



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***PRIAPULUS CAUDATUS*'TAN DOĞAL İNCE KİTİN FİLM
ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze ÖZKAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2021

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 18233047 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Gamze ÖZKAN ilgili yönetmenliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra “**PRIAPULUS CAUDATUS'TAN DOĞAL İNCE KİTİN FİLM ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KAYA

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Serkan GÜL

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 19/03/2021

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

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

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

İmza

Gamze ÖZKAN

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecimde benden yardım ve bilgi birikimini esirgemeyen, akademik tecrübelerinden ve fikirlerinden faydalandığım, her zaman bana göstermiş olduğu anlayış, manevi destek, hoşgörü, sabır ve yardımları için, Yüksek Lisans Bitirme Tezimin yürütülmesine danışmanlık eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KAYA' ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim için desteğini esirgemeyen Dr. Martin Vinther Sørensen'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca tezim için doktora öğrencisi Ar.Gör. Bahar Akyüz Yılmaz'a manevi desteği ve öğrettiği bilgileri için teşekkür ederim.

Hücre çalışmalarının yapılmasında ve deneylerin yorumlanmasında yardım eden Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe Karaduman'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince beraber ortak çalışmalar yaptığımız, birbirimizden desteğimizi, bilgilerimizi ve yardımlarımızı esirgemediğimiz grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

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

Gamze ÖZKAN
AKSARAY, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Kitinin Bilim Dünyasındaki Yeri	5
2.2 Kitin Özellikleri ve Uygulamaları	6
2.3 Kitin Film	8
2.4 Beta Kitin	10
2.5 <i>Priapulius caudatus</i>	11
3. MALZEME VE YÖNTEM	12
3.1 Malzeme Temini.....	12
3.2 Kullanılan Materyaller	12
3.3 Kitin İzolasyonu	12
3.3.1 Minerallerin uzaklaştırılması	12
3.3.2 Proteinlerin uzaklaştırılması	13
3.3.3 Renk giderme.....	13
3.4 Kitin İçeriği	13
3.5 Karakterizasyon.....	13
3.5.1 Fourier dönüşümlü infrared spektrometre (FT-IR).....	14
3.5.2 Termogravimetrik analiz (TGA).....	14
3.5.3 X-Işını kırınım yöntemi (XRD).....	14
3.5.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	14
3.5.5 Filmin kalınlığı	14
3.5.6 Elemental analiz.....	15
3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları	15
3.6.1 Hücre kültürü	15
3.6.2 MTT testi	15
3.6.3 İstatiksel analiz	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	17
4.1 Kitin İçeriği	17
4.2 FT-IR	18
4.3 TGA.....	20
4.4 XRD.....	23
4.5 <i>P. caudatus</i> 'tan İzole Edilen Kitinlerin Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri	24
4.6 Filmin Kalınlığı	26
4.7 Elemental Analiz	27
4.8 Hücre Kültürü Çalışmaları	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ.....	39

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PRIAPULUS CAUDATUS'TAN DOĞAL İNCE KİTİN FİLM ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Gamze ÖZKAN

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

ÖZET

Kitin çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan, selülozdan sonra en bol bulunan polisakkarittir. Eklem bacaklılar, yumuşakçalar, halkalı solucanlar, sünger, alg, mantar ve mercan gibi çeşitli canlıların farklı yapılarında bulunmaktadır. Doğada bulunan kitin formları üç çeşittir: α , β ve γ formları. Kitin toksik olmama, biyobozunabilirlik, biyoyumluluk, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri sayesinde su arıtma, tekstil, ilaç, gıda ve tarımda yaygın kullanım alanlara sahiptir. Kitin ve türevlerinden üretilen biyobozunur filmler, endüstrideki en önemli ürünlerden biridir.

Bu çalışmada, *Priapulus caudatus* (*P. caudatus*) türünün direk vücut bütünlüğü korunarak tamamen doğal ince kitin film elde edilmiştir. Bu canlının vücut içeriğindeki kitinin hangi forma ait olduğu bilinmemekteydi fakat bu çalışma ile ilk kez elde edilen kitinin beta forma ait olduğu yapılan karakterizasyonlar sonucu belirlenmiştir. *P. caudatus* türünden elde edilen ince kitin filmin fizikokimyasal özellikleri FT-IR, TGA, XRD, SEM ve elemental analiz teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca MTT analizi ile sitotoksik olmadığı ortaya konmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, izole edilen doğal ince kitin filmin yüzey morfolojisini, termal kararlılığını, kristallinitesi ve içerdiği elementlerin oranlarını belirlenmiştir. Elde edilen doğal kitin film ileriye yönelik pek çok alanda kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kitin, İnce Film Teknolojisi, Doğal Film, Kitin Film, *Priapulus caudatus*.

Mart, 2021; 39 sayfa

M.Sc. THESIS

**NATURAL THIN CHITIN FILM PRODUCTION AND
CHARACTERIZATION FROM *PRIAPULUS CAUDATUS***

Gamze ÖZKAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA

ABSTRACT

Chitin is the most abundant polysaccharide after cellulose, which is widely used in various areas. It is found in different structure as Arthropods, mollusks, ringworms, sponges, algae, fungi, and corals. The forms of chitin in nature are in three types: α , β , and γ forms. Chitin has widespread applications in water treatment, textiles, pharmaceuticals, food, and agriculture due to its non-toxic, biodegradable, biocompatibility, antimicrobial and antioxidant properties. Biodegradable films produce from chitin and its derivatives are one of the most important products in the industry.

In this study, the direct body integrity of the *P. caudatus* species was preserved and a completely natural thin chitin film was obtained. It was not known which form the chitin of this sample belonged to, but it was determined as a result of the characterizations that the chitin obtained for the first time belonged to the beta form. The physicochemical properties of the thin chitin film obtained from *P. caudatus* species were determined using FT-IR, TGA, XRD, SEM, and elemental analysis techniques. In addition, MTT assay revealed that it is not cytotoxic. As a result of this study, the isolated natural thin chitin film's surface morphology, thermal stability, crystallinity and the ratio of the contents of the element were determined. The natural chitin film obtained can be used in many areas of the future.

Keywords: Chitin, Thin Film Technology, Natural Film, Chitin Film, *Priapulus caudatus*.

March, 2021; 39 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Web of Science verilerine göre 2012-2021 yılları arası yıllara göre kitin üzerine yapılan çalışmalar.	5
Şekil 4.1. a) <i>P. caudatus</i> orjinal yapısı, b) İzolasyon sonunda elde edilen 3 boyutlu kitin yapısı.	17
Şekil 4.2. <i>P. caudatus</i> ' un vücut kısımlarından izole edilen kitin ince filmin FT-IR spektrumları.	19
Şekil 4.3. <i>P. caudatus</i> ' un kafa kısımlarından izole edilen kitinin FT-IR spektrumları.	19
Şekil 4.4. a) <i>P. caudatus</i> ' un vücut kısımlarından izole edilen kitin ince filmin Termogravimetrik analiz sonuçları b) <i>P. caudatus</i> ' un kafa kısımlarından izole edilen kitinin termogravimetrik analiz sonuçları.	22
Şekil 4.5. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin ince filmin XRD kırınım pikleri.	24
Şekil 4.6. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitinin ışık mikroskobu ile üç boyutlu görüntüsü.	24
Şekil 4.7. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin filmlerin ışık mikroskobunda incelenmesi.	25
Şekil 4.8. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin filmlerin SEM görüntüleri.	26
Şekil 4.9. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin filmlerin dijital mikrometre ile ölçümü.	26
Şekil 4.10. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin filmlerin 24, 48 ve 72. saatteki sitotoksosite grafiği.	28
Şekil 4.11. <i>P. caudatus</i> 'tan izole edilen kitin filmlerin a) 48 saat oküler görüntüsü, b) 4x, c)10x ve d) 40x görüntüsü.	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>P. caudatus</i> 'tan elde edilen kitin filmlerinin FT-IR fonksiyonel grubu ve titreşim modları.....	20
Çizelge 4.2. <i>P. caudatus</i> ' tan elde edilen kitinin TG – DTA analizlerinin sonuçları.....	23
Çizelge 4.3. <i>P. caudatus</i> ' tan elde edilen kitinin asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz sonuçları.....	27



SİMGELER VE KISALTMALAR

C	Karbon
C₂H₅OH	Etanol
CH₃OH	Metanol
CHCl₃	Kloroform
cm	Santimetre
CrI	Kristalinite İndeksi
DA	Asetilasyon Derecesi
DTG	Diferansiyel Termogravimetri
EtOH	Etil alkol
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H	Hidrojen
HCl	Hidroklorik Asit
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Miliamper
mm	Milimetre
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
N	Azot
N₂	Azot
NaOH	Sodyum Hidroksit
°	Derece
O	Oksijen
°C	Santigrat
pH	Hidrojen Potansiyeli
S	Kükürt
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi
TGA	Termogravimetrik Analiz
XRD	X-ışını Kırınımı Yöntemi
µm	Mikrometre
Θ	Theta
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde
~	Yaklaşık

1. GİRİŞ

Kitin genellikle çoğu omurgasız hayvan grubunda ve mantarların hücre duvarında bulunan, selülozdan sonra en önemli ikinci yapısal polisakkarittir. Kitin, ilk kez 1884'te tanımlanmıştır (Rinaudo, 2006). Eklem bacaklılar Al Sagheer vd. (2009), yumuşakçalar, halkalı solucanlar Ravaux vd. (2003), süngerler Ehrlich vd. (2010), Bryozoa Kaya vd. (2015b), alg, mantar Kaya vd. (2015a) ve mercan Bo vd. (2012) gibi çeşitli canlıların farklı vücut kısımlarında bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte amfibi ve balık omurgalı canlılarda da kitinin varlığı belirlenmiştir (Tang vd., 2015). Kitin canlıların dış iskeletinde bulunur ve iskeletin mukavemetini artırır. Doğada bulunan kitin formları üç çeşittir: α , β ve γ formları. Kristal formlarından α anti-paralel, β paralel zincirler sergilerken γ kitin paralel aynı zamanda anti paralel zincir kombinasyonu şeklindedir (Ehrlich vd., 2007; Rinaudo, 2006). Bu formlar düzenli ve kristal yapılar sergilemektedir (Blackwell, 1969; Carlstrom, 1957; Hackman ve Goldberg, 1965; Roberts, 1992). Genellikle nanofibril ve gözenekli yapıya sahiptir (Kaya vd., 2017a). Kitin ve türevleri (özellikle kitosan) toksik olmama, biyouyumlu, biyobozunabilir, güçlü antioksidan, adsorbsiyon kapasitesi, antibakteriyel, antimikrobiyal ve antitümör gibi eşsiz özellikleri sayesinde biyomalzeme alanında önemli bir biyopolimerdir (Kumar, 2000; Muzzarelli, 1983; Zhao vd., 2010).

Kitosan, kitinin deasetillenmesi ile elde edilen biyopolimerdir. Deasetilasyon, kitinin yapısındaki asetil gruplarının uzaklaştırılarak kitosana dönüştürülmesi işlemidir. Polimerin nasıl uygulanacağını belirlediği için deasetilasyon derecesi kitosan için önemlidir (Tan vd., 1998). Ayrıca kitosanın biyolojik aktiviteleri, fiziksel ve kimyasal özellikleri bu sayede belirlenir (Illanes vd., 1990). Kitin deasetilasyon derecesi yaklaşık %50'ye ulaştığında polimerin kaynağına bağlı olarak sulu asetik ortamda çözünür hale gelir böylelikle kitosan eldesi sağlanmış olur (Gagné, 1993). Bazı asetil gruplarını veya tümünü uzaklaştırmak için derişik sodyum veya potasyum hidroksit çözeltisi etkileştirilmesi ile gerçekleştirilir. Deasetilasyon derecesini baz derişimi, partikül büyüklüğü, sıcaklık, deasetilasyon süresi, izolasyonundan önce kitine uygulanan işlemler, atmosfer (hava veya azot) kitin/baz oranı, kitinin yoğunluğu, parçacık boyutu gibi birçok faktör etkiler (Kaya vd., 2014). Kitinden kitosan elde

edilmesiyle kullanım alanlarının genişlemesi ve mevcut kullanım alanlarında da avantaj sağlar.

Kitin ve kitosan geniş kullanım alanına sahiptir. Kullanım yelpazesi malzemenin asetilasyon derecesine, preparasyon metoduna, fiber dizilimine, kristal indeks değerine, saflığına, azot içeriği gibi özelliklerine göre değişmektedir. Potansiyel kullanım ve uygulama alanları; tıbbi farmasötik, gıda, biyoteknoloji, tarım, kozmetik Goosen (1996), biyomedikalde yaraların iyileşmesi Muzzarelli vd. (1999), kontrollü ilaç salınımı Agnihotri vd. (2004), gen terapisi Prashanth ve Tharanathan (2007), doku mühendisliği Hutmacher (2000), besinlerin raf ömrünün uzatılması Mujtaba vd. (2019), biyomedikal Srinivasa ve Tharanathan (2007), su arıtma sistemleri Davila-Rodriguez vd. (2009), ve tekstildir (Jayakumar vd., 2011). Tüm bu mevcut uygulamaların yanı sıra kullanım alanları farklı özellikler eklenerek zenginleştirilip değiştirilebilir ve genişletilebilir.

Geçmişten bugüne filmler endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan sentetik olanlar yani petrol bazlı türevlerinin biyolojik olarak parçalanmaması ve dezavantajları sebebiyle birçok ekolojik soruna neden olduğu gözlemlenmiştir. Bunların kullanımı tamamen ortadan kaldırılmasa da yavaş yavaş kullanımı sınırlandırılmalı ve birkaç spesifik uygulama için mümkünse terk edilmelidir (Kaya vd., 2018).

