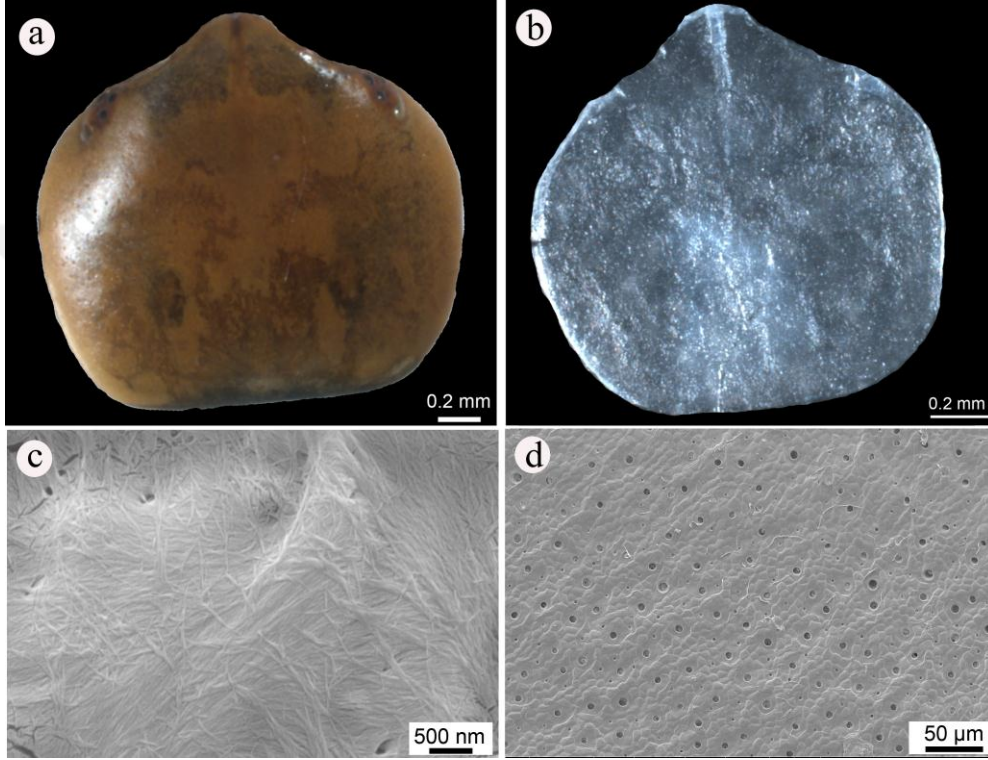
Kısa, silindirik ve üç boyutlu kitin çıyanın anten kısmından elde edilmiştir (Şekil 4.3). Bu silindirik yüzey nanolifler ile iç içe geçmiş mikro ve nano porlar içermektedir. Kısa silindirik kitinin uzunluğu 0.33-0.42 mm aralığında, çapı ise 0.29 ve 0.39 mm aralığında değişmektedir. Mikro ve nano porların büyüklüğünün 2.2-3.4  $\mu\text{m}$  ve 140-210 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4. 3:** Çıyanın anten kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

Çıyanın kafa kısmından orijinal yapı ve şekli korunarak izole edilen kitinler Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Kitinlerin şekli ovale benzemektedir fakat üst kısım biraz keskin sonlanmaktadır. Oval şeklindeki kitinlerin çapları 1.3-1.5 mm aralığındadır.

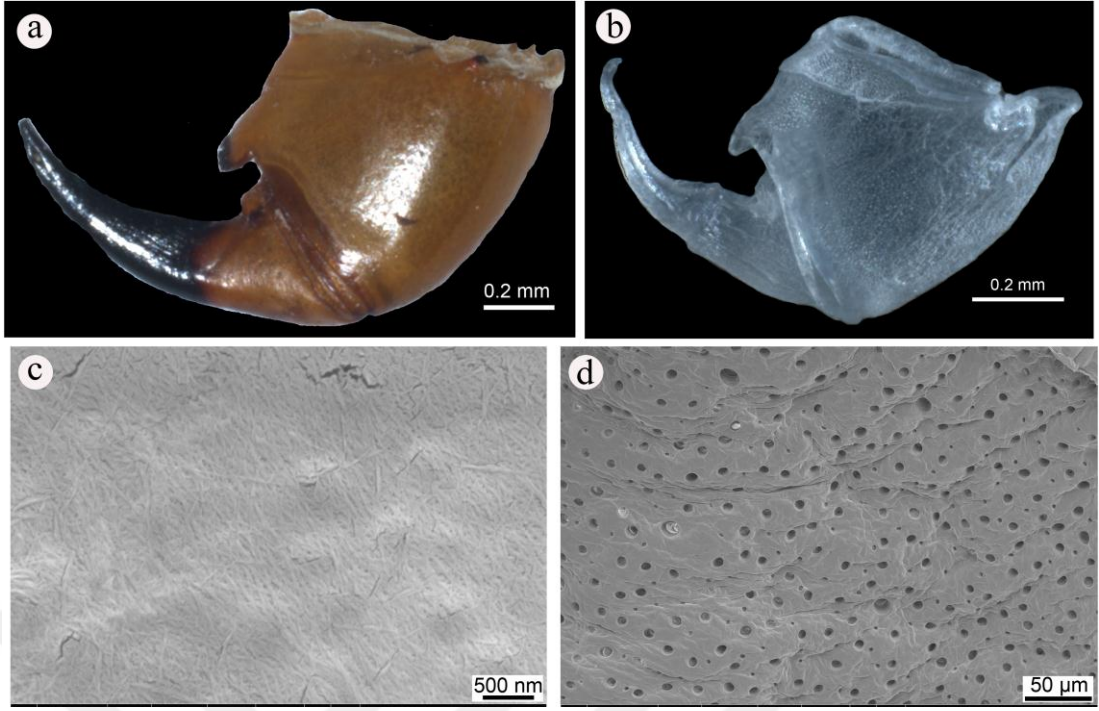
Kafa kısmından izole edilen kitinler nano fiber ile iç içe geçmiş üç tip por yapısından oluşmaktadır. Bu porlar 3 gruba ayrılır: 1) yüzeye homojen olarak dağılan 6.7-7.4  $\mu\text{m}$  aralığındaki mikro porlar, 2) yüzeye homojen olarak dağılan 2.5-2.7  $\mu\text{m}$  aralığındaki mikro porlar, 3) yüzeyde nadiren gözlenen 110-130 nm aralığındaki nanoporlar. Oval şeklindeki kafa kitininin diğer önemli özelliği ise ıslak halde şeffaf halde olmasıdır.



