

T.C.  
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Eustigmaeus absens* (ACARI: STIGMAEIDAE) TÜRÜNDEN  
ÜRETİLEN KİTİN ve GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARI DEKORE  
EDİLMİŞ KİTİNİN, KARAKTERİZASYONU ve  
ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ

Şifanur UĞURLU

Danışman: Prof. Dr. Salih DOĞAN  
İkinci Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇAĞLAR

NANOBİLİM ve NANOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2023

Her Hakkı Saklıdır.

## Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“*Eustigmaeus absens* (Acari: Stigmaeidae) Türünden Üretilen Kitin ve Gümüş Nanoparçacıkları Dekore Edilmiş Kitinin, Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Özellikleri” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 14/07/2023

(İmza)

**Şifanur UĞURLU**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ***Eustigmaeus absens* (ACARI: STIGMAEIDAE) TÜRÜNDEN ÜRETİLEN KİTİN ve GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARI DEKORE EDİLMİŞ KİTİNİN, KARAKTERİZASYONU ve ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİ**

Şifanur UĞURLU

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih DOĞAN  
İkinci Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇAĞLAR

Bu çalışmada *Eustigmaeus absens* Doğan (Acarı) akar türünden kimyasal yöntemle 3D kitin elde edildi ve elde edilen kitin üzerine gümüş nanoparçacıkları dekore edildi. Elde edilen kitinler seyreltilmiş toplam yansıma-Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (ATR-FTIR), stereo mikroskop, faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDX) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri ile karakterize edildi ve antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildi. Elde edilen kitinin yapısında karbon (C), azot (N), oksijen (O) elementlerinin yer aldığı, eser miktarda kalsiyum (Ca) elementinin bulunduğu belirlendi. ATR-FTIR analizi ile  $\alpha$ -kitin için karakteristik olan amid-I ve amid-II bantları gözlemlendi. SEM görüntüleri ile kitin yüzeyinin makro gözenekler, mikro gözenekler ve kesik nanoliflerden oluştuğu açığa çıkarıldı. TEM analizi ile gümüş nanoparçacıkların boyutlarının 6-20 nm arasında farklılık gösterdiği belirlendi. Stereo mikroskop ve faz-kontrast donanımlı ışık mikroskopundan alınan görüntüler organizmanın üç boyutlu yapısını bozmadan kitin elde edildiğini gösterdi. Ayrıca gümüş nanoparçacıklı kitinin *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite sergilediği belirlendi.

**2023, 51 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Akar, Antibakteriyel Aktivite, FTIR, Gümüş-kitin Nanokompozit, SEM, TEM, 3D Kitin

## ABSTRACT

MSc Thesis

### **CHARACTERIZATION and ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CHITIN and SILVER NANOPARTICLES DECORATED CHITIN PRODUCED FROM *Eustigmaeus absens* (ACARI: STIGMAEIDAE)**

Şifanur UĞURLU

Erzincan Binali Yıldırım University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Nanoscience and Nanotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Salih DOĞAN  
Cosupervisor: Prof. Dr. Bülent ÇAĞLAR

In this work, 3D chitin was obtained from *Eustigmaeus absens* Doğan (Acari) mite species by chemical method and silver nanoparticles were decorated on the obtained chitin. The resulting chitins were used for diluted total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), stereo microscope, phase-contrast equipped light microscope, scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray spectrometry (EDX) and transmission electron microscope (TEM). analyzed and their antibacterial activities were evaluated. It was determined that the obtained chitin contained carbon (C), nitrogen (N), oxygen (O) elements and trace amount of calcium (Ca) element. The amide-I and amide-II bands characteristic for  $\alpha$ -chitin were observed by ATR-FTIR analysis. With SEM images, it was revealed that the surface of the chitin consisted of macropores, micropores and cut nanofibers. With TEM analysis, it was determined that the sizes of silver nanoparticles differed between 6-20 nm. Images taken from the stereo microscope and the phase-contrast equipped light microscope showed that the chitin was obtained without disturbing the 3D structure of the organism. In addition, it was determined that silver nanoparticle chitin exhibited antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

**2023, 51 Pages**

**Keywords:** Antibacterial Activity, FTIR, Mite, SEM, Silver-chitin Nanocomposite, TEM, 3D Chitin

## TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgilerini ve deneyimlerini esirgmeden benimle paylaşan, yapılan her işin en güzelini yapmaya yönlendiren, disiplini ve çalışma azmiyle beni her seferinde şaşırtan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Salih DOĞAN'a, yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen kıymetli ikinci danışman hocam Prof. Dr. Bülent ÇAĞLAR'a en içten dileklerimle minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarında antibakteriyel aktivitenin bakılmasına ve değerlendirilmesine yardımcı olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK'a (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü), antibakteriyel aktivite veri görüntülerin düzenlenmesine ve FTIR, EDX spektrumlarının iyileştirilmesine yardımcı olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Agah Oktay ÖZDEMİR'e (Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tasarım Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte birçok konuda yardımını ve desteğini gördüğüm sevgili Dr. Bilge DOĞAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatıma anlam katan, varlıklarıyla hayatımı güzelleştiren, en kıymetlilerime; babam Necdet UĞURLU, annem Emine UĞURLU ve canım kardeşim Mehmet Hamza UĞURLU'ya minnettarım. Aynı yolu yürüdüğüm, hayatımın her alanında desteğini hissettiğim kıymetli dostum Tuğçe VAROL'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi (EBYU) Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenen FBA-2019-642 numaralı proje kapsamında toplanan örnekler kullanılmıştır. Maddi desteklerinden dolayı EBYU-BAP'a teşekkür ederim.

Şifanur UĞURLU

Temmuz, 2023

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET .....                                                                                                                       | i         |
| ABSTRACT .....                                                                                                                   | ii        |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                                   | iii       |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                                                           | vi        |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                                                                           | vii       |
| SİMGELER ve KISALTMALAR .....                                                                                                    | viii      |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                                                                            | <b>1</b>  |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                                                                                                  | <b>11</b> |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>                                                                                               | <b>19</b> |
| 3.1. Materyal .....                                                                                                              | 19        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler .....                                                                                      | 19        |
| 3.1.2. Kullanılan cihazlar .....                                                                                                 | 20        |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                                                | 20        |
| 3.2.1. Akarların eldesi, preparasyonu ve teşhisi .....                                                                           | 20        |
| 3.2.2. Kitin eldesi .....                                                                                                        | 22        |
| 3.2.3. Kitin üzerine gümüş nanoparçacıkların dekorasyonu .....                                                                   | 23        |
| 3.2.4. Kitinlerin antibakteriyel aktivitesinin incelenmesi .....                                                                 | 23        |
| 3.2.5. Kitin numunelerinin karakterizasyonu .....                                                                                | 24        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....</b>                                                                                  | <b>26</b> |
| 4.1. Kitinin Stereo Mikroskop Görüntülerinin Değerlendirilmesi .....                                                             | 26        |
| 4.2. Kitinin Faz-Kontrast Donanımlı Işık Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi .....                                       | 27        |
| 4.3. Gümüş Nanoparçacıkları Dekore Edilmiş Kitinin Faz-Kontrast Donanımlı Işık Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi ..... | 27        |
| 4.4. Kitinin SEM-EDX Verilerinin Değerlendirilmesi .....                                                                         | 28        |
| 4.5. Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin SEM-EDX Verilerinin Değerlendirilmesi .....                                                    | 31        |
| 4.6. Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin TEM Verilerinin Değerlendirilmesi .....                                                        | 33        |
| 4.7. Kitinin ATR-FTIR Verilerinin Değerlendirilmesi .....                                                                        | 35        |
| 4.8. Kitinin Asetilasyon Derecesinin Değerlendirilmesi .....                                                                     | 37        |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.9. Kitin ve Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin Antibakteriyel Aktivite Verilerinin Değerlendirilmesi ..... | 38        |
| <b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>                                                                   | <b>41</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                  | <b>43</b> |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. <i>Eustigmaeus absens</i> (dişi). Üstten görünüm.....                                                                                                                                                                                                | 7  |
| Şekil 3.1. Berlese-Tullgren düzeneği.....                                                                                                                                                                                                                       | 21 |
| Şekil 4.1. <i>Eustigmaeus absens</i> 'in üstten görünümü (a) işlemsiz (b) işlemlili.....                                                                                                                                                                        | 26 |
| Şekil 4.2. <i>Eustigmaeus absens</i> 'in yandan görünümü (a) İşlemsiz (b) İşlemlili .....                                                                                                                                                                       | 26 |
| Şekil 4.3. Gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobu görüntüleri (a) genel görünüm, (b) gümüş nanoparçacıkların yakından görünümü .....                                                                              | 28 |
| Şekil 4.4. <i>Eustigmaeus absens</i> kitininin EDX spektrumu.....                                                                                                                                                                                               | 29 |
| Şekil 4.5. <i>Eustigmaeus absens</i> kitininin SEM görüntüsü: (a) kitinin genel görüntüsü, (b) makro gözenekler, (c) makro gözenekler ve çevresindeki mikro gözenekler, (d) makro gözeneklerin yakından görünümü .....                                          | 30 |
| Şekil 4.6. Gümüş nanoparçacıklı kitinin EDX spektrumu .....                                                                                                                                                                                                     | 32 |
| Şekil 4.7. Gümüş nanoparçacıklı kitinin SEM görüntüleri .....                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| Şekil 4.8. Gümüş nanoparçacıklı kitinin TEM Mikroskobu görüntüleri .....                                                                                                                                                                                        | 34 |
| Şekil 4.9. <i>Eustigmaeus absens</i> 'ten elde edilen kitinin ATR-FTIR spektrumu .....                                                                                                                                                                          | 35 |
| Şekil 4.10. Saf kitin ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve <i>S. aureus</i> ATCC 29213'e karşı antibakteriyel aktivitelerinin kuyu diffüzyon görüntüleri K (Kontrol), A ( Kitin), C ( Gümüş nanoparçacıklı kitin)..... | 39 |
| Şekil 4.11. Saf kitin ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve <i>S. aureus</i> ATCC 29213'e karşı bakteri sayısındaki azalma grafikleri .....                                                                             | 40 |



## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                              | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tablo 4.1. <i>Eustigmaeus absens</i> kitininin element analiz verileri ..... | 29    |
| Tablo 4.2. Gümüş nanoparçacıklı kitinin element analiz verileri.....         | 32    |



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

|             |                  |
|-------------|------------------|
| $\alpha$    | Alfa             |
| $\beta$     | Beta             |
| $\gamma$    | Gama             |
| $\mu$       | Mikron           |
| $\mu m$     | Mikrometre       |
| $\mu M$     | Mikromolar       |
| $\mu g$     | Mikrogram        |
| $\mu L$     | Mikrolitre       |
| <           | Küçüktür         |
| $^{\circ}C$ | Santigrat derece |
| %           | Yüzde            |

### Kısaltmalar

|      |                                             |
|------|---------------------------------------------|
| AD   | Asetilasyon Derecesi                        |
| ATR  | Seyreltilmiş Toplam Yansıma Tekniği         |
| cfu  | Toplam bakteri sayısı                       |
| EA   | Element Analizi                             |
| EDX  | Enerji Dağılımlı X-ışını spektrometresi     |
| eV   | Elektronvolt                                |
| FTIR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| kV   | Kilovolt                                    |
| NMR  | Nükleer Manyetik Rezonans                   |
| sp.  | Tür (species)                               |
| SEM  | Taramalı Elektron Mikroskobu                |
| TEM  | Geçirimli Elektron Mikroskobu               |
| TG   | Termogravimetri                             |
| TGA  | Termogravimetrik Analiz                     |

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| UV-VIS | Morötesi-Görünür Işık |
| XRD    | X-ışını Kırınımı      |
| 3D     | 3 boyutlu             |



## 1. GİRİŞ

### *Genel bilgiler*

Kitin, Yunanca zırh anlamına gelen “*kiton*” kelimesinden gelmektedir. İlk kez Fransız bilim insanı Henri Braconnot tarafından 1811 yılında mantardan keşfedilmiştir. Daha sonra 1823'te Fransız bilim insanı Odier, böcek kutikulasına potasyum hidroksit ile muamele ederek böceklerde kitini keşfetmiştir (Winterowd ve Sandford, 1995).

Kitin, tabiatla selülozdan sonra en bol bulunan; sert, beyaz, elastik olmayan, azotlu bir biyopolimerdir ve canlıların %70'inden fazlasında bulunur (Kumar, 2000). Kitin, birçok organizmanın dış kabuklarından (örneğin yengeç, karides ve ıstakoz), mantarların ve alglerin hücre duvarlarından, mercan, sünger ve böceklerin dış iskeletlerinden izole edilebilir (Çakmak ve Koç Bilican, 2021).

Kitin hidrofobik yapıdadır ve güçlü hidrojen bağları içerir. Bu nedenle her türlü çözücüde çözünmez. Mineral asitlerin seyreltik çözeltileriyle birleşen hekzafloroaseton, kloroalkoller ve hekzafloroizopropanol ile %5-8 lityum klorür içeren dimetilasetamit gibi toksik özelliği yüksek olan çözücülerde çözünür (Koçer, 2015).

Doğada çok yaygın olarak bulunan ve bir aminopolisakkarit olan kitinin, ticari amaçlarla selüloz kadar üretildiği düşünülmektedir. Kitin; biyolojik olarak parçalanabilmesi, doğal bir kaynak olması ve çevre kirliliğine sebebiyet vermemesi hem hayvan hem bitki dokuları için uygun olması ve toksik etkisinin olmaması, biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olması, molekül yapısının dönüştürülebilmesi nedeniyle endüstriyel alanda aktif bir şekilde kullanılmaktadır (Seyyar ve Demir, 2020). Bu özelliklerin sonucu olarak kozmetikte, atık su arıtımında, ameliyat ipliği imalatında, yenilebilir biyofilm üretiminde, sağlıklı zayıflama haplarında ve kontrollü ilaç salınımında kullanılabilir. Kitin ayrıca antimikrobiyal, antioksidan, antitümör ve antikanser çalışmalarında da yer almaktadır (Kaya vd., 2014a).

Aşağıda kitinin yapısı, kitinin hammadde kaynakları, kitin eldesi ve çalışmanın materyalini oluşturan akar türü hakkında bilgiler verilmektedir. Ayrıca analiz cihazları hakkında da bilgilendirme yapılmıştır.

### ***Kitinin yapısı***

Kitinin moleküler formülü  $(C_8H_{13}O_5N)_n$ 'dir (Rinaudo, 2006). Kitin formları uzun ve düz zincirler içerdiğinden selüloza benzerlik gösterir fakat yapısında hidroksil grupları bulundurmuyup, asetilasyona uğramış amino grupları bulundurarak selülozdan ayrılır (Kuzu, 2008). Kitin aynı zamanda, düşük azot içeriği (%1,25) ile hazırlanan sentetik selüloz türevlerine kıyasla daha yüksek azot yüzdesine (%6,89) sahiptir. Selüloz, dekstrin, pektin, agar, agaroz gibi doğal polisakkaritlerin çoğu asidik iken kitin yüksek derecede bazik polisakkaritdir (Taşer, 2019).

### ***Kitinin formları***

Yapısındaki mikrofibrillerin yönelimine göre kitinin;  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  formları mevcuttur (Rudall, 1963). Antiparalel zincirlere sahip olan  $\alpha$ -kitin doğada en fazla bulunan formdur (Gardner ve Blackwell, 1975). Arthropoda, Tardigrada, Bryozoa, Mollusca şubelerinde ve mantarların hücre duvarlarında tespit edilmiştir (Çakmak ve Koç Bilican, 2021).

$\beta$ -kitin doğada ender rastlanan formdur, paralel zincirler içerir ve mürekkep balığının uzantılarında bulunur.  $\gamma$ -kitin ise hem paralel hem antiparalel zincirler içerir ve böcek kozalarında bulunur (Herth ve Barthlott, 1979).

### ***Kitinin hammadde kaynakları***

Kitin; karides, yengeç gibi kabuklu (Crustacea) su ürünlerinin ana maddesidir. Mantarların hücre duvarlarının yapısında ve böceklerin (Hexapoda) iskeletinde bulunur. Kitinin yıllık imalının yaklaşık  $1,50 \times 10^5$  ton dolayında olduğu belirtilmektedir. Bu miktarın  $23 \times 10^3$  tonu istiridyelerden,  $3,2 \times 10^4$  tonu mantarlardan,  $3,9 \times 10^4$  tonu çeşitli deniz kabuklularından ve  $5,6 \times 10^4$  tonu karidesten karşılanmaktadır (Üçgül vd., 2016).

Farklı organizmalarda bulunan ağırlıkça saf kitin yüzdeleri şu şekildedir: *Cancer* sp. (yengeç) %72,1, *Carcinus* sp. (yengeç) %64,2, *Paralithodes camtschaticus* (Kral yengeç) %35, *Callinectes sapidus* (Mavi yengeç) %14, *Crangon* sp. ve *Pandalus* sp. (karides) %17–40, *Nephro* sp. (istakoz) %69,8, *Homarus* sp. (istakoz) %60-75, *Periplaneta* sp. (Hamam böceği) %2, *Blatella* sp. (Hamam böceği) %18,4, kelebek %64, Coleoptera (Kın kanatlılar) %27-35, Diptera (İki kanatlılar) %54,8, *Bombyx* sp. (İpek böceği) %44,2,

*Galleria* sp. (Balmumu solucanı) %33,7, *Saccharomyces cerevisiae* (bira mayası) %2,9, Krill (planktonik kabuklular) %40, *Aspergillus niger* (küf mantarı) %42, *Penicillium notatum* %18,5, *Penicillium chrysogenum* (küf mantarı) %20,1, *Mucor rouxii* (küf mantarı) %44,5, *Lactarius vellereus* (şapkalı mantar) %19 (Kurita, 2006; Rinaudo, 2006; Arbia vd., 2013; Üçgül vd., 2016).