Farklı çalışmalarda ele alındığı gibi film oluşumunda filme gerekli esneklik, şeffaflık gibi özellikleri kazandırmak amacıyla kullanılan plastikleştiricilerin çevre ve sağlık sorununa neden olmaktadır. Aynı kitin formunun sentetik yumuşatıcılar eklendikten sonra yani sentetik film haline getirildikten sonra yüksek termal stabilite, şeffaflık, nanolifli ve gözenekli yapısı, çekme dayanımı, young modülü ve hidrofobiklik gibi birçok özelliğini kaybettiği yapılan çalışmalar ve analizler ile gösterilmiştir (Butchosa vd., 2013; Ifuku vd., 2013; Mushi vd., 2014; Sakurada vd., 1962).

Kitinden film yapım esnasında, kitin, toksik bir kimyasal olan lityum klorür çözeltisinde çözündürülmektedir. Kitinin bu çözeltide çözündürülmesi toksisite olmayan, antimikrobiyal ve antioksidan gibi bazı değerli özelliklerin kaybına neden olmaktadır. Bu toksik olan kimyasal bileşikler sentetik kitin filmlerinde kullanılması bu filmlerin uygulama alanlarında pratik kullanımını sınırlandırmaktadır (Kaya vd., 2018).

Sentetik yumuşatıcıların neden olduğu bu sorunlar göz önüne alındığında canlıların doğal orijinal halini kullanarak doğrudan kullanımıyla kitin bazlı filmler üretilmeye ihtiyaç duyulmuştur. Ürettiğimiz kitin filmimiz herhangi bir kimyasal madde kullanmadan film oluşturmaya potansiyel çözümdür.

Priapulida, Ecdysozoa olarak tanımlanan gruplandırmanın bir şubesidir. İlk olarak 1997 yılında Ribo Nükleik asit genleri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturma çalışmaları yapılmıştır (Aguinaldo vd., 1997). Ardından morfolojik karakterlerle desteklenerek Dunn ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yeniden oluşturulmuştur (Dunn vd., 2008). Ecdysozoan kütikül tabakasının epidermise yakın katmanlarında kitin bulunduğu bilinmektedir. Ecdysozoa'nın kütikülü, dikkate alınan taksona bağlı olarak yapısal olarak çok çeşitlidir. Genellikle epikutikül, eksokutikül ve endokutikül olmak üzere en az üç katmandan oluşur (Schmidt-Rhaesa vd., 1998). Fakat kitin varlığı literatürde olmasına rağmen detaylı kitin karakterizasyonu üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. Priapulida şubesinde de bu sorun ile karşılaşilmektedir. Priapulida, yaklaşık 20 türü bulunan küçük bir filumdan oluşur (Wennberg vd., 2009). Priapulida şubesinde bulunan *Priapulus caudatus* türü ilk 1816 yılında Hammond tarafından filogenetik çalışmalarla literatüre eklenmiştir. *Priapulus caudatus* deniz ve okyanus altındaki çamura gömülmüş halde yaşayan bir deniz omurgasızıdır. Cinsiyetler ayrı ve döllenme dışsaldır. Yumurtalar küçük ve oval şeklindedir ve yarıma holoblastik, radyal ve eşittir. Larvaları deniz dibinde yaşar. Kalın bir kütikül tabakası ile çevrelenmiş içe dönük bir gövdeye sahiptir. Gövde yüzeysel bir birleşme ile ayırt edilir dikey ve yatay papillalar bulunur. Gövde ince yapıda olup vücudunun diğer kısımları pullu ve oluklu bir görünümündedir (Hammond, 1970). Kütikül içindeki kitin mevcudiyeti, spesifik bir enzimatik yöntem kullanılarak saptanmıştır. Yetişkin bireylerinde kitin tabakası kollajen bir tabaka ile değiştiği için kitin sentezinin erken gelişim evrelerinde olduğu düşünülmektedir (Lemburg, 1998).

Bu çalışmada, *Priapulus caudatus* türünün direk vücut bütünlüğü korunarak tamamen doğal ince kitin film elde edilmiştir. *P. caudatus*'un yapısında kitinin varlığının bilinmesine karşın, fizikokimyasal karakterizasyonu üzerine detaylı araştırma bulunmamakta ve içeriğindeki kitinin hangi forma ait olduğu bilinmemektedir. Bu çalışma ile elde edilen kitinin hangi forma (alfa, beta veya gama) ait olduğu yapılan karakterizasyonlar sonucu belirlenmiştir ve ilk defa literatüre eklenmiştir. *P. caudatus*

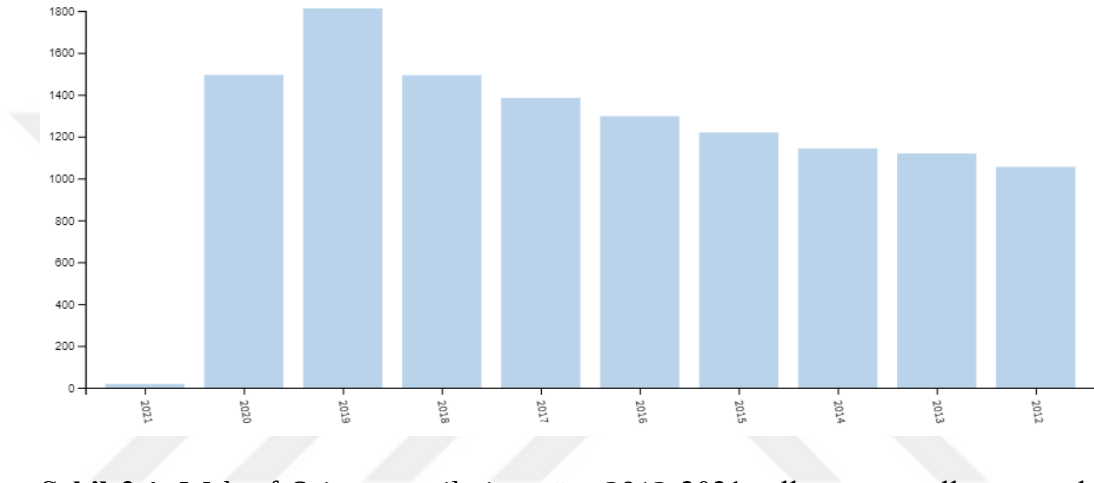
türünden elde edilen kitin Fourier dönüşümlü infrared spektrometre (FT-IR), Termogravimetrik analiz (TGA), X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), filmin kalınlığı ve elemental analiz teknikleri kullanılarak ince kitin filmin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) analizi ile sitotoksitesi belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, izole edilen doğal ince kitin filmin yüzey morfolojisini, termal kararlılığını, kristallinitesi ve içerdiği elementlerin oranları belirlenmiştir. Malzeme bilimine biyo-bazlı tamamen doğal ve canlının vücut yapısı korunarak ince kitin film yapısının kazandırılması amaçlanmıştır.



1. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kitinin Bilim Dünyasındaki Yeri

Kitin bol bulunması, biyoyoumlu, biyobozunur, toksik olmama, antioksidan ve bunun gibi özellikleri ile bilim insanlarının ilgisini çekmektedir ve kitin üzerine yapılan çalışmalar da buna bağlı olarak sürekli artmaktadır (Şekil 2.1). Web of Science (03.11.2020)'a göre anahtar kelime olarak “chitin” yazılıp konu (subject) olarak arama yapıldığında 24.069 çalışma bulunmaktadır.



Şekil 2.1. Web of Science verilerine göre 2012-2021 yılları arası yıllara göre kitin üzerine yapılan çalışmalar (2012(1044), 2013(1108), 2014(1132), 2015(1208), 2016(1286), 2017(1373), 2018(1482), 2019(1801), 2020(1483) ve 2021(7) olarak kaydedilmiştir).

Kitin dünyada selülozdan sonra en bol bulunan ve en önemli ikinci doğal amino polisakkarittir ve doğada birçok kitin kaynağı vardır (Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003). Kitinin α , β ve γ olarak olmak üzere üç allomorfik formdan oluşan oldukça düzenli, kristal yapıdadır (Carlstrom, 1957; Hackman ve Goldberg, 1965; Roberts, 1992). Kitin bazik polisakkaritlerdendir. Benzersiz özelliklerinden; film oluşturma yeteneği, polioksisalt oluşumu, metal iyonları şelatlama ve optik yapısal özellikleri bulunmaktadır (Hench, 1998). Kitin bolluğu, doğal biyoyoumlu ve biyobozunur olması sebebiyle artan ilgi görmektedir. Alkali koşullar altında deasetilasyonu, fizikokimyasal özellikleri ve kendine özgü biyolojik aktivesi sebebiyle biyomedikal teknolojisinde mükemmel bir malzeme kaynağıdır (Duan vd., 2015). Kitinin α formu en çok allomorftur ve sert yapıdadır, β ve γ kitin ise esnek yapıdadır (Jang vd., 2004). Kitin beyaz, azotlu bir polisakkarittir. Kitosan, kitinin N- deasetillenmiş türevidir, ancak bu N- deasetilasyon neredeyse hiçbir zaman tamamlanmaz. Kitin ve kitosan

arasında N- deasetilasyon derecesine göre keskin bir isimlendirme tanımlanmamıştır (Allan vd., 1984; Muzzarelli ve RAA, 1973). Kitin benzersiz özellikleri sayesinde bilim dünyasında oldukça ilgi çekmektedir.

2.2 Kitin Özellikleri ve Uygulamaları

Abirami ve arkadaşları tarafından, bu yıl içinde yapılan bir çalışmada karides atık kabuklarından önce kitin ve ardından da kitosan elde edilerek bu kitosanın bakteri ve mantarlar üzerine antimikrobiyal özelliklerine sahip olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu da belirlenmiştir. Tüm bunlara ilaveten domatesin yüzeyini ince film olarak kaplayarak raf ömrünü uzattığı rapor edilmiştir (Abirami vd., 2021).

Biyolojik malzemelerin genellikle 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda özelliklerinin stabil kalamadığı bilinmektedir. Bununla birlikte çok aşırı koşullarda yaşayabilen jeotermal ortamlarda (70-96 °C) özel silika oluşturan bakteriler bulunmaktadır. Kitinin potansiyel şablon olarak uygulanmasını belirleyen ana kriter bu polimerin termal stabilitesidir. β kitin ve çinko oksit kompozitlerinin gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal özellik gösterdiği belirlenmiştir. İnorganik organik yara pansuman materyallerinin geliştirilmesi için kullanılabileceği belirlenmiştir (Wysokowski vd., 2013).

Literatürdeki bir diğer çalışmada kitinin nanofibröz yapısından yararlanılarak kitin mikro küreler oluşturulup termal bir yöntemle NaOH/ üre sulu çözeltisi indüklenerek dokunmuş mikro küreler oluşturulmuştur. Nanofibröz yüzey ve kitinin biyoyumumluluğu sebebiyle uygulanan hücreler kitin mikro kürelerine yapışıp yüksek bir bağlanmanın yanı sıra doku oluşumu için yeterli alan sağlayabildiği gösterilmiştir. Doku mühendisliği için önemli yapı iskeletine alternatif bir üç boyutlu mikro boyutta taşıyıcılar elde edilebildiği belirtilmiştir (Duan vd., 2015).

Kitinin, hayvan vücudunda veya doğada biyobozunur bir polimer olduğu ve düşük toksisiteye sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Hirano vd., 1990; Sashiwa vd., 1990). Doku mühendisliği uygulamalarına alternatif çözümler için hazırlanan kitin rejenere hidrojel kitin membranlarının şişen hidrojel ile hazırlanan kitin membranlarından yüksek termal stabiliteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu

membranlarda fibroblast hücrelerinin büyümesi ve hücrelerin toplandığı gözlemlenmiştir. Bu membranlar doku mühendisliği için faydalı biyomalzemelerdir (Nagahama vd., 2008).

Biyomedikal alanda, yapılan kitin ve kitosanın in vitro olarak köpek polimorfonükleer hücrelerini salgılaması için polimorfonükleer hücre süpernatantlarını uyardığını ve PMN göçünü içeren peritoneal eksüdatif sıvıyı indüklediğini göstermiştir. Yara iyileşmesinde önemli bir adım olan polimorfonükleer hücre süpernatantların göçü üzerindeki kitin ve kitosanın çeşitli etkileri gösterilmiştir. Kitinin bir yara iyileştirme hızlandırıcısı olarak yüksek aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Usami vd., 1998).

Kitinin yara iyileştirme yeteneği ve antibakteriyel aktivitesi gümüş nanopartiküller eklenerek daha da artırılabilir (Demling ve Desanti, 2001). Bu özelliğinden dolayı β -kitin ve nano gümüş kompozit yapı iskeleleri hazırlanmıştır. İskelelerin iyi nem ortamını tutması, gazın nüfuz etmesi, yara eksüdalarının emilmesi ve yarada travma oluşturmada kolay çıkarılması avantajlarından faydalanılmıştır. Elde edilen bu kompozit iskelelerin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı bakterisit olduğu ve in vitro ortamda antibakteriyel, kan pıhtılaşması, şişmesi, hücre bağlanması ve sitotoksite çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak ideal yara örtüleri uygulamaları için kullanılabileceği kaydedilmiştir (Kumar vd., 2010).

Biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama, düşük maliyet vb özelliklere sahip olan kitin ve türevlerinin organizma üzerine kullanımı ile birçok protein ile etkileşim sağlaması mümkündür. Buda kitin ve türevlerini protein ayrımı endüstrilerinde pozitif yüklü, asidik ve nötre yakın pH koşullarında uygulamalar için gerekli absorbansları vermesini sağlar. Mondal ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada kitosan hidrojenleri, glutaraldehit ile çapraz bağlayarak farklı pH ve çapraz bağlama oranlarında bir model protein olan sığır serum albümini adsorpsiyonu için incelemişlerdir. Bu çapraz bağlamanın hidrojel boncukların yapısal ve kimyasal stabilitesini önemli ölçüde iyileştirdiği kaydedilmiştir (Mondal vd., 2015).

