



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***CALLINECTES SAPIDUS*'DAN
KİTİN, KİTOSAN İZOLASYONU VE FİZİKOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma DUDAKLI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2015

ÖNSÖZ

Kitin ve kitosan nantoksik, biyolojik olarak bozulabilir, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip biyopolimerlerdir. Bu özelliklerinden dolayı başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, atık su arıtımı ve tekstil gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitin ticari olarak yengeç, kerevit ve karides gibi kabuklu canlıların besin olarak tüketildikten sonra oluşan kabuk yapılarından üretilir. Mevcut çalışmada da bir yengeç türü olan mavi yengeç (*Callinectes sapidus*)den kitin izole edilmiştir.

C. sapidus doğal olarak Kuzey Amerika kıyılarında dağılım gösteren bir canlıdır. Adaptasyon özelliğinin yüksek olması nedeniyle hemen hemen dünya genelinde dağılım göstermekte ve besin olarak tüketilmesinden dolayı yaygın olarak üretimi de yapılmaktadır. Mavi yengecin besin olarak tüketildikten sonra oluşan kabuk yapılarının kitin ve kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi hem çevreye verilecek zararın azaltılması hem de teknolojik açıdan çok yönlü kullanılabilecek bir materyal üretilmesi sağlanabilir.

Mavi yengeçten elde edilen kitin ve kitosan fizikokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Karakterize edilen kitosanın antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri sonuçları değerlendirildiğinde çalışmamızda elde ettiğimiz kitosanın ticari olarak satılan kitosana yakın veya eşit sonuçlar göstermesi *C. sapidus*'dan elde edilen kitosanın ticari olarak satılan kitosanalara alternatif antimikrobiyal madde kaynağı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca yengeçten elde edilen kitosanın uygun dozlarının da ticari olarak satılan ve birçok hastalığa karşı kullanılan ticari olarak satılan antibakteriyel ve antifungal maddelere alternatif doğal bir kaynak olabilecektir.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330307 numaralı Yüksek Lisans/Doktora öğrencisi, “Fatma DUDAKLI”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Callinectes sapidus*’dan Kitin, Kitosan İzolasyonu ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Doç. Dr. Murat Kaya**
 Aksaray Üniversitesi
 Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji ABD

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Yavuz Selim Çakmak**
 Aksaray Üniversitesi
 Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji ABD

Jüri üyeleri: **Doç. Dr. Fatih Duman**
 Erciyes Üniversitesi
 Biyoloji ABD

Teslim Tarihi: 02 Temmuz 2015

Savunma Tarihi: 05 Ağustos 2015

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yaralandığım eserlerin kaynakça gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yaralandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

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

Fatma DUDAKLI

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca sabırla, çok değerli bilgilerini benden esirgemeyen ve bu çalışmada en büyük yardımcım, çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Murat KAYA'ya ve yine desteğini gördüğüm Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a, Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a, Yüksek lisans öğrencisi Muhammed MUJTABA'ya, mavi yengeçleri edinmem konusunda yardımcı olan sevgili dayım H. Mehmet GÖHER'e ve kuzenim İlksen Nur HATUNOĞLU'na, yazım ve dil bilgisi konusunda yardımcı olan kuzenim, abim Gazi BAHARGÜLÜ'ne, beni her zaman destekleyen ve yardımcı olan sevgili eşim Latif DUDAKLI'ya, canım kızım Eslem DUDAKLI'ya ve aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle.

**FATMA DUDAKLI
AKSARAY, 2015**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	7
3.1 Materyaller	7
3.1.1 Kullanılan materyallerin hazırlanması	7
3.2 Yöntemler.....	7
3.2.1 Demineralizasyon (Mineral uzaklaştırma)	7
3.2.2 Deproteinizasyon (Protein uzaklaştırma)	8
3.2.3 FTIR analizi	8
3.2.4 Termogravimetrik analizi (TGA).....	8
3.2.5 XRD analizi.....	8
3.2.6 Tarama elektron mikroskobu (SEM)	9
3.2.7 Antimikrobiyal aktivite	9
3.2.8 Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde uygulanan metotlar	9
3.2.8.1 DPPH süpürme etkinliği	9
3.2.8.2 Demir indirgeme gücü.....	10
4. BULGULAR	11
4.1 FTIR	13
4.2 TGA	17
4.3 XRD	18
4.4 SEM	21
4.5 Antimikrobiyal aktivite	22
4.6 Antioksidan kapasite	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ.....	35

ÖZET

CALLINECTES SAPIDUS'DAN KİTİN, KİTOSAN İZOLASYONU VE FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Crustaceae familyasının üyesi olan *Callinectes sapidus* türü yengeçler dünya üzerinde geniş bir dağılıma sahiptir. Canlı kabuğunun iç kısmı besin olarak tüketildiğinden ekonomik değere sahiptir. Canlı dış kabuğunu demineralizasyon tekniği ile (4M HCL) ve deproteinizasyon tekniği ile (2 M NaOH) ayırttığımızda temel bileşenlerinden biri olan kitin maddesi elde edilmiştir. Canlı kabuğundaki kitin maddesi canlı kabuğunun kuru ağırlığının yaklaşık % 11- 12' si kadardır. Elde ettiğimiz saf kitin maddesini % 60'lık NaOH çözeltisi ile deasetilasyona maruz bıraktığımızda tüm maddenin (kitin) % 77'si kadar kitosan elde edilmiştir. Yapılan çalışmada kitosanın deasetilasyon derecesi % 82.5 olarak belirlenmiştir. Çeşitli analizler (FTIR, TGA ve XRD) ile yapılan incelemede kitosanın α formunda olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada kitinin DTG (Derivative Termogravimetrik Analiz) max değeri 390 °C iken deasetilasyon sonucu oluşan kitosan maddesinin DTG max değeri 306 °C olduğu belirlenmiştir. SEM metodu ile elde edilen kitin ve kitosan maddelerinin yüzey morfolojilerinin incelenmesi sonucu porlu (geçirgen) ve nanofiber yapılarda olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışmada mavi yengecin dış kabuğundan elde edilen kitosan maddesinin birçok özelliğinin yanı sıra antioksidan, antibakteriyel, antifungal etkiye sahip olduğu, insanlar üzerinde 6 farklı patojene ve çeşitli balık türleri üzerinde ise 3 farklı patojene karşı yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Şu an itibariyle ülkemiz genelinde kitin ve türevlerinin üretiminin yapıldığı herhangi bir fabrika ya da tesis bulunmamaktadır. Gümrük kayıtları incelendiğinde farklı özelliklere sahip, yıllık 13 milyon dolar civarında kitin ve türevinin ithalatının yapıldığı belirlenmiştir. Mevcut çalışma ile bu malzemenin artık ülkemizde de üretilebileceği bir üretim metodu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kitin, Kitosan, SEM, FTIR, XRD, TGA

ABSTRACT

ISOLATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION CHITIN, CHITOSAN FROM THE *CALLINECTES SAPIDUS*

Callinectes sapidus crab species is a member of crustacea family and is world widely distributed. The interior shells are consumed as food due to which it has a great economic value. Chitin which is one of the basic components of outer shells was obtained by using demineralization (4M HCL) and deprotienization (2 M NaOH) techniques. The dry weight of chitin was recorded as approximately % 11 of the dry weight of shells. When the obtained pure chitin was subjected to % 60 NaOH solution for deacetylation, % 77 chitosan was obtained from all the material (chitin). In this study, chitosan deacetylation degree was determined as % 82.5. Through various analyses (FTIR, TGA and XRD) it was determined that the obtained chitosan was of α form. In the present study the DTGA max value for chitin was observed as 390 °C while for chitosan this value was recorded as 306 °C. Porous and fibrous surface morphology was revealed by SEM results. In this study the obtained chitosan from outer shells of blue crab possess antioxidant, antifungal and antibacterial properties i.e. high antimicrobial activity was observed against 6 human pathogens and 3 fish pathogens. As of right now, our country does not have any factory or plant where chitin and its derivatives can be produced. By examining the customs records it was observed that annually \$ 13 are spending upon the imports of chitin and its derivatives. Current study demonstrated a good manufacturing method of chitin and its derivatives which is easily applicable in our country.

Keywords: Chitin, Chitosan, SEM, FTIR, XRD, TGA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen kitin ve kitosanın FTIR spektrumu..	17
Şekil 4.2: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen kitin ve kitosanın TGA ve DTG sonuçları	18
Şekil 4.3: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen kitin ve kitosanın XRD spektrumu ..	20
Şekil 4.4: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen kitin ve kitosanın SEM görüntüleri .	21
Şekil 4.5: Kitosanın DPPH radikali giderme aktivitesi	24
Şekil 4.6: Kitosanın demir iyonu indirgeme gücü	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1: Farklı canlıların yapısındaki kitin ve kitosan içerikleri.....	12
Çizelge 4.2: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan ve farklı canlılardan elde edilen α – kitinin FTIR bantları.....	14
Çizelge 4.3: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen ticari kitosanın FTIR bantları	16
Çizelge 4.4: <i>Callinectes sapidus</i> 'dan elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi	23

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
° C	Santigrat derece
°	Derece



KISALTMALAR DİZİNİ

cm	Santimetre
DTG	Derivative termogravimetrik analiz
FTIR	Fourier transform infrared (Yakım infrared spektroskopi)
G	Gram
Kv	Kilovat
mA	Molekül ağırlığı
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
SEM	Scanning electron mikroskope (Taramalı elektron mikroskobu)
Ssp.	Alt türleri
TGA	Thermogravimetric analyzer (Termogravimetrik analiz)
vd.	Ve diğerleri
X	Büyütme
XRD	X-Ray diffraction (X – ışını difraksiyon)

1. GİRİŞ

Kitin ve türevlerinin ticari olarak üretimi yengeç, karides ve kerevit gibi canlıların kabuk yapısının işlenmesi sonucu elde edilir. Dünya genelinde yaklaşık 4500 yengeç türü vardır ve bunlardan sadece birkaç tanesinin kitin yapısı izole edilerek fizikokimyasal olarak incelenmiştir. Bolat vd. (2010), yaptığı çalışmaya göre dünya genelinde 22 yengeç türünün kitin yapısı araştırılmıştır. Daha önceki bir çalışmada (mavi yengeç) *Callinectes sapidus*'un kitin içeriği ve kabuk yapılarının kuru ağırlıklarının kitin içeriği ve bu kitinin kitosan verimi araştırılmıştır (Özbay vd., 2012). Fakat bu çalışmada *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitin ve kitosan yapılarının FTIR, TGA, XRD ve SEM ile karakterizasyonu yapılmamıştır.

Callinectes sapidus doğal olarak Kuzey Amerika kıyılarında dağılım gösterir. Adaptasyon özelliğinin yüksek olması nedeniyle hemen hemen dünya genelinde dağılım göstermekte ve besin olarak tüketilmesinden dolayı yaygın olarak üretimi de yapılmaktadır (Holthuis 1961, Tureli vd. 2000, Özcan ve Akyurt 2006). Mavi yengecin besin olarak tüketildikten sonra oluşan kabuk yapılarının kitin ve kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi hem çevreye verilecek zararın azaltılması hem de teknolojik açıdan çok yönlü kullanılabilir bir materyal üretilmesi sağlanacaktır.

