



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***VESPA CRABRO*' NUN GELİŞİM SÜRECİNE (LARVA, PUPA VE
YETİŞKİN) BAĞLI OLARAK KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNDEKİ DEĞİŞİM**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARWAN SOFI GHAFOOR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2016



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***VESPA CRABRO*' NUN GELİŞİM SÜRECİNE (LARVA, PUPA VE
YETİŞKİN) BAĞLI OLARAK KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNDEKİ DEĞİŞİM**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARWAN SOFI GHAFOOR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2016

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

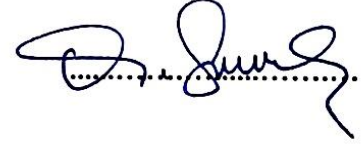
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330805 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, "Karwan AZEEZ SOFI GHAFOOR", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "VESPA CRABRO' NUN GELİŞİM SÜRECİNE (LARVA, PUPA VE YETİŞKİN) BAĞLI OLARAK KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNDEKİ DEĞİŞİM" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat KAYA
Aksaray Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Osman SEYYAR
Niğde Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. DrYavuz Selim ÇAKMAK
Aksaray Üniversitesi



Teslim Tarihi: 11. Mayıs.2016

Savunma Tarihi: 03. Haziran.2016

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında 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.

Karwan SOFI GHAFOR

TEŞEKKÜR

En derin şükranlarımı yüksek lisans tez danışmanım Doç.Dr. Murat KAYA'ya sunuyorum. Doç.Dr. Murat KAYA'nın öğrencisi olduğumdan beri kendisinden çok değerli bilgiler öğrendim. Ayrıca hocam beni akademik anlamda geliştirmek (makale yazımını ve literatür taraması yapmayı öğretti) için çok zaman ve emek harcamıştır.

Dr. Idris SARGIN'a deneylerim boyunca göstermiş olduğu sonsuz desteklerinden dolayı gönülden teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans arkadaşlarım Muhammad MUJTABA, Ivan AL-JAF, Esra BULUT ve Bahar AKYÜZ 'e özel olarak teşekkür ediyorum.

Türkiyede geçirdiğim 2 yıl boyunca, arkadaşlarım hayatıma renk kattılar ve onlar sayesinde bu süre boyunca karşılaştığım zorlukların üstesinden gelebilmem için bana güç veren arkadaşlar edindim.

Sonuncu ve en önemlisi olarak, yüksek lisansımı başarıyla tamamlayabilmem için beni her zaman destekleyen aileme gönülden teşekkür ediyorum.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü'nün yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma da, bir yaban arısı olan *Vespa crabro*'nun farklı gelişim evrelerinden (larva, pupa ve yetişkin) aynı metod kullanılarak izole edilen kitinlerin sahip olduğu özellikler detaylıca incelenmiştir. Kitin izolasyonu için kullanılan örnekler Irak'ın Süleymaniye şehrinden toplanmıştır. *V. crabro*'dan izole edilen kitinlerin kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri farklı analitik metotlar kullanılarak karakterize edilmiştir. Mevcut çalışma, *V. crabro*'nun gelişim evreleri boyunca sahip olduğu kitin yapısının fizikokimyasal özellikleri bakımından nasıl değiştiğine odaklanmıştır. Yapılan deney sonuçları, organizma gelişimini tamamladıkça sahip olduğu kitin içeriğinin arttığını göstermiştir. Ayrıca larva, pupa ve yetişkin yapılarından izole edilen kitinlerin sahip oldukları yüzey morfolojilerinde büyük farklılıklar olduğu da gözlenmiştir.

Bu yüksek lisans tezi, Aksaray Üniversitesi bünyesinde bulunan Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genel Biyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. MALZEME VE YÖNTEM	8
3.1 Örneklerin Toplanması.....	8
3.2 Kitin İzolasyonu.....	9
3.3 Analizler	9
3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	9
3.3.2 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopu (FT-IR).....	10
3.3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA).....	10
3.3.4 Elementel Analiz.....	10
3.3.5 Kitinaz Yıkım Testi	10
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	12
4.1 Larva, pupa ve yetişkin <i>V. crabro</i> 'nun Kitin İçerikleri	12
4.2 SEM	12
4.3 FT-IR.....	14
4.4 TGA	17
4.5 Elementel Analiz.....	20
4.6 Kitinaz Yıkım Testi	20
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	21
KAYNAKLAR	22
ÖZGEÇMİŞ.....	28