Literatürde yapılan birçok çalışma ile beraber Kato ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada kitin ve kitosan türevlerinin farmasötik alanda ilaç taşıyıcıları ve kontrollü ilaç salınımında kullanılabileceği belirtilmiştir. Kitin ilaveli çalışmalarla toksisitenin azaldığı dolayısıyla mevcut materyallerin uygulama

alanlarının genişlediği kaydedilmiştir. Kitin kullanılarak hazırlanan filmlerin sürekli ilaç salınımı sergilediği ve yapışma özellikleri ile yara sargısı, oral muko yapışkan ve suya dayanıklı yapışkan sargı olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (Kato vd., 2003; Jayakumar vd., 2007).

2.3 Kitin Film

Kitin, çeşitli biyolojik avantajları nedeniyle biyomedikal uygulamaları için film formuna dönüştürülerek kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kitinin sert kristal yapısı nedeniyle yaygın çözücülerde çözülmesi çok zordur. Bazı çözücü sistemler kullanılarak kitin hidrojel formu elde edilmiştir (Nagahama vd., 2008). Ancak, kitinin belirli çözücüler kullanılarak film formuna dönüşmesiyle karakteristik özelliklerinin çoğunu kaybettiği bilinmektedir.

Duan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kitin solüsyonu elde etmek için kitini dondurma -30°C 'de döngülerle çözündürme yapıp %11 NaOH, %4 üre solüsyonunda çözündürülüp, ardından kitin film hazırlamak için etanol veya dimetilasetamid pıhtılaştırıcılarla rejenere edilerek şeffaf saf kitin filmler elde edilmiştir. Organik pıhtılaştırıcıdaki kitin solüsyonunun yavaş rejenerasyon sebebiyle kitin zincirlerinin homojen bir yapı oluşturması için düzenli hizalanması ve yeniden yapılandırılması gerekmektedir. Ayrıca baz-asit nötralizasyonu ve kitin çözeltisi ile sulu sülfürik asit pıhtılaştırıcı arasındaki hızlı değişim nedeniyle, kitin zincirleri gevşek bir fibrid yapı oluşturmak üzere hızla bir araya gelmesiyle kusurlu zayıf mekanik özelliklere sahip kitin filmi oluşumuna yol açar. Bu nedenle, pıhtılaştırıcı türleri, kitin filmlerinin oluşumunu, yapısını ve özelliklerini etkilemiştir (Duan vd., 2013).

Yengeç kabuklarından elde edilen kitin tozundan kitin nanofiberler hazırlanıp süspansiyon için hidrofilik bir politetrafloroetilen membran filtresi kullanılarak vakumla filtre edilmiştir. Kurutma işlemi için 100°C 'de 30 dakika sıcak preslenmiştir. Preslenen kitin nano tabakalar kesilerek %2'lik 11 farklı (met) akrilik reçinelerle emprenye edilmiştir. 24 saat azaltılmış basınçta 2-hidroksi-2-metil propiyofenon ile muamele edilmiştir. Kitin içeriği kitinin kuru ağırlığına göre yaklaşık %40 olmuştur. Takviye etkisiyle termal genişmesi azalmıştır. Aynı koşullar altında hazırlanan reçine

filmleri hazırlanmıştır. Daha sonra karakterizasyonları yapılmıştır. Işık geçirgenliğinin yaklaşık %90 olduğu saptanmıştır (Ifuku vd., 2011).

Ifuku ve arkadaşları yaptıkları bir diğer çalışmada, yengeç ve karides kabukları kullanılmıştır. Canlıdan direk olarak yani yukarıdan aşağıya yaklaşımla kitin izole edilerek 11 farklı akrilik reçine ile tekrar muamele edilip film hazırlanmıştır. Bu çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiştir (Ifuku ve Saimoto, 2012).

Cervimunida johni ıstakozunun toz atıklarından α -kitin ekstraksiyonu yapılarak %15.2 verimle kitin eldesi sağlanmıştır. Elde edilen kitinden α -kitin nanokristalleri ve nanofiberler mekanik ve kimyasal işlemlerden geçirilerek elde edilmiştir. Elde edilen kitin deasetile edilerek kitosana dönüştürülmüştür. Daha sonra kitosan, kitin nanokristalleri ve kitosan, kitin nanofiberleri ve kitosandan sırasıyla çözücü buharlaştırma-döküm yaklaşımı ile asetik asit çözeltisinde muamele edilip akrilik plakalara dökülerek biyonanokompozit filmler hazırlanmıştır. Kitosan filmlere nanokristaller ve nanofiberler eklendiğinde morfolojisinin daha pürüzlü ve transparan özelliğinde yani geçirgenliğinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Salaberria vd., 2015).

Serov vd. (2015), Kuzey Denizinden temin edilen karides kabuklarından izole edilen kitinin üre ve tiyoüre sulu çözeltilerinde çözünmesi ve de katkı maddeleri eklendiğinde oluşan filmin yapısı üzerine çalışmışlardır. Dimetilamin ve lityum klorür viskozitesi belirlenmiştir. Islak şekillendirme ile film haline getirilerek çökeltme banyosuna daldırılıp cam plakalara dökülmüştür. Çökeltme banyosunda %5'lik Sodyum Sülfat kullanılmıştır. Filmlerin yapıları, FT-IR spektroskopisi ve x-ışını kırınımı kullanılarak incelenmiştir. Kitin filmin, X-ışını kırınım desenlerinde yansıma ve yoğunluğun azaldığını yani ilk polimer yapısının düzenin bozulduğu görülmüştür. Elde edilen kitin film yapısı kitine göre daha az düzenli olduğu belirlenmiştir (Serov vd., 2015).

Kitin ve selüloz temelli oluşturulacak filme polimerik iyonik sıvılar eklenerek bu iyonik sıvıların özelliklerini ve fonksiyonlarını içeren polisakkarit bazlı filmler hazırlamışlardır. Polimerize olabilen iyonik sıvılar ile kitin / selüloz çözeltisine sırasıyla eklenmiştir (Setoyama vd., 2013).

Bu çalışmalarda filmlere farklı polimerik malzemeler eklenerek, esneklik, mekanik, antimikrobiyal vb. özellikler kazandırmak için kullanılmıştır. Bu polimerik malzemelerin film teknolojisinde kullanılmasının ciddi sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaktadır.

Sentetik malzemelerin dezavantajlarından dolayı, canlının doğal üç boyutlu yapısı korunarak kitin film elde edilmesi bu sorunlara çözüm bulmada önem kazanmıştır.

İlk kez Arthropoda şubesinde bulunan hamam böceğinin (*Periplaneta americana*) dorsal pronotum ve kanat yapısı korunarak kitin film üretimi yapmışlar ve detaylı bir şekilde karakterize etmişlerdir. Bu çalışma ile bir böceğin farklı bölgelerinden elde edilen kitin filmlerinde termal kararlılığı, hidrofobisitesi, antifungal ve antibakteriyel özelliklerinin farklı olabileceğini açıkça göstermiştir. Kitin filmlerin porlu ve fibril yapılarında farklılıklar olabileceği gibi aynı morfolojik yapıda, aynı canlı da fakat farklı bölgelerden elde edilen filmler de dahi mekanik özellikler, şeffaflık, hidrofobiklik, antibakteriyel ve antifungal biyofilm aktivitelerinde farklılık olabileceği ortaya konmuştur (Kaya vd., 2017b).

2.4 β Kitin

Kalamar kalemelerinin alternatif kitin kaynağı olarak birçok avantajı vardır. Deniz ürünleri üretiminden dolayı bol miktarda atık olarak bulunur (Arkhipkin vd., 2015). Kalamar kafeslerinde mineral içeriği çok düşüktür ve bu da hafif koşullarda ekstraksiyona imkân sağlar (Kurita vd., 1993). β-kitin α-kitine göre suya karşı daha yüksek afiniteye sahiptir, böylelikle biyolojik dokudan ayrışması kolay gerçekleşir. Sert koşullar kitin molar kütlelerini azalmasına, fiber uzunluklarının bozulmasına, kitin nanofibrillerin düşük mekanik özelliklere ayrıca sert baz muamelesi asetilasyon derecesinin düşmesine sebep olur. Diğer kitin formlarına kıyasla daha yüksek en boy oranına sahiptir. Yüksek film mukavemeti iyi korunmuş doğal fibril yapılarından kaynaklanır. Yüksek mekanik performansı; yüksek saflık, düşük protein kalıntısı, yüksek en-boy oranları, yüksek molar kütleleri, yüksek kristallik ve yüksek asetilasyon derecesi sağlar (Wu vd., 2019).

Mollusca şubesinde bulunan kalamarın yapı iskeletinde (Lavall vd., 2007), Ochrophyta şubesinde bulunan bazı diatomların hücre duvarında (Brunner vd., 2009),

Annelida şubesinde yer alan bazı polychaete deniz solucanlarının yapılarında (Chamoy vd., 2001) β kitinin varlığı bilinmektedir. Moleküllerin paralel zincirler sergilemesinden dolayı β kitin, zayıf moleküller arası kuvvetlere sahiptir (Kurita, 2001). Bu sayede enzimatik bozulmalara ve kimyasal reaksiyonlara karşı daha duyarlıdır (Kurita vd., 1993). Diğer kitin formlarına göre, β kitin daha hafif koşullar altında izole edilebilir (Blackwell vd., 1980; Gardner ve Blackwell, 1975; Mazeau vd., 1994). Kitin ekstraksiyonu sırasında α kitin için sert koşulların kullanılması polisakkaritin doğal yapısını etkiler, β kitin hafif koşullarda ekstrakte edilebildiği için doğal yapısını korumak mümkündür (Lavall vd., 2007).

2.5 *Priapulus caudatus*

Arthropoda, Onychophora, Tardigrada, Nematoda, Kinorhyncha, Loricifera ve Nematomorphalarla ile birlikte Priapulida da Ecdysozoa grubunun üyeleridir (Dunn vd., 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarla priapulid solucanlarını (Priapulida) morfolojik olarak, Kinorhyncha ve Loricifera şubeleriyle kardeş grup Scalidophora olarak adlandırılmaktadır (Dunn vd., 2008; Pisani vd., 2013). *Priapulus caudatus*, Priapulida şubesine ait bir türdür. Priapulid türleri okyanus ve denizlerde çamura gömülü veya interstisyel yaşayan hayvanlardır. Yetişkinler halka şeklinde kurtlardır (Schmidt-Rhaesa, 2013). Priapulid yumurtalar, Ecdysozoa için karakteristik olan holoblastik radyal bölünme, deuterostomik gelişim ve ventral ağız oluşumu şeklinde gelişirler (Martín-Durán vd., 2012; Zhinkin, 1949). Emriyonik gelişimi, yetişkin tür oluşana kadar değişen bir larva ile sonuçlanır (Lang, 1949; Wennberg vd., 2009). Yumurtadan çıkan larva iyi gelişmiş bir kas ve sindirim sistemine sahiptir (Martín-Durán ve Hejnol, 2015). *Priapulus caudatus*'un kütikül tabakasının katmanlarında kitin bulunduğu bilinmektedir fakat detaylı kitin karakterizasyonu için çalışma bulunmamaktadır. Kütikül içindeki kitin mevcudiyeti, spesifik bir enzimatik yöntem olan lektin-altın etiketleme tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Yetişkin bireylerinde kitin tabakası kollajen bir tabaka ile değiştiği için kitin sentezinin erken gelişim evrelerinde oluştuğu düşünülmektedir (Lemburg, 1998).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzeme Temini

Danimarka’da bulunan “Zoology Museum of Copenhagen” müzesinden Priapulida şubesinde bulunan *Priapulus caudatus* türüne ait örnekler temin edilmiştir. Üzerindeki kir ve kalıntıları uzaklaştırmak için distile su ile defalarca yıkanmıştır. Örnekler 40 °C etüvde 2 gün boyunca kurutulmuş daha sonra hassas terazi ile ilk ağırlıkları tartılmıştır. Ardından %20’lik EtOH solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2 Kullanılan Materyaller

Canlının içeriğinde bulunan kitini izole etmek için kullanılan materyaller hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), metanol (CH₃OH), etanol (C₂H₅OH), kloroform (CHCl₃) Sigma-Aldrich’den temin edilmiştir. İzole edilen kitinin karakterizasyonu için FT-IR, TGA, XRD, SEM, dijital mikrometre ve EA analizleri kullanılmıştır.

3.3 Kitin İzolasyonu

Priapulus caudatus örneklerinden saf bir kitin elde edebilmek için aşamalı olarak bir seri kimyasal işlemler uygulanmıştır. Uygulanan kimyasal işlemler; minerallerin uzaklaştırması, proteinlerin uzaklaştırılması ve renk giderme işlemidir. Örnekler her uygulamadan önce ve sonra pH nötr oluncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Yapılan kitin izolasyon işlemleri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.3.1 Minerallerin uzaklaştırılması

Minerallerin canlının yapısından uzaklaştırılması işlemine demineralizasyon denir. Canlının yapısından mineralleri uzaklaştırmak için HCl kullanılmıştır. Örnekler 24 saat boyunca oda sıcaklığına 2M HCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra örnekler filtre edilerek pH nötr oluncaya kadar saf su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Örnekler deproteinizasyon işlemine alınmıştır.

3.3.2 Proteinlerin uzaklaştırılması

Proteinlerin canlının yapısından uzaklaştırılması işlemine deproteinizasyon denir. Örneklerin yapısından proteinlerin uzaklaştırılması için NaOH kullanılmıştır. Örnekler 24 saat boyunca ısıtılmalı karıştırıcıda 150 °C de sadece ısıtarak 2M 100 ml NaOH ile muamele edilmiştir. Böylelikle canlının 3 boyutlu yapısı korunarak yapıdaki protein uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örnekler pH nötr oluncaya kadar saf su ile filtre edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Örnekler dekolorizasyon işlemine alınmıştır.