Kitin doğada selülozdan sonra en bol bulunan biyopolimerdir ve özellikle Arthropoda grubu canlılarda vücudun dış yüzeyinde koruyucu olarak görev yapar (Felse ve Panda, 1999). Bununla birlikte mantarların hücre duvarında da bulunurlar. Kitin ve türevleri medikal, kozmetik, ziraat, tekstil, su arıtımı ve gıda sektörü gibi çeşitli alanlarda aktif olarak kullanılmakta ve sürekli yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi ile yeni kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır (Rinaudo 2006, Park ve Kim 2010, Liu vd. 2012). Mevcut çalışmada *Callinectes sapidus*'un dünya geneli yaygın dağılım göstermesinden dolayı önemli bir kitin kaynağı olabileceği için bu canlının kitin yapısı izole edilmiş ve ticari bir ürün olan kitosan sentezlenmiştir. Elde edilen kitin ve kitosanın teknolojik açıdan daha etkin kullanılabilmesi için FTIR, TGA, XRD ve SEM yöntemleri ile analiz edilerek fizikokimyasal olarak karakterizasyonları yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Son yıllarda kitin ve kitosan üzerine birçok araştırmalar yapılmaktadır.

Bir araştırmada Kuzgun ve İnanlı (2013), tarafından kitosanın üretimi, özellikleri ve kullanım alanları üzerine bir takım çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada bir polimer olan kitosan, eklem bacaklıların yapısal maddesi olan kitinin deasetile edilmesi işlemiyle elde edilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda kitosanın kolesterolü düşürücü, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Rinaudo, 2006). Kitinin kitosana dönüştürülmesi genel olarak kimyasal yöntemlerle yani kitinin yüksek alkali solüsyonda deasetile olması ile gerçekleştirilmektedir. Dünya genelinde ticari olarak üretimi yapılan kitin ve kitosan örnekleri deniz kabuklularından (Crustacea) elde edilmektedir.

Başka bir araştırmaya baktığımızda Kurt vd. (2005), kitin, kitosan ve türevlerinin gıdalarda ne tür kullanım alanları olduğunu araştırmışlardır. Gıda ve uygulamalarında kitosanın çözünürlüğüne baktıklarında aktivitesinin kitinden oldukça fazla olduğunu bulmuşlardır. Kitosan polikasyonik bir özelliktedir. Bakteri ve funguslara karşı etkileri mevcuttur, ayrıca antioksidan etkileri, yüksek adsorbsiyon kapasitesi, jel oluşturabilme ve çelat oluşturabilme yeteneği de vardır.

Özbay vd. (2012), kitin ve kitosanın fizikokimyasal özellikleri üzerine araştırma yapmışlardır. Bu araştırma manta karidesi (*Squilla sp.*) ve mavi yengecin (*Callinectes sapidus*) atık kabuklarından elde edilen kitin ve kitosanın fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra yağ ve su bağlama kapasitelerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak ticari kitin ve kitosan kullanılmıştır. Atık kabuklardan kimyasal yolla elde edilen kitin ve kitosanın yağ bağlama kapasitesi iki farklı yağ (ayçiçeği ve mısır özü) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Sonuca baktığımızda, manta karidesi kitin ve kitosanının hem mavi yengeç hem de ticari kitin ve kitosandan daha yüksek yağ ve su bağlama kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Mavi yengeç ve

manta karidesi kabuklardan üretilen kitin ve kitosanın yüksek yağ ve su bağlama kapasitesinden dolayı endüstriyel alanda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Meyve sularının durultulması işlemlerinde Imeri vd. (1998), çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalarda bulanıklık etkeni partiküllerin kitosan veya tuzları olan maddelerle çökmesini sağlamışlardır. İşlemlerinde kitosan pozitif yüke sahipken, meyve suyundaki partiküller negatif yüke sahiptir ve birleşince çökme işlemi gerçekleşmektedir.

Kitosan, bağırsaklarda yağ emilimini azaltmakta, plazma kolesterolü ve trigliserit seviyesini düşürmektedir. Ayrıca toksik olmamaları, vücutta parçalanabilmeleri, ekonomik olmaları da gıdalarda kullanım olanaklarını artırmaktadır.

Maezaki vd. (1993), kitosanın hipokolesterolemik etkisi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Çalışmalarında sağlıklı erkeklerin belirli zaman aralıklarında diyetlerine kitosan eklenmiş ve ölçümler yapılmıştır.

Daha sonra kanlarındaki toplam serum kolesterol seviyelerine bakıldığında önemli ölçüde azalmalar tespit edilmiş. Kitosan, HDL kolesterol (iyi huylu kolesterol) seviyesini artırmaktadır. Bu yönüyle kolesterol hastaları için hazırlanan ilaçlarda kitosan kullanımı da alternatif olabilir.

Demir vd. (2009), yaptıkları araştırmada ticari kitosanı elde etmişlerdir. Kitosan ve kitinin kıyasladıklarında kitosanın daha çok kullanıma uygun olduğunu ve uygulama alanlarına baktıklarında eczacılıkta, medikalde, atık suları arıtma, biyoteknolojik ürünlerde, kozmetikte, besin olarak tüketimde, tekstilde ve ziraa işlemlerde kullanılabileceğini keşfetmişlerdir.

Muzzarelli (1982), yaptığı çalışmalar sonucu yeni bir kitosan olarak adlandırılan 5-metilpirolidinon kitosanı keşfetmiştir ve yaralar üzerine uygulandığında lizozim enziminin etkisiyle üretilen oligomer yapıya geçiş yaptığını gözlemlemiştir. Kitinle alakalı çalışmalar sonucu Beschitin® (Unitika) adlı yara bandı üretilmiştir. Bu bant kitin içerikli ve nonwovendan yapılmıştır. Japonya'da ise satışa sunulmuştur.

Cho vd. (1999), suda çözünabilen özellikteki kitosanı, araştırmada kullandığı yaralı tavsanların sırtına yapıştırmış ve yaranın hızla iyileştiğini gözlemlemiştir. Günümüzde kitosan tabanlı bandajlar medikal alanda büyük ilgi görmektedir. Bu kitosan bandajlar Irak körfez savaşlarında kullanılmış ve ölümcül hastalarının yaklaşık % 70'inin tedavisinde başarılı olunmuştur.

Kitosan bazlı malzemelerin kanamayı durdurma hızı ortalama 60 ml/dakikadır. Bu bandajlar, karides, yengeç gibi deniz kabuklularına karşı alerjik reaksiyon gösteren askerler üzerinde de denenmiştir ve herhangi bir alerjik reaksiyon göstermemiştir.

Berger J. vd. (2004), biyomedikal uygulamalardaki kitosan hidrojenlerinin nasıl kullanılacağını araştırmışlardır. Kovalent bağlı olan hidrojenler, implantlar veya bandaj üretiminde, iyonik bağlı olanlar ise ilaç salınım sistemlerinde kullanımını keşfetmişlerdir. Kitosan, toksik özellikte değildir ve çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut içerisinde zararsız ürünlere (amino şekere) yıkılır. Bundan dolayı herhangi bir yan etkisi de gözlenmemiştir.

Kitosan ayrıca film oluşturma özelliğine sahiptir, bu özelliği sayesinde yapay böbrek zarı yapımında da kullanılmaktadır. Bu amaç için Kitosan, Polivinil Alkol (PVA) karışımı membranlar, Miya vd. (1983), tarafından araştırma konusu olmuş ve kitosan PVA ile oldukça homojen bir karışım oluşturmuştur. Bu karışım membranlardan, geçirgenlik ve uyumluluk açısından incelendiğinde iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Majt'an vd. (2007) demineralizasyon ve deproteinizasyon metotlarını uygulayarak yabancısından kitin elde etmişlerdir. Elde edilen bu kitinin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, katı-hal ¹³C (CP/MAS)-NMR ve konfokalmikroskopi yöntemleri ile analiz edilmiş ve yabancı kitinin özellikleri elemental analiz sonuçları da dikkate alınarak karides kitini ile karşılaştırılmıştır. Araştırmanın sonuçları yabancı kitinin içeriğinin krustase grubu organizmalardan daha düşük olduğunu, ama buna karşın fiziko-kimyasal özelliklerinin (düşük asetilasyon derecesi ve ince dokulu) karides kitininden daha iyi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yazarlar ayrıca yabancı kitin ve kitosanının ince dokulu yapılarından dolayı biyomedikal kullanımlar için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada Sajomsang ve Gonil (2010), ağustos böceği derisinden kitin izole etmişler ve bu kitinin kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özelliklerini, elementel analiz, ATR-FTIR, ¹H NMR, (CP/MAS) NMR spektroskopisi, XRD ve TGA analizleriyle belirlemişlerdir. Kitinin asetilasyon derecesini (DA) ¹H NMR, ve ¹³C CP/MAS NMR tekniklerinden yararlanarak hesaplamışlardır. Yazarlar analiz sonuçlarının ağustos böceği kitininin alfa formunda olduğunu ve ağustos böceği kitininin krustaselerden daha yüksek kitosan verimine sahip olduğunu ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, ağustos böceği derisinin yeni bir böcek kitini kaynağı olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca kitinin asetilasyon derecesinin (DA) kullanılan tekniklere

göre % 97 ve % 102 olarak belirlendiğini ve DA'nın termal kararlılık ve kristalinitedeki artışa bağlı olarak arttığını rapor etmişlerdir.

Liu vd. (2012), bir böcek türü olan *Holotrichia parallela*'dan kimyasal metotla kitin elde etmişler ve bu kitini FTIR, XRD, SEM ve elementel analizlerle karakterize ederek analiz sonuçlarını ticari kitin ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada *H. parallela*'nın kitin içeriği % 15 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar her iki kitinin de benzer fizikokimyasal özellikler sahip olduklarını belirtmişler ve çok miktarda üreyerek ekili alanlara zarar veren ergin *H. parallela* bireylerinin öldürmek yerine toplanarak alternatif kitin kaynağı olarak değerlendirilmesi gerektiğini önermişlerdir.