Bir kabuklunun %50-60'ı işlenebilir atık, %25'i katı, %20-25'i yenilebilir kısım olarak belirtilmiştir. Kitinin en büyük kaynağı, kabuklu atıklardır ve yılda 1,44 milyon ton kuru ağırlığında kabuklu atığı oluşmaktadır. Kabukluların kabuğu, ağırlıklı olarak %13-42 arası kitin, %30-50 mineral tuzlar, %30-40 proteinler, az miktarda Na, Mg, P gibi diğer mineralleri ve karotenoidleri bulundurmaktadır (Koçer, 2015).

### ***Kitin eldesi***

Kitin eldesi; organizmanın yapısındaki minerallerin, proteinlerin ve mevcutsa pigmentler ile lipidlerin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Kitin elde etmek için biyolojik ve kimyasal olmak üzere iki farklı yöntem kullanılır.

### ***Kimyasal yöntemle kitin eldesi***

Proteinlerin uzaklaştırılması, kitin ve protein arasındaki kimyasal bağların kırılmasını gerektirdiğinden güçtür. Ayrıca, biyopolimerin depolimerizasyonuna sebep olabilecek kimyasalların kullanımını gerektirir. Proteinlerin tamamen uzaklaştırılması, özellikle biyomedikal uygulamalarda insanlar üzerinde alerjik reaksiyonlara sebep olmasından dolayı oldukça önemlidir. NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gibi çeşitli kimyasallar protein uzaklaştırıcı reaktifler olarak test edilmiştir. NaOH öncelikli tercih edilen reaktiftir ve 0,125-5 M arasında değişen konsantrasyonlarda, değişen sıcaklıklarda (160°C'ye kadar), değişen işlem süresinde (birkaç dakika ile birkaç gün arasında) uygulanabilir. Proteinlerin uzaklaştırılmasının yanı sıra, NaOH kullanımı kitinin kısmen deasetilasyonuna ve biyopolimerin hidrolizine sebep olarak molekül ağırlığını azaltmaktadır (Younes ve Rinaudo, 2015).

Minerallerin uzaklaştırılması genellikle HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH ve HCOOH gibi asitlerin uygulanmasıyla gerçekleştirilir (Taşer, 2019). Bu asitler arasında öncelikle tercih edilen reaktif hidroklorik asittir. Minerallerin uzaklaştırılması, kalsiyum karbonatın

karbondioksit salınımı ile suda çözünür kalsiyum tuzlarına dönüşümünden dolayı kolaylıkla gerçekleştirilebilir (Younes ve Rinaudo, 2015).

Kabuklularda kabuk yapısında bulunan diğer minerallerin çoğu asit varlığında benzer şekilde reaksiyona girer ve çözünür tuzlara dönüşürler. Daha sonra tuzlar, katı kitin fazından filtrelenerek ve saf su kullanılarak yıkamayla kolayca uzaklaştırılabilirler (Younes ve Rinaudo, 2015).

Minerallerin uzaklaştırılması, genellikle 2-3 saatlik HCl çözeltisi ile karıştırma ile gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, reaksiyon süresi 15 dakikadan 48 saate kadar değişiklik gösterebilir. Daha uzun demineralizasyon süresi polimerin degradasyonuna yol açabilir (Okafor, 1965).

Renklerin giderilmesi ve lipitlerin ortadan kaldırılması için numuneler; kloroform, metanol ve su karışımında tutulur (Kaya vd., 2014a).

#### ***Biyolojik yöntemle kitin eldesi***

Kimyasal adımlar genellikle daha yüksek enerji girişi gerektiren yüksek sıcaklık koşullarında gerçekleştirilir. Üstelik yıkama adımları, teknik olarak geri dönüşümü zor ve pahalı olan, yüksek konsantrasyonlarda asit içeren, çok büyük miktarlarda aşındırıcı kimyasal atık suyun ortaya çıkmasına neden olur. Bu geleneksel kimyasal kitin elde etme işlemleri, çevre için son derece tehlikelidir, maliyetli süreçlerdir ve her yıkama basamağı sırasında yüksek miktarda su tüketimi ile yüksek konsantrasyonlarda mineral asit açığa çıkmaktadır (Gortari ve Hours, 2013).

Karides kabuklarının kimyasal ve biyolojik yöntemlerle kitin eldesini içeren karşılaştırmalı çalışmalarda, biyolojik yöntemin (mikroorganizmalar kullanarak) kimyasal yöntemden daha iyi olduğu, çünkü kitin yapısının korunduğu gösterilmiştir (Khanafari ve ark., 2008). Kitinin biyolojik olarak elde edilmesi, daha kısa sürede yüksek tekrarlanabilirlik, daha az çözücü tüketimi ve daha düşük enerji girdisi sunar. Bununla birlikte, biyolojik yöntem hala laboratuvar ölçekli çalışmalar ile sınırlıdır (Younes ve Rinaudo, 2015).

Son zamanlarda, kitin eldesi için proteinlerin uzaklaştırılmasında proteolitik enzimlerin kullanıldığı yaygın biyolojik yöntemler ilgi görmeye başlamıştır. Proteinlerin uzaklaştırılması basamağında enzimlerin kullanımı ilk olarak 1934'te tanımlanmıştır, ancak 1977'den bu yana bu yaklaşıma olan ilgi artmıştır (Younes ve Rinaudo, 2015).

Biyolojik yöntemle kitin eldesi proteaz kullanımını gerektirir. Proteolitik enzimler esas olarak bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal kaynaklardan elde edilebilir. Alkalaz, pepsin ve tripsin gibi birçok proteaz, Crustacean kabuklarından proteinleri uzaklaştırmakta ve kitin izolasyonu sırasında deasetilasyonu ve depolimerizasyonu en aza indirmektedir. Bu işlem, reaktanların erişilebilirliğini değiştiren katı malzemenin minerallerin uzaklaştırılması adımından önce veya sonra gerçekleştirilebilir (Younes ve Rinaudo, 2015).

Enzimatik yöntemin verimi kimyasal yöntemle göre daha düşüktür buna bağlı olarak izole edilen kitinde %5-10'luk protein kalıntısı görülebilir. Bu nedenle izole edilmiş kitin daha sonra saflığını arttırmak ve yapısını korumak için ek bir NaOH ile muamele (düşük miktarda ve kısa süreli) edilebilir (Younes ve Rinaudo, 2015).

Birçok çalışmada, proteinlerin uzaklaştırılması aşamasında bakteriyel proteazların uygulandığı görülmektedir. Örneğin, Synowiecki ve Al-Khateeb (2000) kitin ve besin açısından değerli protein hidrolizatlarının üretimi için önceden demineralize edilmiş karides atıklarına enzimatik deproteinizasyon uygulamıştır. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen bir serin endopeptidaz olan alkalaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen proteinlerin uzaklaştırılması etkinliği, kitin molekülüne bağlı kalıntı peptidlerin ve aminoasitlerin varlığı ile sınırlandırılmıştır. Bu yöntem, yaklaşık %4 protein safsızlığı içeren kitin izolasyonuna imkân verir ve bu saflık, kitinin tıbbi olmayan birçok uygulaması için yeterlidir (Taşer, 2019).

Kabuklu atıklarında minerallerin uzaklaştırılması laktik asit bakterileri ile ortamda glukoz, laktoz, süktroz veya dekstroz gibi bir karbon kaynağının, organik asitlerin ve çeşitli tuzların eklenmesiyle gerçekleştirilebilir. (Taşer, 2019).

Kimyasal yöntem daha hızlı sonuç verir ve daha kolaydır. Bu yüzden biyolojik yöntemle göre daha çok tercih edilir (Taşer, 2019).



### ***Eustigmaeus absens* Doğan**

*Eustigmaeus absens* Doğan (Şekil 1.1) akar (Acari) türü Stigmaeidae familyasında yer almakta ve sadece Türkiye’den bilinmektedir. Trombidiformes takımının Raphignathoidea üst familyasında yer alan bu familya Raphignatoidlerin en zengin grubu olup, oldukça geniş bir yayılım göstermektedir. Türlerinin çoğu Nearktik, Palearktik, Oryantal, Afrotropikal ve Avustralya bölgelerinden kaydedilmiştir (Fan ve Zhang, 2005; Doğan ve Doğan, 2020). Stigmaeid akarlar günümüzde 33 cins ve 600’den fazla türle temsil edilmektedir (Fan vd., 2016, 2019; Doğan ve Doğan, 2020). Şu ana kadar Türkiye’den bu familyanın 11 cinsi tespit edilmiş olup, *Eustigmaeus* (Berlese) cinsinden 28 türün kaydı/tanımı verilmiştir (Doğan, 2019; Doğan ve Doğan, 2020).

*Eustigmaeus absens* ilk defa Doğan (2005) tarafından Erzurum’dan tanımlanmış daha sonra Kelkit (Dönel ve Doğan, 2011) ve Harşit Vadilerinden (Dilkaraoğlu vd., 2016) kaydı verilmiştir. Şu ana kadar sadece ülkemizden bilinen ve bazı katalog ve kontrol listelerinde (Doğan, 2007, 2019; Erman vd., 2007; Fan vd., 2016) geçen bu tür, histerozoma plağının 5 çift kıl taşımasıyla cinsin diğer türlerinden ayrılmaktadır. Ayrıca III. bacağın trokanterinde bir kıl bulunması ve sırt plaklarının çokgenimsi desenlere sahip olmasıyla yakın türlerden kolayca ayırt edilebilir (Doğan, 2005).

Yaşama alanı olarak daha çok nemli ve çimenli yosunları tercih eden bu türün beslenme şekli bilinmemekle birlikte, cinsin diğer çoğu üyesi gibi predatör olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 1.1.** *Eustigmaeus absens* (dişi). Üstten görünüm

### ***Kızılötesi (infrared) spektroskopisi (IR)***

İnfrared spektroskopisi (kırmızı ötesi spektroskopisi) inorganik, organik, biyokimyasal maddelerin yapılarının açığa çıkarılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, molekül içi grupların veya moleküllerin infrared bölgesindeki frekanslarını içeren elektromanyetik ışımaları absorblanmasının ölçümünü esas alan bir yöntemdir. IR ışınları dalga sayısı  $12500-20\text{ cm}^{-1}$ , dalga boyu biriminden ifade edilecek olursa  $0,78-500\text{ }\mu\text{m}$  aralığında yer alan ışınlardır. IR spektroskopisi uygulamaları uzak IR bölgesi ( $400-20\text{ cm}^{-1}$ ), orta IR bölgesi ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) ve yakın IR bölgesi ( $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ ) olmak üzere başlıca üç muntıkada yapılır. Uzak IR bölgesinde genellikle inorganik ve metal-inorganik gibi ağır atomların titreşimleri ile örgü titreşimleri incelenir. Yakın IR bölgesinde molekül titreşimlerinin üst ton (overtone) ve harmonikleri gözlenir ve ayrıca karbon dioksit, kükürt,

su, amin tuzları ve düşük molekül kütleli hidrokarbonlar gibi basit maddelerin kantitatif tayini gerçekleştirilir. (Skoog vd., 1998).

IR spektroskopisi sayesinde bir molekülün yapısında hangi fonksiyonel grupların yer aldığı, iki bileşiğin aynı veya farklı olduğu ve bazı numunelerdeki bir maddenin kantitatif tayini yapılabilir. IR spektroskopisinde en çok tercih edilen numune hazırlama yöntemi potasyum bromür (KBr) ile pelet (disk) hazırlamaktır. Bu teknikte KBr ile katı numune belirlenen oranda karıştırılır ve karışım homojenize olana kadar öğütülür. Sonrasında bu karışım takribi 10.000 psi'lik basınçta sıkıştırılarak saydam bir disk elde edilir. Elde edilen disk nemlenmeden spektroskopi cihazında ölçümleri yapılır. IR spektroskopisinde kullanılan diğer teknik ise ATR (seyreltilmiş toplam yansıma) tekniğidir. Bu teknikte KBr ile pelet hazırlamaya gerek duyulmaz. ATR-FTIR tekniğinde IR ışının ZnSe veya elmas gibi kırılma indisi yüksek IR geçirgen bir kristal boyunca geçişine müsaade edilerek ışının birkaç defa yansıtılması sağlanır. Bu kristal yüzeyinde sıkıştırılmış numune içerisine yansıtılan ışının belirli bir kısmı numuneye nüfuz eder ve her yansımada bu durum tekrarlanır böylece saçılan ışın kristalden çıkıp spektrometredeki normal ışın yoluna girer. ATR tekniğinde gelen ışın açısının daima kritik açıdan büyük olması gereklidir böylece ışının kırınımı elde edilir. ATR tekniği; polimer, malzeme, tekstil ve boya endüstrisinde, çözünürlüğü az olan katılar, filmler, köpükler, lifler, yapıştırıcılar, kaplamalar, tozlar ve yumuşak maddelerin analizinde sıklıkla kullanılan yaygın ve önemli bir tekniktir (Çağlar vd., 2010).

IR spektrumu sonuçlarından asetilasyon derecesi (AD) hesaplanabilir. Asetilasyon derecesi kitinin saflığını gösterir. Literatürde saf kitinin asetilasyon derecesi %100 olarak kabul edilir. Hesaplama sonucu elde edilen değer %100'ü geçerse kitinin yapısında protein veya mineral kalıntısı olduğu anlaşılır (Kaya vd., 2014a).

### ***Taramalı elektron mikroskobu (SEM)***

Taramalı elektron mikroskobu (SEM); lantan hekza borit, tungsten veya alan emisyonlu tabancadan çıkan küçük dalga boylu elektronların numune yüzeyine gönderilerek numunenin biçimi, şekli, yapısı ve diğer yüzeysel özellikleriyle beraber kimyasal bileşimleriyle ilgili ayrıntılı bilgi edinilmesini sağlar. SEM ışık mikroskoplarına göre yüksek büyütme, yüksek ayırım gücü, büyük alan derinliği, net görme oranı, üç boyutlu

görüntü ve net görüntü kalitesi gibi önemli üstünlüklere sahiptir. Yüksek enerjili elektronların numune yüzeyine nüfuz etmesi sonucunda meydana gelen ışınların dedektörler tarafından toplanması ve kaydedilmesiyle SEM görüntüleri elde edilir (Çırak, 2005).

Elektronlar katı numuneye çarptığında, yansılar veya yutulurlar. Yansıyan elektronlar farklı sinyaller üretir. Yansıyan elektronların sinyalleri; geri yansıyan, ikincil, Auger ve diğer yansıyan elektron sinyalleri olarak adlandırılır. Temel elektronların enerji düzeyi yaklaşık 50 eV'den daha yüksektir. Bu nedenle yansıyan elektronlar dışında geri dönen elektronlar meydana gelmektedir. Geri dönen elektronların en belirleyici özelliği yüksek enerjili olmalarıdır. Yutulan elektronların katı hacim içerisinde dağılması sayesinde numunenin mikro analizi yapılabilmektedir. Malzemenin mikro analizi ile SEM analizinde, dalga dağıtıcı ışın metotları ve enerji dağıtıcı X-ışınlarından faydalanılır. Bu analizlerde geri yansıyan ve ikincil elektronların yakalanması en çok kullanılan metotlardır. Yansımalar malzemenin yüzeyinden gerçekleşir. Malzemenin tanecik biçimlerinin belirlenmesinde geri yansıyan elektronlar kullanılırken, malzeme yüzeyine ilişkin veriler ikincil elektronlar sayesinde sağlanır. Yansıyan elektronların şiddeti malzemenin atom numarası ve özgül ağırlığıyla orantılıdır (Ramachandran vd., 2000).

Karakteristik X-ışınları, yüksek enerjili birincil elektronların örnek yüzeyine çarpmasıyla oluşur. Gelen elektron numunede yer alan atomun iç tabakasından elektron koparır, elektron eksikliği olan tabakaya bir üst tabakadan elektron geçer ve bunun sonucunda iki tabaka enerji seviyesi arasındaki enerji farkı miktarına sahip X-ışınları yayılır. X-ışınları, her kabuk ve her element için karakteristik dalga boyu ve enerjiye sahiptir. Bu ışınlar numune yüzeyinin kantitatif ve kalitatif analizlerinde kullanılır. (Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektrometresi).

### ***Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)***

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), yüksek enerjili elektronların çok ince kalınlıktaki (<100 nm) numune ile etkileşime girmesi sonucu, numuneden geçerek veya kırınımına uğrayarak görüntü işleyebilen yüksek çözünürlüklü sistemdir.

TEM kimyasal analiz imkanı, atomik seviyede görüntü ve kristallografik bilgi sağladığından farklı amaçlarda kullanılmaktadır. Kullanım alanlarından bazıları şunlardır: Mekanik deformasyonun olup olmadığının belirlenmesi, faz içeriğinin ve fazların tane boyutunun belirlenmesi, bir iç yapıda mikron-altı boyutlar için bir fazın kristal yapıda mı amorf yapıda mı olduğunun belirlenmesi, farklı kristaller arasında oluşan hataların şeklinin belirlenmesi. TEM’de elektron-madde etkileşimi sonucunda farklı sinyaller toplanmaktadır. Bunlar; karakteristik X-ışınlarının, doğrudan geçen elektronların, elastik olarak saçılan elektronların ve elastik olmadan saçılan elektronların meydana getirdiği sinyallerdir (Freeman vd., 1996).