**Şekil 4. 4:** Çıyanın kafa kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

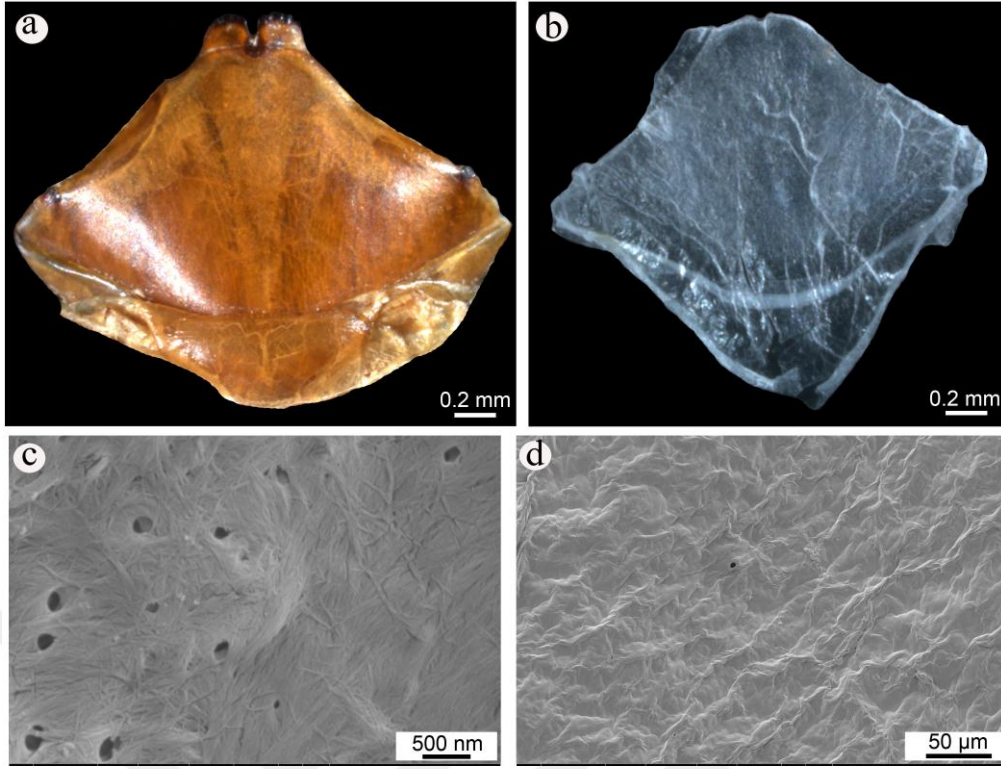
Üç boyutlu boru şeklindeki kitin, çıyanın kısıkaç kısmından yapı ve şekil tamamen korunarak başarılı bir şekilde izole edilmiştir (Şekil 4.5b). Boru şeklindeki kısıkaç kitini iki tip mikro por ve nanoliflerden oluşmuştur (Şekil 4.5c,d). Büyük ve küçük porların genişliği sırasıyla 8.1-11.4  $\mu\text{m}$  ve 2.6-3.5  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür.





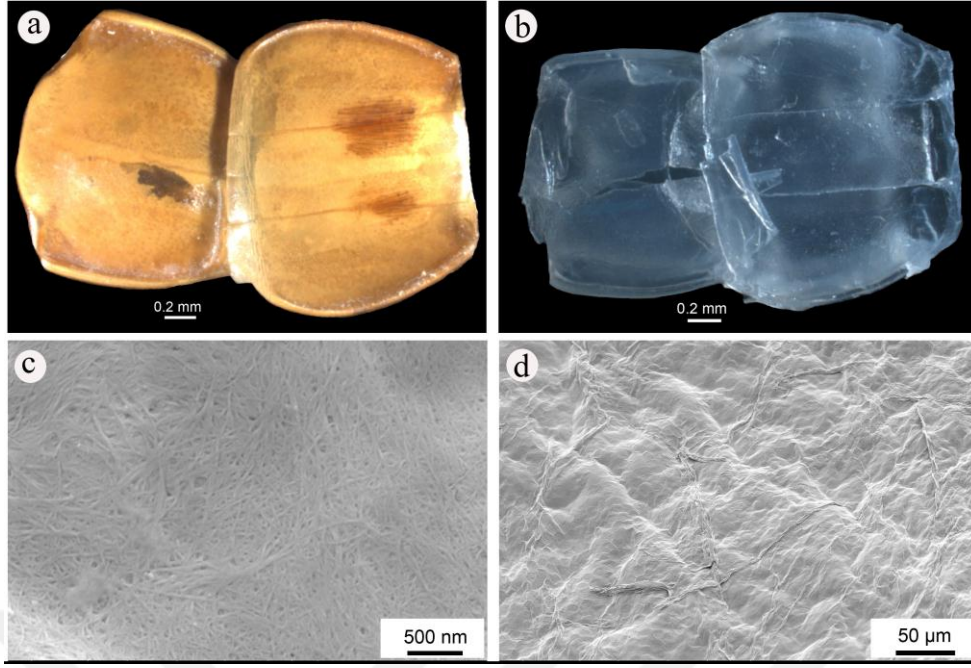
**Şekil 4. 5:** Çıyanın kısıkaç kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

Çıyanın boyun kısmından izole edilen kitin kalkan şeklindedir (Şekil 4.6b). Bu kalkan şeklindeki kitin düşük büyütmelerde düz bir yüzeye sahip gibi gözükse de (Şekil 4.6d), daha yüksek büyütmelerde nano fiber ve nano porlara sahip olduğu açıkça gözlenmektedir (Şekil 4.6c).



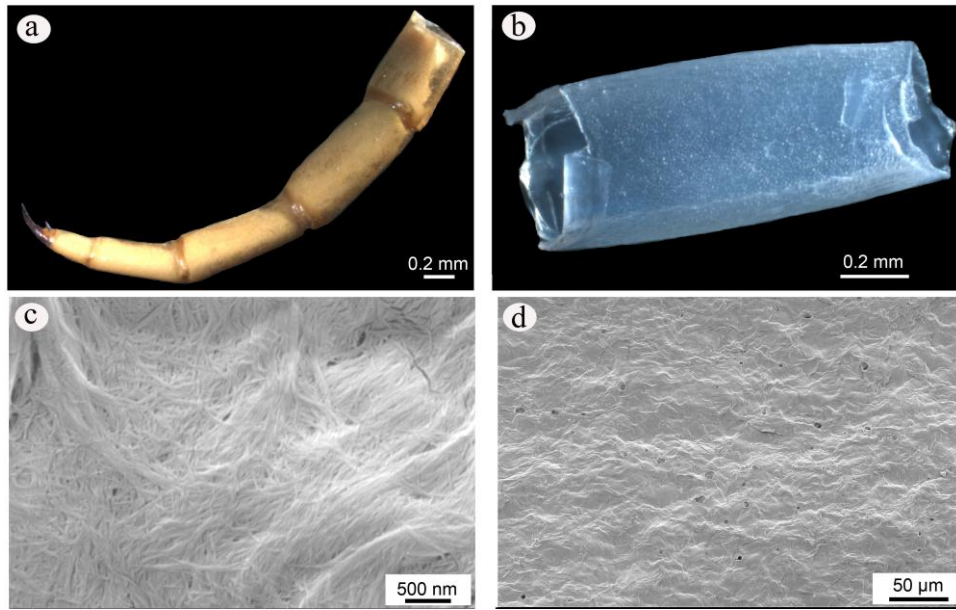
**Şekil 4. 6:** Çıyanın boyun kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

Canlının gövdesinden yapı ve şekil tamamen korunarak izole edilen kitinler segmentli yapıya sahiptir. Şekil 4.7d’de bu kitinin papilla şeklinde hücre duvarı düşük büyütmede gösterilmiştir. Nanofiber ve nanoporlar daha yüksek büyütmelerde görünür haldedir (Şekil 4.7c).