3.3.3 Renk giderme

Pigmentlerin canlının yapısından uzaklaştırılması işlemine dekolorizasyon denir. Örneklerin yapısındaki renk giderimi için kloroform: metanol: saf su karışımı 1:2:4 oranlarında hazırlanarak muamele edilmiştir. Ardından örnekler pH nötr oluncaya kadar saf su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Böylelikle saf kitin film örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen 3 boyutlu saf kitin film örnekleri 48 saat boyunca 40 °C etüvde kurutularak ağırlıkları tartılıp kitin içeriği belirlenmiştir. Örnekler %20'lik alkol-su çözeltisinde bekletilmiştir.

3.4 Kitin İçeriği

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen filmin kitin içeriğini belirlemek için ilk ağırlıkları izolasyondan önce belirlenmiştir. İzolasyon aşamalarından sonra tekrar tartılarak aşağıdaki formül ile kitin içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Kitin İçeriği (\%)} = (m_{\text{son}}/m_{\text{ilk}}) \times 100$$

m_{son} : örneğin izolasyondan sonraki saf kitin ilk kütlesi

m_{ilk} : örneğin izolasyondan önceki kütlesi

3.5 Karakterizasyon

Kitin film örnekleri: FT-IR, TGA, XRD, SEM, dijital mikrometre (Mitutoyo, Çin) ve Elemental analiz cihazları kullanılarak fiziko-kimyasal özellikleri karakterize edilmiştir.

3.5.1 Fourier dönüşümlü infrared spektrometre (FT-IR)

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen kitin filmin FT-IR spektrumları, 650-4000 cm⁻¹ frekans aralığında Perkin-Elmer FT-IR Spektrometre (Universal Attenuated Total Reflectance) cihazı kullanılarak ayrı ayrı kaydedilmiştir.

3.5.2 Termogravimetrik analiz (TGA)

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen kitin filmin termal bozunma eğrileri, inert bir azot (N₂) atmosferi altında dakikada 10 °C'lik sıcaklık artışı ile 25 °C'den 700 °C'ye kadar TGA/SDTA 851(Mettler Toledo) cihazı kullanılarak kaydedilmiştir.

3.5.3 X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen kitin filmin XRD spektrumları Rigaku D max 200 X-ışını difraktrometresi kullanılarak saptanmıştır. Kitin varlığı ve var olan kitinin kristal indeks değeri hesaplanmıştır. Kitin varlığının keskin pikleri yaklaşık 9° ve 19°'dir. Destekleyici ara pikleri ise 13°, 21°, 23° ve 26°'dir. 40 kV, 30 mA ve 2θ da 5°-45° aralığında tarama açısıyla yapılan ölçümde bu iki ana pik ve ara piklerin varlığına bakılarak kitinin α, β ve γ formlarından hangisine ait olduğu saptanmıştır. İzole edilen kitin filmin kristalinite indeksi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

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

CrI: % yüzde kristalinite indeksini

I₁₁₀: 2θ 20° daki en yüksek pik

I_{am}: 2θ 13° daki en yüksek dağılma yoğunluğu şiddetini gösterir.

3.5.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen kitin filmin yüzey morfolojisi, JEOL JFC-2300 HR cihazında püskürtme kaplayıcı yöntemiyle platin / paladyum ile kaplanmıştır. Ardından JEOL JSM-6335F marka taramalı elektron mikroskobu ile filmin yüzey özellikleri ve morfolojisi incelenmiştir.

3.5.5 Filmin kalınlığı

P. caudatus'un örneklerinden izole edilen kitin filmin kalınlığı (Mitutoyo, Çin) marka dijital mikrometre ile filmlerin 10 farklı kısmından alınan ölçümlerin ortalaması hesaplanarak belirlenmiştir.

3.5.6 Elemental analiz

P. caudatus'un kafa ve vücut örneklerinden izole edilen kitin filmin yapısında bulunan elementlerin % içeriklerini belirlemek için Thermo Flash 2000 cihazı kullanılmıştır. Kitin örneklerinin N, C, S ve H içeriğine göre elde edilen analiz sonuçları ile asetilasyon derecesi (DA), aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$DA (\%) = [(C/N - 5.14) / 1.72] \times 100$$

3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1 Hücre kültürü

L929 fare fibroblast hücreleri (HÜKÜK, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) hücreleri, %10 fetal bovine serumu ve penisilin/streptomisin (100 U/mL; 100 µg/ml) içeren geliştirme besiyerinde (DMEM) %5 CO₂ 'li ortamda 37 °C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. 25 cm²'lik flasklarda çoğaltılan hücreler, hücre kültür kaplarını kapladıkları zaman %0.05 tripsin/EDTA çözeltisi ile flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Pasajlama sırasında yeni pasajda 1:4 hücre olacak şekilde hücre aktarımı yapılmıştır. Kültür besiyeri pasajdan sonra her iki günde bir değiştirilerek hücreler düzenli olarak inverted mikroskopla kontrol edilmiştir.

3.6.2 MTT testi

P. caudatus'un örneklerinden izole edilen kitin filmin L929 hücrelerinde sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT, Sigma ®) canlılık testi kullanılmıştır. Aynı pasaj numarasına sahip L929 hücreleri, hücre kültür kaplarının ortalama %70'ini kapladığı zaman besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra hücreler sayılarak her kuyucuğa 10⁴ hücre/100 µL gelecek şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Örneklerin her inkübasyon süresi için üç bağımsız deney gerçekleştirilmiştir. Hücreler

37 °C ve %5 CO₂ 'li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklenmiştir. Daha sonra uygulama kuyucuklarına steril 2x2 mm *P. caudatus*'un örneklerinden izole edilen kitin film eklenerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kontrol kuyuları taze besiyeri ile bırakılmıştır. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 10 µL gelecek şekilde MTT (final konsantrasyon 0,5 mg/ml) karışımı eklenerek oluşan formazan kristallerinin DMSO ile çözünmesi ile ortaya çıkan renk değişimi 4 saat sonunda ChroMate®ELISA okuyucu ile 492 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Burada ortaya çıkan absorbans canlı hücrelerin varlığı ile doğru orantılıdır. Malzeme içermeyen kontrol grubundaki hücrelerdeki canlılık %100 olarak kabul edilerek uygulama kuyularındaki canlılık aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = ((A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}})) \times 100 \quad (3.2)$$

A_{kontrol} kontrol kuyusunun absorbansını, $A_{\text{örnek}}$ *P. caudatus*'un örneklerinden izole edilen kitin film içeren kuyu absorbansını, A_{blank} ise hücre içermeyen besiyeri absorbansını ifade etmektedir.

3.6.3 İstatiksel analiz

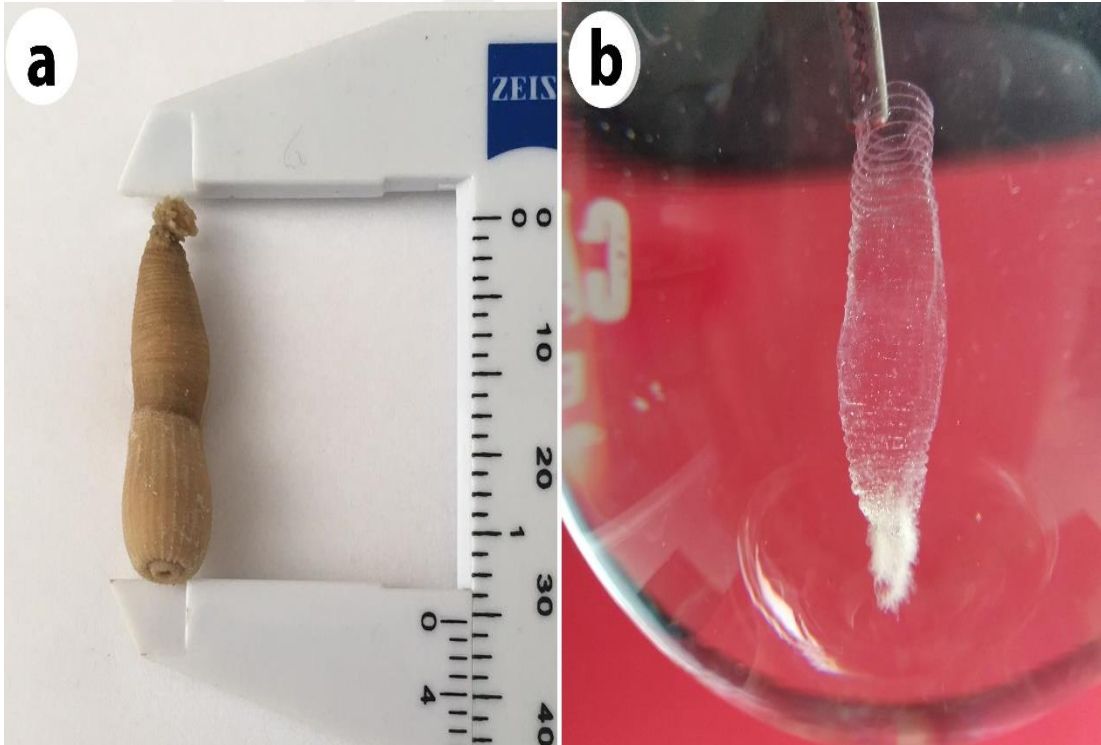
Veri analizi GraphPad Prism 8.0 yazılımı ile yapılmıştır. Testlerin sonuçları iki yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-test ile analiz edilerek ortalama $\pm$ standart hata ile verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

P. caudatus' tan izolasyon yapılarak elde edilen kitin filmin yapısı korunmuş ve 3 boyutlu kese şeklinde elde edilmiştir. *P. caudatus*'un kitin film tabakası çok ince saydam yapıda elde edilmiştir. Bu çalışma ile doğada bulunan α , β ve γ olmak üzere üç kristal kitin formundan *P. caudatus*'un hangi forma ait olduğu ve yüzde kitin içeriği ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen kitinin FT-IR, TGA, XRD, SEM, filmin kalınlığı, elemental analiz ve MTT analizi ile detaylı olarak karakterize edilmiştir.

4.1 Kitin İçeriği

P. caudatus'un izolasyonu sonucu elde edilen 3 boyutlu kitin yapısı Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu çalışmada, canlının vücudundan protein içeriği ve yüksek miktarda mineral içeriği uzaklaştırıldıktan sonra *P. caudatus*'tan izole edilen filmin kitin içeriği, ~%2,03 olarak belirlenmiştir. Demineralizasyon, deproteinizasyon ve dekolorizasyon işlemlerinden sonra kütle kaybı %97,97 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. a) *P. caudatus* orjinal yapısı, b) izolasyon sonunda elde edilen 3 boyutlu kitin yapısı.

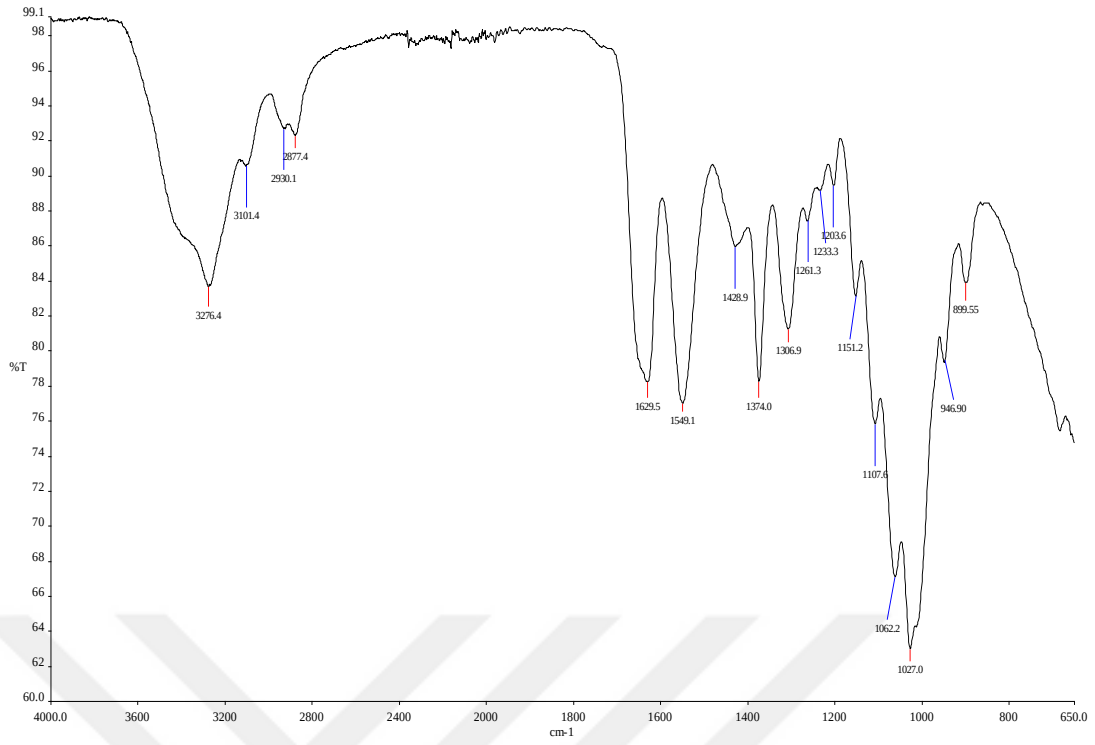
4.2 FT-IR

P. caudatus' un vücut kısımları ve kafasından izole edilen kitinin FT-IR spektrumları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. FT-IR spektroskopisi, biyolojik numunelerin tanımlanması ve karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dukor vd., 1999).