Benhabiles vd. (2012), karides (*Parapenaeus longirostris*) kitini, kitosanı ve kitosanoligomerlerinin dört gram-pozitif ve yedi gram-negatif bakteri türüne karşı antimikrobiyal aktivitelerini moleküler ağırlık ve deasetilasyonderecelerini de dikkate alarak araştırmışlardır. Yazarlar kitinin gram-negatif bakteri türleri; *Escherichia coli* ATCC25922, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, ve *Bacteroides fragilis* üzerinde bakteristatik etki gösterirken, kitosanın *Salmonella typhimurium* hariç test edilen diğer tüm bakteriler için bakteristatik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca kitosan oligomerlerinin ise tüm bakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Hajji vd. (2014), karides (*Penaeus kerathurus*) kabukları, yengeç (*Carcinus mediterraneus*) kabukları ve mürekkep balığı (*Sepia officinalis*)'nın iç iskeleti olmak üzere üç farklı kaynaktan kitin izole etmişlerdir. Karides ve yengeç kabuklarından izole ettikleri α -kitin ile mürekkep balığından izole ettikleri β -kitin arasındaki yapısal farklılıkları C13 NMR, FTIR ve XRD analizleri ile belirlemişlerdir. Ayrıca FTIR ve C13 NMR sonuçlarına göre kitinlerin asetilasyon derecelerini (DA) hesaplamışlardır. Araştırma sonucunda mürekkep balığı iskeletinin kitin veriminin diğerlerinden düşük olduğunu, alfa kitinin beta kitinden daha kristalin yapıya sahip olduğunu ve asetilasyon derecesi % 20 den daha düşük ve nispeten düşük moleküler ağırlıklı kitosanların asidik ortamda çok iyi çözündüklerini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, kitin ve kitosanların karakteristik özelliklerinin kitin kaynağına bağlı olarak değiştiğini derapor etmişlerdir. Ayrıca karides kabuklarının kitin içeriklerinin yüksek olması ve düşük asetilasyon derecesine sahip olmasından dolayı diğerlerine nazaran daha iyi bir kitin kaynağı olduğunu ve biyomedikal ve farmakolojik uygulamalar için uygun bir materyal olduğunu belirtmişlerdir.

Tüm bu araştırmalara baktığımızda kitin ve kitosanın günümüzde popüler kullanım alanlarına sahip olduğunu ve birçok kullanım metotlarının da mevcut olduğunu söyleyebiliriz.



3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyaller

Çalışmada kullanılan *Callinectes sapidus* örnekleri 22 Nisan 2013 tarihinde İskenderun (Antakya, Mediterranean part of Turkey)'dan toplanmıştır. Örnekler laboratuvara getirildikten sonra kabuk yapıları ayrılarak saf su ile defalarca yıkanmıştır. Ardından 70 °C'de bir etüvde 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler porselen bir havanda ince toz haline gelene kadar ezilmiştir

3.1.1 Kullanılan materyallerin hazırlanması

25 gr toz numune 2 M'lık 250 ml HCl çözeltisinde 2 saat 150 °C'de reflux edilmiştir. Ardından por açıklığı 1 µm olan süzgeç kâğıdında saf su ile defalarca yıkanarak süzölmüştür. Etüvde 24 saat 60 °C'de kurutulan malzeme daha sonra 2 M NaOH çözeltisinde 19 saat 200 °C'de reflux edilmiştir. Reflux işleminden sonra bu numune deiyonize damıtık distile su ile pH nötral olana kadar yıkanarak deproteinizasyon (protein uzaklaştırma) işlemi gerçekleştirilmiştir. Süzülen malzeme etüvde 60 °C'de 4 saat içerisinde kurutulduktan sonra renk değişimi ve ağartmak için kloroform, metanol ve su (1:2:4 oranında) organik çözelti karışımında 1 saat inkübe edilmiştir. Tekrar saf su ile yıkama ve süzme işleminden sonra elde edilen nemli ürün 50 °C'de bir etüvde 48 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak canlılığın kuru ağırlığının % kitin içeriği tespit edilmiştir. Elde edilen bu kitinin bir kısmı FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri için ayrılırken diğer bir kısmı da kitosan üretimi için kullanılmıştır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Demineralizasyon (Mineral uzaklaştırma)

25 gr toz numune 2 M'lık 250 ml HCl çözeltisinde 2 saat 150 °C'de reflux edilmiştir. Ardından por açıklığı 1 µm olan süzgeç kâğıdında saf su ile defalarca yıkanarak süzölmüştür. Etüvde 24 saat 60 °C'de kurutulan malzeme, daha sonra 2 M NaOH çözeltisinde 19 saat 200 °C'de reflux edilmiştir. Reflux işleminden sonra bu numune deiyonize damıtık distile su ile pH nötral olana kadar yıkanarak deproteinizasyon

(protein uzaklaştırma) işlemi gerçekleştirilmiştir. Süzülen malzeme etüvde 60 °C’de 4 saat içerisinde kurutulduktan sonra renk değişimi ve ağartma için kloroform, metanol ve su (1:2:4 oranında) organik çözelti karışımında 1 saat inkübe edilmiştir. Tekrar saf su ile yıkama ve süzme işleminden sonra elde edilen nemli ürün 50 °C’de bir etüvde 48 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak canlının kuru ağırlığının % kitin içeriği tespit edilmiştir. Elde edilen bu kitinin bir kısmı FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri için ayrılırken diğer bir kısmı da kitosan üretimi için kullanılmıştır.

3.2.2 Deproteinizasyon (protein uzaklaştırma)

2 gr kitin % 60’lık NaOH çözeltisinde 140 °C’ de 2 saat reflux edildikten sonra saf su ile pH nötr oluncaya kadar yıkama ve süzme işlemi ile kitosan elde edilmiştir. Ardından etüvde 50 °C’de 48 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak bu kitinin % kitosan verimi belirlenmiştir.

3.2.3 FTIR Analizi

Mavi yengeçten elde edilen kitin ve kitosanın Infrared spektrumları, ölçümü dbya Perkin-Elmer FTIR Spektrometre 4000-625 cm frekans aralığındadır.

Mavi yengecin (*Callinectes sapidus*) asetilasyon derecesi (DA), aşağıdaki denklemi kullanarak ölçülmüştür (Liu vd., 2012):

$$DA (\%) = (A_{1655} / A_{3450}) \times 100 \quad (3.1)$$

Kitosanın deasetilasyonu derecesi (DD) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Yen ve Mau 2007).

$$DD (\%) = 100 - [(A_{1658} / A_{3450}) \times 115] \quad (3.2)$$

Bu çalışmada kullanılan ticari kitosan α formundadır.

3.2.4 Termogravimetrik Analizi (TGA)

Callinectes sapidus’tan elde edilen kitin ve kitosanın termogrametrik analizinde EXSTAR S11 7300 marka cihaz kullanılmıştır. Analiz esnasında 25 °C’den 650 °C’ye kadar, 10 °C/dk’lık değişimler ölçülmüştür.

3.2.5 XRD analizi

Mavi yengeçten (*Callinectes sapidus*) elde edilen kitin ve kitosanın XRD analizi RIGAKU 2000 Dmax sistemi kullanılarak 45° için 5° 2 θ aralığında ölçülmüştür. Elde edilen kitinin Kristal indeks değeri (CrI), aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır;

$$CrI = [(I_{110} - I_{am}) / I_{110}] \times 100 \quad (3.3)$$

Cr I110 = [(I110- Iam) / I110] 2 θ 16 ° ve en I110 amorf kırınım x 100 yoğunlukta Iam 2 θ 20 °’de maximum yoğunluğudur.

3.2.6 Tarama elektron mikroskobu (SEM)

Mavi yengeçten üretilen kitin ve kitosan yapısının yüzey morfolojisi EVO LS 10 ZEISS marka taramalı elektron mikroskobu (SEM), kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerden daha iyi görüntü alabilmek için çekimden önce Sputter Coater (Cressingto Auto 108) marka altın kaplama cihazı ile örneklerin yüzeyi altınla kaplanmıştır.

3.2.7 Antimikrobiyal Aktivite

Kitosan solüsyonu (5 mg/ml) 1% (v/v) asetik asit solüsyonunda hazırlanmış ve 121 °C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. Antibakteriyel aktivite *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Yersinia enterocolitica* NCTC 11175, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* Pasteur Inst.55118, *Vibrio alginolyticus*, antifungal aktivite *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida glabrata* RSKK 04019’e karşı test edilmiştir. Antimikrobiyal metod, disk difüzyon tekniği ile inoküle edilmiş petrilere yerleştirilen steril disklerle 50 µl (250 µg/disc) kitosan solüsyonu emdirilerek yapılmıştır. Negatif kontrol olarak % 1 asetik asit, pozitif kontrol olarak Ampicillin (Amp, 10 µg/disc) Gentamicin (CN, 10 µg/disc), Erythromycin (E, 15 µg/disc) ve Fluconazole (FCA, 25 µg/disc) antibiyotikleri kullanılmıştır. Minimal Bactericidal (MBC) veya Fungicidal (MFC) konsantrasyon mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır (Kaya vd., 2014). Ayrıca ticari olarak satılan düşük molekül ağırlıklı kitosanın (Sigma, PCode: 1001654970) antimikrobiyal aktivitesi de test edilmiştir.

3.2.8 Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesinde Uygulanan Metotlar

3.2.8.1 DPPH Süpürme Etkinliği

Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için yengeçten elde edilen kitosanların 1.25-5 mg/ml arasında değişen konsantrasyonları kullanılmıştır. Antioksidan aktivite araştırmasında uygulanan testlerden olan DPPH giderme aktivitesi testi Kaya vd. (2014a), çalışmasındaki metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle kitosanın farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Daha sonra standart olarak kullanılan sentetik antioksidan olan BHT ise 200 µg/ml ile 3.125 µg/ml konsantrasyonları arasında beş farklı konsantrasyonda hazırlandı. DPPH çözeltisi ise 6×10^{-5} M konsantrasyonunda hazırlandı ve bu miktardan seyreltme yapılarak kalibrasyon eğrisi için beş farklı konsantrasyon oluşturuldu.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kitosan çözeltilerinden 0.5 ml alınıp ve bunun üzerine 6×10^{-5} M konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 3 ml ilave edildi. Tüplerin

ağızları kapatıldı, kuvvetlice karıştırıldı. Sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bir süre bekletildi. Bu süre sonunda absorbanslar 517 nm’de okundu. Çözeltilerin ve standart maddenin inhibisyonu aşağıdaki verilen denklemden hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon(\%)} = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (3.4)$$

Kitosan ve standart maddenin konsantrasyon inhibisyon grafiği çizildi ve buradan DPPH radikalinin yarısını süpürebilen konsantrasyon hesaplandı (IC₅₀). IC₅₀ değerine bakıldığında bu değer düşük olması antioksidan kapasitenin yüksek olduğunu göstermektedir. (Sarıkürkçü vd., 2008)

3.2.8.2 Demir İndirgeme Gücü

Bu yöntemde kitosanın 5000 µg/ml ile 1250 µg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Standart olarak bir önceki metotta hazırlanan BHT çözeltileri kullanıldı.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kitosan çözeltilerinden 2.5 ml alınıp bunun üzerine 0.2 M (pH 6.6) 2.5 ml fosfat tamponu ve % 1’lik 2.5 ml potasyum ferrisiyanür ilave edildi. Tüpler daha sonra 50 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüplerin üzerine 2.5 ml % 10’luk TCA ilave edildi. Tüpler iyice karıştırıldı ve üst kısımlarından 2.5 ml lik kısım başka bir tüpe aktarıldı. Bu tüpün üzerine de 2.5 ml saf su ve 0.5 ml % 0.1’lik FeCl₃ çözeltisi konuldu.

Tüm çözelti absorbans değerleri 700 nm’de okundu (Oyaizu, 1986). Absorbans değerindeki artış indirgeme gücünde de artış göstermektedir.