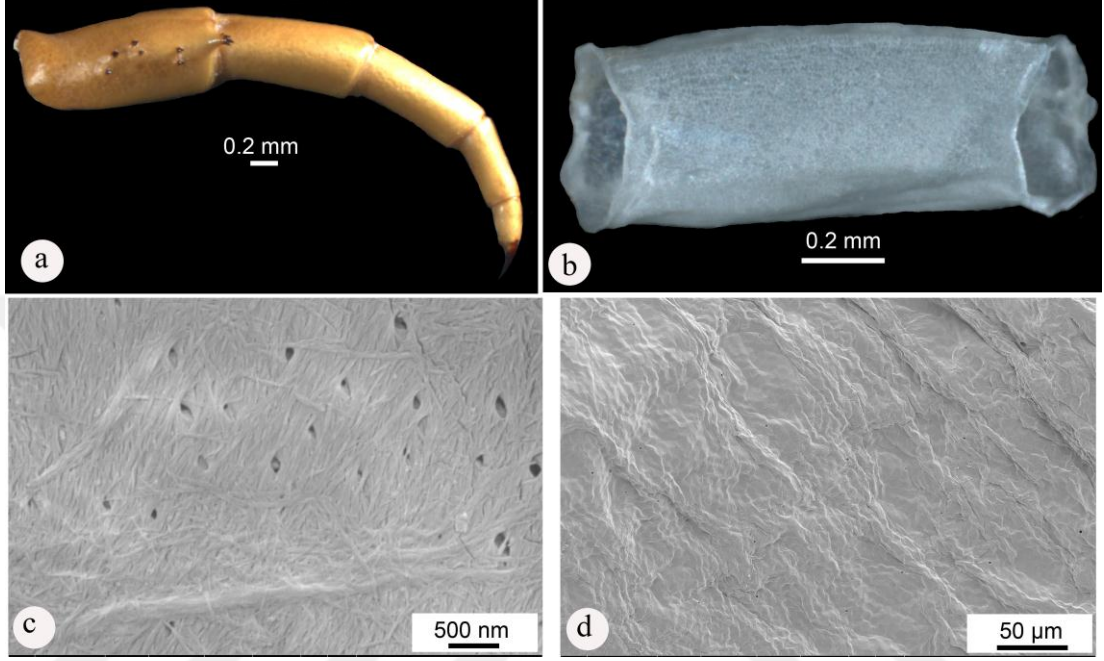
**Şekil 4. 7:** Çıyanın gövde kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

Silindir şeklindeki kitin, çıyanın ayak kısmından yapı korunarak izole edilmiştir (Şekil 4.8b). Bu kitinin yüzeyi birçok nanofiber ve birkaç mikropor ile kaplanmış durumdadır.



**Şekil 4. 8:** Çıyanın ayak kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

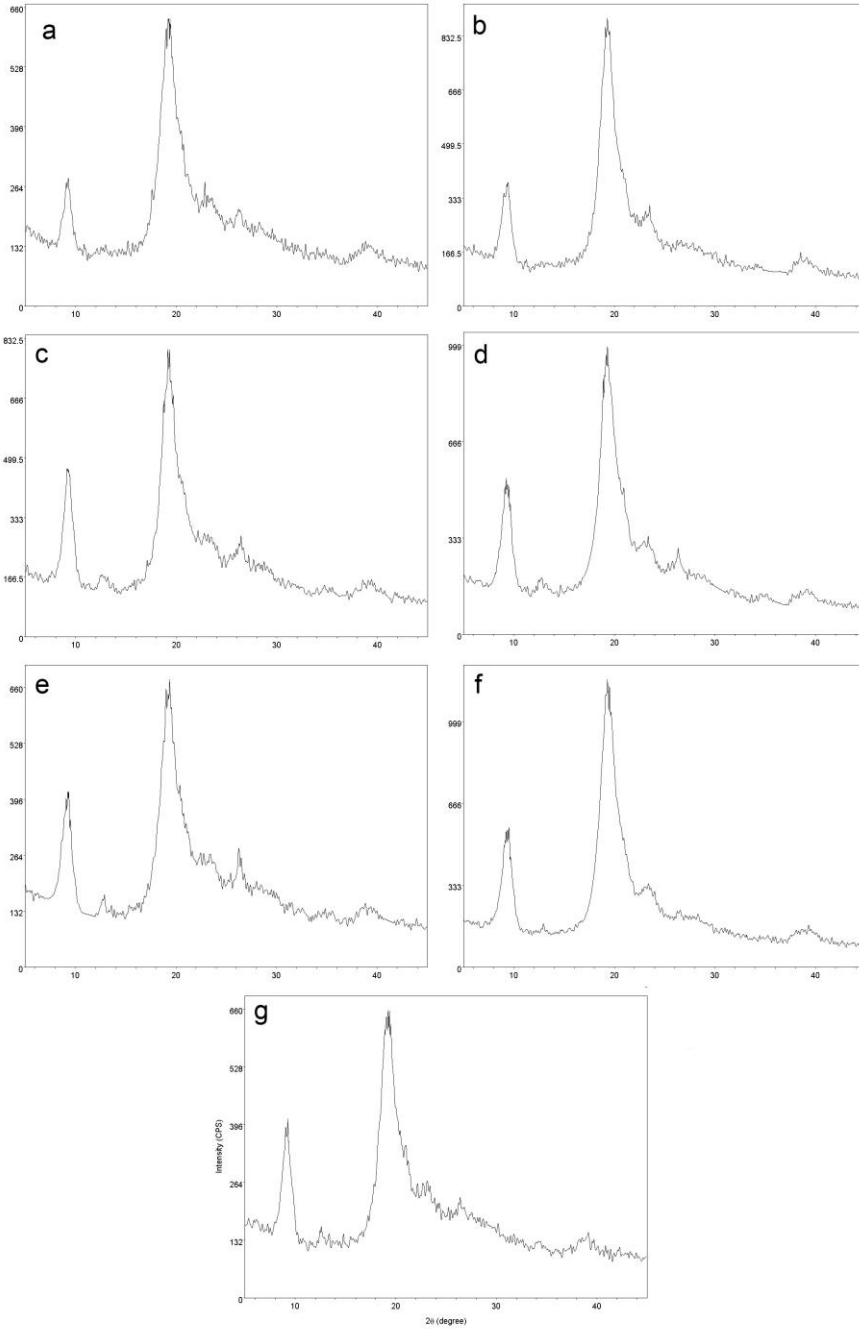
Son olarak, çıyanın kuyruk kısmından izole edilen kitin ayak kitinine benzer olarak silindirik şeklindedir (Şekil 4.9b). Düşük büyütmelerde, yüzeyde papillaların hücre duvarına benzer yapıların varlığı gözlenir de (Şekil 4.9d) daha yüksek büyütmelerde kitin yüzeyinde nanofiber ve mikroporların olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.9c).



**Şekil 4. 9:** Çıyanın kuyruk kısmının orijinal yapısı (a); Yapı ve şekil korunarak elde edilen kitininin ışık mikroskobu (b) ve SEM ile incelenmesi (c,d).

#### 4.5 XRD

İzole edilen kitin örneklerinin XRD pikleri ve CrI değerleri Çizelge 4.2’ de gösterilmiştir. Genellikle, 9 ve 19° civarında iki keskin ve 13, 21, 23, 26 ve 39° civarında 5 keskin olmayan pikler gözlenmiştir (Şekil 4.10). En yüksek CrI değeri (%83.6) kuyruk kitininde, en düşük CrI değeri (%71.1) ise gövde kitininde gözlenmiştir.



**Şekil 4. 10:** Çıyanın farklı vücut kısımlarından elde edilen kitin örneklerinin XRD pikleri. (a) anten, (b) kafa, (c) kısıkaç, (d) boyun, (e) gövde, (f) ayak, (g) kuyruk.