Mikroskobun tabancasından çıkarak numuneye ulaşan hızlandırılmış elektronlar, numunenin atomlarına enerjilerini aktarır ve numunenin atomlarındaki elektronların daha dış yörüngelere çıkmalarına neden olur. Çekirdeğin elektrostatik çekiminden dolayı yeri boşalan elektronun yerini dış yörüngedeki elektronlardan biri alır ve fazla enerjisini elektromanyetik dalga olarak yayar. Atomların farklı kabuklarındaki elektronlar, bir alt seviyedeki kabuklara geçerken kabuklar arasındaki enerji farkı kadar karakteristik ışıma meydana getirirler. Numune ile etkileşime giren elektronların oluşturduğu görüntü büyütülerek floresans ekrana yansıtılır ve numuneye ait görüntü elde edilir (Egerton, 2008).

### ***Çalışmanın önemi***

Bu çalışmada; *Eustigmaeus absens* (Acari: Stigmaeidae) türünden kimyasal yöntemle kitin elde edilmiş, elde edilen kitinlerden nanokompozit sentezlenmiş, kitinin ve kitin temelli nanokompozitin yapısal, morfolojik özellikleri aydınlatılmış ve bunların antibakteriyel aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile daha önce kitin eldesi ile ilgili üzerinde hiç çalışılmamış olan *E. absens* türünün kitin özellikleri açığa çıkarılarak gelecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kitin, selülozdan sonra doğada en fazla mevcut olan biyopolimerdir. Kitin ve türevleri biyolojik aktiviteleri ve endüstriyel ve biyomedikal uygulamaları nedeniyle büyük ekonomik değere sahiptir. Kitinin ana ticari kaynakları, kabuklu deniz ürünleri işleme endüstrileri tarafından büyük miktarlarda tedarik edilen karides, yengeç, istakoz ve kril gibi organizmalardır (Yang vd., 2013; Üçgül vd., 2016).

Kitin eldesi ile ilgili literatür taraması yapıldığında, üzerinde en çok çalışma yapılan canlı grubu kabuklulardır. Akarlardan kitin eldesi ile ilgili ise sadece dört çalışma mevcuttur. Konu ile ilgili çalışmalar kronolojik sıraya göre aşağıda verilmiştir.

No vd. (1989), kerevit kabuğu atıklarından ve kerevitin tamamından kitin elde etmişlerdir. Kerevit kabuğu atıklarının ve kerevitin tamamının proteinlerinden arındırılması için 3,5 M NaOH, minerallerinden arındırılması için ise 1 M HCl çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen kitinlerin analizleri EA (element analizi) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kerevit kabuğu atıklarından elde edilen kitin veriminin, kerevitin tamamından elde edilenden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Acosta vd., (1993), yaptıkları çalışmada Dikenli istakozu (*Polinurus vulgaris*), Karamot karidesi (*Penaeus karamot*), Norveç istakozu (*Nephrops norvegicus*), Mantis karidesi (*Squilla mantis*), İspanyol kereviti (*Astecus juviabilis*), Amerikan kereviti (*Astecus cambarus*) ve bir askomiset mantarı (*Fusarium oxysporum*) da dâhil olmak üzere çeşitli doğal kaynaklardan kuru bazda %14-25 verimle kitin izole etmişlerdir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen kitinin fizikokimyasal özellikleri IR (İnfrared spektroskopisi) ve SEM (Taramalı elektron mikroskobu) ile incelenmiştir. IR analizleri, elde edilen kitinlerin %100 saflıkta olmadığını göstermiştir.

Das vd. (1996), Portunidae familyasına ait iki yengecin (*Scylla serrata* ve *Portunus pelagicus*) çeşitli vücut kısımlarından kitin eldesine yönelik yaptıkları çalışmada; *P. pelagicus* türünden kuru ağırlıkta (g/100g) vücut kabuğundan 11,67, kısıkaç kabuğundan 10,42, bacak kabuğundan 16,07 kitin içeriği; *S. serrata* türünden kuru ağırlıkta vücut kabuğundan 13,51, kısıkaç kabuğundan 11,66, bacak kabuğundan 20,19 gram kitin içeriği olduğunu açığa çıkarmışlardır. İstatiksel olarak *P. pelagicus* türünün vücut kabuğundan

elde edilen kitin ile kısa  kabuğundan elde edilen kitin arasında anlamlı bir pozitif bir ilişki olduğu halde, *S. serrata* türünün vücut kabuğundan elde edilen kitin ile bacak kabuğundan elde edilen kitin arasında negatif bir ilişkinin olduğu anlaşılmıştır.

Zhang vd. (2000),  pekb ce i (*Bombyx mori*)’den kitin izole etmişlerdir. Kitin elde etmek için 1 M HCl   zeltisi ve 1 M NaOH kullanılmışlardır. Elde edilen kitinlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için XRD (X-ışını kırınımı), NMR (Nükleer manyetik rezonans) ve SEM analizlerini yapmışlardır.

Wu vd. (2004), *Agaricus bisporus* (kültür mantarı) atıklarından NaOH kullanarak kitin elde etmiştir. Elde edilen kitinin asetilasyon derecesinin %75,8 ile %87,6 arasında olduğunu ortaya konmuş ve bu değerin kabuklulardan elde edilen kitin ile benzer olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca kültür mantarının ticari kitin kaynağı olabileceği ortaya konmuştur.

Paulino vd. (2006),  pekb ce i krizalitlerinden ekstrakte edilen kitinin, SEM ile gözlemlemiş, yüksek saflıkta ve gözenekli bir kitosan üretimi için kullanmışlardır. Üretilen kitin ve kitosanı, FTIR, NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, TGA (Termogravimetrik Analiz), DSC (diferansiyel taramalı kalorimetri) ve SEM yöntemleri ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen kitin ve kitosan yüksek saflı a sahip olmalarına rağmen, kabuklulardan üretilen kitin ve kitosan ile kar ıla tırıldı ında verimi düşük olduğu anlaşılmıştır.

Majt n vd. (2007), *Bombus terrestris* cesetlerine 1M HCl   zeltisi ve 1M NaOH ile muamele ederek böcek kitinini elde etmişlerdir. IR ve NMR spektroskopisi ve konfokal mikroskop ile kitinin karakterizasyonunu yapmışlardır.

Yen ve Mau (2007),  itaki mantarından (*Lentinula edodes*) kitin elde etmiştir. Kitin elde etmek için sodyum hipoklorit, etil alkol ve potasyum permanganat kullanılmıştır. Kitin eldesi için etil alkol kullanılmasının kitin verimini artırdığı saptanmıştır. Kitin veriminin sodyum hipokloritte 283,2, etil alkolde 367,2 ve potasyum permanganatta 250,8 mg/g olduğu kaydedilmiştir.

Mario vd. (2008), yedi mantar türünden (*Mucor rouxii*, *Absidia glauca*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus sajor-caju*, *Gongronella butleri*, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus oryzae*,

*Lentinula edodes*) kitin elde etmiştir. Kitinlerin saflıkları asetilasyon derecesi ile karakterize edilmiş ve kitinlerin ticari kitine benzediği belirtilmiştir.

Sobotnik vd. (2008), *Acarus siro* (Acari: Acaridae) türünün peritrofik membranından elde ettikleri kitini akarisit olarak kullanmışlardır. Çalışmada peritrofik zar içindeki kitin, kolloidal altınla (10 nm) konjuge edilmiş buğday tohumu-lektin kullanılarak tespit edilmiştir. Peritrofik zardaki kitin, *A. siro*'nun popülasyon büyümesini baskılamada yeni akarisit bileşikler için uygun bir hedef olarak belirlenmiştir.

Thirunavukkarasu ve Shanmugam (2009), *Scylla tranquebarica*'nın (Çamur yengeci) vücudunun farklı bölgelerinden kitin elde etmişlerdir. Yengecin bacak kısmından elde edilen kitinin, kısıkaç kısmından elde edilen kitine göre daha verimli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yen vd. (2009), yengeç kabuklarından kitin daha sonra kitosan elde etmişlerdir. Elde edilen kitosanların moleküler ağırlıkları, element analizleri, SEM ve XRD analizleri karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları elde edilen kitosanının yüksek saflıkta olduğunu göstermiştir.

Nessa vd. (2010), karides kabuğu atıklarında demineralizasyon, deproteinizasyon, renk giderme işlemlerini kimyasal aşamalarla gerçekleştirerek kitin elde etmişlerdir. Elde edilen kitini deasetile ederek, deasetillenme işleminin kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisine bakmışlardır. Dört kitosan örneği farklı deasetilasyon süreci (45, 55, 65 ve 72 sa.) ile oda sıcaklığında hazırlanmışlardır. Sonuçlar, deasetilasyon süresinin kitosanın deasetilasyon derecesini ve çözünürlüğünü etkilediğini ortaya koymuştur.

Sajomsang ve Gonil (2010), Ağustosböceği integümentinden minerallerin uzaklaştırılması ve proteinlerin uzaklaştırılması için sırasıyla 1 M HCl çözeltisi ve 1 M NaOH ile kitin elde etmişlerdir. Çalışma kapsamında ağustosböceği kabuklarından elde edilen  $\alpha$ -kitinin fizikokimyasal özellikleri EA, ATR-FTIR, NMR, XRD ve TG ile incelenmiştir.

Ifuku vd. (2011), farklı türdeki mantarların (*Agaricus bisporus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*) hücre çeperlerinden kitin elde



etmişlerdir. Kitinlerin boyutunun 10-20 nm arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Elde ettikleri kitinlerin gıda sektöründe ve tıbbi çalışmalarda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Jalal vd. (2012), tavuk ayağından kitin eldesi için en uygun koşulları bulmayı amaçlamışlardır. Mineralleri uzaklaştırmak için en uygun HCl çözelti molaritesini 1,5 M ve proteinleri uzaklaştırmak için en uygun NaOH molaritesini 1 M olarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri FTIR spektrumu ile diğer çalışmaların spektrumlarını karşılaştırıp, kitinlerin uyum içinde olduğunu göstermişlerdir.

Liu vd. (2012), 1 M NaOH ve 1 M HCl çözeltisi ile muamele ve sonrasında renk giderme için %1 potasyum permanganat ile muamele ederek yetişkin bir Mayıs böceği olan *Holotrichia parallela*'dan kitin izole edilmişlerdir. Bu türün kitin verimini %15 olarak bulmuşlardır. Bu böcek kitini, IR, XRD, SEM ve EA analizi sonuçlarını karidesten elde edilen ticari alfa kitin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen kitinler benzer fizikokimyasal özellikler ve kimyasal yapılar sergilemiştir. Çalışmada *H. parallela* türünün alternatif kitin kaynağı olabileceği ifade edilmiştir.

Kaya vd. (2014a), yetişkin ve larva *Leptinotarsa decemlineata*'dan (patates böceği) kitin ve kitosan elde etmişlerdir. Kitin ve kitosanı fizikokimyasal olarak karakterize etmişler ve yetişkinler ile larvalar arasındaki farklılıkları belirlemişlerdir. Çalışmalarında FTIR, XRD, TGA, SEM, EA yöntemlerini kullanmışlar, kitin ve kitosanın moleküler ağırlıklarına, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerine bakmışlardır.

Kaya vd. (2014b), iki yaygın örümcek türünün (*Geolycosa vultuosa* ve *Hogna radiata*) kitin yapısını fizikokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Kitin içeriğini *G. vultuosa* için %8-8,5 ve *H. radiata* için %6,5-7 olarak belirlemişlerdir. FTIR, TGA ve XRD sonuçları, kitin yapılarının alfa formda olduğunu göstermiştir.

Kumari vd. (2014), yaptıkları çalışmada bir balık (Cypriniformes) türü olan *Labeo rohita*'ten kitin ve kitosanı kimyasal yöntemle elde etmişlerdir. Optimum verim elde etmek amacıyla etkili konsantrasyonu belirlemek için asit ve alkali ile çeşitli işlemler dikkate alınmıştır. FTIR, XRD ve SEM analizleri sonucunda, *L. rohita*'in kitin kaynağı olabileceği görülmüştür.

Kaya vd. (2015a), 16 eklem bacaklı türünden [13 böcek (Hexapoda), 2 araknid (Arachnida), 1 akar (Acari)] kitin örneklerini ilk kez aynı yöntem kullanarak izole etmişlerdir. Kitinlerin; FTIR, TGA, XRD, SEM ve elemental analizi yapılarak fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Kaya vd. (2015b), *Argynnis pandora* türündeki kelebeğin kanatlarından ve diğer vücut kısımlarından aynı yöntemle elde ettikleri kitinleri FTIR, TGA, XRD, SEM ve EA ile karakterize edip karşılaştırmışlardır. Kanat parçalarından elde ettikleri kitin içeriğini %22, diğer vücut kısımlarından elde ettikleri kitin içeriğini %8 bulmuşlardır. Kanatlardan ve diğer vücut kısımlarından elde ettikleri kitinlerin SEM analizi dışındaki diğer analizlerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiğini açığa çıkarmışlardır. Kanatlardan elde edilen kitin yüzeyinin bazı bölgelerinde gözeneksiz düz bir yüzey bazı bölgelerinde boru şeklinde gözenekler gözlemlemişlerdir. Diğer vücut kısımlarından elde edilen kitin yüzeyinin ise farklı dizilimde ve yapıda dizayn edilen gözenekler ve sivri uçlu kitinsi yapılar içerdiğini belirlemişlerdir.

Choi vd. (2016), ev tozu akarlarından kitin elde etmişlerdir. Kitin eldesi için, 100 mg ev tozu akarını, fosfat tamponlu tuzlu su içinde 24 sa. yıkayıp ardından 55°C'de 10 sa. kurutmuşlardır. Sonrasında sırasıyla 2 M NaOH, 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile işleme tabii tutmuşlardır. 1 mg ev tozu akarından 700 µg kitin elde edilmiştir. Elde ettikleri kitini, solunum yollarında solunan alerjenlere karşı bağışıklık tepkisinin geliştirilmesi için kullanmışlardır.

Fernando vd. (2016), *Portunus pelagicus* (Kum yengeci) türünden kitin elde etmişlerdir. Elde edilen kitin, XRD, TGA ve FTIR analizine tabi tutulmuştur. Kitinler, farklı oluşum koşullarında polimer filmler oluşturmak için kullanılmıştır. Oluşturulan filmler, ticari kitinden oluşturulan filmler ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda filmlerin gerilme karşısındaki zayıflamaları birbirine benzer çıkmıştır.

Kim vd. (2017), asit ve alkali ile kimyasal işlemten sonra, iki noktalı tarla cırcır böceklerinden (*Gryllus bimaculatus*) kitin ve kitosan elde etmişlerdir. Kitin eldesi için, sırasıyla minerallerin uzaklaştırılması aşamasında 2 M HCl çözeltisi ve proteinlerin uzaklaştırılması aşamasında 1,25 M NaOH solüsyonlarını kullanmışlardır. Cırcır böceklerinden elde ettikleri kitinin ticari kitin kaynağı olabileceğini göstermişlerdir.

Tokatlı ve Demirdöven (2018), yaptıkları çalışmada karides atıklarından elde edilen kitin ve kitosanların üretim koşullarını optimize etmeyi amaçlamışlardır. Kitin üretiminde demineralizasyon için oda sıcaklığında 132,61 dk. boyunca 0,73 mol/L HCl çözeltisi ve deproteinizasyon için 60,49°C'de, 75,65 dk. boyunca 0,95 mol/L NaOH kullanılmıştır. Kitinlerden elde edilen kitosanolardan birini 120°C'de 300 dk. boyunca %40 NaOH ile diğerini ise 100°C'de 720 dk. boyunca %50 NaOH kullanımı ile elde etmişlerdir.

Küçükgülmez (2018), yaptığı çalışmada kerevit (*Astacus leptodactylus*) kabuklarından kimyasal olarak kitin elde etmişlerdir. Kitin elde etmek için proteinleriz uzaklaştırılması, minerallerin uzaklaştırılması ve renk pigmentlerinin uzaklaştırılması işlemleri uygulamıştır. Kitinin deasetilasyonu ile kitosan elde etmişlerdir. Kitosanın karakterizasyonunu belirlemek için; nem ve kül içerikleri, deasetilasyon derecesi, renk özellikleri, FTIR ve SEM analizleri uygulanmıştır. Bu çalışmanın bulguları, değerlendirilmemiş kerevit atıklarından kitin elde edilmesi açısından önemlidir.

Ibitoye vd. (2018), yaptıkları çalışmada ev kriketlerinden (*Brachytrupes portentous*) kimyasal yöntemle kitin ve kitosan elde etmişlerdir. Kriketlerden elde ettikleri kitin ve kitosanın fizikokimyasal özelliklerini, ticari kitin ve kitosan ile karşılaştırmışlardır. Kitinlerin karakterizasyonu için XRD, SEM ve EA yapılmıştır. Bunun sonucunda elde edilen kitinlerin ölçümleri birbirine benzer çıkmıştır.

Machalowski vd. (2019), çalışmalarında ilk kez, kitinin *Caribena versicolor* örümcek kütikülünden izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Kitinin ışık mikroskobu, SEM, Raman spektroskopisi, XRD, elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi, NMR, kitinaz sindirim testi, UV-VIS spektroskopisi analizleri yapılmıştır.