ÖZET

VESPA CRABRO' NUN GELİŞİM SÜRECİNE (LARVA, PUPA VE YETİŞKİN) BAĞLI OLARAK KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNDEKİ DEĞİŞİM

Bilindiği gibi, bir organizmada bulunan kitin, onun farklı vücut kısımlarının sahip olduğu fonksiyonel özelliklerinden dolayı oldukça büyük farklılık gösterebilir fakat bir organizmanın farklı gelişim evrelerinde bulunan kitinin karakteristik özelliklerinin nasıl değiştiği hala bilinmemektedir. Bu tez çalışması, bir böceğin (*Vespa crabro*) farklı morfolojik evreleri-larva, pupa ve yetişkin-boyunca kitin matriksin fizikokimyasal özelliklerinin nasıl değiştiğini belirlemek için yapılmıştır. Organizmanın içerdiği % kitin miktarının canlı büyüdükçe aşamalı olarak arttığı (% 2.6.2 ve %10.3), özellikle larva evresinden pupa evresine geçerken sentezlenen kitin miktarının neredeyse 3 kat olacak şekilde önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Enzimatik yıkım testleri izole edilen kitinlerin neredeyse tamamen saf olduklarını ispatlamıştır. Bu kitin örnekleri ayrıca termal yıkım analizine tabi tutulmuş ve örneklerin sahip oldukları termal kararlılıklarının birbirlerine benzer oldukları görülmüştür. Diğer yandan, kitinlerin yüzey morfolojilerinin canlının gelişimine göre oldukça farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Böcek, biyopolimer, kitin, izolasyon, karakterizasyon, kitinaz testi.

ABSTRACT

CHANGES IN PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CHITIN AT DEVELOPMENTAL STAGES (LARVAE, PUPA AND ADULT) OF *VESPA* *CRABRO* (WASP)

It is already known that chitin in a single organism can exhibit huge differences depending on the functions it serves in different body parts, but the alterations in the characteristics of chitin in course of developmental stages of an organism still remain unknown. This thesis study presents findings on how chitin matrix is changing physicochemically through discrete morphological stages –larva, pupa and adult– of an insect (*Vespa crabro*). Chitin content of the organisms were found to increase gradually as the organism grew; 2.1, 6.2 and 10.3%, with a dramatic increase in chitin deposition (nearly 3 folds) during the instar from larva to pupa. Enzymatic digestion test demonstrated that chitin isolates were close to pure. Chitin isolates were also subjected to thermal pyrolysis and no variations were observed in the thermal stability of the samples. However, it was observed that surface characteristics of chitin changed greatly as the insect grew.

Keywords: Insect, biopolymer, chitin, extraction, characterization, chitinase test.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1: <i>Vespa crabro</i> 'nun kamera görüntüsü. (a) larva, (b) pupa ve (c) yetiş görüntüleri.....	8
Şekil 4.1: Yetişkin <i>Vespa crabro</i> 'dan izole edilen kitin örneklerinin SEM görüntüleri.....	13
Şekil 4.2: <i>Vespa crabro</i> 'nun pupasından izole edilen kitin örneklerinin SEM analiz görüntüleri.....	13
Şekil 4.3: <i>Vespa crabro</i> 'nun larvasından izole edilen kitin örneklerinin SEM görüntüleri.....	14
Şekil 4.4: <i>Vespa crabro</i> 'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları. (a) larva, (b) pupa ve (c) yetişkin	16
Şekil 4.5: <i>Vespa crabro</i> ' dan izole edilen kitinlerin TG Analizi sonuçları. (a) larva, (a) larva, (b) pupa ve (c) yetişkin.....	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1: FT-IR spektrumunun fonksiyonel grupları ve <i>Vespa crabro</i> 'dan izole edilen kitinlerin vibrasyon modları.....	17
--	----



SİMGELER DİZİNİ

Cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
G	Gram
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