Bilindiği gibi, 9 ve 19° civarında iki keskin ve 13, 21, 23, 26 ve 39° civarında 5 keskin olmayan pik kitin biyopolimeri için karakteristiktir (Jang vd., 2004). Bu çalışmada ise aynı keskin ve keskin olmayan piklerin kaydedilmesi, çıyanın 7 farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin saf olduğunu ve bu kitinlerin  $\alpha$  kristalin formunda olduğuna işaret etmektedir.

**Çizelge 4.2.** Çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin X-Işını Kırınımı verileri ve bu kitinlerin CrI değerleri.

Vücut Bölgeleri	XRD Pikleri (°)	(%)CrI
Anten	9.26, 12.76, 19.28, 21.1, 22.92, 26.38, 39.14	78.5
Kafa	9.42, 12.78, 19.3, 20.74, 23.18, 26.6, 39.06	82.3
Kıskaç	9.24, 12.84, 19.34, 21.04, 23.54, 26.5, 39.1	76.1
Boyun	9.44, 12.78, 19.22, 20.98, 23.78, 26.28, 39.27	79
Gövde	9.28, 12.64, 19.38, 20.62, 23.48, 26.26, 39.11	71.1
Ayak	9.22, 13.04, 19.32, 20.9, 23, 26.6, 39.38	83.6
Kuyruk	9.1, 12.62, 19.4, 21.26, 23.08, 26.42, 39.16	72.9

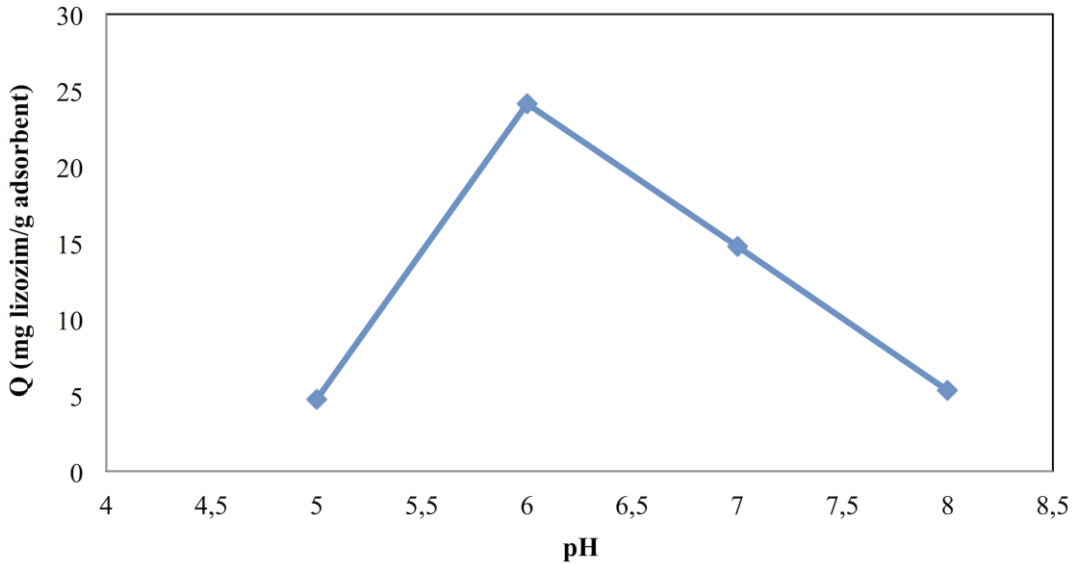
Literatüre bakıldığında, ipek böceği pupasından (%54) ve arı larvasından (%58) izole edilen kitinler düşük CrI değerine sahipken Zhang vd., (2000); karidesden (%89.17) izole edilen kitinin yüksek CrI değerine sahip olduğu görülmüştür (Liu vd., 2012). CrI değerindeki bu değişiklikler kitinin izolasyon metodu ve izole edildiği kaynağa bağlıdır. Mevcut çalışmada kitinler izole edilirken tüm örnekler için aynı metod kullanılmasına rağmen farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin CrI değerlerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Bu farklılık izole edilen vücut bölgesinin fonksiyonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca kitinin sahip olduğu kristalin değerinin de izole edildiği vücut bölgesine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

#### **4.6 Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından Elde Edilen Kitinlerin Lizozim Adsorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi**

İzole edilen iki ve üç boyutlu kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri farklı pH ve protein konsantrasyonu parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Bu parametreler çalışılırken öncelikle gövde kitini kullanılmıştır. Uygun pH ve protein konsantrasyonu gövde kitini ile belirlendikten sonra bu parametreler diğer kitinler için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin protein tutma kapasitelerinin oldukça farklı olduğu gözlenmiştir.

#### 4.6.1 Uygun pH'nın belirlenmesi

Dört farklı pH tamponu (5-8) gövde kitini için değerlendirilmiş ve maksimum pH nın altı olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Lizozimin izoelektrik noktası 11.2 dir. Çalışılan pH aralığında lizozim molekülünün net yüzey yükü pozitiftir. Diğer yandan kitinin izoelektrik noktası pH 6 civarındadır ve izoelektrik noktasında kitinin yüzey yükü nötrdür. Buradan anlaşıldığı gibi kitin yüzeyinin yüksüz olduğu pH da en yüksek lizozim adsorpsiyonu gözlenmiştir. Beklentinin aksine yüksek pH değerlerinde -kitin yüzeyinin daha negatif olduğu pH: 7 ve 8 gibi- lizozim adsorpsiyonunda artış gözlenmemiştir. Buradan kitin-lizozim etkileşiminde elektrostatik kuvvetlerin diğer etkileşimlere göre baskın olmadığı söylenebilir.



Şekil 4. 11:Gövde kitininin lizozim adsorpsiyon kapasitesinin farklı pH larda araştırılması.

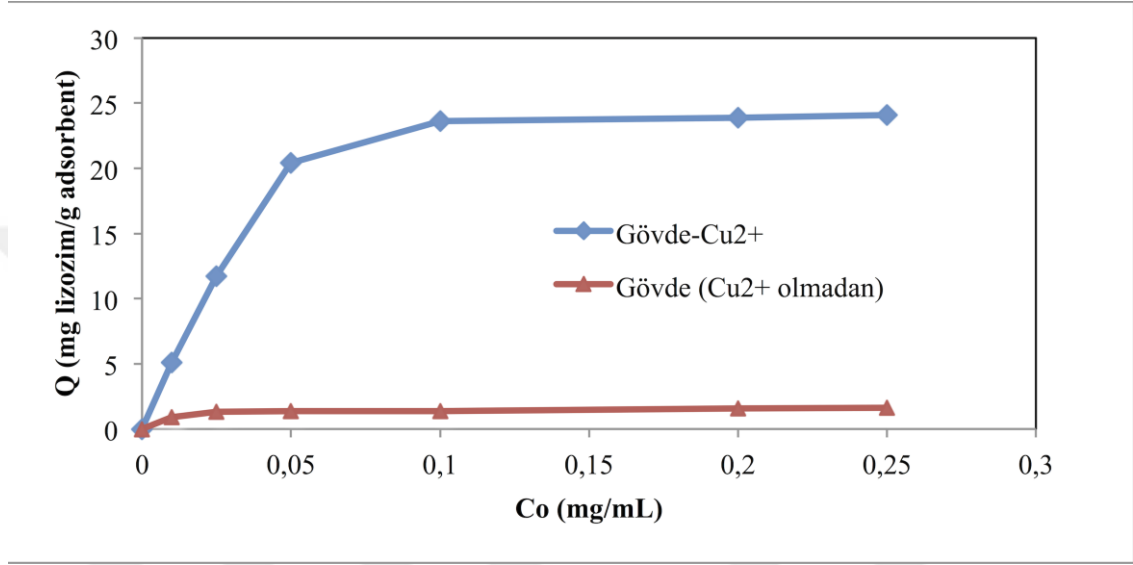
Diğer kitinlerin (kafa, kısıkaç, boyun, ayak, kuyruk) protein tutma kapasiteleri pH 6 da araştırılmıştır.