Seyyar ve Demir (2020), bir otbiçen (Opiliona) olan *Phalangium opilio*'dan ilk kez kitin elde etmişlerdir ve TGA (termogravimetrik analiz), XRD (X-ışını kırınımı), FTIR ve SEM analizleri ile kitinin karakterizasyonu yapmışlardır. Elde ettikleri kitinin yüzey morfolojisinde nanofiber ve nanoporlara rastlamışlardır. Ayrıca kitinin termal kararlılığının yüksek ve alfa formda olduğunu açığa çıkarmışlardır.

Mohan vd. (2019), Bir salyangoz (Gastropoda) türü olan *Conus inscriptus*'tan kitin elde etmişlerdir. XRD, FTIR, SEM, EDX, TG/DTA analizleri sonucunda elde ettikleri kitinin alfa formda olduğunu doğrulamışlardır.

Shin vd. (2019), un kurdu larva pupa ve erginlerinden, *Oryctes nasicornis* (gergedan böceği) larva, pupa ve erginlerinden deproteinizasyon ve demineralizasyon yoluyla kitin izole etmişlerdir. Un kurdu larvalarının kitin verimi larva, pupa ve ergin sırasıyla %4,60, %8,40 ve %3,90, gergedan böceğinin larva, pupa ve ergininde %10,53, %12,70 ve %14,20 olarak bulunmuştur. Daha sonra, her türün tüm aşamalarından kitin ekstraksiyonlarının deasetilasyonu ile kitosan elde etmişlerdir. Elde edilen kitosanların FTIR ve XRD analizlerini yapmışlardır. Elde edilen kitosanların analiz sonuçlarının ticari kitosana benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Demir ve Seyyar (2020), örümcek (Araneae) türü olan *Aculepeira ceropegia*'dan kitin eldesi gerçekleştirmişler ve kitinin SEM, TGA, FTIR ve XRD analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda elde edilen kitinin alfa forma sahip olduğu açığa çıkarılmıştır.

Huet vd. (2020), farklı saflık derecelerindeki kitinleri (%45, %89,7 ve %93,3) *Bombyx eri* (Eri ipek kurdu) larvalarından verimli bir şekilde ekstrakte etmişler ve fizikokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Elde edilen kitin, ticari olarak temin edilebilen ve karides kabuğundan ekstrakte edilen  $\alpha$ -kitin ile karşılaştırıldığında, kitinlerin kristalografik yapılarının, termal stabilitelerinin ve asetilasyon derecelerinin benzer olduğu görülmüştür.

Çakmak ve Koç Bilican (2021), bir akar türü olan *Trachytes pauperior*'dan (Berlese) (Acari) ilk kez üç boyutlu (3D) kitin ekstraksiyonu gerçekleştirilmişlerdir. Elde ettikleri kitini, ışık mikroskobu ile gözlemleyip, FTIR ve SEM analizi ile karakterize etmişlerdir. Yazarlar bulgularına göre, yüksek saflıkta elde edilen ve organizmanın vücut yapısının büyük bir bölümünü oluşturan kitinin ileride yapılacak çalışmalar için potansiyel bir kaynak olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarda (Örn. Gibbs ve Morrison, 1959; Crowe ve Camara, 1973; Crowe, 1975; Woolley, 1973; Mothes ve Seitz, 1984; Pugh vd., 1987; Rounsevell ve

Greenslade, 1988; Ioffe-Uspensky vd., 1997; Locher vd., 2010, Alberti, 2013; Chatterjee, 2019) akarların kutikular yapıları kitin eldesi yapılmadan doğrudan ışık ve elektron mikroskobu yardımıyla incelenmiş olmakla birlikte, tez çalışması ile ilgili akarlar üzerine yapılan çalışmaların (Sobotnik vd., 2008; Choi vd., 2016; Kaya vd., 2015a; Çakmak ve Koç Bilican, 2021) oldukça sınırlı olduğu söylenebilir.

Şu ana kadar *Eustigmaeus absens* türünün kitini ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma, akarlar konusunda yapılacak sonraki çalışmalara ışık tutulacaktır.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Daha önce FBA-2019-642 numaralı proje kapsamında Sansa Boğazı'ndan toplanan *Eustigmaeus absens* Doğan örneklerinden elde edilen kitin, çalışmanın ana materyalini oluşturmaktadır. Çalışma süresince kullanılan malzemelere aşağıda yer verilmiştir.

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Laktik asit, akar örneklerinin ağartılması ve temizlenmesinde %60 saflıkta kullanıldı.
- Hoyer eriyiği; 50 mL saf su, 200 g kloralhidrat, 20 mL gliserin ve 30 g kristal arap zımkı karıştırılarak elde edildi. Akarların preparasyon işleminde kullanıldı.
- Değiştirilmiş Hoyer eriyiği, kitinlerin preparatını yapmak için saf suyla %50 seyreltilmiş Hoyer kullanıldı.
- Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), elde edilen kitinler üzerinde gümüş nanopartiküller büyötmek için 10 mM kullanıldı.
- Etil alkol, akarların elde edilmesi aşamasında %70 saflıkta, muhafaza edilmesinde %95 saflıkta kullanıldı.
- Hidroklorik asit (HCl), kitin eldesi aşamasında akarların yapısında bulunan minerallerin uzaklaştırılması için 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M ve 2 M kullanıldı.
- Kloroform-metanol-su karışımı, organizmanın yapısındaki lipidlerin uzaklaştırılması için kullanıldı.
- Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ), akarların yapısında bulunan proteinlerin uzaklaştırılması için 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M ve 2 M kullanıldı.
- Saf su, akarların partiküllerinden arındırılmasında ve elde edilen kitinlerin sıralı işlemler yapılana dek muhafaza edilmesinde kullanıldı.

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Akarların ayıklanması Leica EZ4 stereo mikroskopta yapıldı.
- Preparatları yapılan akar örneklerinin teşhisi için Leica DM500 model ışık mikroskobu kullanıldı.
- Elde edilen kitinler JSON-100 markalı etüvde kurutuldu.
- Tartım işlemleri için Ohaus markalı hassas terazi kullanıldı.
- Elde edilen kitinlerin morfolojik görüntüleri Nikon SMZ25 stereo mikroskoba entegre DS-Ri2 model dijital kamera aracılığı ile alındı.
- Kitinlerin preparatları DM 4000B model faz-kontrast donanımlı ışık mikroskopunda incelendi.
- Elde edilen kitinlerin üzerine gümüş nanopartiküllerin dekore edilmesi için 8 watt gücünde 6 adet UVA lambalı Luzchem LZC-4X fotoreaktör kullanıldı.
- Elde edilen kitinlerin ayrıntılı yüzey morfolojisi hakkında bilgi sağlamak için Quanta FEG 450-FEI alan emisyon kaynaklı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve HITACHI HT-7700 geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanıldı.
- Kitinlerin element analizi enerji dağılımlı X-Işını spektrofotometresiyle (EDX) ile belirlendi.
- Kitinlerin ATR-FTIR spektrumları Thermo Nicolet 6700 spektrometresiyle kaydedildi.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Akarların eldesi, preparasyonu ve teşhisi

Bu çalışmada, daha önce FBA-2019-642 numaralı proje kapsamında Sansa Boğazı'ndan toplanan *Eustigmaeus absens* örnekleri kullanıldı. *E. absens* türünün Sansa Boğazı'nın

sınırları içinde, bir akarsu yakınlarında (39°33'30,9"K 40°07'11,4"D) nemli, çimenli ve yosunlu alanlarda yaşadığı belirlendi. Arazide naylon torbalara konularak etiketlenip, laboratuvara getirilen örnekler birleştirilmiş Berlese-Tullgren hunilerinden oluşan ayıklama düzeneğine yerleştirildi. Bu düzeneğin; 40 cm derinliğinde, 30 cm çapında olan bir huni ile bunun üzerine konulan gözenek çapı 2 mm olan bir elek ve bunun da üzerine yerleştirilen 15-25 Watt'lık lambalardan oluşan bir ışık kaynağından ibarettir (Şekil 3.1). Işık kaynağı en az 7 gün süreyle açık bırakıldı. Berlese-Tullgren hunilerinin alt tarafına yerleştirilen ve içinde %70'lik etil alkol içeren toplama şişelerine biriktirilen organizmalar Petri kaplarına boşaltıldıktan sonra stereo mikroskop altında ayıklandı.



**Şekil 3.1.** Berlese-Tullgren düzeneği

Akarların eldesi ve preparasyonu konusunda Walter ve Krantz (2009)'un eserinden yararlanıldı. Tür teşhisi için örneklerin ağartılması ve temizlenmesinde %60'lık laktik asit çözeltisi kullanıldı. Ağartılmış örneklerin daimî preparatları Hoyer ortamında yapıldı. Teşhis işlemleri Doğan (2005) ve Fan ve Zhang (2005)'e göre gerçekleştirildi. Teşhis işlemleri tamamlandıktan sonra akar örnekleri kitin eldesi için sayılarak, etiketlenip %96'lık etil alkol içinde ve -24°C'de muhafaza edildi.



### 3.2.2. Kitin eldesi

Kitin eldesi aşamasında organizmanın yapısındaki mineralleri uzaklaştırmak için HCl çözeltisi kullanıldı (Majtán vd., 2007; Liu vd., 2012; Kim vd., 2017; Çakmak ve Koç Bilican, 2021). *Eustigmaeus absens* için uygun HCl çözelti molaritesini belirlemek amacıyla, 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M ve 2 M HCl çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan farklı molaritelerdeki asitler 0,5 mL olacak şekilde saklama tüplerine koyuldu. Aynı molariteye sahip asitlerin farklı sürelerde işleme tabi tutulması amacıyla her bir molariteden iki saklama tüpü oluşturuldu. Bir sonraki aşamada, %96'lık etil alkolde muhafaza edilen numuneler, Petri kaplarına dökülüp, partiküllerinden arındırılana kadar saf su ile yıkandı. Yıkanan numuneler sayılıp, her biri 40 adet olacak şekilde içinde farklı molaritelerde HCl çözeltisi bulunan saklama tüplerine konuldu. HCl çözeltisi içindeki numuneler 60 °C etüvde 6 ve 8 sa. süreyle bekletildi. Etüvden çıkarılan örnekler nötr pH değerine ulaşana kadar saf su ile birkaç kez yıkandı. Her yıkama işleminden sonra pH kâğıdı ile kontrol edilip nötr pH değerine ulaşana kadar bu işlem tekrar edildi. Sonrasında her tüpte kaç numune olduğu sayıldı. Sayma işlemi sayesinde, örneklerin hangi molaritelerde ve hangi sürede zarar gördüğü tespit edildi. Nötr pH değerine ulaşan ve sayılan numuneler, sıradaki aşama uygulanana kadar saf suda 4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

HCl çözeltisinde işlem gören numunelerin, yapısında bulunan proteinlerin giderilmesi için NaOH kullanıldı (Kaya vd., 2014b; Seyyar ve Demir, 2020; Çakmak ve Koç Bilican, 2021). *E. absens* için uygun NaOH molaritesini belirlemek amacıyla, 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M ve 2 M NaOH hazırlandı. Hazırlanan farklı molaritelerdeki bazlar 0,5 mL olacak şekilde saklama tüplerine koyuldu. Aynı molariteye sahip bazların farklı sürelerde işleme tabi tutulması amacıyla her bir molariteden iki saklama tüpü oluşturuldu. Hazırlanan farklı molaritelerdeki bazların her birine saf su ile yıkayıp partiküllerinden arındırılmış *E. absens* numuneleri koyuldu. Numuneler, 80 °C etüvde 8 ve 11 sa. bekletildi. Etüvden çıkarılan numuneler nötr pH değerine ulaşana kadar saf su ile yıkandı. Sonrasında her tüpte kaç numune olduğu sayıldı. Nötr pH değerine ulaşan ve sayılan numuneler, sıradaki aşama uygulanana kadar saf suda 4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

*Eustigmaeus absens*'in yapısındaki yağları uzaklaştırmak için kloroform-metanol-su karışımı, hacimce 1:2:4 oranında olacak şekilde hazırlandı (Kaya vd., 2014b).

Numuneler, belirlenen orandaki karışıma koyularak, oda sıcaklığında 30 dk. süreyle bekletildi. Karışımdan çıkarılan numuneler nötr pH değerine ulaşana kadar saf su ile yıkandı. Gerekli analizler yapılana kadar saf su içinde 4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Tüm bu işlemler ve gerçekleştirilen analizler sonucunda; *E. absens*’in yapısındaki minerallerin uzaklaştırılması için en uygun HCl çözelti molaritesi 1,5 M ve HCl çözeltisinde işlem görme süresi 6 sa., proteinlerin uzaklaştırması için en uygun NaOH molaritesi 1 M ve NaOH’de işlem görme süresi 8 sa. olarak belirlendi.

Elde edilen kitinler; TEM-SEM analizi, element analizi, ışık ve stereo mikroskopta görüntü alınımı, antibakteriyel aktivite ve kitinlerin dekorasyon işleminin yapımı için kurutulmadan saf su içinde 4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi. IR analizi için kitinler ölçüm alınmadan önce 3 gün 60 °C’de kurutuldu.

### **3.2.3. Kitin üzerine gümüş nanoparçacıkların dekorasyonu**

Buzdolabında saf su içinde muhafaza edilen kitinler, dört farklı Petriye eşit sayıda konuldu. Kitin numunelerinin üzerine, kitinleri kapatacak şekilde 10 mM AgNO<sub>3</sub> eklendi (Hong vd., 2006; Guin vd., 2007). Daha sonra 4 Petri kabı fotoreaktörde ultraviyole A (UVA) ışınları (365 nm) altına konuldu. Birinci Petri UVA ışınlarına 30 dk., ikinci Petri 1 sa., üçüncü Petri 2 sa. ve dördüncü Petri 3 sa. maruz bırakıldı. Sonrasında yapılan SEM ve TEM analizleri sonuçlarından en iyi gümüş nanopartiküllerin büyüdüğü sürenin 1 sa. olduğu belirlendi.

### **3.2.4. Kitinlerin antibakteriyel aktivitesinin incelenmesi**

Antibakteriyel aktivite deneyleri bir Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) ve bir Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) bakteri suşu üzerinde gerçekleştirildi. Bakteriler Luria-Bertani sıvı besiyeri içerisinde 37 °C’de, 150 rpm’de 18 sa. inkübe edilerek ön kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerden OD<sub>600</sub> değerleri *E. coli* ATCC 25922 için 0,4, *S. aureus* ATCC 29213 için 0,25 olacak şekilde taze besiyeri içerisinde dilüsyonları hazırlandı. Hazırlanan bu dilüsyonlardaki bakteri sayısı yaklaşık olarak 1,5 x 10<sup>8</sup>/mL’dir. Kültürün 1 ml’si Eppendorf tüplere aktararak santrifüj (13.000 rpm, 2 dk)

edildi. Üst faz uzaklaştırılarak pelet steril fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) ile 1 kez yıkandı. Bakteriler 108 cfu/mL olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su içerisinde sulandırıldı ve böylece bakteriyel çalışma solüsyonları hazırlanmış oldu. Steril inokülasyon çubuğu bakteri çalışma solüsyonlarına daldırıldıktan sonra (yaklaşık 100 µL) bakteriler, Petri kaplarında bulunan LB agar besiyeri üzerine her noktasına eşit olacak şekilde yayıldı. Steril agar delici (cork borer) kullanılarak agar yüzeyinde 7 mm kuyular açıldı. Kuyuların içerisine aktivitesine bakılacak örneklerden 100 µL (100 µM) ilave edildi. Petri kapları 37 °C’de 24 sa.’lik inkübasyonun ardından kontrol (çözücü), saf kitin (A) ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitin (C) maddelerinin bulunduğu kuyuların etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü. Ayrıca kültürden seri sulandırma yapılarak canlı hücre sayımı yapıldı. Canlı hücre sayıları üç tekrarın ortalaması alınarak hesaplandı.

### **3.2.5. Kitin numunelerinin karakterizasyonu**

Elde edilen numunelerin yapısal ve morfolojik özellikleri Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını analizi (SEM-EDX) teknikleri kullanılarak aydınlatıldı.

Elde edilen kitinler, 3 gün 60 °C etüvde kurutulduktan sonra FTIR analizlerinin gerçekleştirilmesi için iki farklı tekniğe tabii tutuldu. İlk teknikte toz haldeki kitinler ile KBr homojenlik sağlanana kadar öğütüldü. Daha sonra bu karışım yaklaşık 10.000 psi’lik basınç altında sıkıştırılarak saydam bir disk hazırlandı. Elde edilen disk nemden uzak tutularak spektroskopi cihazında ölçümü alındı. Diğer teknikte ise KBr ile pelet hazırlanmadan IR cihazının elmas yüzeyine toz haldeki kitinler sıkıştırılarak ATR tekniği ile ölçüm alındı (Madejová, 2003). Farklı iki teknikten elde edilen analiz sonuçlarına bakıldığında, ATR tekniği ile elde edilen piklerin, pelet hazırlanarak elde edilen piklere göre daha net olduğu görüldü.

Elde edilen kitinlerin SEM ve EDX analizleri gerçekleştirilirken, kitinlerin farklı kısımlarının birbirine yapışmasını engellemek için numuneler kurutulmadan kullanıldı. Analizlerden önce şu hazırlıklar yapıldı: Karbon bant 2-3 mm büyüklüğünde kesilip staba yapıştırıldı. Saf su içinde buzdolabında muhafaza edilen kitinlerden analizleri yapılacak

olan numuneler, alkole alındı. Alkole alınan numuneler pipet yardımıyla stab üzerine yerleştirildi. Alkolün saf suya göre daha hızlı buharlaşma özelliği kullanılarak stab üzerinde sıvı birikmesi engellendi. Böylelikle numunelerin karbon banda yapışması sağlandı. SEM, EDX analizlerinden önce numunelerden daha iyi görüntü elde etmek için numuneler altın ile kaplandı. Altın ile kaplanan numuneler SEM cihazına yerleştirildi ve kitinin farklı kısımlarından, farklı büyütmede görüntüler alındı (Kaya vd., 2014b, 2017).