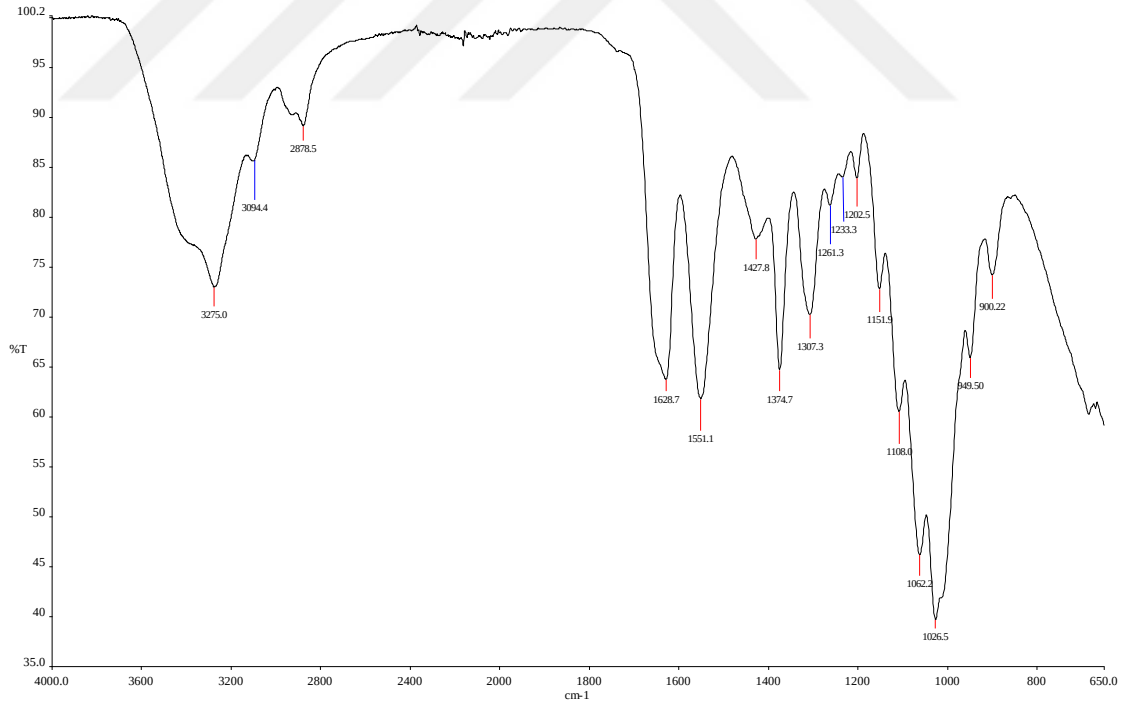
FT-IR spektroskopisi kitinin hangi allomorfik forma sahip olduğunu belirlemek için kullanılan en yaygın tekniklerden biridir (Darmon ve Rudall, 1950). Kitin varlığı ve kitinin hangi forma sahip olduğu Amid I bandına bakılarak anlaşılması mümkündür. Kitin örnekleri için karakteristik olan diğer pikler ise Amid II ve Amid III bantlarıdır (Noishiki vd., 2003). Bildirilen pek çok çalışmada bilindiği gibi bu bantlar (Amid I) bölünmüş ise yani iki tepe noktası var ise α -kitin, bölünmemiş tek tepe noktası var ise β -kitin ve hafif bölünmüş fakat tepelenmemiş ise γ -kitin varlığını göstermektedir. β -kitin için Amid I bandının karakteristik piki, 1650 cm^{-1} - 1620 cm^{-1} aralığında, moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklı olarak 1640 cm^{-1} çevresinde tek bir keskin band oluşturmaktadır (Jang vd., 2004).

Bu çalışmada *P. caudatus*'tan izole edilen saf kitinin vücut kısmındaki film ve kafa kısmındaki kitin FT-IR spektrumu ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.2 ve 4.3'te gösterildiği gibi *P. caudatus*' un kızılötesi ışıınım spektrumunda intermoleküler O-H bağlanması nedeniyle geniş pikler yaklaşık olarak 3275 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Bu pik yapıda bulunan suya atfedilmektedir. Vücut kısmının FT-IR spektrumu Amid I (C=O ikincil amid gerilme) 1630 cm^{-1} , Amid II bandı (N-H, C-N gerilimi) 1549 cm^{-1} ve Amid III (CH₂ titreşimi) 1307 cm^{-1} olarak kaydedilmiştir. Kafa kısmının FT-IR spektrumu ise Amid I (C=O ikincil amid gerilme), Amid II bandı (N-H, C-N gerilimi) ve Amid III (CH₂ titreşimi) karşılık gelen sırasıyla 1629 cm^{-1} , 1551 cm^{-1} , 1307 cm^{-1} olarak ölçülmüştür.

FT-IR spektrumlarındaki tüm bantlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. *P. caudatus*'tan izole edilen saf kitinin kafa ve vücuttaki tüm FT-IR spektrumlarının birbiriyle yakın olduğu gözlemlenmiştir. Literatür incelendiğinde kalamardan izole edilen kitinlerden elde edilen sonuçlara göre β formunda olduğunu göstermektedir (Cárdenas vd., 2004; Jang vd., 2004).



Şekil 4.2. *P. caudatus*' un vücut kısımlarından izole edilen kitin ince filmin FT-IR spektrumları.



Şekil 4.3. *P. caudatus*' un kafa kısımlarından izole edilen kitinin FT-IR spektrumları.

Çizelge 4.1. *P. caudatus*’tan elde edilen kitin filmlerinin FT-IR fonksiyonel grubu ve titreşim modları.

Fonksiyonel gruplar ve titreşim modları	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	
	Kafa	Vücut
N–H gerilme	3275	3276
CH ₂ simetrik gerilme	3094-2879	3101-2930 Alifatik bileşikler
C=O ikincil amid gerilme	1629	1630 Amid I
N–H bükme, C–N gerilme	1551	1549 Amid II
CH ₂ bükülme	1428	1429 Alifatik bileşikler
CH ₃ simetrik deformasyon	1375	1374 Alifatik bileşikler
CH ₂ dalgalanma titreşimi	1307	1307 Amid III, protein bileşiği
C–O–C asimetrik Faz halkasında gerilme	1062	1062 Sakkarit şeker halkaları
C–O asimetrik Faz halkasında gerilme	1027	1027

4.3 TGA

P. caudatus’tan izole edilen kitin örneklerinin N₂ atmosferi altında termogravimetrik analiz sonuçları Şekil 4.4’ te verilmiştir. Isıtma hızı artıkcı diferansiyel termogravimetri (DTG) termogramları belirlenmiştir. Bu DTG eğrisinde termal bozunması iki aşamada gerçekleştiğı gözlemlenmiştir. İlk basamaktaki ağırlık kaybı biyopolimerin zincirlerinde bulunan hidrofilik gruptaki suyun buharlaşmasıdır (Jang vd., 2004). İkinci basamakta ise polimerik yapının bozulması, asetillenmiş kitin birimlerinin bozulması ve sakkarit halka dehidrasyonu ile kütle kaybı gerçekleşmiştir. Bu basamaktaki termal bozunmanın kitine ait olduğı daha önce yapılan çalışmalarla literatüre kaydedilmiştir (Wanjun vd., 2005, Paulino vd., 2006). Termal bozunma sıcaklığı artıkcı dayanıklılık artar ve kitinin uygulama alanı seçilirken dikkat edilen en önemli parametrelerden biri termal kararlılıktır (Wysokowski vd., 2015).

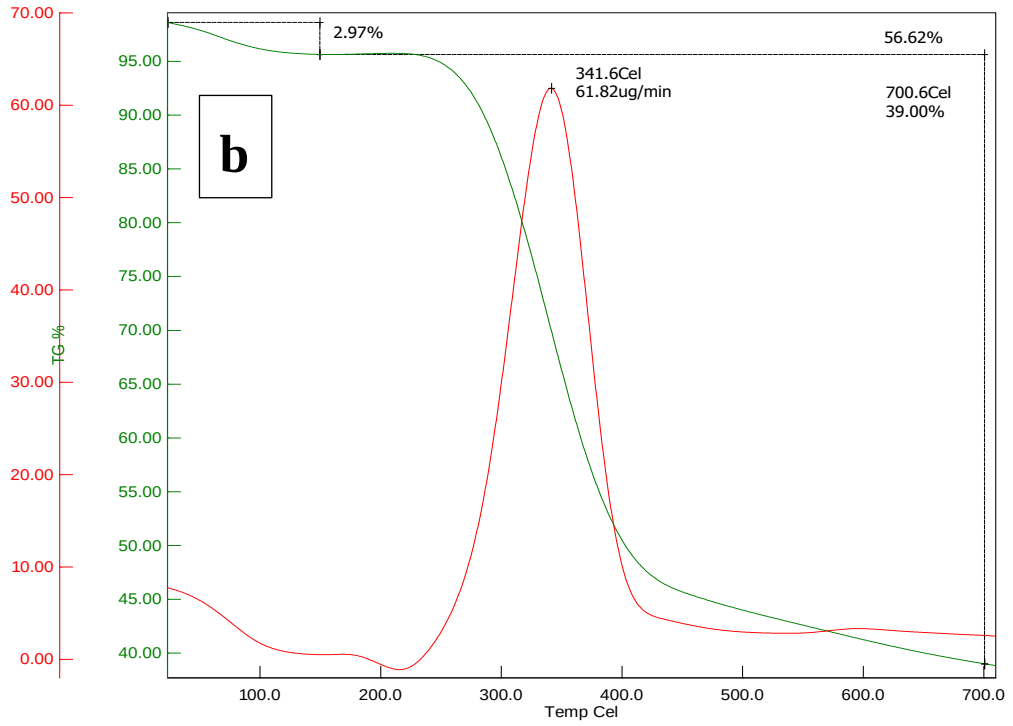
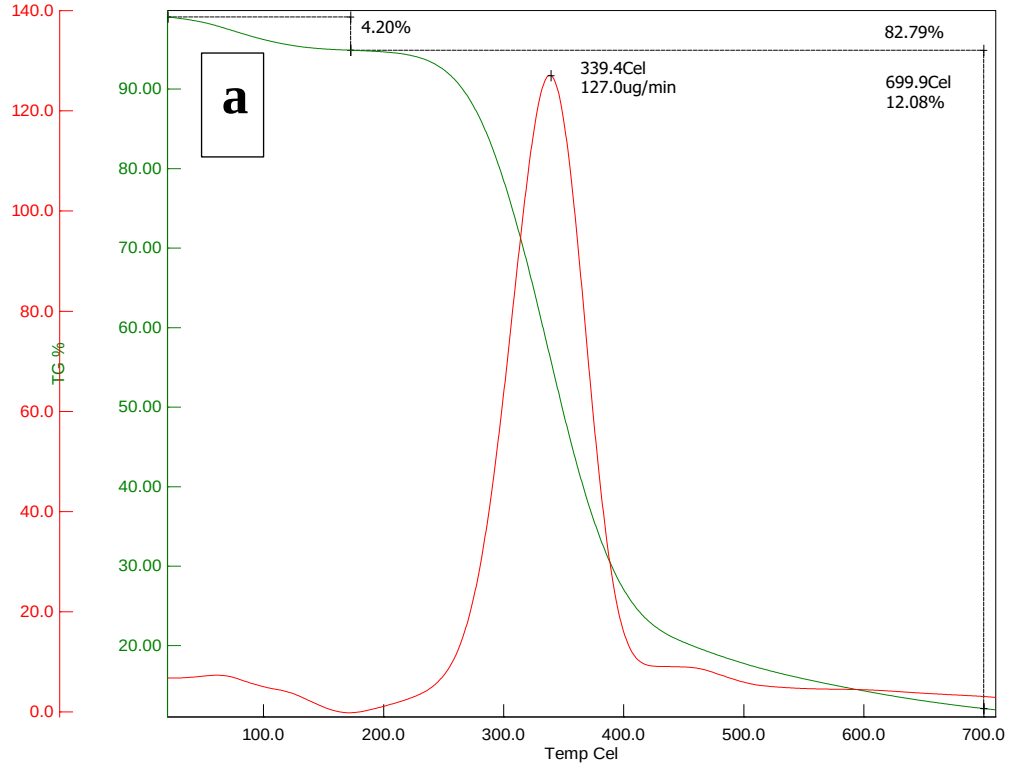
Bilindiğı üzere α -kitinin maksimum bozunma termogramları 350 °C’nin üzerinde, γ -kitinin ~ 350 °C ve β -kitinin ise 350 °C’nin altındadır (Kaya vd., 2017a). Kitin ve

kitosan genellikle 300 °C ile 400 °C sıcaklıkları arasında maksimum bozunma göstermektedir (Greven vd., 2019).

Bu çalışma ile *P. caudatus*'tan izole edilen vücut ve kafa kitin örneklerinin sahip olduğu DTG_{max} (°C) değerleri sırasıyla 339,4 °C ve 341,6 °C'dir. Saptanan değerler literatür ile uyumlu bulunmuştur (Chen vd., 2004; Maeda vd., 2008; Peesan vd., 2003).

P. caudatus'tan izole edilen kitin örneklerinin kütle kaybı ise ilk aşamada vücut için %4,2 ve kafa için %2,97 ikinci aşamada vücut için %82,79 ve kafa için %56,6 üçüncü aşamada kül içeriği vücut için %13,01 ve kafa için %40,43 olarak saptanmıştır.





Şekil 4.4. a) *P. caudatus*' un vücut kısımlarından izole edilen kitin ince filmin Termogravimetrik analiz sonuçları b) *P. caudatus*' un kafa kısımlarından izole edilen kitinin Termogravimetrik analiz sonuçları.