#### 4.6.2 Uygun protein konsantrasyonunun belirlenmesi

0.05, 0.10, 0.15, 0.20 ve 0.25 mg/mL konsantrasyonlarındaki protein çözeltileri, gövde kitininin hangi konsantrasyonda maksimum protein tuttuğunun belirlenmesi için kullanılmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi gövde kitini 0.25 mg/mL'de

doğunluğa ulaşmıştır. Yani gövde kitininin maksimum lizozim adsorpsiyonu yaptığı protein konsantrasyonu 0.25 mg/mL 'dir.

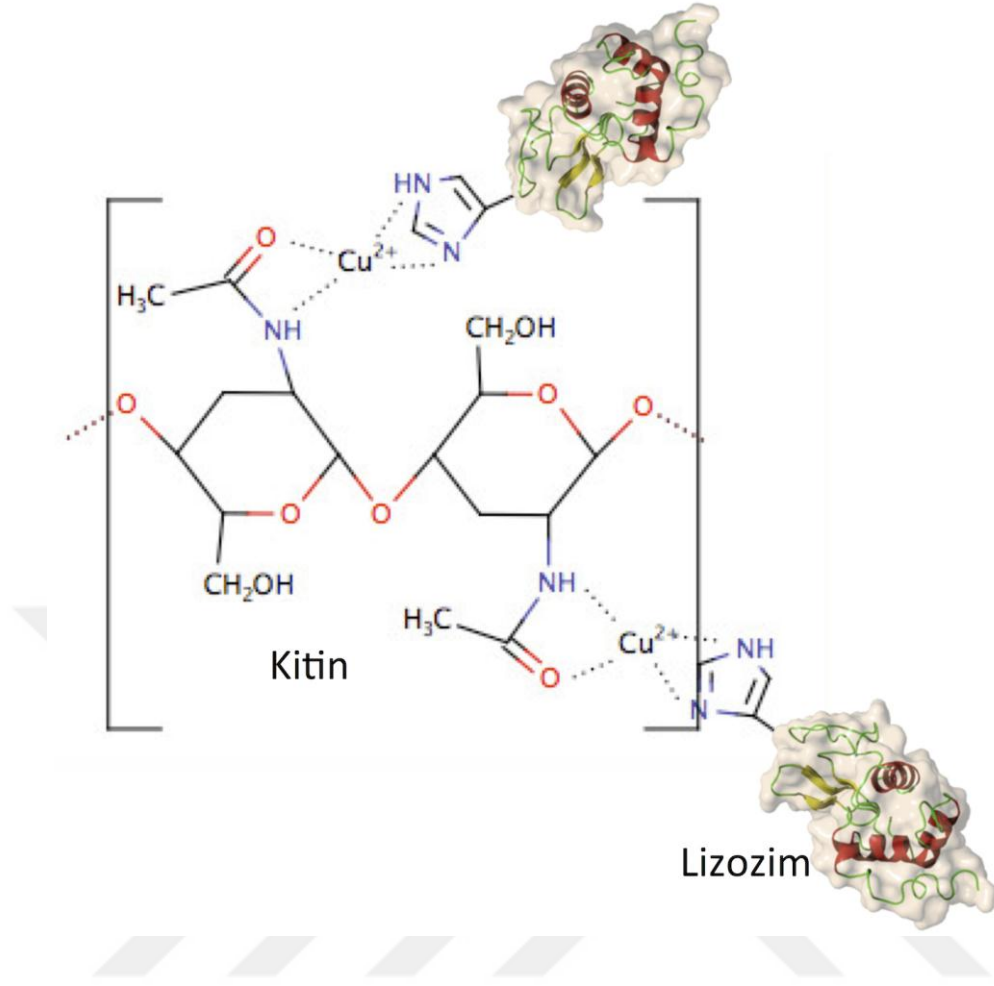
$\text{Cu}^{+2}$  bağlanan ve bağlanmayan gövde kitinlerinin lizozim adsorpsiyonları ayrı ayrı incelenmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$  bağlanmayan gövde kitininin lizozim adsorpsiyonu oldukça düşüktür ve bu değerler ihmal edilebilir (Şekil 4.12). Buradan anlaşıldığı gibi  $\text{Cu}^{+2}$  bağlanması kitinin adsorpsiyon kapasitesini oldukça artırmıştır.



**Şekil 4. 12:**Bakır bağlı olan ve olmayan gövde kitinlerinin lizozim adsorpsiyon kapasitesinin farklı protein konsantrasyonlarında araştırılması.

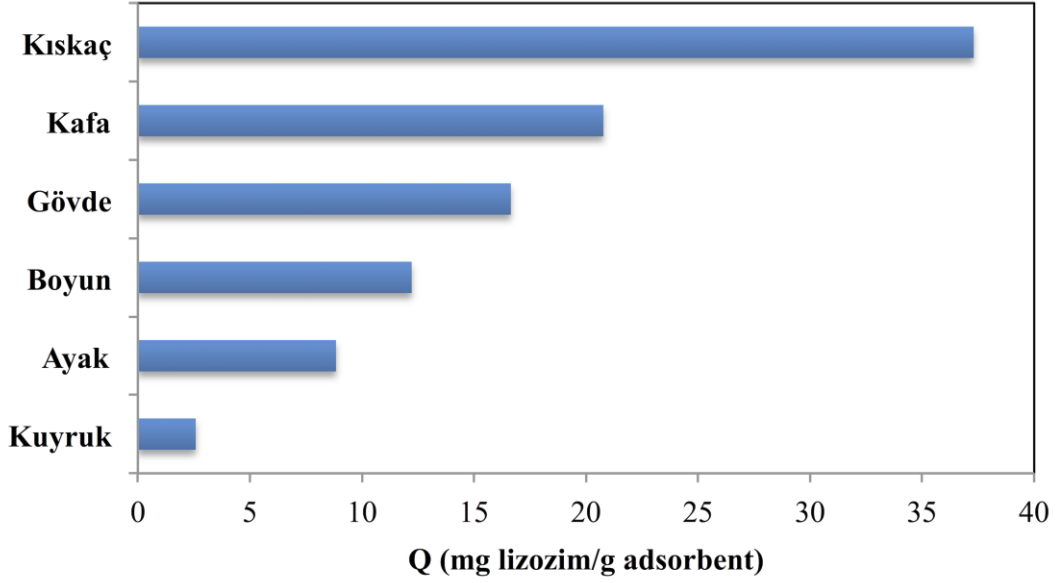
Yüzeyinde bol miktarda amin, karboksil ve hidroksil gibi hidrofilik fonksiyonel gruplar bulunduran kitin, doğal biyolojik moleküllere karşı inert davranmaktadır. Bu sebeple kitinin biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılabilmesi için, yüzeylerine uygun ligantlar takılarak türevlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Fe}^{2+}$  gibi metaller bu tür çalışmalarda yaygın olarak kullanılan metaller arasındadır. Bu metaller, saflaştırılacak moleküllerin yüzeyindeki histidin, triptorfan ve sistein gibi amono asitlerin sırasıyla imidazol, indol ve tiyol gibi grupları ile etkileşime girerek, ilgili proteini bağlayabilmektedirler (Odabaşı vd., 2010; Cömert ve Odabaşı, 2014). Bu çalışmada metalligant olarak kullanılan  $\text{Cu}^{2+}$  ve üzerinde bir tane histidin amino asidi bulunduran lizozimin olası etkileşimi Şekil 4.13 'de gösterilmiştir.