Numunelerin Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri, 120 kV'luk bir hızlanma voltajı altında HITACHI HT-7700 elektron mikroskobu ile alındı.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Kitinin Stereo Mikroskop Görüntülerinin Değerlendirilmesi

*Eustigmaeus absens*'in kimyasal muamele görmemiş halinin üstten görüntüsü Şekil 4.1a'da ve yapısındaki minerallerin, proteinlerin ve yağların uzaklaştırılması işlemlerine tabi tutulduktan sonra elde edilen kitininin üstten görüntüsü Şekil 4.1b'de verilmiştir. Şekil 4.2'de ise yine *E. absens*'in işlemsiz ve işlemlili hallerinin yandan görüntüsü verilmektedir.



Şekil 4.1. *Eustigmaeus absens*'in üstten görünümü (a) işlemsiz (b) işlemlili



Şekil 4.2. *Eustigmaeus absens*'in yandan görünümü (a) İşlemsiz (b) İşlemlili

İşlemsiz *E. absens*'in yapısında; mineral, protein ve yağlar mevcut olduğundan stereo mikroskop görüntüsünün renkli ve vücuttaki ağısı yapıların içlerinin nokta desenli olduğu anlaşılmaktadır. Yapısındaki mineral, yağ ve protein uzaklaştırma işlemlerine tabi tutulduktan sonra içyapısının yok edilmesi sonucu stereo mikroskop görüntüsünün şeffaf olduğu görülmektedir. Görüntülerden anlaşılacağı üzere, yapılan işlemler organizmanın vücut içeriğini yok ederek kitin eldesinin sağlandığını göstermektedir. Gümüş nanopartikül dekore edilen kitinlerin stereo mikroskop görüntüsü alınmasına rağmen, mevcut mikroskobun yeterli büyütme sağlayamaması sebebiyle gümüş nanoparçacıkları gözlemlenememiştir. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri alınmıştır.

Yapılan çalışmalara bakıldığında, elde edilen kitinlerin hiçbirinin stereo mikroskop görüntüsünden bahsedilmemektedir.

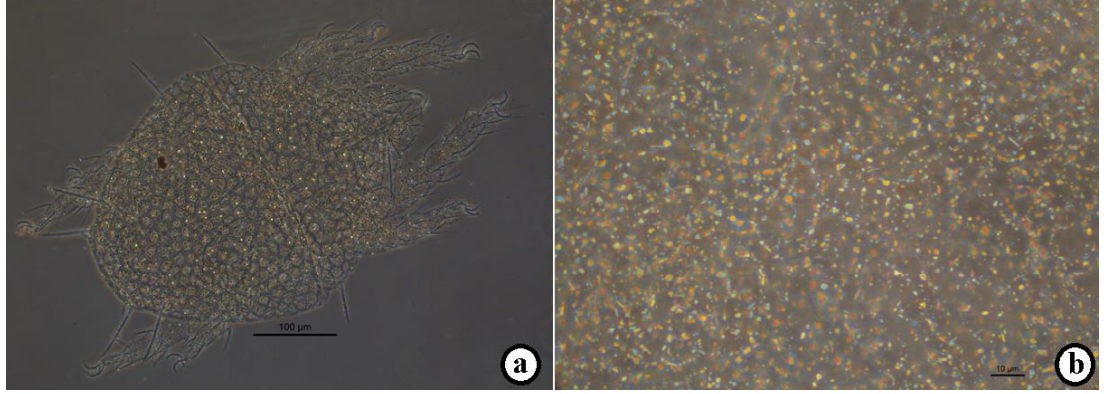
#### **4.2. Kitinin Faz-Kontrast Donanımlı Işık Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi**

Elde edilen kitinin aşırı derecede şeffaf olması, ışık mikroskobundaki ışığın yansıyamamasına sebep olduğundan görüntülerde parlama meydana gelişir. Aslında bu durum, elde edilen kitinde kalıntı olmadığını, *E. absens*'in içeriğinin (yapısındaki mineral, yağ ve protein türlerinin) başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını morfolojik olarak ispatlamaktadır.

Çalışmalar, *Trachytes pauperior* (Acari: Mesostigmata) türünden elde edilen kitin dışında hiçbir kitinin ışık mikroskobu görüntüsünün alınmadığını göstermektedir (Çakmak ve Koç Bilican, 2021).

#### **4.3. Gümüş Nanoparçacıkları Dekore Edilmiş Kitinin Faz-Kontrast Donanımlı Işık Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi**

Gümüş nanoparçacıkların dekore edildiği kitinin, faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobundaki görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir. Görüntülerdeki sarı, mavi, turuncu ve beyaz renkli noktalar gümüş nanoparçacıklarını göstermektedir. Elde edilen görüntüler gümüş nanoparçacıklarının kitin yüzeyinde homojen bir dağılım sergilediğini göstermektedir.



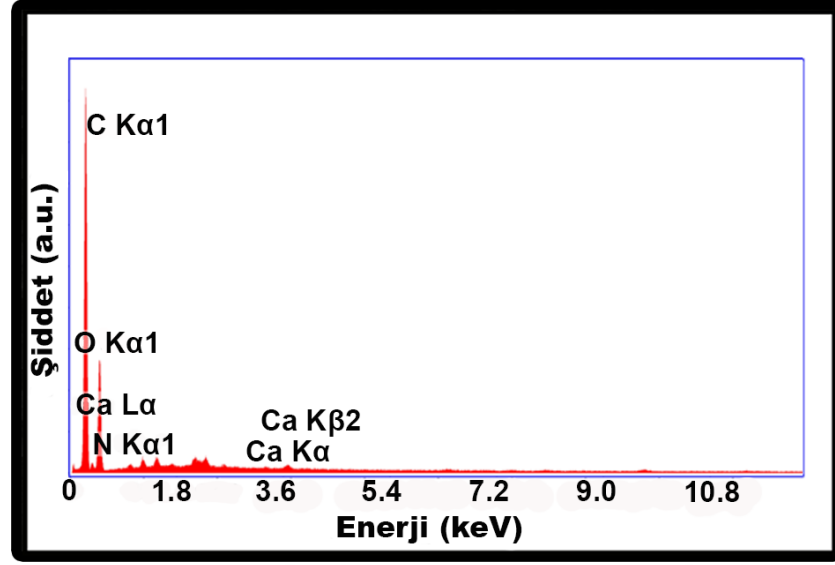
**Şekil 4.3.** Gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobu görüntüleri (a) genel görünüm, (b) gümüş nanoparçacıkların yakından görünümü

Yapılan çalışmalara bakıldığında, daha önce kitin üzerine gümüş nanoparçacıkların dekore edilmediği görülmektedir. Bu çalışma ile kitin üzerine ilk kez gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş ve ışık mikroskobunda görüntüsü alınmıştır.

#### **4.4. Kitinin SEM-EDX Verilerinin Değerlendirilmesi**

*Eustigmaeus absens*'ten elde edilen kitinin EDX spektrumu Şekil 4.4'te, kütlece ve atomik element yüzdeleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Buna göre elde edilen kitinin yapısında ağırlıklı olarak karbon (C), oksijen (O) ve azot (N) elementlerinin bulunduğu ve eser miktarda kalsiyum (Ca) elementinin yer aldığı görülmektedir. C, N ve O elementlerinin varlığı kitinin protein yapısında olduğunu gösterirken, eser miktarda Ca elementinin dışındaki farklı elementlere rastlanmaması elde edilen kitinin neredeyse %100 saflıkla elde edildiğini göstermektedir.

Akarlarda diğer eklem bacaklılarda olduğu gibi kutikula tabakası farklı gruplara göre değişik derecelerde sertleşmiştir yani sklerotize olmuştur (sklerotizasyon). Sertleşmede kitin lifleri protein yapısındaki bir matriks içine gömülerek hem sağlam hem de esnek bir karışım oluşturur. Ayrıca bu yapıya kalsiyum ve diğer inorganik tuzların eklenmesi ile sertliğin derecesi artmıştır (Doğan ve Ayyıldız, 2023). Çalışma kapsamında elde edilen kitindeki kalsiyumun varlığı bunu desteklemektedir.



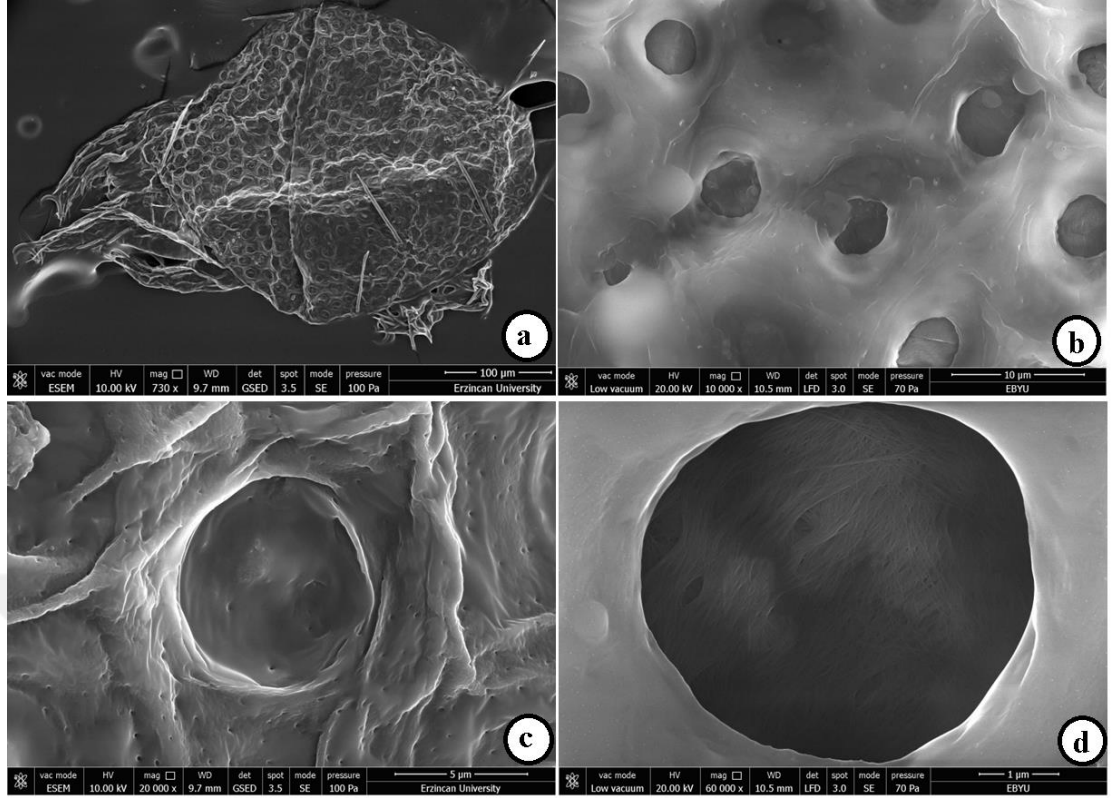
Şekil 4.4. *Eustigmaeus absens* kitininin EDX spektrumu

Tablo 4.1. *Eustigmaeus absens* kitininin element analiz verileri

|                   | C     | N   | O     | Ca   |
|-------------------|-------|-----|-------|------|
| <b>Kütle (%)</b>  | 56,04 | 8,7 | 35,05 | 0,21 |
| <b>Atomik (%)</b> | 62,35 | 8,3 | 29,27 | 0,07 |

*E. absens*'ten elde edilen kitinin SEM görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Kitinin yüzeyi incelendiğinde, makro gözenekler, mikro gözenekler ve yüzeyin tamamında kesik nanolifler görülmektedir. Makro gözeneklere daha yakından bakıldığında, kesintisiz nanoliflerin bir araya gelerek farklı boyutlarda gözenekler oluşturduğu anlaşılmaktadır.





**Şekil 4.5.** *Eustigmaeus absens* kitininin SEM görüntüsü: (a) kitinin genel görüntüsü, (b) makro gözenekler, (c) makro gözenekler ve çevresindeki mikro gözenekler, (d) makro gözeneklerin yakından görünümü

Literatüre bakıldığında, kitin yüzeyinin canlı gruplarına göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Mantarlardan elde edilen kitinin yüzey morfolojisinde genellikle nanolifli yapıların, gözeneklerin görülmediği ve yüzey morfolojisinin düz olduğu anlaşılmaktadır (Yen ve Mau, 2007). Karides (Crustacea: Malacostraca) kabuğundan elde edilen kitin yüzeyinin pürüzsüz ve çok sayıda gözeneğe sahip olduğu bilinmektedir (Abdel-Rahman vd., 2015). Öte yandan *Ariolimax californicus* (Gastropoda: Stylommatophora) sümüklüböceğinden elde edilen kitinde lifli yüzey morfolojisi görülürken (Montroni vd., 2019), *Hogna radiata* ve *Geolycosa vultuosa* (Arachnida: Araneae) adındaki farklı iki örümcekte elde edilen kitinlerde makro ve mikro gözeneklerle birlikte nanoliflere rastlanmıştır. (Kaya vd., 2014b). Farklı eklembacaklılardan elde edilen kitinlerde de farklı boyutlarda gözenekler, kesik nanolifler ve pürüzsüz lifler görülmüştür (Sajomsang ve Gonil, 2010; Kaya vd., 2017; Seyyar ve Demir, 2020). *Vespa crabro* (Insecta: Hymenoptera) yaban arısından elde edilen kitinde ise gözeneklere ve liflere ek olarak balık pulu şeklinde nano lifli yapılar görülmüştür (Kaya vd., 2016). *Ixodes ricinus* (Acari:

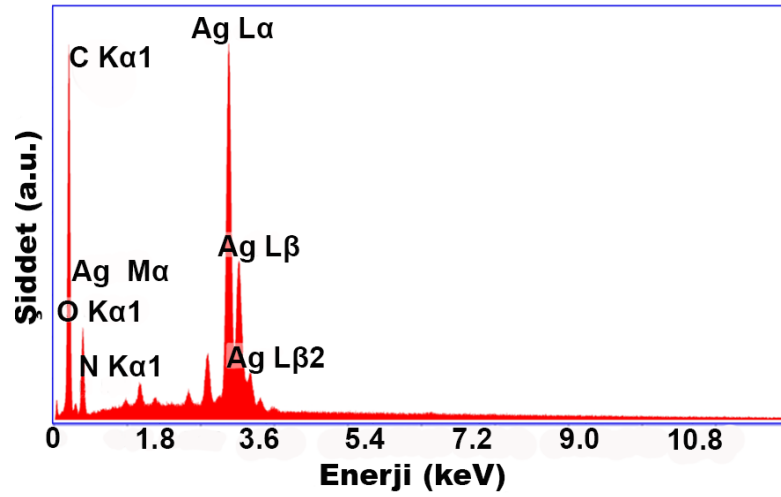
Ixodida) sert kene türünden elde edilen kitinin yüzey morfolojisinde iç içe karışık lifler gözlenmiştir (Kaya vd., 2015a). *Trachytes pauperior* akar türünden elde edilen kitinin yüzey morfolojisinin de nanolifler ve gözeneklere sahip olduğu görülmüştür (Çakmak ve Koç Bilican, 2021).

Akarların yaşam şekli ile derinin yapısı arasında sıkı bir ilişki vardır. Deride katlanmalar, kırışıklıklar, çizgilenmeler, ağsı yapılar, küçük yumrular, tümsekler, çöküntüler ve gözenekler bulunabilir. Çalışma sonucunda elde edilen görüntüler ayrıntılı olarak incelendiğinde; kitinsi lifli yapının kesik kesik olduğu, bazı kısımlarda paralel bazı kısımlarda çapraz dizayn edildiği görülmüştür. Bu durum literatürle uyum içindedir (Sajomsang ve Gonil, 2010; Kaya vd., 2014b; Kaya vd., 2015a; Kaya vd., 2017; Seyyar ve Demir, 2020; Çakmak ve Koç Bilican, 2021).

Derideki bazı epidermis hücreleri salgı yapacak şekilde özelleşmiştir. Bunların bağlandığı kanallar, vücut ve bacaklar üzerinde değişik şekillerde olan gözeneklerle sonlanır. Gözenek açıklıkları yuvarlak veya elips şeklinde olabilir (Doğan ve Ayyıldız, 2023). Çalışma kapsamında görüntüleri alınan gözeneklerin yuvarlağa yakın olduğu anlaşılmaktadır. Akarlarda dermal bezlerin işlevleri hala tam olarak bilinmemekle birlikte salgı ürünlerinin semiokimyasal üretimiyle ilişkili olabileceği ve dehidrasyona karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (Doğan ve Ayyıldız, 2023).