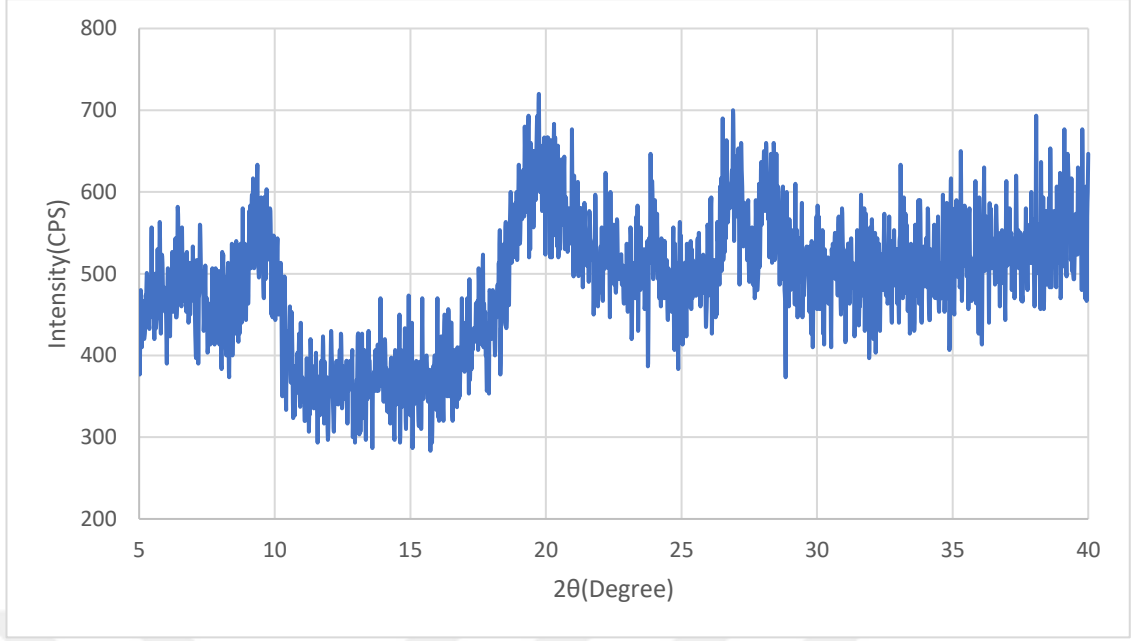
Çizelge 4.2. *P. caudatus*' tan elde edilen kitinin TG – DTA analizlerinin sonuçları.

Türler	Sıcaklık oranı	Kütle kaybı (%wt)	Toplam kütle kaybı (%wt)	DTGmax (°C)
<i>P. caudatus</i> vücut	0-700	4.2 82.79	86.99	339.4
<i>P. caudatus</i> kafa	0-700	2.97 56.6	59.59	341.6

4.4 XRD

P. caudatus'tan izole edilen kitin ince filmin XRD kırınım pikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Malzemenin kristal derecesini elde etmek ve değerlendirmek için yapılan analizdir. Üç farklı allomorfik formu (α -, β - ve γ -kitin) ayırt etmek için önemli standart analizdir (Cárdenas vd., 2004). *P. caudatus*'tan elde edilen kitin toz haline getirilerek numunenin X-ışını kırınım analizi 2θ cinsinden $5-40^\circ$ açı aralığında yapılmıştır. Keskinliklerine göre malzemenin kristallliği ve içeriği analizle belirlenmiştir. Kristalin polimorf yapısından dolayı β -kitin daha geniş, dağınık saçılma ve daha az yoğunlukta tepe noktaları gösterir (Lavall vd., 2007). Kitin biyopolimeri için karakteristik 9° ve 19° da oluşan iki keskin majör pik bulunmaktadır. Keskin olmayan 13° , 21° , 23° , 26° ve 39° civarında kitin varlığını destekleyen beş tane minör pik kitin için karakteristiktir (Jang vd., 2004). Literatüre bakıldığında α -kitin için belirgin yoğun pikler sergilerken, β kitin için geniş dağınık bir saçılma daha az yoğun pikler olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, kalamardan izole edilen β kitin nanofiberlerin kırınım pikleri $9,8^\circ$ ve $19,3^\circ$ 'de bildirilmiştir (Fan vd., 2008).

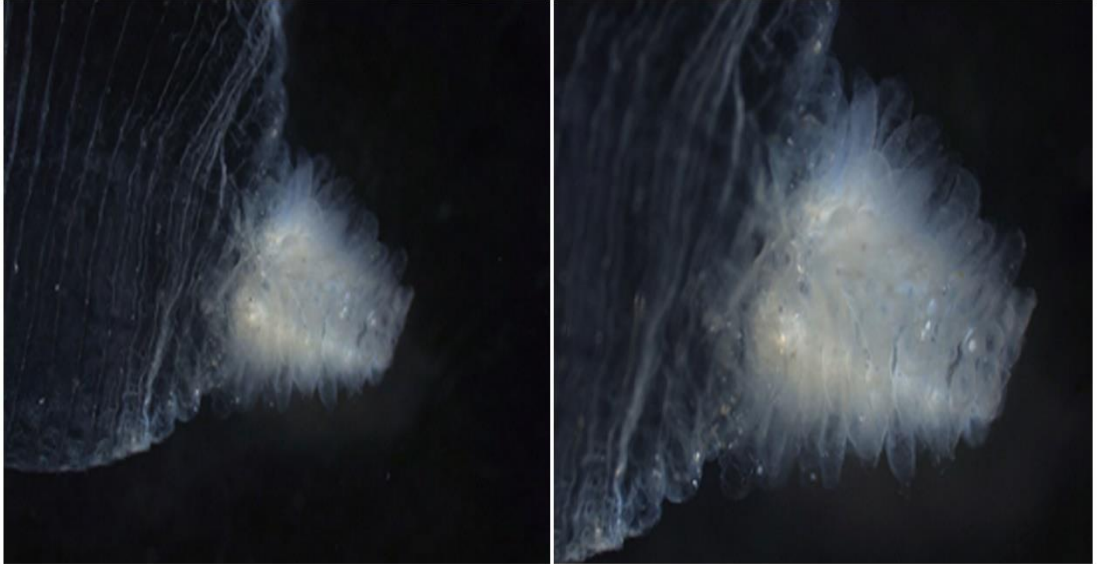
Mevcut çalışmada *P. caudatus*'tan izole edilen kitin ince filmin XRD kırınım pikleri $9,2^\circ$ ve $19,74^\circ$ 'de iki majör pik, $13,9^\circ$, $21,6^\circ$, $23,8^\circ$, $26,6^\circ$ ve $39,1^\circ$ 'de kitin için beş tane minör pik vermiştir. Literatürdeki mevcut çalışmalarda kitinin farklı allomorfik formlarında X-Işını kırınım yöntemiyle belirlenen spektrumlarının mevcut çalışma ile benzer pikler verdiği saptanmıştır (Al Sagheer vd., 2009; Hajji vd., 2014; Jang vd., 2004). Elde edilen bu β -kitin örneklerinin CrI değerleri formüle göre hesaplandığında %73.07 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *P. caudatus*'tan izole edilen kitin ince filmin XRD kırınım pikleri.

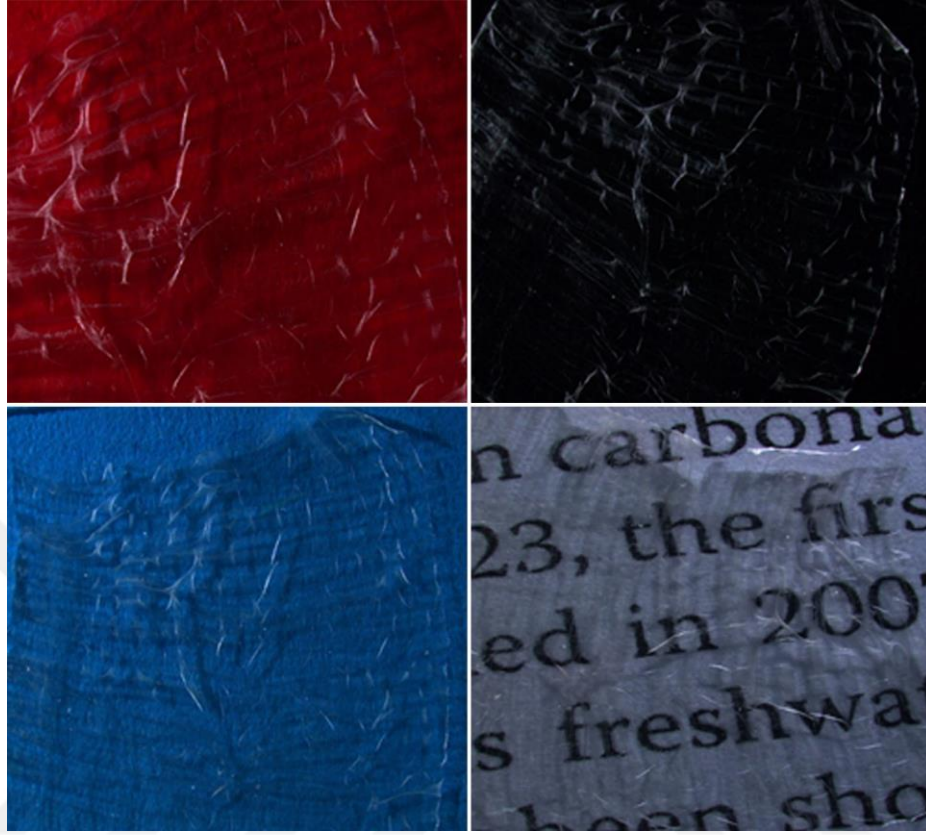
4.5 *P. caudatus*'tan İzole Edilen Kitinlerin Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Üç boyutlu yapısı korunarak *P. caudatus*'tan izole edilen kitinin ışık mikroskobu (Leica Z6 APO) görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. *P. caudatus*'tan izole edilen kitinin ışık mikroskobu ile üç boyutlu görüntüsü.

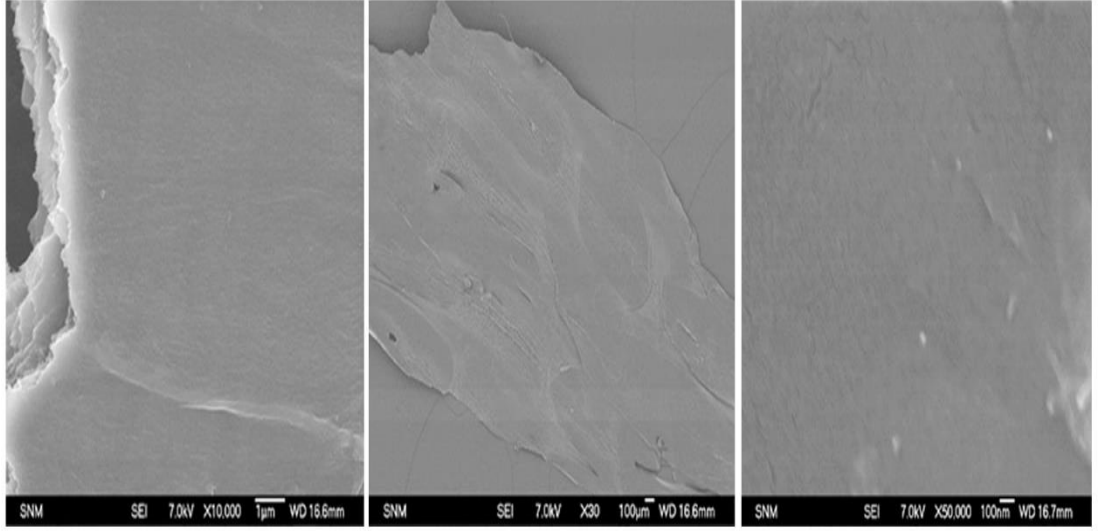
Tabla üzerine renkli ve yazılı zeminler eklendiğinde transparan özelliğe sahip olduğu Şekil 4.7’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. *P. caudatus*’tan izole edilen kitin filmlerin ışık mikroskopunda incelenmesi.

Yapısı korunarak *P.caudatus*’ tan izole edilen kitin filmin yüzey morfolojileri SEM aracılığıyla detaylı olarak incelenmiştir. Literatürde kitin yüzey morfolojilerinin dört farklı biçimde olduğu belirtilmiştir. Bunlar; nano lif ve gözenek içermeyen pürüzsüz bir yüzey, nano liflerden oluşan ancak gözenek içermeyen yüzey, nano lifli ve gözenekli yüzey, nano fiberlerle kombinasyon halinde ve farklı boyutlarda (makro ve/veya mikro) iki tip gözenekten oluşan yüzeylerdir (Kaya vd., 2015b).

Bu çalışmada *P.caudatus*’ tan elde edilen kitin filmin yüzey morfolojisi nano lif ve gözenek içermeyen pürüzsüz bir yüzey gibi görünse de hafif fibril kırıklarına rastlanmıştır. *P. caudatus*’ tan izole edilen kitin filmlerin SEM görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da β kitinde hafif görünür fibriller olduğu kaydedilmiştir (Lavall vd., 2007; Kaya vd., 2016).



Şekil 4.8. *P. caudatus*'tan izole edilen kitin filmlerin SEM görüntüleri.

4.6 Filmin Kalınlığı

P. caudatus'tan izole edilen kitin filmlerin kalınlığını belirlemek için 0-25 mm aralığında 0,001 mm doğruluk ile ölçüm yapan dijital mikrometre kullanılmıştır. Elde edilen filmin kalınlığı 33 µm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.9. *P. caudatus*'tan izole edilen kitin filmlerin dijital mikrometre ile ölçümü.

4.7 Elemental Analiz

P. caudatus’tan elde edilen kitinin asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz sonuçları Çizelge 4.3’te verilmiştir. *P. caudatus*’tan izole edilen kitin ince film örneklerinin element içeriği N (%5.61), C (%35.25) ve H (%4.97) olarak sırasıyla kaydedilmiştir. Bu veriler dikkate alınarak ince kitin filmin %DA verilen formülle %66.44 olarak belirlenmiştir. Elde edilen asetilasyon derecesi, saflaştırma işlemleri, analitik yöntemler ve kitin kaynakları gibi birkaç faktöre bağlıdır (Gonil ve Sajomsang, 2012). Literatüre bakıldığında *Loligo sanpaulensis* ve *Loligo plei*’den kalamar kalemelerinden ekstrakte edilen β -kitin örneklerinde analiz edilen C/N oranı ile *P. caudatus*’tan elde edilen kitin filmdeki C/N oranı 6.28 ve karşılık gelen DA tutarlıdır (Lavall vd., 2007). Asetilasyon derecesi ve N içeriği izole edilen kitin içeriğinin saflığını belirlemektedir. Teorik olarak tamamen asetilenmiş kitin için hesaplanan N içeriği %6,9’dur (Liu vd., 2012). Ancak uygulamada bu değeri elde etmek imkansızdır. Toz hale getirilen kitin atmosferden suyu çeker bu yüzden %6,9’a yakın değerler saf kitin olarak değerlendirilir. *P. caudatus*’tan izole edilen ince kitin filmin N içeriği 5,61 olarak saptanmıştır. Teorik değerden daha düşük olması TGA analizinde de gözlenen su içeriğine atfedilebilir.