4. BULGULAR

Crustacea grubuna dahil canlılar (özellikle yengeç, karides, kerevit, kril) kitin ve kitosanın ticari üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu canlıların kitin içerikleri ve bu kitinlerin kitosan verimleri üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 4.1’de farklı Crustacea türlerinin kuru ağırlıklarının kitin içerikleri ve kitosan verimleri gösterilmiştir.

Mevcut çalışmada *Callinectes sapidus*’un kuru ağırlığının % 11-12’si oranında kitin içerdiği ve yine canlının kuru ağırlığından % 8.6-9.2 kitosan (% 82.5 deasetilasyon derecesine sahip) üretilmiştir. Daha önce gerçekleştirilmiş bir lokal çalışmada mavi yengecin kuru ağırlığının kitin ve kitosan içeriği araştırılmıştır (Özbay vd., 2012). Özbay vd. (2012), tarafından gerçekleştirilen çalışmada mavi yengeç kabuk yapısından % 10.21 kitin yine bu kabuktan % 7.55 kitosan elde edilmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen bu değer Özbay vd. (2012), tarafından elde edilen değerlere oranla biraz yüksek olarak kaydedilmiştir. Dünya genelinde yaygın olarak besin amaçlı tüketilen mavi yengecin atık olan kabuk yapılarından saf olarak kitin ve kitosan elde edilmesinden dolayı alternatif bir kaynak olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

Çizelge 4.1: Yengeç, kerevit, karides ve karides bazı türlerin kuru ağırlığının kitin ve kitosan içeriği

YENGEÇ TÜRLERİ	% kitin içerikleri	% kitosan verimi	Referanslar
Mavi Yengeç Kabuğu	11-12	8.6-9.2	Mevcut çalışma
Mavi Yengeç Kabuğu	10.21	7.55	Özbay vd., 2012
<i>Potamon potamios</i> (Tatlı su yengeci) kabuğu	6.83	4.65	Bolat vd., 2010
<i>Chionoecetes opilio</i> (Kar yengeci) kabuğu	17.35-20.62		Youn vd., 2009
<i>Podophthalmus vigil</i> kabuğu	20.15-22.6		Das ve Ganesh, 2010
Yengeç Kabukları	16.73		Abdou vd., 2008
<i>Pandalus borealis</i> kabuğu	11.4-16.5		Kjartansson vd., 2006
<i>Penaeus aztecus</i> kabuğu	21.53		Abdou vd., 2008
<i>Penaeus duorarum</i> kabuğu	23.72		Abdou vd., 2008
<i>Metapena eusstebbingi</i> kabuğu		17.48	Kucukgulmez vd., 2011
Yengeç kabuğu		16.4-18.8	Fernandez-Kim, 2004
Yengeç kabuğu	20.6		Abdou vd., 2008
Kril	27.8		Wang vd., 2013
<i>Gammarus argaeus</i>	11-12		Kaya vd., 2013a
<i>Artemia urmiana</i> kisti	29.3-34.5	19.2-22.9	Tajik vd., 2008
<i>Daphnia manga</i> kış yumurtası	18-21		Kaya vd., 2013b

4.1 FTIR

FTIR spekturumu ile kitin yapıları incelendiğinde, α -kitin için karakteristik bandlar olan, amit I in karbonil grupları ($-C=O$) ile amit II nin ($-N-H$) grupları arasındaki hidrojen bağlarının absorpsiyonu 1660 cm^{-1} 'de, ($-CH_2OH$) grupları ile karbonil grupları arasındaki hidrojen bağlarının absorpsiyonu 1620 cm^{-1} 'de olduğu rapor edilmiştir (Mı-Kyeong Jang, 2004). Mevcut çalışmada *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitinin FTIR spektroskopisi incelendiğinde 1657 ve 1622 cm^{-1} α -kitin için karakteristik bandlar gözlemlenmiş ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Ayrıca mevcut çalışmada *Callinectes sapidus*'dan ve literatürde farklı canlılardan elde edilen α -kitinin FTIR sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen FTIR sonuçları ile önceki çalışmalardan elde edilen FTIR sonuçları ile kıyaslandığında, oldukça paralellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Materyal ve metod kısmında verilen formüle göre kitinin asetilasyon derecesi (DA) FTIR sonuçlarına göre % 77 olarak tespit edilmiştir.

FTIR spektroskopisi ile kitosan çalışmalar incelendiğinde ise kitosan için karakteristik pikler olan Amit I bandı karbonil ($\nu(C=O)$) ile Amit II amin ($\nu(NH_2)$) gerilmeleri 1650 cm^{-1} ve 1590 cm^{-1} civarında absorpsiyon bandı verdiği gözlenmiştir. (Sing, 1994; Qu, 2000; Peng, 1994). Mevcut çalışmada *Callinectes sapidus*'tan elde edilen kitosanın FTIR spektrumunda ise 1658 ve 1591 cm^{-1} deki absorpsiyon bandları kitosan oluşumunun bir göstergesidir. Ayrıca *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitosan ile ticari kitosanın FTIR spekturumları kıyaslanmış ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Ticari kitosan için amit I ($C=O-NHR$) ve amin grupları ($-NH_2$) bandları sırasıyla 1650 ve 1586 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Ticari kitosan ile *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitosan FTIR sonuçları incelendiğinde oldukça benzerlik gösterdiği gözlenmiş ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi (DD) FTIR incelemesi sonucu % 82.5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2: *Callinectes sapidus* ve farklı canlılardan elde edilen α – kitinin FTIR bantları

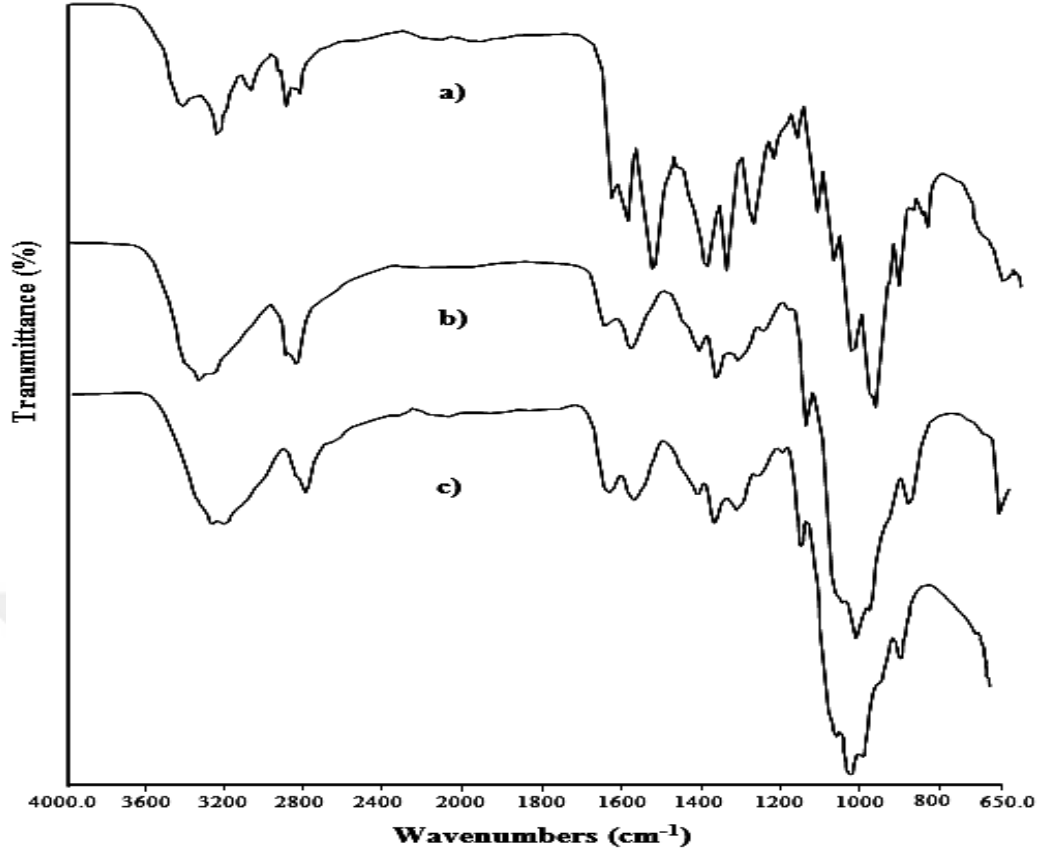
		Dalga Sayısı(cm^{-1}) Frekans			
Titreşim Modu	Sınıflandırma	Kitin Formu (<i>Callinectes sapidus</i>)	α -kitin (Pearson vd., 35)	Kitin Formu <i>Penaeus semisulcatus</i> (Al Sagheer vd., 2009)	Kitin Formu <i>Gammarus argaeus</i> (Kaya vd., 2013)
O–H gerilmeleri	-	3432	3447	3438	3433
N-H gerilmeleri	-	3260,3103	3264-3106	3301	3258-3101
CH ₃ simetrik gerilmeleri ve CH ₂ asimetrik gerilmeleri	Alifatik Bileşikler	2919	2929	2918	2913
CH ₃ simetrik gerilmeleri	Alifatik bileşikler	2850	2962	2879	2875
C=O İkincil amit gerilmeleri	Amit I	1657	1652	1656	1655
C=O İkincil amit gerilmeleri	Amit I	1622	1619	1625	1620
N–H eğilmeleri, C–N gerilmeleri	Amit II	1550	1555	1562	1554

Çizelge 4.2 (devam): *Callinectes sapidus* ve farklı canlılardan elde edilen α – kitinin FTIR bantları

CH ₂ eğilmeleri ve CH ₃ deformasyon	-	1431	1430	1431	1424
CH eğilmeleri, CH ₃ simetrik deformasyonu	-	1377	1378	1378	1376
CH ₂ bükülmeleri	Amit III, protein bileşenleri	1308	1310	1315	1309
Asimetrik Oksijen Germe Köprüsü		1153	1155	1157	1155
Asimetrik Faz İçi Halka Germe Modu		1113	1110	1115	1112
C–O–C Asimetrik halka içi gerilmeleri	Sakkarit Halkalar	1064	1065	1072	1064
C–O Asimetrik halka içi gerilmeleri	-	1007	1020	1031	1010
CH ₃ Bükülmeleri	Zincir boyunca	952	975	950	952
CH Germe Halkası	Sakkarit Halkalar	893	890	899	894

Çizelge 4.3: *Callinectes sapidus* 'tan elde edilen ticari kitosanın FTIR bantları

Dalga Sayısı(cm^{-1}) Frekans		Titreşim Modu
Kitosan Formu (<i>Callinectes sapidus</i>)	Ticari Kitosan	
3362	3353	$\nu(\text{NH}_2)$ assoc. in primary amines and $\nu(\text{OH})$ assoc. in pyranose ring
2923	2921	$\nu(\text{CH}_2)$ in CH_2OH group
2871	2871	$\nu(\text{C-H})$ in piranoz halka
1658	1652	$\nu(\text{C=O})$ in NHCOCH_3 grubu (Amit I bandı)
1591	1586	$\nu(\text{NH}_2)$ in NHCOCH_3 grubu (Amit II band)
1422	1420	$\delta(\text{CH}_2)$ in CH_2OH group
1376	1375	$\delta(\text{CH}_3)$ in NHCOCH_3 group
1322	1317	$\delta(\text{C-H})$ in piranoz halka
1258	1258	NHCO grubunun kompleks titreşimleri (Amit III bandı)
1149	1149	$\nu(\text{C-O-C})$ (glikozidik bağlar)
1062	1062	$\nu(\text{C-O-C})$ (glikozidik bağlar)
1022	1021	$\nu(\text{C-O})$ içinde sekonder OH grubu
987	985	$\nu(\text{C-O})$ içinde primer OH grubu



Şekil 4.1: Kitin ve kitosan örneklerinin FTIR Spektrumları:

- a) Mavi yengeç'ten (*Callinectes sapidus*) elde edilen kitin,
- b) Mavi yengeç'ten (*Callinectes sapidus*) elde edilen kitosan,
- c) Ticari kitosan Sigma-Aldrich'tan.