#### **4.5. Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin SEM-EDX Verilerinin Değerlendirilmesi**

*E. absens*'ten elde edilen ve üzerinde gümüş nanoparçacıkların dekore edildiği kitinin SEM-EDX spektrumu Şekil 4.6 ve 4.7'de, kütlece ve atomik element yüzdeleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

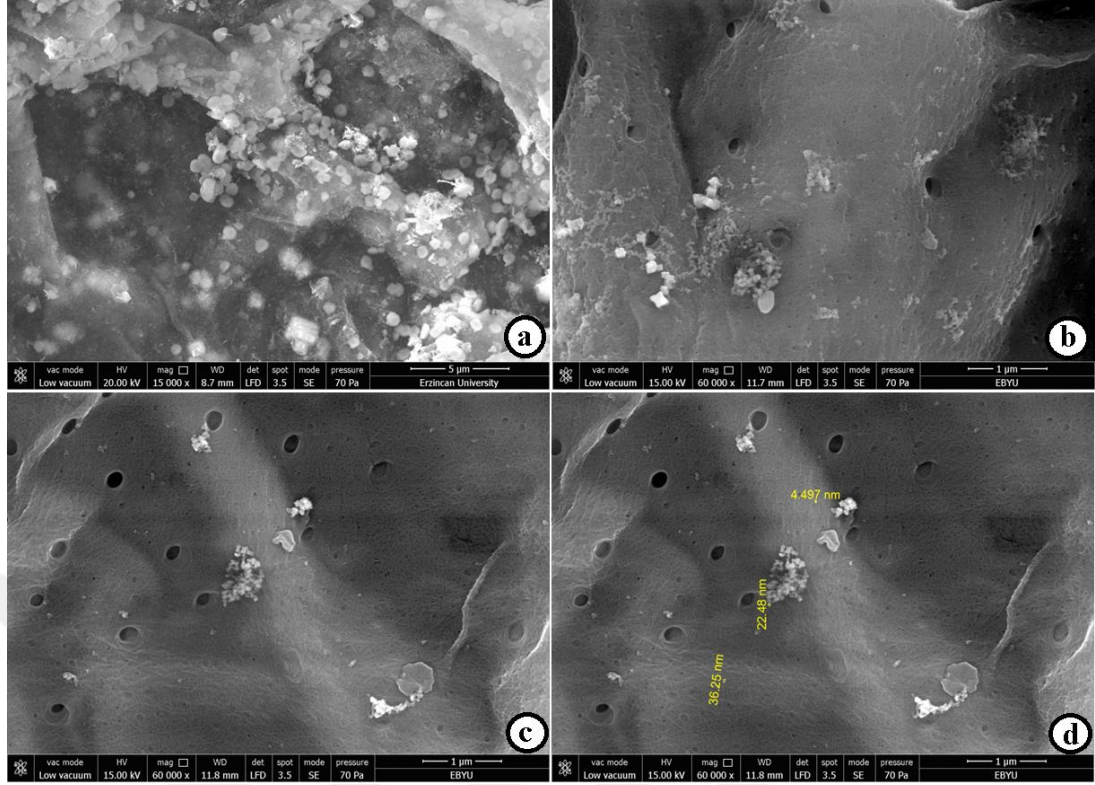


**Şekil 4.6.** Gümüş nanoparçacıklı kitinin EDX spektrumu

**Tablo 4.2.** Gümüş nanoparçacıklı kitinin element analiz verileri

|                   | C     | N    | O     | Ag    |
|-------------------|-------|------|-------|-------|
| <b>Kütle (%)</b>  | 31,67 | 4,79 | 23,17 | 40,37 |
| <b>Atomik (%)</b> | 54,92 | 7,12 | 30,17 | 7,79  |

Kitinin protein yapısından kaynaklanan C, O ve N elementlerine ilaveten başarılı bir dekorasyon işlemini ispatlayan Ag elementinin varlığı gözlenmiştir. Bu elementlere ilaveten başka elementlerin tespit edilmemesi gümüş nanoparçacıklarının saf olarak elde edilen kitinin üzerine dekore edildiğini ispatlamaktadır. Buna ilaveten gümüşün metalik halde olduğu ve farklı tuz yapılarının bulunmadığını göstermektedir.

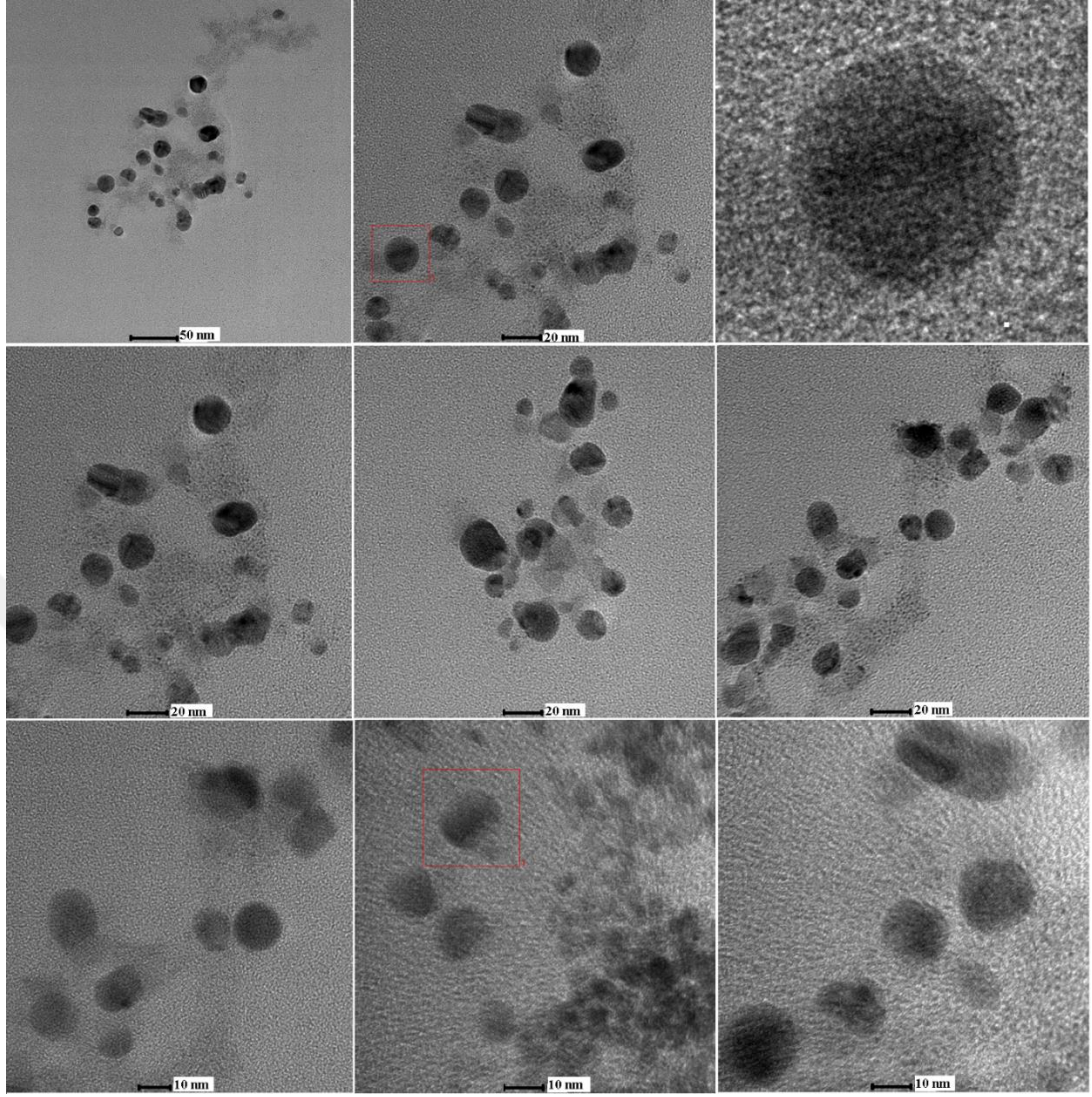


**Şekil 4.7.** Gümüş nanoparçacıklı kitinin SEM görüntüleri

SEM görüntüleri sonucunda kitin üzerine dekore edilen gümüşlerin, kitin yüzeyinin tamamında farklı aralıklarla bulundukları görülmüştür (Şekil 4.7a-d). Gümüşlerin boyutları ölçüldüğünde, 4 nm ile 37 nm arasında farklılıklar gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.7d).

#### 4.6. Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin TEM Verilerinin Değerlendirilmesi

*E. absens*'ten elde edilip üzerine gümüş nanoparçacıkların dekore edildiği kitinin TEM görüntüleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



**Şekil 4.8.** Gümüş nanoparçacıklı kitinin TEM Mikroskobu görüntüleri

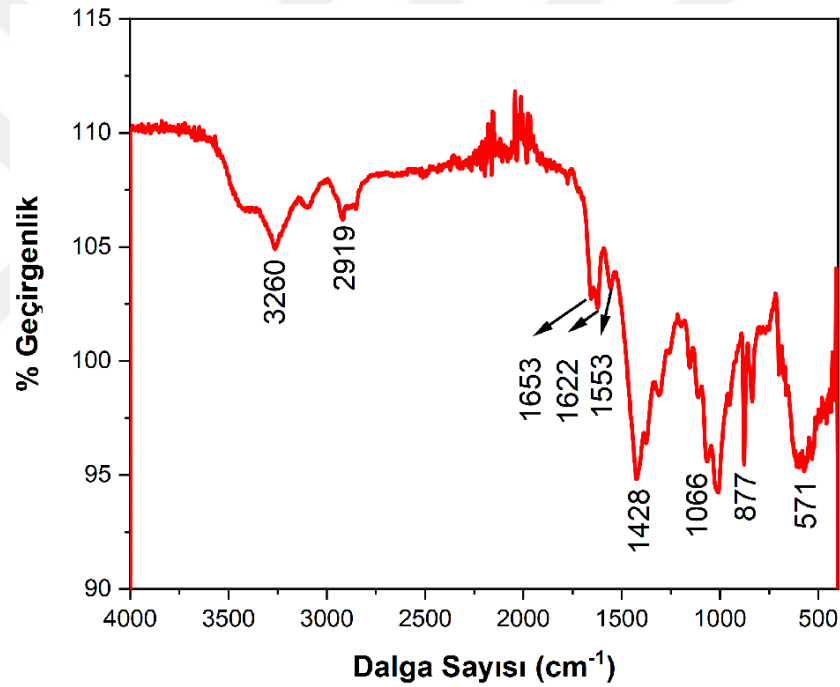
TEM görüntülerinde görüldüğü gibi numunenin kitin bölümü şeffaf görünümde olup, gümüş nanopartiküllerin ise kitin üzerine dekore olduğu açık bir şekilde anlaşılmaktadır. Gümüş nanoparçacıklarının kitin yüzeyindeki dağılımı bazı bölgelerde kısmi yığılmalar şeklinde olmakla beraber nispeten homojen dağılım sergilediği görülmektedir. Dekore olan gümüş nanoparçacıkları küresel yapıya sahip olup parçacık çapları 6 ile 20 nm arasında değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında elde edilen hiçbir kitinin ve kitin yüzeyine dekore olmuş gümüş nanoparçacıklarının TEM görüntülerinin alınmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile gümüş nanoparçacıklı kitinin ilk kez TEM görüntüsü alınmıştır. Kitin yüzeyindeki gümüş nanoparçacıkların boyutunun literatürdeki farklı platformlar yüzeyine dekore olmuş gümüş nanoparçacıklarının boyutlarıyla uyum



içerisinde olup, oldukça küçük nanoparçacık çapına sahip olduğu tespit edilmiştir (Kim vd., 2005; Nazeruddin vd., 2014; Xu vd., 2014; Niu vd., 2020). Bilindiği gibi nanoyapıların parçacık boyutu küçüldükçe mikrobiyal aktivitesinde artış gözlenmektedir (Nazeruddin vd., 2014). Çalışmamızdaki gümüş nanoparçacıklarının da küçük boyutta olması antibakteriyel aktivite için avantajlı bir durumdur.

#### 4.7. Kitininin ATR-FTIR Verilerinin Değerlendirilmesi

*Eustigmaeus absens* türünden elde edilen kitinin ATR-FTIR spektrumu Şekil 4.9’da, önemli karakteristik titreşim bantları ve dalga sayıları ise Tablo 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.9. *Eustigmaeus absens*’ten elde edilen kitinin ATR-FTIR spektrumu

Kızılötesi spektroskopisi kitinin protein yapısının moleküler konformasyonunu araştırmak için kullanılan en önemli tekniklerden birisidir (Shao vd., 1999; Nimmen vd., 2008). Moleküler konformasyonun tayininde protein yapısında bulunan amid gruplarına ait amid-I, amid-II ve amid-III bantları olarak adlandırılan ve 1200-1700  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gelen titreşim pikleri esas alınır. Amid-I bantları C=O gerilmesinden kaynaklanır ve genellikle 1590-1700  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlenir. Amid-I bandının ikili pik halinde görülmesi kitinin alfa formunda olduğunu ifade ederken, tek pik halinde görülen amid-I

bandı kitinin beta formda olduğunu ifade eder (Jang vd., 2004). Amid-II bandı ise N-H ve C-N eğilme titreşimleri ve amid-III bandı ise C-H eğilme titreşimlerinden meydana gelir ve 1460-1590  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlenirler (Koperska vd., 2014).

**Tablo 4.3.** *Eustigmaeus absens*'ten elde edilen kitinin ATR-FTIR titreşim bantları

| Dalga Sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Titreşim Türü                          |
|-----------------------------------|----------------------------------------|
| 3260                              | N-H gerilme                            |
| 2919                              | Alifatik C-H gerilme                   |
| 1653                              | Amid-I bandı (C=O gerilme)             |
| 1622                              | Amid-I bandı (C=O gerilme)             |
| 1553                              | Amid-II bandı (N-H eğilme, C-N eğilme) |
| 1371                              | C-H eğilmesi                           |
| 1306                              | Amid-III bandı (C-H eğilme)            |
| 1066                              | C-O-C gerilmesi                        |
| 1010                              | C-O eğilmesi                           |

*E. absens* kitininin ATR-FTIR spektrumunda 3260, 2919, 1653, 1622, 1553, 1371, 1306, 1066 ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de pikler gözlenmiştir. 3260  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pik protein yapısındaki N-H gerilme titreşiminden kaynaklanırken, 2919 ve 2854  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pikler ise sırasıyla asimetrik ve simetrik alifatik C-H gerilme titreşimine karşılık gelir. 1653 ve 1622  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen IR pikleri amid-I bandını ifade etmektedir. Amid-I bandının ikiye ayrılmış şekilde gözlenmesi kitinin alfa formda olduğunu göstermektedir (Jang vd., 2004). 1553  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik amid-II bandının varlığını gösterirken, 1371  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenen pik C-H eğilmesini, 1306  $\text{cm}^{-1}$  amid-III bandının varlığını, 1066  $\text{cm}^{-1}$  C-O-C gerilmesini, 1010  $\text{cm}^{-1}$  C-O eğilmesini ifade etmektedir.

Böcekler (Hexapoda) üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) türünden elde edilen kitinin amid-I bantı 1620-1654  $\text{cm}^{-1}$ 'de ikili pik halinde ve amid-II bantı 1542  $\text{cm}^{-1}$ 'de (Kaya vd., 2014a); *Blattella germanica* (Blattodea), *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera), *Blaps tibialis* (Coleoptera), *Cetonia aurata* (Coleoptera), *Geotrupes stercorarius* (Coleoptera), *Calliphora vicina* (Diptera), *Coreus marginatus* (Hemiptera), *Lygaeus equestris* (Hemiptera), *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera), *Bombus lapidarius* (Hymenoptera), *Formica clara* (Hymenoptera),

*Cordulia aenea* (Odonata), *Libellula quadrimaculata* (Odonata) türlerinden elde edilen kitinlerin amid-I bantları 1620-1654 cm<sup>-1</sup>'de ikili pik halinde ve amid-II bantları 1553 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmiştir (Kaya vd., 2014a; Kaya vd., 2015a). Örümceklerden (Araneae) *Hogna radiata* ve *Geolycosa vultuosa*'dan elde edilen kitinlerin amid-I bantları 1619-1654 cm<sup>-1</sup>'de ikili pik halinde ve amid-II bantları 1542 cm<sup>-1</sup>'de (Kaya vd., 2014b), *Argiope bruennichi*, *Chaetopelma olivaceum* türlerinden elde edilen kitinlerin amid-I bantları 1620-1654 cm<sup>-1</sup>'de ikili pik halinde ve amid-II bantları 1553 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmiştir (Kaya vd., 2015a). Akarlardan (Acari) *Ixodes ricinus*'dan (Ixodida) elde edilen kitinin amid-I bantı 1620-1654 cm<sup>-1</sup>'de ikili pik halinde ve amid-II bantı 1553 cm<sup>-1</sup>'de (Kaya vd., 2015a) ve *Trachytes pauperior*'dan (Mesostigmata) elde edilen kitinin amid-I bantı 1621-1651 cm<sup>-1</sup>'de ikili pik halinde ve amid-II bantı 1556 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmiştir (Çakmak ve Koç Bilican, 2021). Buna ilaveten bu çalışmalarda, kitine ait N-H gerilmesi, alifatik C-H gerilmeleri, C-H eğilmeleri, Amid-III bandı, C-O-C gerilmesi ve C-O eğilmesini karşılık gelen IR piklerinin değerlerinin çalışmamızla uyumlu olduğu görülmüştür. Elde edilen kitinlerin hepsinin alfa forma sahip olduğu tespit edilmiştir (Kaya vd., 2014a, b; Kaya vd., 2015a; Çakmak ve Koç Bilican, 2021). Tüm bunlar, çalışma kapsamında elde edilen kitinin yüksek saflıkta olduğunu ortaya koymaktadır.