**Şekil 4. 13:**  $\text{Cu}^{2+}$  ve lizozimin olası etkileşimi.

Kafa, kısıkaç, boyun, gövde, ayak ve kısıkaç kitinlerinin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri pH 6 ve 0.25 mg/ml protein konsantrasyonunda incelenmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi kısıkaç kitininin en yüksek (37.3 mg/g) ve kuyruk kitininin en düşük (2.5 mg/g) adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri, kafa (20.7 mg/g), gövde (16.6 mg/g), boyun (12.2 mg/g) ve ayak (8.8 mg/g) olarak sıralanmıştır (Şekil 4.14).



**Şekil 4. 14:**Çıyanın farklı vücut kısımlarında izole edilen kitinlerin pH 6 ve 0.25 mg/mL protein konsantrasyonundaki lizozim adsorpsiyon kapasiteleri.

Şekilden anlaşıldığı gibi çıyanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin lizozim adsorpsiyonlarında oldukça büyük farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur. Bu farklılığın kitinlerin sahip oldukları spesifik yüzey morfolojilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü yüzey morfolojileri benzerlik gösteren kitinlerin protein adsorpsiyon kapasiteleri birbirlerine oldukça yakın olarak bulunmuştur. Öyle ki yüksek lizozim adsorsiyonu kapasitelerine sahip olan kıskaç (Şekil 4.5) ve kafa (Şekil 4.4) kitinleri oldukça porlu yapılara sahiptirler. Diğer yandan lizozim adsorpsiyon kapasiteleri düşük olan ayak (Şekil 4.8) ve kuyruk (Şekil 4.9) kitinlerinin birbirlerine benzer olarak yüzeylerinde çok az miktarda por olduğu görülmüştür. Gövde (Şekil 4.7) ve boyun (Şekil 4.6) kitinleri ise sahip oldukları por miktarı olarak orta seviyededirler. Bu sonuçlar kitinin yüzeyinde bulunan porların lizozim adsorpsiyonunda çok aktif rol oynadığını göstermektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünya genelinde izole edilen ve ticari olarak satılan kitinler toz veya granül halindedir. İki ve üç boyutlu kitin izolasyonu çalışmaları birkaç sünger ve bir böcek türü ile sınırlıdır. Kitin ve türevlerinin iki ve üç boyutlu olarak elde edilmesi, sahip oldukları önemli fizikokimyasal özelliklerden dolayı bu biyopolimerlerin spesifik alanlarda (üç boyutlu hücre kültürü çalışmaları) kullanılmasına olanak sağlayacaktır. Örneğin süngerden izole edilen üç boyutlu kitinler doku mühendisliği, kondrosit hücrelerinin gelişmesi için hücre kültür ortamı Ehrlich vd., (2010b), zirkonyum depolama Ehrlich vd., (2013) ve uranyum adsorpsiyonu Schleuter vd., (2013) gibi önemli alanlarda kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında ilk kez bir Chilopoda türünden elde edilen üç boyutlu kitinler, bu tarz uygulamalar için oldukça önemli malzemeler olacaktır.

Anten, ayak ve kuyruk kısımlarından izole edilen silindirik kitinler sahip oldukları fiber ve porlu yapıları sayesinde stent teknolojisinde kullanılabilecek yapıya sahiptir. Oval şeklinde izole edilen kafa kitinleri antimikrobiyal özelliğe sahip olması ve şeklinden dolayı lens teknolojisinde kullanılmak için oldukça uygundur. Bilindiği gibi kontak lenslerin mikrobiyal enfeksiyon riski en büyük problemlerden biridir. Ayrıca bu kitin mikro ve nanoporlara sahip olduğundan dolayı filtreleme sistemlerinde de kullanılabilecektir. Kısaçtan izole edilen üç boyutlu boru şeklindeki kitinler de filtreleme sistemleri için uygun işlev ve yapıya sahiptir. Sonuç olarak, izole edilen nanolif ve nanoporlu kitinlerin sahip oldukları oval, silindirik ve segmentli yapı ve şekillerinden dolayı ileride ağır metal, boya, DNA veya RNA, kan hücreleri gibi farklı adsorpsiyon uygulamalarında kullanılmak için önemli malzemeler olduğu düşünülmektedir.

Önceki çalışmalara bakıldığında üç boyutlu kitosan üretimi için farklı metodlar kullanılmıştır. Asetik asit çözeltisinde çözünen kitosan kalıplara dökülerek  $-70^{\circ}\text{C}$  de

dondurulmuş sonrasında NaOH-metanol-su çözeltisi ile nötral hale getirilmiş ve etanol-su ile yıkanmıştır veya liyofilizasyon işlemine maruz kalmıştır (Panda vd., 2005). Bu durum biyomateryalin sahip olduğu bazı özelliklerin (biyolojik olarak yıkılma, biyo uyumlu, toksik olmama, antitümör, antimikrobiyal vb.) az da olsa kaybolmasına sebep olacaktır. Bu yöntemlerle üretilen üç boyutlu kitosanlar sitotoksik etkileri oldukça düşük olduğu için üç boyutlu hücre kültürüne model olarak veya kök hücrelerde gen taşınımı gibi önemli alanlarda kullanılmıştır (Cao vd., 2012; Abbott, 2003). Bugüne kadar üç boyutlu kitosanın özelliklerinden faydalanmak için bir seri işlem sonucu ancak üretilen kitosan kompozitleri kullanılması doğal üç boyutlu kitosana ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada izole edilen iki ve üç boyutlu kitinler ileride farklı alanlarda kullanılması için kolaylıkla iki veya üç boyutlu kitosana dönüştürülebilecektir. Böylece kompozit haldeki üç boyutlu kitosanalara alternatif olarak doğal üç boyutlu kitosan polimerleri üretilenilecektir.