4.2 TGA

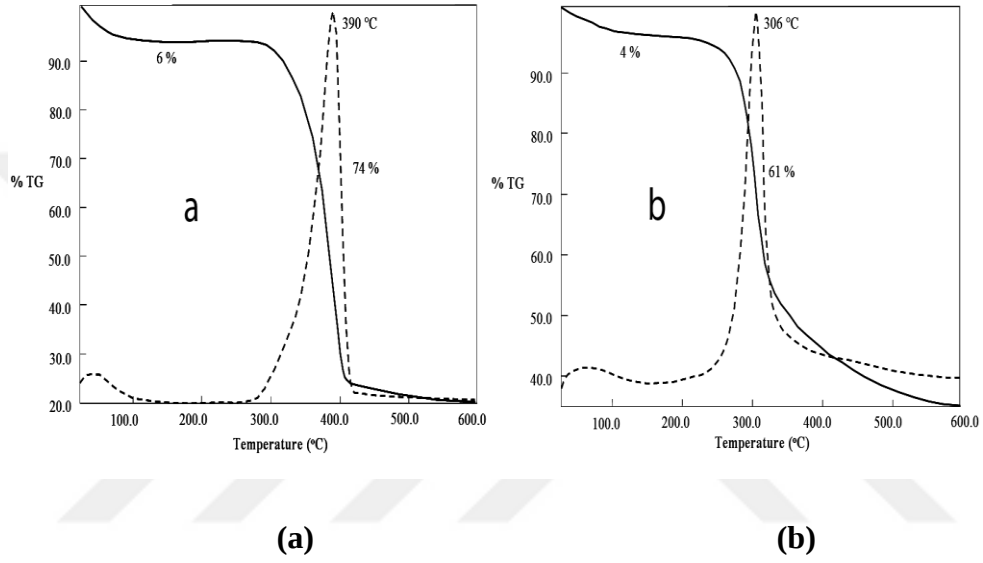
Callinectes sapidus'dan elde edilen kitin ve kitosanın TGA analiz sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. *Callinectes sapidus*'tan elde edilen kitinin TG diyagramına bakıldığında literatürdeki α -kitin çalışmalarına benzer şekilde iki basamakta kütle kaybının gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Birinci basamakta 0-150°'de % 6'luk kaybının kitin moleküllerine adsorbe olmuş sudan, ikinci basamak ise 150-600 °C (DTG max:390 °C) % 74'lük kayıp kitin birimlerinin asetillenmiş ve deasetillenmiş birimleri ile molekülün polisakkarit yapısının bozunmasına atfedilmiştir (Jua'rez-de la Rosa vd., 2012).

Kitosanın TG-DTG diyagramına bakıldığında ise yine literatürdeki çalışmalara benzer şekilde iki basamakta kütle kaybı gözlenmiştir (Entsar, 2008). Birinci basamakta 0-150 °C'de % 4'lük kütle kaybı kitosan birimerine adsorbe olan su moleküllerine, ikinci

basamakta ise 150-650 °C’de (DTG max:390 °C) % 61’lik kütle kaybı kitosanın termal bozunma basamağına atfedilmiştir. Hem kitin hem de kitosanın TG-DTG diyagramlarına bakıldığında ana bozunma basamaklarının tek bir adımda gerçekleştiği görülmüştür.

Kitinin için ana bozunma basamağı 339 °C’de (DTG max) gerçekleşirken kitosan için ise bozunma basamağı 272 °C (DTG max)’de gerçekleşmiştir. Bu sonuç kitin molekülünün kitosan molekülünden daha kararlı olduğu göstermektedir (Entsar, 2008).



Şekil 4.2: TGA analizi ve DTG eğrileri:

- a) *Callinectes sapidus*’dan elde edilen kitin,
- b) *Callinectes sapidus*’dan elde edilen kitosan.

4.3 XRD

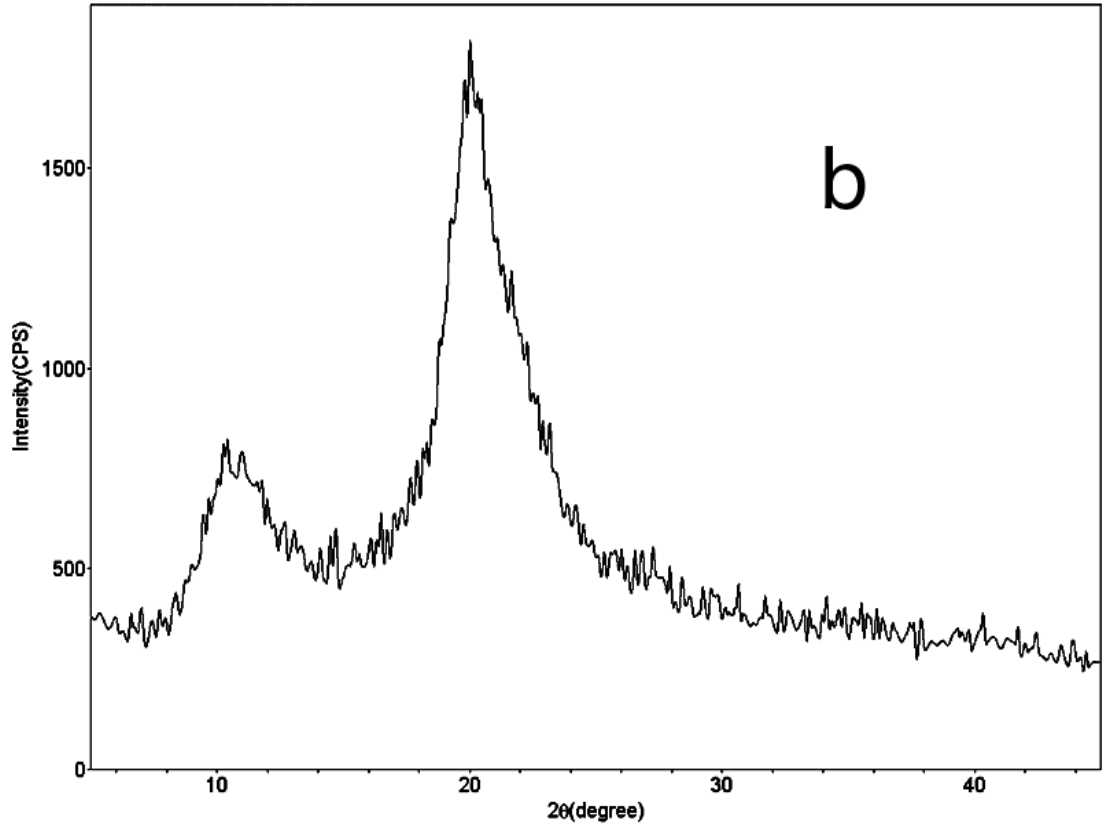
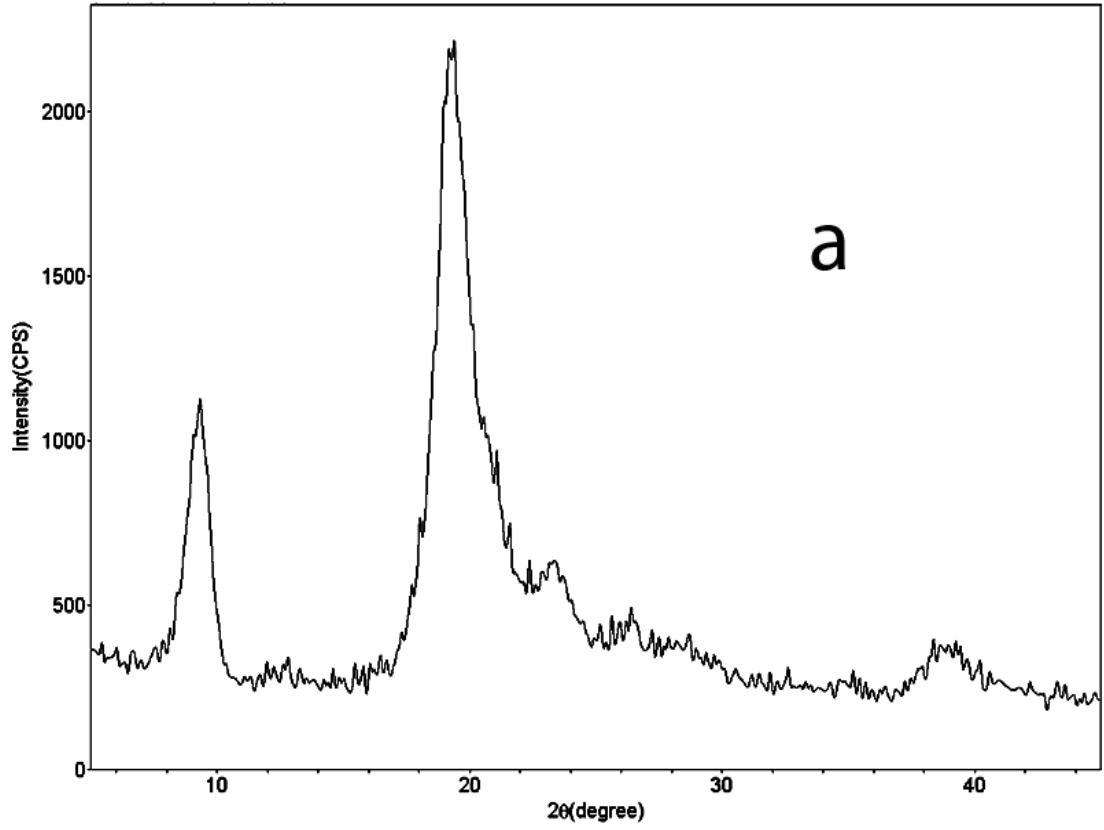
Mavi yengeçten elde edilen kitin ve kitosan örnekleri 5° ve 45° 2θ aralığında incelenmiştir. İnceleme sonucu kitin için 2 keskin (9.26° ve 19.16°) ve 4’de zayıf (12.62°, 20.7°, 23.16° ve 26.18°) olmak üzere toplam 6 pik gözlenmiştir. Kitosan için 10.26° ve 20.04°’te 2 keskin pik gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Ticari olarak üretimi yapılan yengeç, karides ve krill gibi canlılar ile birlikte böcek, mercan ve mantar gibi canlılardan elde edilen α-chitin yapılarına bakıldığında mevcut çalışmadakine benzer şekilde 9° ve 19° civarında 2 keskin ve 12°, 21°, 23° ve 26° civarında 4’te zayıf pik gözlenmiştir (Abdou vd. 2008, Ifuku vd. 2011, Jua’rez-de la Rosa vd. 2012, Liu vd. 2012, Wang vd. 2013). (Jang vd., 2004) α , β ve γ kitini karakterize etmiştir. Bu çalışmaya göre α-chitin için 9.6°, 19.6°, 21.1° ve 23.7°’de

pikler gözlenmektedir. Bu piklerden de 9.6° ve 19.6° keskin diğer piklerde zayıf olarak gözlenmiştir (Jang vd., 2004). Bu sonuçlar doğrultusunda mevcut çalışmada mavi yengeçten kaydedilen kitin α formdadır.