#### 4.8. Kitinin Asetilasyon Derecesinin Değerlendirilmesi

Asetilasyon derecesi (AD), çeşitli organizmalardan elde edilen kitinin saflığını ortaya koyan önemli bir parametredir ve NMR, XRD, EA ve FTIR analizlerinden hesaplanmaktadır (Majtán vd., 2007; Yen vd., 2009; Kaya vd., 2014a; Kaya vd., 2015a). FTIR'dan hesaplanan AD değeri, 1655<sup>-1</sup> ve 3450<sup>-1</sup> 'deki IR piklerinin absorbans değerlerinin kullanılması ile aşağıdaki eşitlikten bulunur:

$$\text{Asetilasyon derecesi (AD): } (A_{1655} / A_{3450}) \times 100$$

Bu çalışmada elde edilen kitinin AD değeri, yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve %117 bulunmuştur. Yapılan çalışmalara bakıldığında; *Blattella germanica*'dan (Insecta: Blattodea) elde edilen kitinin AD değeri EA ile hesaplandığında %94,5 bulunurken FTIR ile hesaplandığında %127, *Cetonia aurata*'dan (Insecta: Coleoptera) elde edilen kitin AD değeri EA ile hesaplandığında %70,1 bulunurken FTIR ile

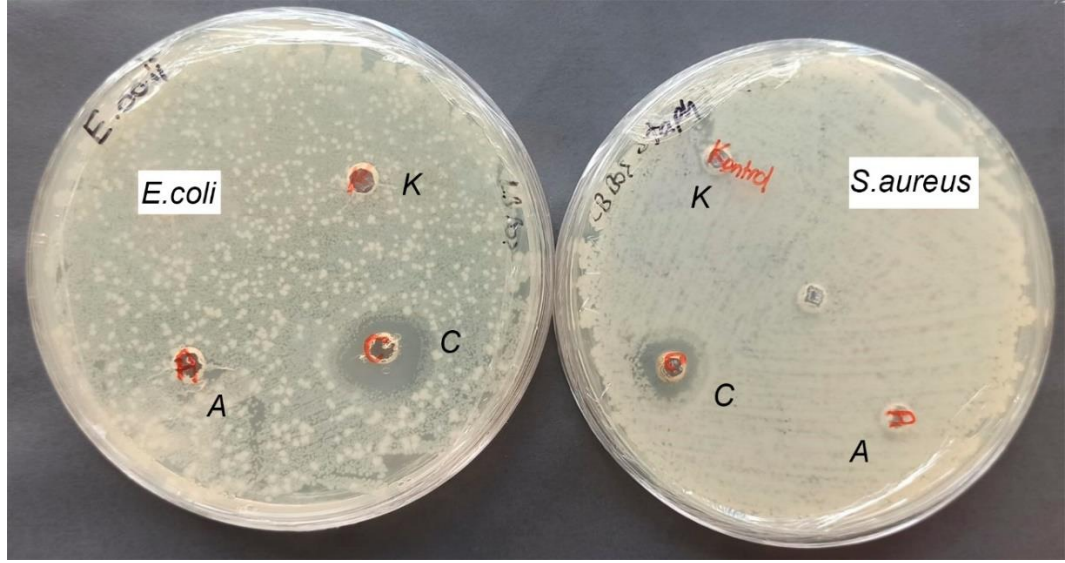


hesaplandığında %128, *Coreus marginatus*'tan (Insecta: Hemiptera) elde edilen kitinin AD değeri EA ile hesaplandığında %79,1 bulunurken FTIR ile hesaplandığında %150 bulunmuştur (Kaya vd., 2015a). Tüm bunlar, *Eustigmaeus absens*'ten elde edilen kitinin AD değerinin literatürle uyum içinde olduğunu ve elde edilen kitinin yüksek saflık gösterdiğini desteklemektedir. Literatürde, FTIR ile hesaplanan AD değerinin EA ile hesaplanan AD değerine göre daha yüksek çıktığı ve bu değer çoğunlukla %100'ün üzerinde olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Majtán vd., 2007; Yen vd., 2009; Kaya vd., 2014a; Kaya vd., 2015a). Bu durum EA analizinin kantitatif, FTIR analizinin ise yarı kantitatif olmasından kaynaklanmaktadır.

#### **4.9. Kitin ve Gümüş Nanoparçacıklı Kitinin Antibakteriyel Aktivite Verilerinin Değerlendirilmesi**

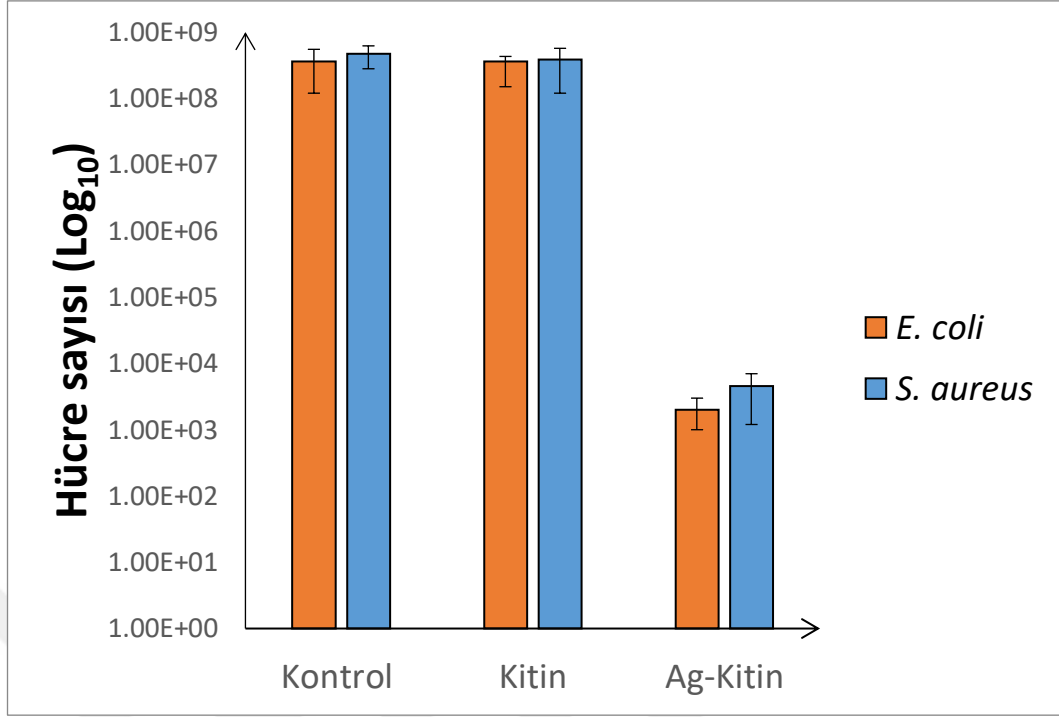
Petri kaplarındaki inhibisyon zonları incelendiğinde (Şekil 4.10) kontrol ve saf kitin her iki bakteriye karşı antibakteriyel aktivite göstermemesine rağmen gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitine ait kuyularda *E. coli* ATCC 25922 için 15 mm, *S. aureus* ATCC 29213 için 11 mm çapında etkinlik zonları tespit edilmiş olup gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin her iki mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesinin bulunduğu anlaşılmıştır. Literatürde önerilen olası mekanizma göz önüne alınarak, gümüş nanoparçacıkların inkübasyonu sırasında  $Ag^+$  iyonları ekilen kuyucuklarda kademeli olarak dağılır ve ardından bu  $Ag^+$  iyonları bakteri hücre duvarına yapışır ve metabolik aktiviteyi bozar. Böylece hücre zarının deformasyonuna bağlı olarak zar geçirgenliğinin artmasıyla beraber gerek  $Ag^+$  iyonları gerekse gümüş nanoparçacıkları bakteri hücrelerine difüze olarak DNA hasarına sebep olurlar (Slavin vd., 2017; Doğan, 2022; Poudel ve Kim, 2023).

Gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin, Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) bakterinin antibakteriyel aktivitesinin Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) bakteriye karşı olan antibakteriyel aktiviteden daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum Gram-negatif (*E. coli* ATCC 25922) bakterideki negatif yüke sahip yapılar pozitif yüklü  $Ag^+$  iyonlarını elektrostatik olarak çekerek bakteri hücrelerine difüzyonlarını ve hücreye alınımlarını arttırarak daha fazla hasara sebep olmalarıyla ilişkilendirilebilir (Slavin vd., 2017; Doğan, 2022).



**Şekil 4.10.** Saf kitin ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213'e karşı antibakteriyel aktivitelerinin kuyu difüzyon görüntüleri. K (Kontrol), A (Kitin), C (Gümüş nanoparçacıklı kitin)

Maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri ayrıca sıvı besiyeri ortamında da test edilmiştir. Bunun için yukarıda bahsedildiği gibi bakteri çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Solüsyonların 500  $\mu$ L'si steril Eppendorf tüpüne aktarılmış ve üstlerine kimyasallar konsantrasyonları 100  $\mu$ M olacak şekilde ilave edilmiştir. Eppendorf tüpler 37 °C'de, 150 rpm'de 18 sa. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürden seri sulandırma yapılarak canlı hücre sayımı yapılmıştır. Canlı hücre sayıları üç deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Kontrol (çözücü), saf kitin (A) ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitin (C) 100  $\mu$ M konsantrasyonları ile yapılan deneylerde elde edilen canlı bakteri sayısındaki azalma grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi saf kitin (A) gerek Gram-negatif (*E. coli* ATCC 25922) gerekse Gram-pozitif (*S. aureus* ATCC 29213) bakterisine karşı ihmal edilecek bir antibakteriyel aktivite sergilerken, gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitin canlı bakteri sayısında her iki bakteri için logaritmik olarak yaklaşık 105 inhibisyona sebebiyet verdiği anlaşılmıştır. Bu sonuçlara göre gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin hem *E. coli* ATCC 25922 hem de *S. aureus* ATCC 29213 bakteri suşları üzerine antibakteriyel aktivitesi tespit edilmiştir.



**Şekil 4.11.** Saf kitin ve gümüş nanoparçacıkları dekore edilmiş kitinin *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213'e karşı bakteri sayısındaki azalma grafikleri

Gümüş nanoparçacıklarının antibakteriyel özellikleri geçmişten günümüze çok uzun yıllardır bilinmekte olup literatürde birçok araştırma grubu tarafından da çalışılmıştır (Doğan, 2022). Gümüş nanoparçacıklarının şekilleri ve boyutları bu nanoparçacıkların antibakteriyel özelliklerini önemli ölçüde etkileyen parametrelerdendir. Literatürde verildiği gibi daha küçük boyutlu gümüş nanoparçacıklarının bakterinin membranından geçişinin kolay olması ve  $Ag^+$  iyonlarının ortama salınımının daha kolay olmasından ötürü küçük boyuta sahip gümüş nanoparçacıklar büyük nanoparçacıklara nispeten daha iyi antibakteriyel etki sergilemektedir (Valgas vd., 2007; Sharma vd., 2009; Kanmani ve Lim, 2013; Acharya vd., 2018; Premkumar vd., 2018). Buna ilaveten literatürde yapılan çalışmalarda farklı şekillere sahip olan (küresel, kübik, üçgen, altıgen ve nanoçubuk) gümüş nanoparçacıklarının da farklı antibakteriyel aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir (Doğan, 2022). Mevcut çalışmada gümüş nanoparçacıkların 6-20 nm arasında farklılık gösterdiği ve küresel şekilde olduğu belirlenmiştir. Gümüş nanoparçacıkların oldukça küçük boyutlanması antibakteriyel aktivitesini artırdığı anlaşılmaktadır.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile ilk defa, bir akar türü olan *Eustigmaeus absens*'in 3 boyutlu yapısı korunarak başarılı bir şekilde kitin elde edilmiş, elde edilen kitin üzerine gümüş nanopartikülleri dekore edilmiş ve hem kitin hem de gümüş nanoparçacıklı kitinlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri; stereo mikroskop, faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı X-ışını spektrofotometresi (EDX), seyreltilmiş toplam yansıma-Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (ATR-FTIR), taramalı elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Ayrıca bu numunelerin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışma tasarlanırken hedefler şu şekilde belirlenmiştir;

1. *Eustigmaeus absens*'ten kitin eldesi,
2. Elde edilen kitinin %100 saflıkta olması,
3. Elde edilen kitin üzerine gümüş nanoparçacık dekorasyonu,
4. Elde edilen kitinin, hangi kitin formuna (alfa, beta, gama) ait olduğunun ortaya konması,
5. Kitinin ve gümüş nanoparçacıklı kitinin yüzey morfolojisinin aydınlatılması,
6. Kitinin ve nanoparçacık dekore edilmiş kitinin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi.

Çalışmanın bu haliyle hedeflere ulaştığı söylenebilir. Araştırma sonucunda, FTIR ve EDX analizlerinden yola çıkarak; *E. absens*'ten kitin eldesi için en uygun HCl çözelti molaritesi 1,5 M ve HCl çözeltisinde işlem görme süresi 6 sa., NaOH molaritesi 1 M ve NaOH'de işlem görme süresi 8 sa. olarak belirlenmiştir. Kitin üzerine gümüş nanokompozit dekorasyonu için SEM ve TEM analizleri sonuçlarından faydalanılarak, 10 mM AgNO<sub>3</sub> içindeki kitinlerin UVA altında bekleme süresi 1 sa. olarak belirlenmiştir.

Yapılan FTIR analizi ile elde edilen kitinin alfa formda olduğu ve yapılan diğer çalışmalarla oldukça uyumlu pikler sergilediği gözlemlenmiştir (Zhang vd., 2000; Paulino vd., 2006; Majtán vd., 2007; Sajomsang ve Gonil, 2010; Liu vd., 2012; Kaya vd., 2014a; Kim vd., 2017). Gözlemlenen piklerin keskinliği elde edilen kitinin saf olduğunu

kanıtlamaktadır. EDX verileri ile kitinin saf olarak elde edildiği desteklenmiştir. Elde edilen kitinin asetilasyon derecesinin %117 bulunması da kitin saflığını yansıtmaktadır. Yapılan SEM, TEM, stereo mikroskop, faz-kontrast donanımlı ışık mikroskobu analizleri ile kitinin ve gümüş nanoparçacıklı kitinin yüzey özellikleri gözlemlenmiş ve elde edilen yüzey morfolojisinin literatürle benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Yen vd., 2009; Kaya vd., 2015a; Ibitoye vd., 2018; Çakmak ve Koç Bilican, 2021). Yapılan antibakteriyel aktivite çalışmaları gümüş nanoparçacıklı kitinin hem *Escherichia coli* ATCC 25922 hem *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterilerine karşı etkili olduğunu göstermiştir.

Literatür, kitin eldesinin daha çok makro organizmalardan yapıldığını, akarlardan kitin eldesi ile ilgili sadece dört çalışmanın (Sobotnik vd., 2008; Choi vd., 2016; Kaya vd., 2015a; Çakmak ve Koç Bilican, 2021) mevcut olduğunu göstermektedir. Akarların mikro boyutta olması ve elde edilmelerinin zahmetli oluşu akarlar üzerindeki çalışmaları kaçınılır hale getirmektedir. Bu tez çalışması ile daha önce üzerinde hiç çalışılmamış bir akar türünden elde edilen kitin verileri bu alanda ve temel bilimler düzeyinde literatür eksikliğini bir ölçüde giderecek ve katkı sağlayacak niteliktedir.

Çalışmada kullanılan yöntemler kitinin ve gümüş nanoparçacıklı kitinin antibakteriyel, görüntüleme ve yapısal analizleriyle sınırlıdır. Akarlardan elde edilen kitinin optik, termik ve mekanik özelliklerinin açığa çıkarılması literatüre yeni bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca mevcut çalışmada kullanılan akar türünün farklı evrelerinde ve dahil olduğu familyanın (Stigmaeidae) diğer üyelerinde kitin eldesi çalışmaları yapılarak, kitin özelliklerinin daha ayrıntılı ve karşılaştırmalı olarak açığa çıkarılması sağlanabilir.

Kitinin doğal bir kaynak olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, toksik olmaması, antimikrobiyal ve antioksidan oluşu tarım, tıp, gıda endüstrisi, tekstil ve kozmetik gibi alanlarda kullanımını sağlar. Tez çalışması sonucu elde edilen kitin ve gümüş nanoparçacıklı kitin bahsi geçen alanlarda kullanılabilir. Ayrıca elde edilen 3 boyutlu kitin biyolojik zar oluşturma çalışmalarında da değerlendirilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, R.M., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A.M., Fouda, M.M., Soliman, A.Y., Mohamed, F.K., Pinto, T.D. (2015) "Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity", *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107-120.
- Acharya D., Singha K.M., Pandey P., Mohanta B., Rajkumari J., Singha L.P. (2018) "Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria", *Scientific Reports*, 8, 201.
- Acosta, N., Jiménez, C., Borau, V., Heras, A. (1993) "Extraction and characterization of chitin from crustaceans", *Biomass and Bioenergy*, 5(2), 145-153.
- Alberti, G. (2013) "Fine structure of pustules of *Labidostoma luteum* Kramer (Acari, Actinotrichida, Labidostomatidae) with further remarks on the complex cuticle of this mite", *Acarologia*, 53(2), 129-143.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. (2013) "Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review", *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 12-25.
- Chatterjee, T. (2019) "Scanning electron microscopic observation of *Acarothrix grandocularis* (Acari, Halacaridae) and notes on the species of the genus *Acarothrix*", *Acta Biologica*, 26, 117-126.
- Choi, J.P., Lee, S.M., Choi, H.I., Kim, M.H., Jeon, S.G., Jang, M.H., Kim, Y.K. (2016) "House dust mite-derived chitin enhances Th2 cell response to inhaled allergens, mainly via a TNF- $\alpha$ -dependent pathway" *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 8(4), 362-374.
- Crowe, J.H. and Camara, C.G. (1973) "Studies on acarine cuticles I. Cuticular pores in a marine mite", *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 45(3), 757-766.
- Crowe, J.H. (1975) "Studies on acarine cuticles. III. Cuticular ridges in the citrus red mite", *Transactions of the American Microscopical Society*, 98-108.
- Çağlar, B., Afşin, B., Çubuk, O., Tabak, A., Erdal, Eren, Porikli, S. (2010) "Asit aktifleştirilmiş bentonit (Ünye) numelerindeki asidik merkezlerinin teşhisi", *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 3(1), 73-89.
- Çakmak, E. and Bilican, B.K. (2021) "Isolation and characterization of 3D chitin from a mite species *Trachytes pauperior* (Parasitiformes: Uropodina)", *Acarological Studies*, 3(2), 66-72.
- Çırak, Ç. (2005) "Taramalı tünelleme elektron mikroskop yapımı ve temel bilimlere uygulamaları", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta.