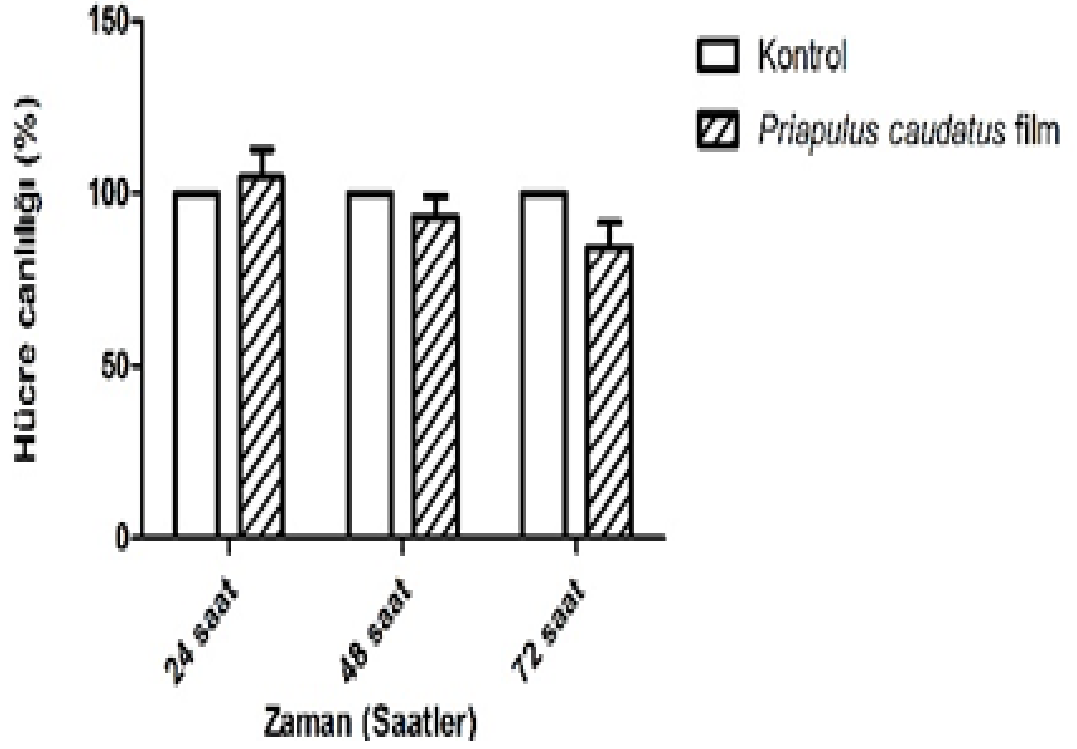
Çizelge 4.3. *P. caudatus*’tan elde edilen kitinin asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz sonuçları.

Kitin Numunesi	%N	%C	%H	% DA
<i>P.caudatus</i>	5.61	35.25	4.97	66.44

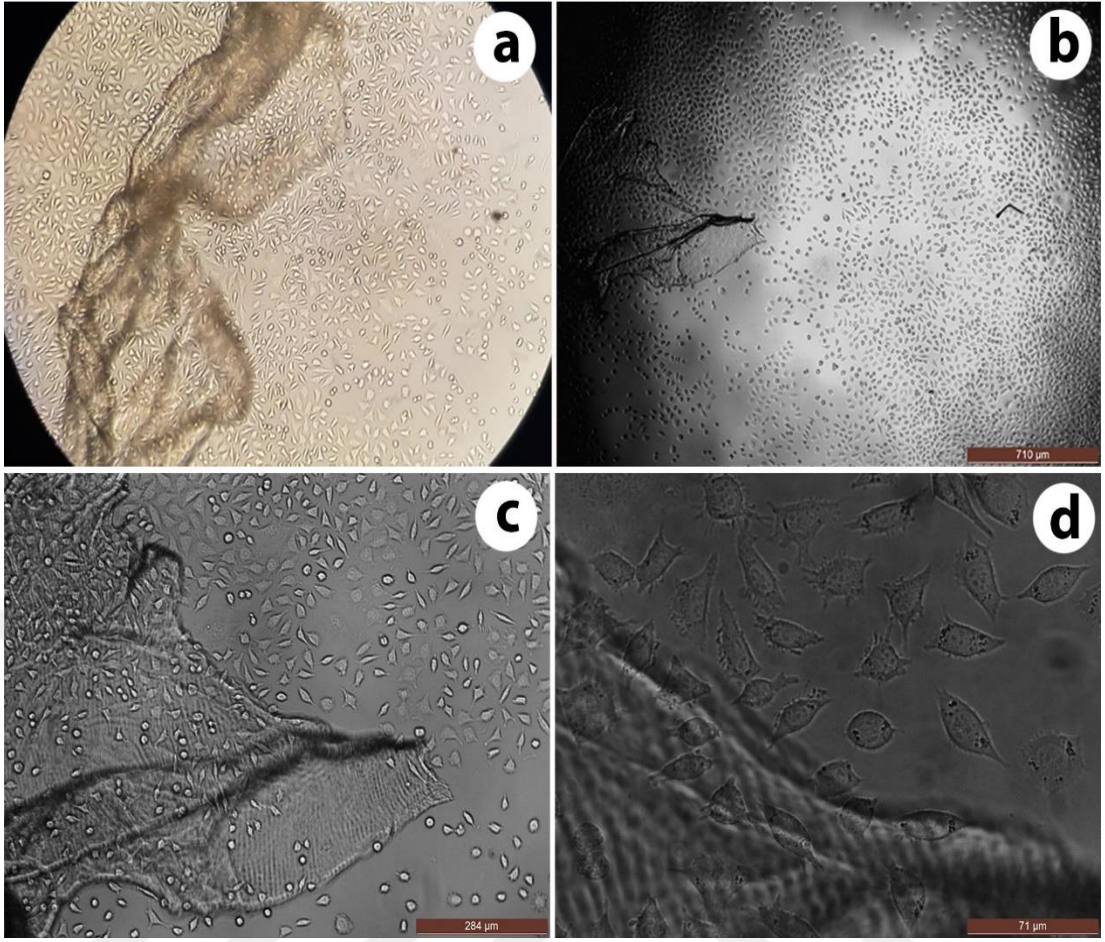
4.8 Hücre Kültürü Çalışmaları

P. caudatus’tan izole edilen ince kitin filminin sitotoksitesi MTT testi ile gösterilmiştir. *P. caudatus*’tan izole edilen kitin filmlerin 24, 48 ve 72. saatteki sitotoksite grafiği Şekil 4.10’da ve sitotoksite görüntüsü Şekil 4.11’de verilmiştir. Hücre canlılığı, film içermeyen kontrol ve film içeren uygulama gruplarında ise 24 saat için sırasıyla %100, %101,89 olarak belirlenmiştir. Hücre canlılık oranları %100 olarak belirlenen kontrol grubuna kıyasla 48. ve 72. saatlerde film içeren gruplarda % 95,55 ve % 82.33 olarak belirlenmiştir. MTT testi ile belirlenen hücre canlılığı sonuçları, 2x2 mm boyutunda *P. caudatus* ince kitin filminin üç zaman diliminde de

L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediğini göstermiştir (Tüm canlılık değerleri % 70'in üzerindedir). Kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılık istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.10. *P. caudatus*'tan izole edilen kitin filmlerin 24, 48 ve 72. saatteki sitotoksosite grafiği.



Şekil 4.11. *P. caudatus*'tan izole edilen kitin filmlerin sitotoksosite görüntüsü a) 48 saat oküler sitotoksosite görüntüsü, b) 4x, c)10x ve d) 40x sitotoksosite görüntüsü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile ilk kez Priapulida şubesine ait bir canlının kitin içeriği detaylı bir şekilde araştırılarak fizikokimyasal özellikleri ortaya konmuştur. Bu bağlamda, üretilen kitinin beta formda olduğu kaydedilmiştir. Bu özelliği ile Priapulida kitini Arthropoda kitininden ziyade Mollusca kitinine daha yakın özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmayı orijinal kılan bir diğer yönü ise, ilk kez bir priapulid solucanının orijinal yapısını koruyarak ince kitin film materyali üretilmesidir. Bilindiği üzere ince film teknolojisi farklı disiplinlerin ilgisini çeken güncel bir konudur ve bu nedenle mevcut çalışmada üretilen ince kitin film ileriye yönelik disiplinler arası yeni araştırmalara olanak sağlayacaktır. Arthropoda grubu canlıların kitin içerikleri genellikle %10'un üzerinde gözlenirken priapulidlerin kitin içeriğinin oldukça düşük olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur. Oldukça ince bir yapıya sahip olan film şeffaf bir renge sahiptir ve bu da filmi oldukça transparan kılmaktadır. Transparan film materyalleride günümüzde malzeme bilimi açısından oldukça ilgi çeken bir konudur. Tüm bunlara ilaveten, üretilen kitin filmin, çalışılan hücre hattı (fare fibroblast hücresi, L929) üzerine toksik bir özellik oluşturmadığı belirlenmiştir. Toksik olmaması nedeniyle mevcut çalışmada üretilen filmin ileriye yönelik biyomedikal alanda kullanım potansiyeli olabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abirami, S., Nagarajan, D., Antony, V.S., Mini Varsini, A., Sugasini, A. ve Anand, D.A., 2020. Extraction, characterization, and utilization of shrimp waste chitin derived chitosan in antimicrobial activity, seed germination, preservative, and microparticle formulation, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11, 2, 8725-8739.
- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. ve Aminabhavi, T.M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery, *Journal of controlled release*, 100, 1, 5-28.
- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A. ve Lake, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals, *Nature*, 387, 6632, 489-493.
- Al Sagheer, F., Al-Sughayer, M., Muslim, S. ve Elsabee, M., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate polymers*, 77, 2, 410-419.
- Allan, G., Altman, L., Bensinger, R., Ghosh, D., Hirabayashi, Y., Neogi, A. ve Neogi, S., 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. In: *Chitin, chitosan, and related enzymes*, Eds: Elsevier, p. 119-133.
- Arkhipkin, A.I., Rodhouse, P.G., Pierce, G.J., Sauer, W., Sakai, M., Allcock, L., Arguelles, J., Bower, J.R., Castillo, G. ve Ceriola, L., 2015. World squid fisheries, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23, 2, 92-252.
- Blackwell, J., 1969. Structure of β -chitin or parallel chain systems of poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 7, 3, 281-298.
- Blackwell, J., Gardner, K., Kolpak, F., Minke, R. ve Claffey, W., 1980. Refinement of cellulose and chitin structures, In. Eds: ACS Publications, p.
- Bo, M., Bavestrello, G., Kurek, D., Paasch, S., Brunner, E., Born, R., Galli, R., Stelling, A.L., Sivkov, V.N. ve Petrova, O.V., 2012. Isolation and identification of chitin in the black coral *Parantipathes larix* (Anthozoa: Cnidaria), *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 1-2, 129-137.
- Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S. ve van Pée, K.H., 2009. Chitin-based organic networks: an integral part of cell wall biosilica in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 51, 9724-9727.
- Butchosa, N., Brown, C., Larsson, P.T., Berglund, L.A., Bulone, V. ve Zhou, Q., 2013. Nanocomposites of bacterial cellulose nanofibers and chitin nanocrystals: fabrication, characterization and bactericidal activity, *Green chemistry*, 15, 12, 3404-3413.

- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E. ve Miranda, S.P., 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ^{13}C cross polarization/mass angle spinning NMR, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 4, 1876-1885.
- Carlstrom, D., 1957. The crystal structure of α -chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine), *The Journal of Cell Biology*, 3, 5, 669-683.
- Chamoy, L., Nicolai, M., Ravau, J., Quennedey, B., Gaill, F. ve Delachambre, J., 2001. A Novel Chitin-binding Protein from the Vestimentiferan *Riftia pachyptila* Interacts Specifically with β -Chitin: CLONING, EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11, 8051-8058.
- Chen, C.H., Wang, F.Y. ve Ou, Z.P., 2004. Deacetylation of β -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions, *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 5, 2416-2422.
- Darmon, S. ve Rudall, K., 1950. Infra-red and X-ray studies of chitin, *Discussions of the Faraday Society*, 9, 251-260.
- Davila-Rodriguez, J.L., Escobar-Barrios, V.A., Shirai, K. ve Rangel-Mendez, J.R., 2009. Synthesis of a chitin-based biocomposite for water treatment: Optimization for fluoride removal, *Journal of Fluorine Chemistry*, 130, 8, 718-726.
- Demling, R.H. ve Desanti, L., 2001. Effects of silver on wound management, *Wounds*, 13, 1, 4-15.
- Duan, B., Chang, C., Ding, B., Cai, J., Xu, M., Feng, S., Ren, J., Shi, X., Du, Y. ve Zhang, L., 2013. High strength films with gas-barrier fabricated from chitin solution dissolved at low temperature, *Journal of Materials Chemistry A*, 1, 5, 1867-1874.
- Duan, B., Zheng, X., Xia, Z., Fan, X., Guo, L., Liu, J., Wang, Y., Ye, Q. ve Zhang, L., 2015. Highly biocompatible nanofibrous microspheres self-assembled from chitin in NaOH/urea aqueous solution as cell carriers, *Angewandte Chemie*, 127, 17, 5241-5245.
- Dukor, R.K., Story, G.M. ve Marcott, C., 1999. A method for analysis of clinical tissue samples using FTIR microspectroscopic imaging. In: *Spectroscopy of biological molecules: new directions*. Eds: Springer, p. 471-472.
- Dunn, C.W., Giribet, G., Edgecombe, G.D. ve Hejnol, A., 2014. Animal phylogeny and its evolutionary implications, *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 45, 371-395.
- Dunn, C.W., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M. ve Edgecombe, G.D., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life, *Nature*, 452, 7188, 745-749.

- Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J., Schiaparelli, S., Ereskovsky, A. ve Schupp, P., 2010. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 2, 132-140.
- Ehrlich, H., Maldonado, M., Spindler, K., Eckert, C., Hanke, T., Born, R., Göbel, C., Simon, P., Heinemann, S. ve Worch, H., 2007. Evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (Demospongia: Porifera).
- Fan, Y., Saito, T. ve Isogai, A., 2008. Preparation of chitin nanofibers from squid pen β -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions, *Biomacromolecules*, 9, 7, 1919-1923.
- Gagné, N., 1993, Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid, McGill University.
- Gardner, K. ve Blackwell, J., 1975. Refinement of the structure of β -chitin, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14, 8, 1581-1595.
- Gonil, P. ve Sajomsang, W., 2012. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin from insect cuticles, *International journal of biological macromolecules*, 51, 4, 514-522.
- Goosen, M.F., 1996. Applications of Chitan and Chitosan, CRC Press.
- Greven, H., Kaya, M., Sargin, I., Baran, T., KRISTENSEN, R.M. ve Sorensen, M.V., 2019. Characterisation of chitin in the cuticle of a velvet worm (Onychophora), *Turkish Journal of Zoology*, 43, 5, 416-424.
- Hackman, R. ve Goldberg, M., 1965. Studies on Chitin VI. The Nature of α -and β -Chitins, *Australian journal of biological sciences*, 18, 4, 935-946.
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M. ve Jellouli, K., 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources, *International journal of biological macromolecules*, 65, 298-306.
- Hammond, R., 1970. The surface of *Priapulius caudatus* (Lamarck, 1816), *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 68, 3, 255-268.
- Hench, L.L., 1998. Biomaterials: a forecast for the future, *Biomaterials*, 19, 16, 1419-1423.
- Hirano, S., Itakura, C., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., Kanbara, N. ve Kawakami, T., 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 38, 5, 1214-1217.

- Hutmacher, D.W., 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 24, 2529-2543.
- Ifuku, S., Ikuta, A., Egusa, M., Kaminaka, H., Izawa, H., Morimoto, M. ve Saimoto, H., 2013. Preparation of high-strength transparent chitosan film reinforced with surface-deacetylated chitin nanofibers, *Carbohydrate polymers*, 98, 1, 1198-1202.
- Ifuku, S., Morooka, S., Nakagaito, A.N., Morimoto, M. ve Saimoto, H., 2011. Preparation and characterization of optically transparent chitin nanofiber/(meth) acrylic resin composites, *Green Chemistry*, 13, 7, 1708-1711.
- Ifuku, S. ve Saimoto, H., 2012. Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications, *Nanoscale*, 4, 11, 3308-3318.
- Illanes, A., Ruiz, A., Zuniga, M., Aguirre, C., O'reilly, S. ve Curotto, E., 1990. Immobilization of lactase for the continuous hydrolysis of whey permaete, *Bioprocess engineering*, 5, 6, 257-262.
- Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H. ve Nah, J.W., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 14, 3423-3432.
- Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S. ve Tamura, H., 2007. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials, *International journal of biological macromolecules*, 40, 3, 175-181.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P.S., Nair, S., Furuike, T. ve Tamura, H., 2011. Novel chitin and chitosan materials in wound dressing, *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, 1-23.
- Kato, Y., Onishi, H. ve Machida, Y., 2003. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4, 5, 303-309.
- Kaya, M., Akata, I., Baran, T. ve Menteş, A., 2015a. Physicochemical properties of chitin and chitosan produced from medicinal fungus (*Fomitopsis pinicola*), *Food Biophysics*, 10, 2, 162-168.
- Kaya, M., Baran, T., Mentes, A., Asaroglu, M., Sezen, G. ve Tozak, K.O., 2014. Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food biophysics*, 9, 2, 145-157.
- Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. ve Tubelytė, V., 2015b. First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin, *International journal of biological macromolecules*, 79, 126-132.

- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A.M., Baran, T., Amemiya, C.T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I. ve Labidi, J., 2017a. On chemistry of γ -chitin, Carbohydrate polymers, 176, 177-186.
- Kaya, M., Salaberria, A.M., Mujtaba, M., Labidi, J., Baran, T., Mulercikas, P. ve Duman, F., 2018. An inclusive physicochemical comparison of natural and synthetic chitin films, International journal of biological macromolecules, 106, 1062-1070.
- Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Tomruk, M.N., Gevrek, S., Karatoprak, I., Colak, N., Sak, Y.G. ve Bulut, E., 2016. Comparison of bovine serum albumin adsorption capacities of α -chitin isolated from an insect and β -chitin from cuttlebone, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 38, 146-156.
- Kaya, M., Sargin, I., Sabeckis, I., Noreikaite, D., Erdonmez, D., Salaberria, A.M., Labidi, J., Baublys, V. ve Tubelytė, V., 2017b. 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.
- Kumar, M.N.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications, Reactive and functional polymers, 46, 1, 1-27.
- Kumar, P.S., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S., Tamura, H. ve Jayakumar, R., 2010. Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications, Carbohydrate Polymers, 80, 3, 761-767.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, Progress in polymer science, 26, 9, 1921-1971.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S.I. ve Shimoda, K., 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 31, 2, 485-491.
- Lang, K., 1949. On the morphology of the larva of Priapulus caudatu Lam, Almqvist & Wiksell.
- Lavall, R.L., Assis, O.B. ve Campana-Filho, S.P., 2007. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization, Bioresource Technology, 98, 13, 2465-2472.
- Lemburg, C., 1998. Electron microscopical localization of chitin in the cuticle of *Halicryptus spinulosus* and *Priapulus caudatus* (Priapulida) using gold-labelled wheat germ agglutinin: phylogenetic implications for the evolution of the cuticle within the Nematelminthes, Zoomorphology, 118, 3, 137-158.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. ve Yang, Q., 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky, Molecules, 17, 4, 4604-4611.

- Maeda, Y., Jayakumar, R., Nagahama, H., Furuike, T. ve Tamura, H., 2008. Synthesis, characterization and bioactivity studies of novel β -chitin scaffolds for tissue-engineering applications, *International journal of biological macromolecules*, 42, 5, 463-467.
- Martín-Durán, J.M. ve Hejnal, A., 2015. The study of *Priapulus caudatus* reveals conserved molecular patterning underlying different gut morphogenesis in the Ecdysozoa, *BMC biology*, 13, 1, 1-20.
- Martín-Durán, J.M., Janssen, R., Wennberg, S., Budd, G.E. ve Hejnal, A., 2012. Deuterostomic development in the protostome *Priapulus caudatus*, *Current Biology*, 22, 22, 2161-2166.
- Mazeau, K., Winter, W.T. ve Chanzy, H., 1994. Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data, *Macromolecules*, 27, 26, 7606-7612.
- Mondal, S., Li, C. ve Wang, K., 2015. Bovine serum albumin adsorption on gluteraldehyde cross-linked chitosan hydrogels, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60, 8, 2356-2362.
- Mujtaba, M., Morsi, R.E., Kerch, G., Elsabee, M.Z., Kaya, M., Labidi, J. ve Khawar, K.M., 2019. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review, *International journal of biological macromolecules*, 121, 889-904.
- Mushi, N.E., Utsel, S. ve Berglund, L.A., 2014. Nanostructured biocomposite films of high toughness based on native chitin nanofibers and chitosan, *Frontiers in chemistry*, 2, 99.
- Muzzarelli, R., Mattioli-Belmonte, M., Pugnali, A. ve Biagini, G., 1999. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing, *Exs*, 87, 251-264.
- Muzzarelli, R.A., 1983. Chitin and its derivatives: new trends of applied research, *Carbohydrate Polymers*, 3, 1, 53-75.
- Muzzarelli, R.A. ve RAA, M., 1973. Natural chelating polymers. Alginic acid, chitin and chitosan.
- Nagahama, H., Nwe, N., Jayakumar, R., Koiwa, S., Furuike, T. ve Tamura, H., 2008. Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, *Carbohydrate polymers*, 73, 2, 295-302.
- Noishiki, Y., Takami, H., Nishiyama, Y., Wada, M., Okada, S. ve Kuga, S., 2003. Alkali-induced conversion of β -chitin to α -chitin, *Biomacromolecules*, 4, 4, 896-899.

- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C. ve Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 1, 98-103.
- Peesan, M., Rujiravanit, R. ve Supaphol, P., 2003. Characterisation of beta-chitin/poly (vinyl alcohol) blend films, *Polymer testing*, 22, 4, 381-387.
- Pisani, D., Carton, R., Campbell, L.I., Akanni, W.A., Mulville, E. ve Rota-Stabelli, O., 2013. An overview of arthropod genomics, mitogenomics, and the evolutionary origins of the arthropod proteome, *Arthropod biology and evolution*, 41-61.
- Prashanth, K.H. ve Tharanathan, R., 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview, *Trends in food science & technology*, 18, 3, 117-131.
- Ravaux, J., Zbinden, M., Voss-Foucart, M., Compère, P., Goffinet, G. ve Gaill, F., 2003. Comparative degradation rates of chitinous exoskeletons from deep-sea environments, *Marine Biology*, 143, 2, 405-412.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in polymer science*, 31, 7, 603-632.
- Roberts, G.A., 1992. Structure of chitin and chitosan. In: *Chitin chemistry*. Eds: Springer, p. 1-53.
- Sakurada, I., Nukushina, Y. ve Ito, T., 1962. Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers, *Journal of Polymer Science*, 57, 165, 651-660.
- Salaberria, A.M., Diaz, R.H., Labidi, J. ve Fernandes, S.C., 2015. Preparing valuable renewable nanocomposite films based exclusively on oceanic biomass—Chitin nanofillers and chitosan, *Reactive and Functional Polymers*, 89, 31-39.
- Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Ogawa, R. ve Tokura, S., 1990. Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin, *International journal of biological macromolecules*, 12, 5, 295-296.
- Schmidt-Rhaesa, A., (2013). *Handbook of zoology Vol 1: Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha, Loricifera*, Walter De Gruyter Berlin, Germany.
- Schmidt-Rhaesa, A., Bartolomaeus, T., Lemburg, C., Ehlers, U. ve Garey, J.R., 1998. The position of the Arthropoda in the phylogenetic system, *Journal of Morphology*, 238, 3, 263-285.
- Serov, I., Bochek, A., Novoselov, N., Zabivalova, N., Lavrent, V., Vlasova, E. ve Volchek, B., 2015. Chitin in aqueous alkaline solutions with urea and thiourea additives and the structures of films obtained from them, *Fibre Chemistry*, 47, 4, 247-250.

- Setoyama, M., Kato, T., Yamamoto, K. ve Kadokawa, J.-i., 2013. Preparation of chitin/cellulose films compatibilized with polymeric ionic liquids, *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 3, 795-801.
- Srinivasa, P. ve Tharanathan, R., 2007. Chitin/chitosan—Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses, *Food reviews international*, 23, 1, 53-72.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb ve N.A., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.
- Tan, S.C., Khor, E., Tan, T.K. ve Wong, S.M., 1998. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination, *Talanta*, 45, 4, 713-719.
- Tang, W.J., Fernandez, J.G., Sohn, J.J. ve Amemiya, C.T., 2015. Chitin is endogenously produced in vertebrates, *Current Biology*, 25, 7, 897-900.
- Usami, Y., Okamoto, Y., Takayama, T., Shigemasa, Y. ve Minami, S., 1998. Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42, 4, 517-522.
- Wanjin, T., Cunxin, W. ve Donghua, C., 2005. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan, *Polymer Degradation and Stability*, 87, 3, 389-394.
- Wennberg, S.A., Janssen, R. ve Budd, G.E., 2009. Hatching and earliest larval stages of the priapulid worm *Priapulus caudatus*, *Invertebrate Biology*, 128, 2, 157-171.
- Wu, Q., Jungstedt, E., Šoltésová, M., Mushi, N.E. ve Berglund, L.A., 2019. High strength nanostructured films based on well-preserved β -chitin nanofibrils, *Nanoscale*, 11, 22, 11001-11011.
- Wysokowski, M., Motylenko, M., Stöcker, H., Bazhenov, V.V., Langer, E., Dobrowolska, A., Czaczyk, K., Galli, R., Stelling, A.L. ve Behm, T., 2013. An extreme biomimetic approach: hydrothermal synthesis of β -chitin/ZnO nanostructured composites, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 46, 6469-6476.
- Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A.L., Stawski, D., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2015. Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics, *Polymers*, 7, 2, 235-265.
- Zhao, Y., Park, R.-D. ve Muzzarelli, R.A., 2010. Chitin deacetylases: properties and applications, *Marine drugs*, 8, 1, 24-46.
- Zhinkin, L., 1949. Early stages in the development of *Priapulus caudatus*, *Dok. Akad. Nauk*, 65, 409-412.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Gamze ÖZKAN

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
Bölümü, 2014-2018

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
ABD, 2018-2021

MESLEKİ DENEYİMLER

1. Erasmus Staj Programı (01.07.2017-01.09.2017), Vytautas Magnus Üniversitesi, Kaunas /LİTVANYA
2. ITAC- POSTER SUNUMU P111 -HAZİRAN 20-23 2018
(The Evaluation of Antioxidant Activities of Different Trifolium hirtum Ex-tracts)
3. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi – Pedagogik Formasyon Eğitimi Sertifikası

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Özkan G. ve Kaya M. 2020. Priapulus caudatus'tan doğal ince kitin film üretilmesi ve karakterizasyonu, Ankara II. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, 6-8 Mart 2020, Ankara, Özet Kitabı, 258-259.