AMIMBr	1-alil-3-metilimidazolyum bromid
ATR FT-IR	Azaltılmış Tam Yansıtıcı- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
C	Karbon
¹³ C CP/MAS	Çapraz-Polarizasyon Majik-Açı-Döndürme Nükleer Manyetik
NMR	Rezonansı
¹³ C NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
DA	Asetilasyon Derecesi
DTG _{max}	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
EA	Elementel Analiz
EC	Enzim Kodu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu
H	Hidrojen
¹ H NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)
HCl	Hidroklorit Asit
IR	Kızılötesi
N	Azot
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	Sodyum Hipoklorit
NEXAFS	Yakın Kenar X-ışını Soğurma İnce Yapısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OBP	Diğer Vücut Kısımları
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
XRD	X-Işını Kırınımı
UV-vis	Mor Ötesi-Görünür Bölgesi

1. GİRİŞ

Kitin yapısı kimyasal olarak benzer olmasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalarda kitinin fizikokimyasal özelliklerinin büyük oranda kaynağa bağlı olduğu vurgulanmıştır ve yapısal bir matriks olarak kitinin karakteristik özellikleri genellikle organizmaların taksonomisi veya ekolojisine göre belirlenir ve ayrıca bir organizmada bulunan kitin tüm vücuda aynı şekilde dağılmaz (Youn vd., 2009; Kaya vd., 2015a). Bir organizmanın, farklı gelişim evrelerinde kitinlerin farklı özelliklere sahip olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalar ile açıklığa kavuşmuştur ve bir gelişim evresinden diğerine geçerken kitinlerde çok önemli farklılıklar olduğu yapılan çalışmalar ile bulunmuştur. Önceki çalışmalarda Kaya vd., (2014), patates böceğinin larvası ve yetişkin bireylerinden kitin izole etmişlerdir. Yetişkin böcek kitininin termal kararlılığının larva kitinine göre oldukça farklı olduğu kaydedilmiştir. Son yıllarda yapılan bu çalışmalara rağmen, organizmanın gelişim evrelerinde (larva, pupa ve yetişkin) bulunan kitinin yapısının kimyasal değişikliği daha detaylıca incelenmelidir.

N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan lineer bir polimer olan kitin, organizmalarda alfa, beta ve gama olmak üzere üç farklı formda bulunur (Imai vd., 2003). Böceklerin kutiküler dış iskelet ve peritrofik matrisleri başlıca kitin fibriller ve proteinler ile kompozit halinde bulunur. Kitin fibrillerin proteinler ile birlikte bulunması, böceklerin dış iskeletine mekaniksel sağlamlık ve bütünlük kazandırmasına rağmen (Ehrlich vd., 2010), böcek bağırsaklarının iç yüzeyinde bulunan kitin mekaniksel sağlamlığın yanı sıra reaktif oksijenlere ve mikrobiyal saldırılara karşı koruma görevi de sağlar (Barbehenn ve Stannard, 2004; Merzendorfer vd., 2006). Böceklerde bulunan kitinler son yıllarda bazı bilim insanlarının ilgisini çekmektedir (Rinaudo, 2006) ve bu organizmalardan izole edilen kitinlerin kaynağa bağlı olarak değişiklik göstermesi üzerine yapılan çalışmalar gitgide artmaktadır (Zhang vd., 2000; Majtán vd., 2007; Ma vd., 2015). Kitinin,

böceklerin fizyolojisinde oldukça önemli rol oynadığı ve biyolojik olarak yıkılabilen ve biyolojik olarak uyumlu özelliklere sahip olduğu için kimyasal- farmasötik endüstrisinde kullanıldığı göz önüne alındığında, bu biyopolimerin gösterilen ilgiyi hak ettiği görülür (Merzendorfer, 2006).

Vespa crabro (yaban arısı, eşek arısı), Avrupa'nın merkezinde en büyük yaban arısı türü olarak kaydedilmiştir. Bu tür ayrıca Avrupalı eşek arısı olarak da bilinir (Kovac ve Stabentheiner, 2012). Renk ve büyüklük, *V. crabro*'nun doğal yaban arısından *Dolichovespula maculata* L. (beyaz lekeli yaban arısı) ve *Vespula* spp. (sarı renkli) olarak farklılaşmasındaki en önemli parametrelerdir. Predatör böcekler olarak çerçöp ve ağaç dalı çiğnerler ve kağıt yapmak için çiğnenmiş bitki kullanırlar (Jennings ve Sferra, 2002). Çok yaygın bulunması ve özellikle farklı gelişim evrelerindeki (larva, pupa ve yetişkin) bireylerinin toplanmasındaki kolaylık, *V. crabro*'yu bu çalışma için ideal organizma yapmıştır.