Bu tez çalışmasının literatüre kazandırdığı diğer önemli bulgu ise fizikokimyasal özellikleri korunarak iki ve üç boyutlu kitin elde edilmesidir. Literatüre bakıldığında kitin, film yapılmak istendiğinde toz haline getirilmiş ve lityum klorürde çözülmüştür. Çözme işlemi sırasında kitinin yapısında bulunan hidrojen bağları kırılmış ve bu durum onların termal kararlılık ve kristalinite gibi fizikokimyasal özelliklerinde bozulmalara sebep olmuştur (Sannan vd., 1975). Ancak mevcut çalışmada çıyanın kafa kısmından oval film şeklindeki kitin izole edilirken bu kitinin fizikokimyasal özelliklerine hiçbir şekilde zarar verilmemiş ve oldukça yüksek CrI değerine (% 82.3) ve termal kararlılığa ( $DTG_{max} = 371^{\circ}C$ ) sahip kitin elde edilmiştir. Mevcut çalışma kapsamında elde edilen kitinlerin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri yüzey morfolojileri kıyaslanarak incelenmiş ve kafa, kaskaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk kitinlerin adsorpsiyon kapasitelerinde oldukça büyük farklılık gözlenmiştir. Çıyanın kaskaç (37.3 mg/mL) ve kafa (20.7 mg/mL) kısmından izole edilen kitinlerin adsorpsiyon kapasiteleri oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum kitinlerin yüzeyinde bol miktarda bulunan mikroporların varlığı ile açıklanmıştır. Düşük lizozim adsorpsiyon kapasitesilerine sahip olan ayak (8.8 mg/g) ve kuyruk (2.5 mg/g) kitininin az miktardaki mikro por ile kaplanmış yüzeye sahip olduğu SEM analizi ile incelenmiştir. Ayak ve kuyruk kitininin düşük adsorpsiyon kapasiteleri, porlu yapıya sahip olmamaları ile açıklanmıştır. Böylece kitinin yüzey

morfolojisinin, protein adsorpsiyonunda oldukça önemli olduğu literatüre kazandırılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca bir organizmanın farklı vücut kısımlarından izole edilen kitinlerin fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. XRD ve TG analiz sonuçları bu kitinlerin CrI ve DTG<sub>max</sub> değerlerinin birbirlerine göre oldukça farklı olduğunu göstermiştir. Fizikokimyasal özellikler kitinin uygulama alanı seçilirken oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada en yüksek termal kararlılığa sahip anten kitininin yüksek hidrotermal koşullarda zirkonyum depolama Ehrlich vd., (2013) gibi uygulamalar için oldukça uygun olduğu ve ayrıca en düşük CrI değerine sahip gövde kitininin adsorpsiyon uygulamaları Aranaz vd., (2009) için oldukça uygun olduğu gözlenmiştir.

Genel bir özetle, bu tez kapsamında ilk kez Chilopoda grubunda bulunan bir canlının (çıyanın) 7 farklı vücut bölgesinden (anten, kafa, kısıkaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk) yapı ve şekil korunarak nanolif ve nanoporlara sahip kitinler elde edilmiştir. Bu kitinlerin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, TGA, SEM ve XRD analizleri ile belirlenmiştir. Farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu öğrenilen kafa, kısıkaç, boyun, gövde, ayak ve kuyruk kitinlerinin lizozim adsorpsiyon kapasiteleri birbirleriyle karşılaştırılarak araştırılmış ve bu kitinlerin adsorpsiyon kapasitelerinin oldukça farklı olduğu gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abbott, A. 2003. Cell culture: biology's new dimension, *Nature*, 424, 6951, 870–2.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Gemma, G. ve Heras, Á., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3, 2, 203-230.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. ve Elsabee, M. Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate Polymers*, **77**, 2, 410-419.
- Bayramoğlu, G., Yılmaz, M. ve Arıca, M. Y., 2003. Affinity dye–ligand poly (hydroxyethyl methacrylate)/chitosan composite membrane for adsorption lysozyme and kinetic properties, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 1, 35-42.
- Bonato, L., Edgecombe, G. D., Lewis, J. G. E., Minelli, A., Pereira, L. A., Shelley, R. M. ve Zapparoli, M., 2010. A common terminology for the external anatomy of centipedes (Chilopoda), *Zookeys*, 69, 17.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J. ve Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42, 8, 3569-3580.
- Cao, X., Deng, W., Wei, Y., Yang, Y., Su, W., Wei, Y., Xu, X. ve Yu, J., 2012. Incorporating pTGF-beta1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation, *Eur Cell Mater*, 23, 8.
- Cömert, Ş. C. ve Odabaşı, M., 2014. Investigation of lysozyme adsorption performance of Cu<sup>+2</sup>-attached PHEMA beads embedded cryogel membranes, *Materials Science and Engineering: C*, 34, 1-8.
- Çorman, M., 2010. Moleküler baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve lizozim saflaştırılmasında kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, ADÜ., Fen Bilimleri Enstitüsü, AYDIN.
- Denkbas, E. B., Odabasi, M., Kiliçay, E. ve Özdemir, N., 2002. Human serum albumin (HSA) adsorption with chitosan microspheres, *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 12, 3035-3039.

- Edgecombe, G. D. ve Giribet, G., 2007. Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda : Chilopoda), *Annual Review of Entomology*, 52, 151-170.
- Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z. ve Brunner, E., 2010a. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 2, 132-140.
- Ehrlich, H., Steck, E., 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., Hunoldt, S., Kammer, M., Paasch, S., Krasokhin, V., Patzke, G., Brunner, E. ve Richter, W., 2010b. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic potential and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 2, 141-145.
- Ehrlich, H., Simon, P., Motylenko, M., Wysokowski, M., Bazhenov, V. V., Galli, R., Stelling, A. L., Stawski, D., Ilan, M., Stöcker, H., Abendroth, B., Born, R., Jesionowski, T., Kurzydłowski, K. J. ve Meyer, D. C., 2013. Extreme Biomimetics: formation of zirconium dioxide nanophase using chitinous scaffolds under hydrothermal conditions, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 38, 5092-5099.
- Ghosh, R. ve Cui, Z.F., 2000. Purification of lysozyme using ultrafiltration, *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 2, 191-203.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M. ve Saimoto, H., 2011. Preparation of chitin nanofibers from mushrooms, *Materials*, 4, 8, 1417-1425.
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H. ve Nah, J. W., 2004. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 14, 3423-3432.
- 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., Menten, A., Asaroglu, M., Sezen, G. ve Tozak, K. O., 2014a. Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food Biophysics*, 9, 2, 145-157.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Menteş, A., Özüsağlam, M. A. ve Çakmak, Y. S., 2014b. 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., Baublys, V., Can, E., Šatkauskienė, I., Bitim, B., Tubelytė, V. ve Baran, T., 2014c. Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*), *Zoomorphology*, 133, 3, 285-293.
- Kaya, M. ve Baran, T., 2015. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 7-12.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L. ve Sofi, K., 2015a. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee, *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16.
- Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A. ve Baran, T., 2015b. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 797-805.
- Kaya, M., Halıcı, M. G., Duman, F., Erdoğan, S. ve Baran, T., 2015c. Characterisation of  $\alpha$ -chitin extracted from a lichenised fungus species *Xanthoria parietina*, *Natural Product Research*, 29, 13, 1280-1284.
- Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. ve Tubelytė, V., 2015d. 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., Baran, T., Özüsağlam, M. A., Çakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Sezen, G. ve Menteş, A., 2015e. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 1, 168-179.
- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelytė V., Baran, T., Seyyar, O., Kabalak, M. ve Yurtmen, H., 2015f. How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin, *Food Biophysics*, 1-10.
- Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I. ve Mujtaba, M., 2016a. Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp), *Carbohydrate Polymers*, 145, 64-70.
- Kaya, M., Akyuz, B., Bulut, E., Sargin, I., Tan, G., Erdonmez, D., Maheta, M., Satkauskas, S. ve Mickevičius, S. 2016b. DNA interaction, antitumor and antimicrobial activities of three-dimensional chitosan ring produced from the body segments of a diplopod, *Carbohydrate Polymers*, 146, 80-89.
- Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., Guzman-Partida, A. M. ve Vazquez-Moreno, L., 2010. Conjugates of bovine serum albumin with chitin oligosaccharides prepared through the Maillard reaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 22, 12000-12005.



- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. ve Yang, C., 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky, *Molecules*, 17, 4, 4604-4611.
- Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G. ve Šimúth, J., 2007. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 3, 237-241.
- Mangalathillam, S., Rejinold, N. S., Nair, A., Lakshmanan, V. K., Nair, S. V. ve Jayakumar, R., 2012. Curcumin loaded chitin nanogels for skin cancer treatment via the transdermal route, *Nanoscale*, 4, 1, 239-250.
- Minke, R. A. M. ve Blackwell, J., 1978. The structure of  $\alpha$ -chitin, *Journal of Molecular Biology*, 120, 2, 167-181.
- Mondal, S., Li, C. ve Wang, K., 2015. Bovine Serum Albumin Adsorption on Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Hydrogels, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60, 8, 2356-2362.
- Norman, M., Bartczak, P., Zdarta, J., Tylus, W., Szatkowski, T., Stelling, A. L., Ehrlich, H. ve Jesionowski, T., 2014. Adsorption of CI Natural Red 4 onto Spongins Skeleton of Marine Demosponge, *Materials*, 8, 1, 96-116.
- Odabaşı, M. ve Denizli, A., 2004. Cibacron Blue F3GA incorporated magnetic poly (2-hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 2, 719-725.
- Odabaşı, M., Baydemir, G., Karataş, M. ve Derazshamshir, A., 2010. Preparation and characterization of metal-chelated poly (HEMA-MAH) monolithic cryogels and their use for DNA adsorption, *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 3, 1306-1312.
- Ospina Álvarez, S. P., Ramírez Cadavid, D. A., Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Rojas Vahos, D. F., Zapata Ocampo, P. ve Atehortúa, L., 2014. Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture, *BioMed Research International*, 2014.
- Panda, A. K., Dhiman, H. K. ve Ray, A. R., 2005. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen, *Biomaterials*, 26, 9, 979-986.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C. ve Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 1, 98-103.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 7, 603-632.

- Sannan, T., Kurita, K. ve Iwakura, Y., 1975. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromolekulare Chemie*, 176, 4, 1191-1195.
- Schleuter, D., Günther, A., Paasch, S., Ehrlich, H., Kljajić, Z., Hanke, T., Bernhard, G. ve Brunner, E., 2013. Chitin-based renewable materials from marine sponges for uranium adsorption, *Carbohydrate Polymers*, 92, 712-718.
- Singh, N., Koziol, K. K., Chen, J., Patil, A. J., Gilman, J. W., Trulove, P. C., Kafienah, W. ve Rahatekar, S. S., 2013. Ionic liquids-based processing of electrically conducting chitin nanocomposite scaffolds for stem cell growth, *Green Chemistry*, 15, 5, 1192-1202.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z. ve Xue, C., 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*), *Carbohydrate Polymer*, 92, 1, 90-97.
- Warren, J., Reinhart, J., Zeilling, B. ve Neidhard, J., 1981. Lysozyme and enhancement of tumor cell immunoprotection in a marine fibrosarcome, *Cancer Research*, 41, 1642-1645.
- Wysokowski, M., Bazhenov, V. V., Tsurkan, M. V., Galli, R., Stelling, A. L., Stöcker, H., Kaiser, S., Niederschlag, E., Gärtner, G., Behm, T., Ilan, M., Petrenko, A. Y., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2013. Isolation and identification of chitin in three-dimensional skeleton of *Aplysina fistularis* marine sponge, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 94-100.
- Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A. L., Stawski, D., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2015. Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics, *Polymers*, 7, 2, 235-265.
- 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.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H. ve Hirano, S., 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx Mori*) pupa exuvia, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** :Esra BULUT  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :17.04.1992 - SİVAS  
**E-posta adresi** :esrablt-2011@hotmail.com

## EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : Cumhuriyet Üniversitesi, 2010-2014  
**Yüksek Lisans** :Aksaray Üniversitesi, 2014-

## YURTDIŞI DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Freiberg Üniversitesi, ALMANYA / Erasmus Staj Programı
2. Vyatutas Magnus Üniversitesi, LİTVANYA/ Erasmus Programı

## YAYINLAR

### 1.1 SCI, SCI Expanded Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Kaya, M., Muhtaba, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L. ve Sofi, K., 2015. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee, *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16.

Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. ve Tubelytė, V., 2015. 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., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelytė V., Baran, T., Seyyar, O., Kabalak, M. ve Yurtmen, H., 2015f. How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin, *Food Biophysics*, 1-10.

Kaya, M., Akyuz, B., Bulut, E., Sargin, I., Tan, G., Erdonmez, D., Maheta, M., Satkauskas, S. ve Mickevičius, S. 2016. DNA interaction, antitumor and antimicrobial activities of three-dimensional chitosan ring produced from the body segments of a diplopod, *Carbohydrate Polymers*, 146, 80-89.

Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Tomruk, N. M., Gevrek, S., Karatoprak, I., Colak, N., Sak, Y. G. ve Bulut, E., 2016. Comparison of bovine serum albumin

adsorption capacities of  $\alpha$ -chitin isolated from an insect and  $\beta$ -chitin from cuttlebone, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, In press, DOI:10.1016/j.jiec.2016.04.015.

Kaya, M., Odabasi, M., Mujtaba, M., Sen, M., Bulut, E. ve Akyuz, B., 2016. Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of *Astragalus gummifer* (fabaceae) tested for protein adsorption performance, Materials Science and Engineering: C, 62, 144-151.

### **1.2 Uluslararası Sempozyumda Sunulan ve Tam Metin Olarak Basılan Yayınlar**

Kaya, M., Muhammad, M., Bulut, E., Akyuz, B., “Recycling and physicochemical characterization of pomegranate waste peels into a green material (cellulose)” International conference on Natural Science and Engineering (ICNASE’16), DOI: 10.13140/RG.2.1.4844.8405 , 19-20 March 2015, Kilis, TURKEY.

### **1.3 Uluslararası Sempozyumda Sunulan Bildiriler**

Kaya, M., Muhammad, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L., Sofi, K., “Extraction and characterization of chitins from coachroach *Oothenca*” 9th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign-9, DOI: 10.13140/RG.2.1.4307.4405, May 2015, Kaunas, LITHUANIA.

### **1.4 Ulusal Sempozyumda Sunulan Bildiriler**

Bulut, E., Kaya, M., Sargin İ., Akyuz, B., Muhammad, M. “Kitosan Mikrokapsül Hazırlanması ve Karakterizasyonu” 1. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, 23-24 Şubat 2016, Kayseri, TÜRKİYE.

### **PROJELER**

1. TÜBİTAK-114Z466, İstilacı Çekirge Türü *Dociostaurus maroccanus* (Thunber, 1815)'un Teknolojik Bir Ürün Olan Kitin ve Kitosana Dönüştürülmesi (Hızlı Destek Projesi), 2014-2015, Proje Yürütücüsü: Öğr. Gör. Dr. Sevil ERDOĞAN, Bursiyerler: Esra BULUT, Bahar AKYÜZ.
2. BAP 2016-003, Çıyanın Farklı Vücut Kısımlarından Orjinal Yapı Korunarak Biyoteknolojik Uygulamalar İçin İki Ve Üç Boyutlu Nano Kitin Üretimi, Nisan 2016- , Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Murat Kaya, Bursiyer: Esra BULUT.