- Das, N.G., Khan, P.A., Hossain, Z. (1996) "Chitin from the shell of two coastal portunid crabs of Bangladesh", *Indian Journal of Fisheries*, 43(4), 413-415.
- Demir, Z. and Seyyar, O. (2020) "Isolation and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)", *Acta Biologica Turcica*, 33(4), 252-257.
- Dilkaraoğlu, S., Doğan, S., Erman, O., Sevsay, S., Adil, S. (2016) "Stigmaeid mites (Acari: Raphignathoidea: Stigmaeidae) of Harşit Valley and Örumcek Forests (Turkey)", *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 9, 10-72.
- Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., Galli, E. (2008) "Chitin and chitosan from Basidiomycetes", *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(1), 8-12.
- Doğan, G. (2022) "Tarçın ve karanfil özütleri kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biyosentezi ve antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze.
- Doğan, S. (2007) "Checklist of raphignathoid mites (Acari: Raphignathoidea) of Turkey", *Zootaxa*, 1454, 1-26.
- Doğan, S. (2005) "*Eustigmaeus* mites from Turkey (Acari: Stigmaeidae)", *Journal of Natural History*, 39, 835-861.
- Doğan, S. (2019) "Raphignathoidea (Acari: Trombidiformes) of Turkey: A review of progress on the systematics, with an updated checklist", *Acarological Studies*, 1(2), 129-151.
- Doğan, S. ve Ayyıldız, N. (2023) "Akarların morfolojisi" In *Genel Akaroloji*. Editörler: Doğan, S., Özman-Sullivan, S. Baskıda.
- Doğan, S. and Doğan, S. (2020) "Newly recorded stigmaeid mites (Acariformes: Raphignathoidea: Stigmaeidae) for the fauna of Turkey", *Acarological Studies*, 2(2), 94-118.
- Dönel, G. and Doğan, S. (2011) "The stigmaeid mites (Acari: Stigmaeidae) of Kelkit Valley (Turkey)", *Zootaxa*, 2942, 1-56.
- Egerton, R.F. (2008) "Electron energy-loss spectroscopy in the TEM", *Reports on Progress in Physics*, 72(1), 016502.
- Erman, O., Özkan, M., Ayyıldız, N., Doğan, S. (2007) "Checklist of the mites (Arachnida: Acari) of Turkey. Second supplement", *Zootaxa*, 1532, 1-21.
- Fan, Q.-H., Flechtmann, C.H.W., De Moraes, D.J. (2016) "Annotated catalogue of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata), with a pictorial key to genera", *Zootaxa*, 4176, 1-199.

- Fan, Q.-H., Flechtmann, C.H.W., De Moraes, D.J. (2019) “Emendations and updates to “Annotated catalogue of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata), with a pictorial key to genera”, *Zootaxa*, 4647(1), 88-103.
- Fan, Q.-H. and Zhang, Z.Q. (2005) “Raphignathoidea (Acari: Prostigmata)”, *Fauna of New Zealand*, 52, 1-400.
- Fernando, L., Poblete, M., Ongkiko, A., Diaz, L. (2016) “Chitin extraction and synthesis of chitin-based polymer films from Philippine blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) shells”, *Procedia Chemistry*, 19, 462-468.
- Freeman, P., Zhang, X., Vurgaftman, I., Singh, J., Bhattacharya, P. (1996) “Optical control of 14 GHz MMIC oscillators based on InAlAs/InGaAs HBTs with monolithically integrated optical waveguides”, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 43(3), 373-379.
- Gardner, K.H. and Blackwell, J. (1975) “Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin”, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(8), 1581-1595.
- Gibbs, K.E. and Morrison, F.O. (1959) “The cuticle of the two-spotted spider mite, *Tetranychus telarius* (Linnaeus) (Acarina: Tetranychidae)”, *Canadian Journal of Zoology*, 37(5), 633-637.
- Guin, D., Manorama, S.V., Latha, J.N.L., Singh, S. (2007) “Photoreduction of silver on bare and colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles/nanotubes: synthesis, characterization, and tested for antibacterial outcome”, *The Journal of Physical Chemistry*, 111(36), 13393-13397.
- Herth, W. and Barthlott, W. (1979) “The site of  $\beta$ -chitin fibril formation in centric diatoms. I. Pores and fibril formation”, *Journal of Ultrastructure Research*, 68(1), 6-15.
- Hong, K.H., Park, J.L., Sul, I.H., Youk, J.H., Kang, T.J. (2006) “Preparation of antimicrobial poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles “, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 44(17), 2468-2474.
- Huet, G., Hadad, C., Husson, E., Laclef, S., Lambertyn, V., Farias, M.A., Van Nhien, A.N. (2020) “Straightforward extraction and selective bioconversion of high purity chitin from *Bombyx eri* larva: Toward an integrated insect biorefinery”, *Carbohydrate Polymers*, 228, 115382.
- Ibitoye, E.B., Lokman, I.H., Hezmee, M.N.M., Goh, Y.M., Zuki, A.B.Z., Jimoh, A.A. (2018) “Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket”, *Biomedical Materials*, 13(2), 025009.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., Saimoto, H. (2011) “Preparation of chitin nanofibers from mushrooms”, *Materials*, 4(8), 1417-1425.



- Ioffe-Uspensky, I., Mumcuoğlu, K.Y., Uspensky, I., Galun, R. (1997) “The cuticle and some cuticular structures in two tick species (Acari: Ixodidae) vectors of Rickettsioses”, 10th Wroclaw Parasitological Conference Parasites *sensu lato* in the Modern Laboratories of the World, Karpacz, Poland, 22.
- Jalal, A.F., Risheed, C.M., Ibrahim, B.M. (2012) “Optimization of chitin extraction from chicken feet”, ***Journal Anal Bioanal Techniques***, 3(5).
- Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H., 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, 3423-3432.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Menteş, A., Özusağlam, M.A., Çakmak, Y.S. (2014a) “Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)”, ***Materials Science and Engineering***, 45, 72-81.
- Kaya, M., Bitim, B., Mujtaba, M., Koyuncu, T. (2015b) “Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*)”, ***International journal of biological macromolecules***, 81, 443-449.
- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelytė, V., Baran, T., Seyyar, O., Kabalak, M. and Yurtmen, H. (2015a) “How taxonomic relations affect the physicochemical properties of chitin”, ***Food Biophysics***, 11(1), 10-19.
- Kaya, M., Sargin, I., Sabeckis, I., Noreikaite, D., Erdonmez, D., Salaberria, A.M., Labidi, J., Baublys, V., Tubelytė, V. (2017) “Biological, mechanical, optical and physicochemical properties of natural chitin films obtained from the dorsal pronotum and the wing of cockroach”, ***Carbohydrate Polymers***, 163, 162-169.
- Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Erdoğan, S., Kar, M. (2014b) “A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology”, ***International Journal of Biological Macromolecules***, 65, 553-558.
- Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I., Mujtaba, M. (2016) “Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp)”, ***Carbohydrate polymers***, 145, 64-70.
- Kanmani P. and Lim S.T. (2013) “Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens”, ***Process Biochemistry*** 48, 1099-1106.

- Kim, M.-W., Song, Y.-S., Han, Y.S., Jo, Y.H., Choi, M.H., Park, Y.-K., Kang, S.H., Kim, S.-A., Choi, C., Jung, W.-J. (2017) "Production of chitin and chitosan from the exoskeleton of adult two-spotted field crickets (*Gryllus bimaculatus*)", **Entomological Research**, 47(5), 279-285.
- Kim, Y.H., Lee, D.K., Kang, Y.S. (2005) "Synthesis and characterization of Ag and Ag-SiO<sub>2</sub> nanoparticles", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 257, 273-276.
- Koçer, İ. (2015) "Farklı yöntemlerle kitosan eldesi ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara.
- Koperska, M.A., Pawcenis, D., Bagniuk, J., Zaitz, M.M., Missori, M., Łojewski, T., Łojewska, J. (2014) "Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy", **Polymer Degradation and Stability**, 105, 185-196.
- Kumar, M.N.V. (2000) "A review of chitin and chitosan applications", **Reactive and Functional Polymers**, 46(1), 1-27.
- Kumari, S. and Rath, P.K. (2014) "Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeo rohita*) fish scales", **Procedia Materials Science**, 6, 482-489.
- Kurita, K. (2006) "Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans", **Marine Biotechnology**, 8, 203-226.
- Kuzu, B.S. (2008) "Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu", Yüksek lisans tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana.
- Küçükgülmez, A. (2018) "Extraction of chitin from crayfish (*Astacus leptodactylus*) shell waste", **Alinteri Journal of Agriculture Science**, 33(1), 99-104.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., Yang, Q. (2012) "Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky", **Molecules**, 17(4), 4604-4611.
- Locher, N., Klimpel, S., Abdel-Ghaffar, F., Al Rasheid, K.A.S, Mehlhorn, H. (2010) "Light and scanning electron microscopic investigations on MiteStop treated poultry red mites", **Parasitology Research**, 107(2), 433-437.
- Machałowski, T., Wysokowski, M., Tsurkan, M.V., Galli, R., Schimpf, C., Rafaja, D., Ehrlich, H. (2019) "Spider chitin: An ultrafast microwave-assisted method for chitin isolation from *Caribena versicolor* spider molt cuticle", **Molecules**, 24(20), 3736.
- Madejová, J. (2003) "FTIR techniques in clay mineral studies", **Vibrational Spectroscopy**, 31(1), 1-10.

- Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G., Šimúth, J. (2007) “Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 237-241.
- Montroni, D., Zhang, X., Leonard, J., Kaya, M., Amemiya, C., Falini, G., Rolandi, M. (2019) “Structural characterization of the buccal mass of *Ariolimax californicus* (Gastropoda; Stylommatophora)”, *PloS one*, 14(8).
- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Rajeevgandhi, C., Seedeve, P. (2019) “Extraction and characterization of chitin from sea snail *Conus inscriptus* (Reeve, 1843)”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 555-560.
- Mothes-Wagner, U., Seitz, K.A. (1984) “Fine structure of the cuticle and structural changes occurring during moulting in the mite *Tetranychus urticae*. I. Fine structure of the cuticle”, *Acarologia*, 25(3), 253-258.
- Nessa, F., Masum, S.M., Asaduzzaman, M., Roy, S.K., Hossain, M.M., Jahan, M.S. (2010) “A process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste”, *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), 323-330.
- Nazeruddin, G.M., Prasad, N.R., Waghmare, S.R., Garadkar, K.M., Mulla, I.S. (2014) “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract and its anti-microbial activity”, *Journal of Alloys and Compounds*, 583, 272-277.
- Niu, X., Zhang, W., Huang, Y., Wang, L., Li, Z., Sun, W. (2020) “An electrochemical sensing platform amplified with a Au@Ag nanoparticle-decorated three-dimensional N-doped graphene aerogel for ultrasensitive determination of baicalein”, *New Journal of Chemistry*, 44(37), 15975-15982.
- Nimmen, E.V., Clerck, K.D., Verschuren, J., Gellynck, K., Gheysens, T., Mertens, J., Langenhove, L.V. (2008) “FT-IR spectroscopy of spider and silkworm silks Part I Different sampling techniques”, *Vibrational Spectroscopy*, 46, 63-68.
- No, H.K., Meyers, S.P., Lee, K.S. (1989) “Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 575-579.
- Okafor, N. (1965) “Isolation of chitin from the shell of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L.”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 101(2), 193-200.
- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J. (2006) “Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides”, *Carbohydrate polymers*, 64(1), 98-103.
- Poudel, M.B. and Kim, A.A. (2023) “Silver nanoparticles decorated TiO<sub>2</sub> nanoflakes for antibacterial properties”, *Inorganic Chemistry Communications*, 152, 110675.

- Rounsevell, D.E. and Greenslade, P. (1988) "Cuticle structure and habitat in the Nanorchestidae (Acari: Prostigmata)", **Hydrobiologia**, 165, 209-212.
- Premkumar J., Sudhakar T., Dhakal A., Shrestha J.B., Krishnakumar S., Balashanmugam P. (2018) "Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from cinnamon against bacterial pathogens", **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 15, 311-316.
- Pugh, P.J.A., King, P.E., Fordy, M.R. (1987) "A comparison of the structure and function of the cerotegument in two species of Cryptostigmata (Acarina)", **Journal of Natural History**, 21(3), 603-616.
- Ramachandran, V.S. and Beaudoin, J.J. (2000) "Handbook of analytical techniques in concrete science and technology: principles, techniques and applications", **Elsevier**.
- Rinaudo, M. (2006) "Chitin and chitosan: Properties and applications", **Progress in Polymer Science**, 31(7), 603-632.
- Rudall, K.M. (1963) "The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles". In: Advances in insect physiology. Editörler: Beament, J.W.L, Treherne, J.E, Wigglesworth, V.B, **Academic Press**, Cambridge, England, 257-313.
- Sajomsang, W. and Gonil, P. (2010) "Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs", **Materials Science and Engineering**, 30(3), 357-363.
- Seyyar, F. and Demir, H. (2020) "Extraction and physicochemical characterization of chitin from *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 (Arachnida: Opiliones)", **Acta Biologica Turcica**, 33(4), 258-263.
- Shao, Z., Vollrath, F., Sirichaisit J., Young, R.J. (1999) "Analysis of spider silk in native and supercontracted states using Raman spectroscopy", **Polymer**, 40, 2493-2500.
- Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. (2009) "Silver nanoparticles, Green synthesis and their antimicrobial activities", **Advances in Colloid and Interface Science**, 145, 83-96.
- Shin, C.S., Kim, D.Y., Shin, W.S. (2019) "Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities", **International journal of biological macromolecules**, 125, 72-77.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (1998) "Principles of Instrumental Analysis (Enstrümental Analiz İlkeleri)", Çeviri Editörleri: E. Kılıç, H. Yılmaz, **Bilim Yayınları**, Ankara, 299-313.

- Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H. (2017) “Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity”, *Journal of Nanobiotechnology* 15, 65.
- Sobotnik, J., Kudlikova-Krizkova, I., Vancova, M., Munzbergova, Z., Hubert, J. (2008) “Chitin in the peritrophic membrane of *Acarus siro* (Acari: Acaridae) as a target for novel acaricides”, *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 1028-1033.
- Taşer, B. (2019) “Topraktan izole edilen bakterilerle karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.
- Thirunavukkarasu, N. and Shanmugam, A. (2009) “Extraction of chitin and chitosan from mud crab *Scylla tranquebarica* (Fabricius, 1798)”, *International Journal on Applied Bioengineering*, 4(2), 31-33.
- Tokatlı, K. and Demirdöven, A. (2018) “Optimization of chitin and chitosan production from shrimp wastes and characterization”, *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13494.
- Tsukada, M., Khan, M.R., Inoue, E., Kimura, G., Hun, J.Y., Mishima, M., Hirabayashi, K. (2010) “Physical properties and structure of aquatic silk fiber from *Stenopsyche marmorata*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 54-58.
- Üçgül, İ., Sultan, A., Küçükçapraz, D.Ö. (2016) “Farklı hammadde kaynaklarından kitinin saflaştırılması ve tekstil uygulamaları”, *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 9(1), 46-56.
- Valgas, C., Souza, S.M.D., Smânia, E. F., Smânia Jr, A. (2007) “Screening methods to determine antibacterial activity of natural products”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Walter, D.E. and Krantz, G.W. (2009) “Collecting, rearing and preparing specimens. A manual of acarology”, Third edition. Editörler: Krantz, G.W., Walter, D.E. Texas, *Texas Tech University Press*, 83-96.
- Winterowd, J. G. and Sandford, P. A. (1995) “Food Polysaccharides and Their Applications: Chitin and chitosan”, Editör: Alistair M. Stephen, New York, *Marcel Dekker*, 441-441.
- Woolley, T.A. (1973) “Scanning electron microscopy of oribatid mites”, In: Proceedings of the 3rd International Congress of Acarology, Rosicky, B. (Ed.), 31 August 1971, Prague, Czechia, 55-56.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Sams, C.E. (2004) “Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7905-7910.

- Xu, L., Zhang, D., Ming, L., Jiao, Y., Chen, F. (2014) “Synergistic effect of interfacial lattice  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Ag}^0$  clusters in enhancing the photocatalytic performance of  $\text{TiO}_2$ ”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(36), 19358-19364.
- Yang, S.F., Zhang, H.C., Shi, Y.X., Wan, A.J. (2013) “The new technologies in chitin/chitosan preparation”, *Advanced Materials Research*, 143-150.
- Yen, M.T., Mau, J.L. (2007) “Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes”, *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 558-563.
- Yen, M.T., Yang, J.H., Mau, J.L. (2009) “Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells”, *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015) “Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications”, *Marine Drugs*, 13(3), 1133-1174.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano, S. (2000) “Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(1), 99-105.