Bu tez çalışması ile ilk defa bir böceğin (*V. crabro*) her bir gelişim evresinden (larva, pupa ve yetişkin) izole edilen kitinlerin fizikokimyasal özellikleri SEM, FT-IR, TGA, elementel analiz ve kitinaz yıkım testi ile incelenecektir. Buna ek olarak, bu çalışmada larva, pupa ve yetişkin *V. crabro*'nun kitin içerikleri de hesaplanacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kitin doğada en fazla kullanılan biyopolimerlerden biridir. Kitin, günümüzde, biyoloji, endüstri, tarım ve biyomedikal uygulamalarda kullanıldığından dolayı ekonomik değere sahiptir. Genellikle, deniz ürünleri endüstrisinde en fazla atık ürüne sahip olan yengeç ve karides en önemli ticari kitin kaynaklarıdır. Ancak, kitin kaynakları bazı mevsimlerde bulunma, sınırlı sayıda olma ve çevresel kirlilik gibi bazı problemlere sahiptir. Bu problemleri ortadan kaldırmak için, kitin kaynağına geleneksel olmayan ama uygulanabilir kaynak olarak böceklerin kabukları önerilmiştir (Gonil ve Sajomsang, 2012).

Bir çalışmada kimyasal yöntemler kullanılarak balık pulundan (*Labeorohit*) kitin izolasyonu yapılmıştır (Kumari ve Rath, 2014). Çeşitli asit ve alkali metodlar, en verimli sonuç alınması için gerekli olan etkili konsantrasyonun belirlenmesinde göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışmada, balığın atık durumunda olan pulları ana materyal olarak kullanılmıştır. Elde edilen örnekler FT-IR, XRD (X-Işını Kırınımı) ve SEM ile analiz edilmiştir.

Kitinin doğada α , β ve γ olmak üzere 3 formu mevcuttur. Shushizadeh vd., (2015), *Sepia Pharaonis sp.*' den izole ettiği kitin ile β formundaki kitine yeni bir kaynak organizma kazandırmışlardır. İzole edilen kitin kitosana dönüştürülmüştür. β kitin ve β kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri FT-IR, NMR (Nükleer Manyetik Rezonansı), XRD ve Viskometrik Analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Sonuçlar elde edilen β kitinin saf olduğunu ve asetilasyon derecesinin (DA) % 85.3 olduğunu göstermiştir.

Kitinin fizikokimyasal özelliklerinin kullanılan metoda göre değiştiği bilinmektedir. Ancak bu özelliklerin kitin kaynağına göre değişip değişmediği merak konusudur. Kaya vd., (2015b), farklı kaynaklardan izole edilen kitinin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için bir kelebek türü olan *Argynnis Pandora*'nın kanat ve diğer vücut kısımlarından (OBP) aynı metodu kullanarak kitin izole etmiştir. Kanat

kısının kitin içeriği (% 22) ve OBP nin kitin içeriğinden (% 8) yüksektir. Kitinlerin kimyasal yapıları FT-IR, TGA, XRD, SEM, ve elementel analiz yöntemleriyle doğrulanmıştır. Sonuçlar kanat ve OBP kitinlerinin yüzey morfolojileri hariç tüm özelliklerinin aynı olduğu gözlenmiştir. SEM analizine göre kanat kitininin bir ve OBP kitininin dört farklı yüzey morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Görüldüğü gibi, kitinin yüzey morfolojisi izole edildiği canlının vücut kısımlarına oldukça bağlıdır.