Kitinin Kristal indeksi değeri materyal ve metotta verilen formüle göre hesaplanarak % 85 olarak tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda farklı canlı gruplarından elde edilen kitinlerin kristal indeks değeri hesaplanmış ve % 54-89.7 arasında değiştiği gözlenmiştir (Zhang vd. 2000, Liu vd. 2012). Mevcut çalışmada mavi yengeçten elde edilen kitinin CrI değeri diğer çalışmalarda gözlenen değerlere göre yüksek olarak kaydedilmiştir.

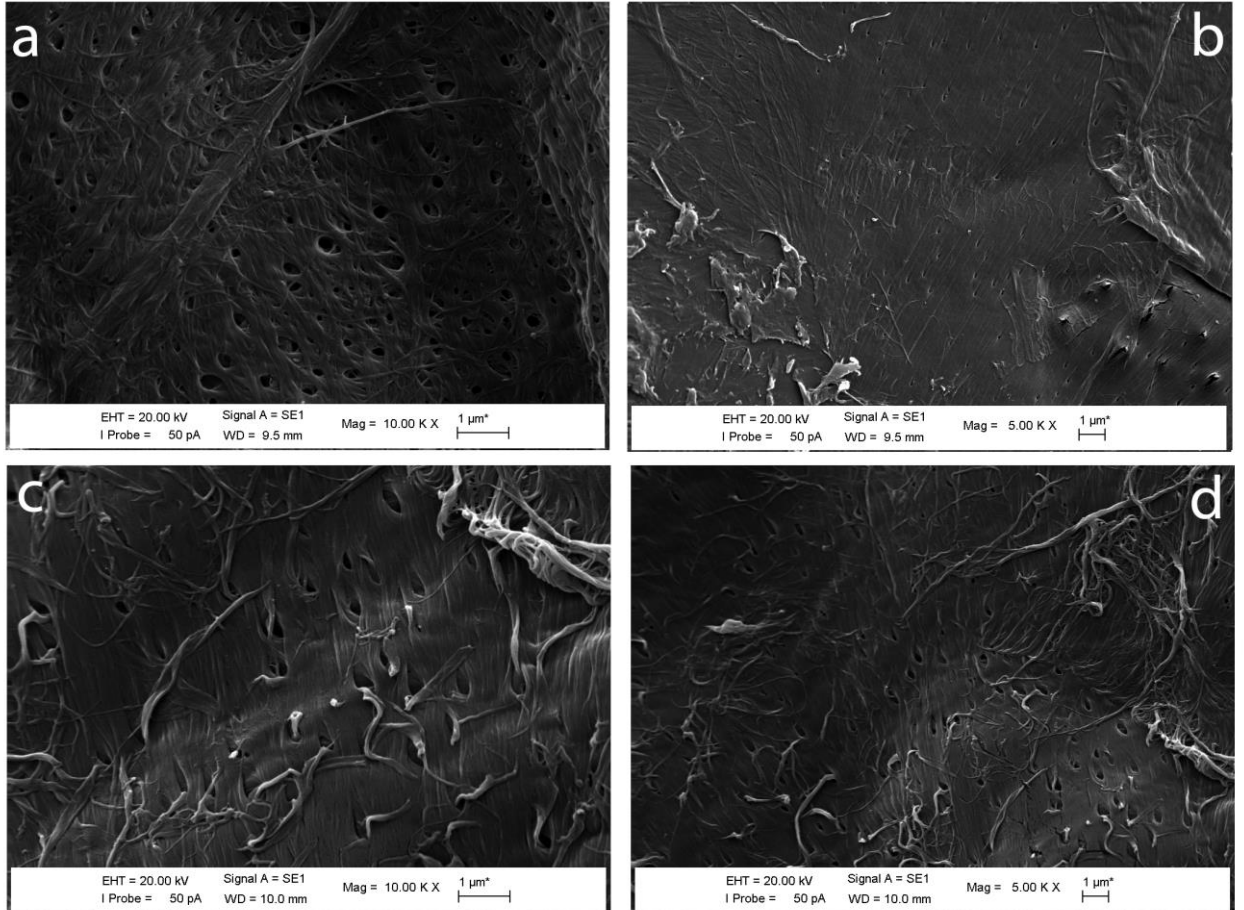




Şekil 4.3: *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitin ve kitosanın XRD spektrumu
(a. kitin, b. kitosan)

4.4 SEM

Callinectes sapidus'dan elde edilen kitin ve kitosanın yüzey morfolojisi incelendiğinde hem porlu hem de nanofiber yapıların varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.4). Mevcut çalışmadakine benzer şekilde krill, *Gammarus argaeus* ve pembe karides gibi Crustacea grubuna ait canlılardan elde edilen kitin ve kitosan yapılarının yüzeyleri porlu ve nanofiber yapılardan oluştuğu diğer çalışmalarda tespit edilmiştir (Kucukgulmez vd. 2011, Wang vd. 2013 Kaya vd. 2013a). Mantarlardan elde edilen bazı kitin ve kitosanların ise porlu ya da nanofiber yapıların bulunmadığı tespit edilirken (Yen ve Mau, 2007), diğer bazı mantarlardan elde edilen kitin ve kitosanın yalnızca nanofiber yapılardan oluştuğu kaydedilmiştir (Cahn vd. 2001, Yen ve Mau 2004, Ifuku vd. 2011).



Şekil 4.4: *Callinectes sapidus* 'tan elde edilen kitin ve kitosanın SEM görüntüleri

(a, b. kitin c, d. kitosan).

4.5 Antimikrobiyal Aktivite

Bu çalışmada mavi yengeçten (*Callinectes sapidus*) elde edilen kitosanın antibakteriyel ve antifungal aktivitesi altı insan patojenine (*Bacillus subtilis* RSKK 244, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Yersinia enterocolitica* NCTC 11175, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida glabrata* RSKK 04019) ve üç balık patojenine (*Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* Pasteur Inst.55118 ve *Vibrio alginolyticus*) karşı belirlenmiştir. Yengeçten elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ticari kitosan ile karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan kitosanın çözöldüğü % 1 v/v asetik asitin çalışmadaki tüm mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisi test edilmiş ve antimikrobiyal aktivitesi olmadığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ticari antibiyotiklerin çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi de tespit edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi sonuçlarına göre yengeçten elde edilen kitosanın inhibisyon zon çapı insan bakteriyel patojenlerine karşı 15.28-20.21 mm, fungal patojenlerine karşı 15.51-16.25 mm ve balık patojenlerine karşı ise 14.22-15.75 mm olarak tespit edilmiştir. Ticari kitosanın bu patojenler üzerine disk difüzyon sonuçları ise insan bakteriyel patojenlerine karşı 17.61-26.37 mm, fungal patojenlerine karşı 14.45-14.76 mm ve balık patojenlerine karşı ise 13.80-16.42 mm olarak bulunmuştur. MBC ya da MFC değerleri ise hem yengeçten elde edilen hem de ticari kitosan için 0.16-2.50 mg/ml arasında değişmiştir. MBC veya MFC değerleri her iki kitosan için *L. monocytogenes* ATCC 7644 (0.63 mg/ml), *S. enteritidis* RSKK 171 (0.16 mg/ml), *S. agalactiae* Pasteur Inst.55118 (1.25 mg/ml), *L. garvieae* (2.50 mg/ml) bakterileri ve *C. glabrata* RSKK 04019 mayası için (1.25 mg/ml) eşit çıkmıştır. *B. subtilis* RSKK 244, *Y. enterocolitica* NCTC 11175, *V. Alginolyticus* bakterileri ve *C. albicans* ATCC 10231 mayasında yengeç kitosanın MBC veya MFC değerleri ticari kitosana kıyasla biraz daha yüksek bulunmuştur. Test edilen tüm mikroorganizmalar içinde en düşük MBC değeri her iki kitosan için *S. enteritidis* RSKK 171'e karşı tespit edilmiştir. Yengeçten elde edilen kitosan ile ticari antibiyotiklerle inhibisyon zonları kıyaslandığında *S. enteritidis* RSKK 171 ve *B. subtilis* RSKK 244 bakterileri için Gentamicin antibiyotiğinden, *L. monocytogenes* ATCC 7644 bakterisi için Eritromisin antibiyotiğinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4: *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi

Test edilen mikroorganizmalar	MBC ^a veya MFC ^b (mg/ml)		İnhibisyon Zon Çapı (mm)		Antibiyotiklerin İnhibisyon Zon Çapı (mm)			
	Yen geç	Ticari kitosan	Yenge ç	Ticari kitosan	Amp	CN	E	FCA
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0.63	0.63	15.28±0.42	13.28±0.45	27.69±0.33	21.06±0.27	14.39±1.48	-
<i>Y. enterocolitica</i> NCTC 11175	1.25	0.32	16.07±2.08	17.61±2.70	21.09±2.20	18.30±0.30	19.21±0.53	-
<i>B. subtilis</i> RSKK 244	0.32	0.16	20.21±0.07	26.37±2.83	43.99±4.06	19.10±1.24	25.87±0.02	-
<i>S. enteritidis</i> RSKK 171	0.16	0.16	17.54±0.24	19.98±4.70	28.47±0.87	13.79±0.22	20.39±0.95	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2.50	1.25	16.25±0.96	14.76±0.51	- ^d	-	-	21.85±1.76
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	1.25	1.25	15.51±0.58	14.45±0.21	-	-	-	25.06±1.92
<i>L. garvieae</i>	2.50	2.50	14.22±0.31	14.09±0.17	28.24±0.82	17.39±0.95	31.08±1.01	-
<i>V. alginolyticus</i>	0.63	0.32	15.75±0.47	16.42±0.17	16.95±1.11	18.27±1.47	20.99±2.04	-
<i>S. agalactiae</i> Pas.Inst. 55118	1.25	1.25	15.41±0.50	13.80±0.28	35.34±3.4	16.25±1.18	30.28±1.68	-

^a: Minimal Bakterisit Konsantrasyon (MBC)

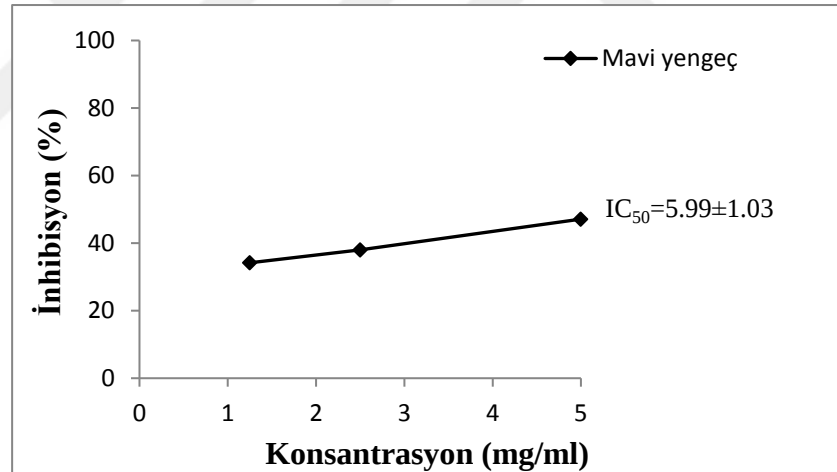
^b: Minimal Fungusid Konsantrasyon (MFC)

^c: Disk çapı dahil engelleme bölgesi çapı. Değerler, üç ayrı deneyin ortalama ± SD olarak rapor edilir.