α ve β kitinin sahip oldukları fizikokimyasal özellikleri kıyaslamak için Hajji vd. (2014) üç farklı sucul organizma ile çalışmışlardır. Karides kabuğu (*Penaeus kerathurus*), yengeç kabuğundan (*Carcinus mediterraneus*) izole edilen α kitinlerin ve mürekkep balığından (*Sepia officinalis*) izole edilen β kitinin yapılarındaki fark ^{13}C NMR, FT-IR ve XRD ile karakterize edilmiştir. ^{13}C NMR analizi sonucuna göre α kitinler C3 ve C5 karbon sinyallerinde ayrılırken, β kitinde bu sinyaller birleşerek tek bir rezonans oluşturmuştur. XRD analizi, α kitinin β kitinden daha kristalin yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Karidesin yüksek miktarda (% 20) ve oldukça saf (protein ve tuz olmayan) kitin içerdiği gözlenmiştir. Bu çalışma da kitinin özelliklerinin kaynağına göre değiştiğini göstermiştir.

Zhang vd., (2000), böcek larvası ve ipekböceği (*Bombyx mori*) pupasından asit (1 N HCl) ve baz (1 N NaOH) uygulamaları sonrası kitin izole etmişlerdir. İzole edilen kitinler, XRD, ^{13}C CP/MAS NMR (çapraz-polarizasyon majik- açıl-döndürme nükleer manyetik rezonansı), ^{13}C FT-NMR ve SEM ile karakterize edilmiştir. Böcek larvası ve ipekböceği pupasından izole edilen kitinler farklı konsantrasyonlardaki asit ve baz uygulamaları ve enzimatik yıkım testine tabii tutulmuştur. Böcek larvasından izole edilen kitinin daha hızlı yıkıldığı görülmüştür.

Başka bir çalışmada, Majtan vd. (2007), ölü halde bulunan yaban arılarından klasik metodu takip ederek kabuk yapısına benzeyen kitin izole etmişlerdir. İzole edilen böcek kitini, karides kitini ile kıyaslanmak için elementel analiz, FT-IR, katı faz ^{13}C CP/MAS NMR spektrumları ve eşodaklı mikroskop kullanılmıştır. Böcek ve karides kitinlerinin birbirine benzer kimyasal yapıya sahip olduğu görülse de, böcek kitininin DA değerinin % 5 daha düşük olduğu bulunmuştur.

Şimdiye kadar çok sayıda mercanın üyesi olduğu Cnidaria şubesinin kitin içerip içermediği hakkında hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu eksikliği gidermek için Bo vd. (2012), Akdeniz Siyah mercanı olan *Parantipathes larix* (Esper, 1792)'in iskelet yapısını kitin izolasyonu için kullanmışlardır. Birçok teknik

(^{13}C NMR, FT-IR, Raman, NEXAFS (Yakın Kenar X-ışını Soğurma İnce Yapısı), Morgan-Elson analizi ve Calcofluor White boyama) kullanılarak izole edilen kitin analiz edilmiştir. İlk kez bu çalışma ile mercanların saplarında kitin olduğu ispatlanmıştır.

Kimyasal metod kullanılarak karides kabuklarından kitin ve kitosan elde edilmiştir. Kitin izolasyonu için öncelikle karides kabukları 800–1000 μm boyutuna getirilmiştir. Bu çalışmada yüksek NaOH konsantrasyonu (%50) kullanılması sayesinde asetil gruplar uzaklaştırılmış ve oldukça saf kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitinler ATR FT-IR (Azaltılmış Tam Yansıtıcı- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), XRD, SEM, UV–vis spektroskopisi, TGA ve asid–baz titrasyonu yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu kitinin antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli*) karşı oldukça yüksek aktivite sergilediği gözlenmiştir (Abdel-Rahman vd., 2015).

Klasik kitin izolasyon metodundan farklı olarak, daha basit kitin izolasyonu yapmak isteyen Setoguchi vd., (2012), yeni bir metod geliştirmiştir. Bu çalışma kapsamında, yengeç kabukları demineralizasyon aşamasında ilk olarak 1-alil-3-metilimidazolyum bromid (AMIMBr) içeren iyonik sıvısı ile muamele edilmiştir. Sonrasında demineralizasyonun tamamlanması için sitrik asit uygulamasına maruz bırakılmıştır. Süzülen örnekler kurutulmuştur. İzole edilen kitin örnekleri XRD, IR, ^1H NMR (proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi), Enerji Dağınımlı X-Işınlari Görünge Gözlemi ve TGA kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçta kitin yapısı belirlenmiştir. Örneklerin DA değeri <7% olarak hesaplanmıştır.