^d: Antimikrobiyal aktivite göstermez.

4.6 Antioksidan Kapasite

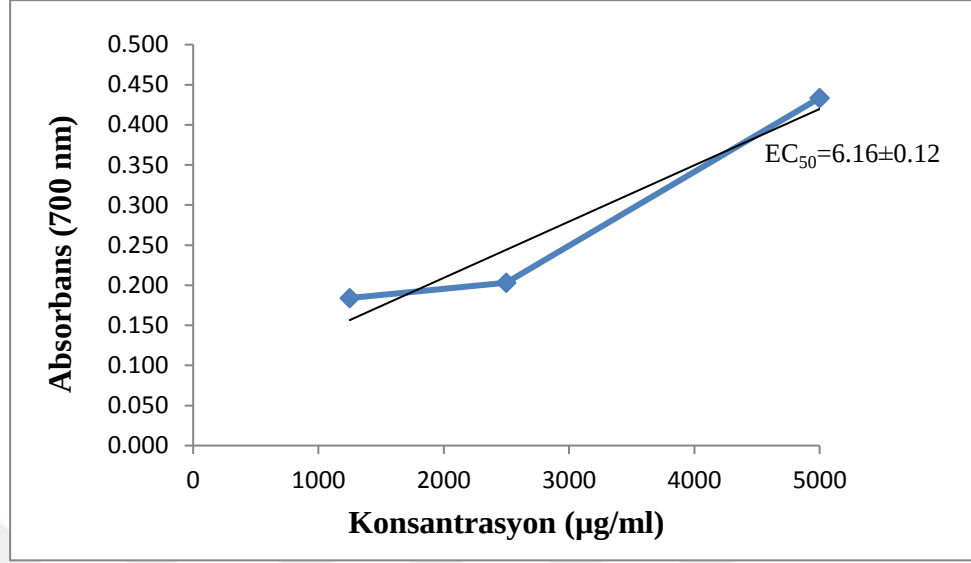
Bu çalışmada mavi yengeçten elde edilen kitosan örneklerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla 2 farklı metot kullanılmıştır. Kullanılan metotlar; serbest radikal süpürme etkinliği (DPPH metodu) ve demir indirgeme gücü testleridir. DPPH metodunda mavi yengeçten elde edilen kitosan örnekleri 5 mg/ml konsantrasyonda % 47.11 oranında DPPH radikalini inhibe ederek gidermiştir. DPPH testinde kitosan örneklerinin farklı konsantrasyonları % 34.18-47.11 oranları arasında değişen inhibisyon değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Ayrıca DPPH süpürme etkinliği testinde bu radikalın yarısının süpürüldüğünü gösteren IC_{50} değerinin düşük olması antioksidan kapasitenin yüksekliğini gösterir. Bu çalışmada araştırılan kitosanın IC_{50} değeri 5.99 ± 1.03 olarak bulunmuştur. Standart antioksidan olan BHT ($IC_{50} = 0.04 \pm 0.01$) daha yüksek seviyede aktivite göstermiş olmasına karşın standart antioksidanların yan etkilere sahip olması dolayısıyla doğal biyolojik bir ürün olan ve toksik etkilere sahip olmayan kitosan onlara tercih edilebilir.



Şekil 4.5: Kitosanın DPPH radikali giderme aktivitesi.

Fe^{+} iyonun indirgeme kapasitesi sıklıkla elektron verme kapasitesinin bir işareti gibi değerlendirilir. Demir iyonlarının indirgenmesi önemli bir antioksidatif mekanizma olup diğer antioksidan kapasite testleri ile güçlü bir bağlantı gösterir (Dorman vd., 2003). Demir iyonları indirgeme gücünde absorbansın artması ile antioksidan kapasite doğru orantılıdır. Bu çalışmada absorbansın 0.5 olduğu etkili konsantrasyon anlamına gelen EC_{50} değerleri hesaplanarak örnek ve standardın demir iyonu indirgeme güçleri karşılaştırılmıştır. Buna göre kitosan örneklerinin ortalama EC_{50} değeri 6.16 ± 0.12

iken standart antioksidan madde olan BHT'nin EC_{50} değeri 0.04 ± 0.01 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Kitosanın demir iyonu indirgeme gücü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Callinectes sapidus (Mavi yengeç) ekonomik anlamda oldukça fazla öneme sahiptir. Kabuk yapıları atık ürün olarak doğaya terk edilmektedir. İçeriğinde bulunan kitin ve bu ürünlerin kitosana dönüştürülerek kazandırılan yapı çalışmamızla ortaya çıkarılmıştır. *Callinectes sapidus* doğal olarak Kuzey Amerika kıyılarında dağılım gösterir. Adaptasyon özelliğinin yüksek olması nedeniyle hemen hemen dünya genelinde dağılım göstermekte ve besin olarak tüketilmesinden dolayı yaygın olarak üretimi de yapılmaktadır

Mevcut çalışmamızda *Callinectes sapidus*'dan porlu ve nanofiber yapıda α -kitin ve kitosan elde edilmiştir. Elde edilen FTIR, TGA, XRD ve SEM ile detaylı olarak karakterize edilmiştir. Aranaz vd. (2009), için kitosan kendi içerisinde kristal yapısı ve deasetilasyon derecesine göre farklı kullanım alanlarına sahiptir. Bununla birlikte mavi yengeçten elde edilen nanofiber ve porlu polimerlerin biyosensör, filtrasyon, kontrollü ilaç verme sistemleri, dental uygulamalar ve tekstil gibi alanlarda etkin olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Ravi Kumar 2000, Pillai ve Sharma, 2009).

(Holthuis 1961, Tureli vd. 2000, Ozcan ve Akyurt 2006). Mavi yengecin besin olarak tüketildikten sonra oluşan kabuk yapılarının kitin ve kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi hem çevreye verilecek zararın azaltılması hem de teknolojik açıdan çok yönlü kullanılabilecek bir materyal üretilmesi sağlanacaktır.

Kitosanın genel kullanım alanları başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri alanıdır.

Yapılan bir çalışmada, yengecin (*Portunus pelagicus*) kabuk atıklarından elde edilen kitosanın on insan patojenine karşı (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus epidermis* and *Micrococcus luteus*) antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. 50 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan kitosandan 50 µl her kuyuya eklenerek yapılan çalışmada inhibisyon zon çapları test edilen bu bakterilere

karşı 1-5 mm olarak tespit edilmiştir (Raja vd., 2012). Araştırmacılar çalışmalarında *B. subtilis* bakterisine karşı 4 mm'lik inhibisyon zonu kaydedilirken bizim çalışmamızda kullanılan *B. subtilis* RSKK 244 suşuna karşı daha az konsantrasyonda (250 µg/disk) kitosan kullanılarak yapılan testte antimikrobiyal aktivite inhibisyon zon çapı çok daha yüksek (20.21 mm) çıkmıştır.

Antimikrobiyal aktivitedeki bu farklılık kullanılan yöntem, bakteri suşu, elde edilen kitosanın fizikokimyasal özelliklerine ve yengeç türünün farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerine test edilen mikroorganizma suşu ve türünün yanı sıra deasetilasyon derecesi de etkilidir. Kitinin alkali deasetilasyonu (DA) ile elde edilen kitosanın DA derecesi (DDA), kullanılan metoda ve serbest amino grupları ile kitosanların karakteristiğinde neden olunan değişikliklere bağlı olarak % 30-95 arasında değişmektedir. Amino grupları aktif fonksiyonel gruplar olup antibakteriyel aktivite için gereklidir (Chung ve Chen, 2008). Daha önce yapılan birçok çalışmada yüksek DA derecesine sahip olan kitosanların düşük olanlara nazaran daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Park vd., 2004).

Araştırmamızda yengeçten elde edilen kitosanın DDA'nun yüksek oluşu (% 86) antimikrobiyal aktivite üzerine de etkili olmuştur. Ayrıca test edilen ticari kitosanın DA derecesinden (% 85) az da olsa yüksek bulunmuştur.

Antimikrobiyal aktivite testleri sonuçları değerlendirildiğinde, çalışmamızda elde ettiğimiz kitosanın ticari olarak satılan kitosana yakın veya eşit sonuçlar göstermesi *Callinectes sapidus*'dan elde edilen kitosanın ticari olarak satılan kitosanalara alternatif antimikrobiyal madde kaynağı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca yengeçten elde edilen kitosanın uygun dozlarının da ticari olarak satılan ve birçok hastalığa karşı kullanılan ticari olarak satılan antibakteriyel ve antifungal maddelere alternatif doğal bir kaynak olabilecektir. Daha önce *Daphnia longispina*'dan elde edilen kitosan ve bundan üretilen O-karboksimetil kitosanın DPPH giderme aktiviteleri sırasıyla 23.01 ve 56.43 IC₅₀ değerleriyle bu çalışmada kullanılan mavi yengeç kitosanolardan oldukça düşük aktivite göstermişlerdir (Kaya vd., 2014a). Yine aynı araştırmacıların patates böceğinin ergin ve larvasından elde edilen kitosanların karakterizasyonu ve antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalarında ergin böcekten elde edilen kitosan 4.15 IC₅₀ değerleriyle bizim çalışmamızdan daha yüksek DPPH giderme aktivitesine sahipken, larva 10.38 IC₅₀ değerleriyle bizim çalışmamızda kullanılan kitosandan daha düşük aktivite göstermiştir (Kaya vd., 2014b).

Patates böceğinin ergin ve larvasından elde edilen kitosanların antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada larvanın ve ergin böceğin EC_{50} değerleri sırasıyla 4.43 ve 4.53 olarak belirlenmiştir (Kaya vd., 2014b). *Daphnia longispina*'nın kış yumurtasından elde edilen kitosan ve O-karboksimetil kitosanın antioksidan aktiviteleri bir başka çalışmayla araştırılmış ve sonuç olarak kitosanın 10.12, O-karboksimetil kitosanın ise 8.30 EC_{50} değerine sahip olduğu görülmüştür (Kaya vd., 2014a). Buna göre patates böceğinden elde edilen kitosan bu çalışmada kullanılan mavi yengeçten elde edilen kitosandan daha yüksek antioksidan aktivite göstermişken, *Daphnia longispina*'dan elde edilen kitosan ve O-karboksimetil kitosan daha düşük antioksidan aktivite sergilemiştir.

Mevcut araştırmada mavi yengeç kitosanının antimikrobiyal aktivite ve yüksek antioksidan gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmamızla yüksek miktarlarda üretilen kitosan biyopolimeri, çevre ve canlıya karşı nontoksik özelliğinin olması, biyolojik olarak bozunabilir olması, yüksek biyoyumluluğu, bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından diğer polimerlere nazaran daha avantajlıdır. Bu özelliklerinden dolayı farklı disiplinlerde geniş kullanım alanlarına sahip olabilecektir. *Callinectes sapidus*'un dünya genelinde yaygın dağılım göstermesi, kolay kültüre edilebilir olması nedeniyle bu türün besin olarak tüketildikten sonra kalan kabuk yapılarının alternatif kitin ve kitosan kaynağı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdou, ES., Nagy, KSA. ve Elsabee, MZ. 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99: 1359–367.
- 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: 410–419.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G. ve Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 3: 203-230.
- Benhabiles M. S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M.F.A. ve Mameri N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and it's oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids* 29: 48-56.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Fel, O., Peppas, N.A. ve Gurny, R., 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57: 19–34
- Bolat, Y., Bilgin, Ş., Günlü, A., İzci, L., Bahadır-Koca, S., Çetinkaya, S. ve Koca, HU., 2010. Chitin-ChitosanYield of FreshwaterCrab (Potamonpotamios, Olivier 1804) Shell. *Pak. Vet. J.* 30 (4): 227-231.
- C.K.S. Pillai, Willi Paul ve Chandra P. Sharma., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in PolymerScience* 34: 641–678.
- Cahn, H.-Y., Chen, M.-H. ve Yuan, G.-F., 2001. Fungal chitosan. *Fungal Science*, 16(1,2), 39–52.
- Cho Y.W., Chung S.H., Yoo G. ve Ko S. W., 1999. Water soluble chitin as a wound healing accelerator, *Biomaterials*, Vol. 20, p. 2139-2145.
- Chung YC ve Chen CY., 2008. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technol*; 99: 2806-14.

- Das, S. ve Ganesh, E.A., 2010. Extraction of Chitin from Trash Crabs (*Podophthalmus vigil*) by an Eccentric Method. *Journal of Biological Sciences*. 2(1): 72- 75.
- Demir, A. ve Seventekin N. 2009. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 92-103
- Dorman, H. J., Peltoketo, A., Hiltunen, R. ve Tikkanen, M.J., 2003, Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food Chemistry*, 83, 255-262.
- Entsar S. Abdou, Khaled S.A. Nagy ve Maher Z. Elsabee, 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *BioresourceTechnology* 99: 1359–1367.
- Felse PA ve Panda T., 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Eng*; 20: 505-512.
- Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaja O., Hajji R., Rinaudo M., Nasri M. ve Jellouli K., 2015. Structural. *International Journal of Biological Macromolecules* 65: 298–306.
- Hirano, S. ve Nagao, N., 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 3065–3066.
- Holthuis, L.B., 1961. Report on The a Collection Crustaceae decapoda and Stomatopoda From Turkey and Balkans. *Zoologiesche Verhandelingen*. No. 47. 1-67.
- Ifuku, S. Nomura, R, Morimoto, M ve Saimoto, H., 2011. Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms. *Materials*, 4: 1417-1425.
- Imeri AG ve Knoor D., 1998. Effects of chitosan on yield and compositional data carrot and apple juice. *Journal of Food Science*, 53: 1707-1709.
- Jang MK, Kong BG, Jeong YI, Lee CH ve Nah JW., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J PolymSci Part A PolymChem*; 42: 3423–3432.
- Juárez-de La Rosa BA, Quintana P, Ardisson PL, Yáñez-Limón JM ve Alvarado-Gil JJ., 2012. Effects of thermal treatments on the structure of two black coral species chitin ou sexoskeleton. *J Mater Sci*; 47: 990–8.

- Kaya, M., Baran, T., Erdogan, S., Menten, A., Asan-Ozusaglam, M. ve Cakmak, 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., Cakmak Y. S., Baran T., Asan-Ozusaglam M., Menten A. ve Tozak K. O, 2014. New Chitin, Chitosan, and O-Carboxymethyl Chitosan Sources from Resting Eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with Physicochemical Characterization, and Antimicrobial and Antioxidant Activities Biotechnology and Bioprocess Engineering 19: 58-69.
- Kaya, M., Cakmak, Y.S., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Menten, A. ve Tozak, K.O. 2014a. New chitin, chitosan, and O-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 19(1): 58-69.
- Kaya, M., Idris Sargin, Kabil Özcan Tozak, Talat Baran, Sevil Erdogan ve Göksal Sezen, 2013. Chitin extraction and characterization from *Daphnia magna* resting eggs, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 61, Pages 459–464.
- Kaya, M., Tozak, K.Ö., Baran, T., Sezen, G. ve Sargin, I. 2013. Natural porous and nano fiber Chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea). Excli Journal 12: 503-510.
- Kendra, D.F. ve Hadwiser, L.A., 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. Experimental Mycology 8, 276–281.
- Kjartansson, G.T, Zivanovic, S., Kristbergsson, K. ve Weiss, J. 2006. Sonication-Assisted Extraction of Chitin From North Atlantic Shrimps (*Pandalus borealis*). J. Agric. Food Chem. 54: 5894-5902.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat H. ve Kadak, A.E. 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. Food Chemistry. 126, 1144-1148.

- Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Kitin (chitin), kitosan (chitosan) ve türevlerinin gıdalarda kullanım olanakları. *Gıda*, 30(6): 371-378.
- Kuzgun, N.K. ve İnanlı, A.G., 2013. ” Kitosan Üretimi ve Özellikleri İle Kitosanın Kullanım Alanları” *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 6 (2): 16-21.
- Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, Zhu F, Qu M, Jiang C ve Yang Q., 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela motschulsky*, *Molecules*; 17: 4604–4611.
- Maizaki, Y., K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto, T. Tsugita, W. Takekawa, A. Terada, H. Hara ve T. Mitsuoka., 1993. Hypocholesterolemic effect of Chitosan In Adult Males. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1439-1444
- Majeti N.V ve Ravi Kumar, 2000. A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers* Volume 46, Issue 1: 1-27
- Majt'an J., B'ílikov'a K., Markovi'c O., Gr'of J. ve Kogan G., 2007. 'Sim'uth J., Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*) *International Journal of Biological Macromolecules* 40: 237–241.
- Miya M., Yoshikawa S., Iwamoto, R., ve Mima, S., 1983, Mechanical properties of poly (vinyl alcohol) – chitosan blend films. *Kobunshi Ronbunshu* 40: 645-651.
- Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F., Emanuelli, M. ve Mariotti, S.N., 1982. (Carboxy methylidene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydr. Res.* 107, p.199–214.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özbay, T., Baştürk, O. ve Sungur, M.A., 2012. The Efficiency of Chitin and Chitosan of Shell Waste of *Manta Shrimp (Squilla Sp.)*, *Squid (Sepia Sp.)* and Blue Crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896). *Yunus Araştırma Bülteni* (1):13-19.
- Özcan T. ve Akyurt I., 2006. Population biology of sand crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) and blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in Iskenderun Bay. *Ege Univ. J FishAquaticSci*, 23: 407– 411.

- P. Raja, C. Chellaram ve A. Alex John, 2012. Antibacterial Properties of Chitin from Shell Wastes Indian Journal of Innovations and Developments Vol. 1 No. S 8; ISSN: 2277–5382
- Park, B.K. ve Kim, M.M., 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. International Journal of Molecular Sciences, 11: 5152–5164.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H. ve Kim, S.-K., 2004. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. J Microbiol Biotechnol 14: 317–323.
- Pearson, F.G, Marchessault, R.H. ve Liang, C.Y., 1960. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. Journal of Polymer Science 43: 101–116.
- Peng, T. ve Goosen, M. F. A., 1994. Structural changes of pH-sensitive chitosan polyether hydrogels in different pH solution. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 32(3), 591-596.
- Qu, X., Wirsén, A. ve Albertsson, A.C., 2000. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. Polymer, 41: 4841-4847.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science, 31, 603–632.
- Sajomsang W. ve Gonil P., 2010. Preparation and characterization of α – chitin from cicada sloughs. Materials Science and Engineering: C, 30: 257-363.
- Sarikurcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. ve Harmandar, M., 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum sub sp. globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays, Bioresource Technology, 99, 4239-4246.
- Singh, D.K., ve Ray, A.R., 1994. Graft copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate onto chitosan films and their blood compatibility. Journal of Applied Polymer Science, 53: 1115-1121.

- Tajik H, Moradi M, Rohani SMR, Erfani AM ve Jalali FSS., 2008. Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. *Molecules*; 13: 1263-1274.
- Türel, C., Çelik, M. ve Erdem, Ü., 2000. İskendurun Körfez’indeki Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus* Rathbun,1896) ve Kum Yengeçleri (*Portunus pelagicus* Linne,1758)’de Et Kompozisyonu ile Veriminin Araştırılması. *Türk J. Vet. Sci.* 24,195-203.
- Uchida, Y., Izume, M. ve Ohtakara, A., 1989. In: Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P.(Eds.), *Chitin and chitosan*. Elsevier, London, UK, p. 373. Ueno, K., Yamaguchi, T., Sakairi, N., Nishi, N., Tokura, S., 1997. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds.), *Advances in chitin science*. Jacques Andre, Lyon, p. 156.
- 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*). *Carbohydr. Polym.* 92: 90–97.
- Yen M.T. ve J.L. Mau, 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shii take stipes, *LWT, FoodSci. Technol.* 40: 472-479.
- Yen, M.-T. ve J.L.Mau., 2004. Physicochemical properties of chitin from shiitake stipes and crab shells. *Annual Tainan Woman’s Coll. Arts Technol.* 23: 229–240.
- Youn, D.K. No, H.K. ve Prinyawiwatkul, W., 2009. Physicochemical and Functional Properties of Chitosans Prepared from Shells of Crabs Harvested in Three Different Years. *Carbohydrate Polymers.* 78: 41-45.
- Zhang, M., Haga, A., Sekigushi, H., ve Hirano, S. 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyxmori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules.* 27: 99–105

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma DUDAKLI

Doğum Yılı : 1987

Eğitim Bilgileri (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, 2010

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, 2015

İletişim Bilgileri

Adres : Şeyhhamit Mah. Atatürk Bulvarı No: 214 4/9 Merkez/Aksaray

Telefon : 0545 628 4086

E-posta : fatmanrgzl06@gmail.com