Böcek kitini yeni bir kaynak olan *Cicada sloughs*'dan izole edilmiştir. Kitini izole edilirken, 1 M HCl ve 1 M NaOH uygulamaları sırasıyla minerallerin ve proteinlerin yapıdan uzaklaştırılması için yapılmıştır. Kitinde bulunan renk, oksitleyici ajan olarak kullanılan sodyum hipoklorit (% 6) ile uzaklaştırılmıştır. *Cicada sloughs*'dan izole edilen kitinin pirinç tarlasında bulunan yengeç ve yengeç kabuğundan izole edilen kitinlerden daha yüksek % kitin içeriğine sahip olduğu görülmüştür. α kitinin fizikokimyasal özellikleri elementel analiz, ATR FT-IR, ^1H NMR, katı faz ^{13}C CP/MAS NMR, XRD ve TG Analizleri karakterize edilmiştir. Sonuçlar böcek kitininin DA değerinin % 97 olduğunu ve DA değerinin kristalinite ve termal kararlılık arttıkça arttığını göstermiştir (Sajomsang and Gonil, 2010).

Son zamanlarda sucul ve tatlı su süngerlerinin (Porifera) iskelet yapıları kitin izolasyonu için kullanılmıştır. Wysokowski vd. (2013), Porifera grubunda bulunan *Aplysina fistularis* 'in yapı ve şeklini koruyarak üç boyutlu kitin izolasyonu yapmıştır. Kullanılan farklı teknikler (Calcofluor White Boyama, Raman ve IR spektroskopisi) ile bu süngerin yapı iskeletlerinden izole edilen üç boyutlu kitinlerin fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal yapıları detaylıca incelenmiştir.

Kitin doğada çok yaygın olarak bulunan bir biyopolimerdir. Bu çalışma da, sahip olduğu yapısı mümkün olduğunca korunan ve yüksek saflığa sahip kitin izole edilmesi için farklı metotlar kullanılmıştır. Çünkü biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için kullanılan kitin yüksek saflık ve kaliteye sahip olmalıdır. Elde edilen kitinin deproteinizasyon etkinliği, farklı mikrobiyal ve balık pulu proteazlarına karşı test edilmiştir. Bu çalışmada seçilen *Bacillus mojavensis* A21 ve *Scorpaena scrofa* balık pulu proteazlarının yüksek deproteinizasyon derecelerine (sırasıyla % 88 $\pm$ 2 ve % 83 $\pm$ 1) sahip olduğu gözlenmiştir (Younes vd. 2016).

Ifuku vd. (2011), kitin nanofiber izolasyonu yapmak için 5 farklı mantar kullanmış ve bu yapılar mineral ve proteinleri uzaklaştırmak için asit uygulaması ile ezmişlerdir. Bu nano-fiberlerin genişliği mantar türüne bağlı olarak 20-28 nm aralığında değişmiştir. Elde edilen kitinler FT-IR ve XRD analizleri incelenmiştir. Analiz sonuçları bu kitinlerin α formunda olduğunu ve yapılarında bir miktar glukan kaldığını göstermiştir.

Kitin kaynaklarına yeni bir şube eklemek isteyen Kaya vd. (2015a), ilk kez *Plumatella repens* 'den (Bryozoa) izole edilen kitinin fizikokimyasal özelliklerini *Palomena prasina* (Arthropoda) ve *Fomes fomentarius* (Mantar) 'den izole edilen kitinler ile kıyaslayarak belirlemişlerdir. Bryozoa kitininin, mantar ve böcek kitini gibi α formda olduğu görülmüştür. Canlıların içerdiği kitinler bryozoa, mantar ve Böcek için sırasıyla % 13.3, 2.4 ve 10.8 olarak bulunmuştur. Bryozoa ve böcek kitinlerinin nano fiber ve nano porlu yapıya sahipken; mantar kitinini por ve fiber olmayan düz bir yüzeye sahip olduğu gözlenmiştir. En yüksek termal kararlılık mantar kitini için bulunmuşken, onu sırasıyla böcek ve Bryozoa kitinleri izlemiştir. Bryozoa kitinini kristalinitesi (% 60.1), böcek kitininden (% 84.9) düşük ve mantar kitininden (% 58.5) yüksek olarak bulunmuştur.

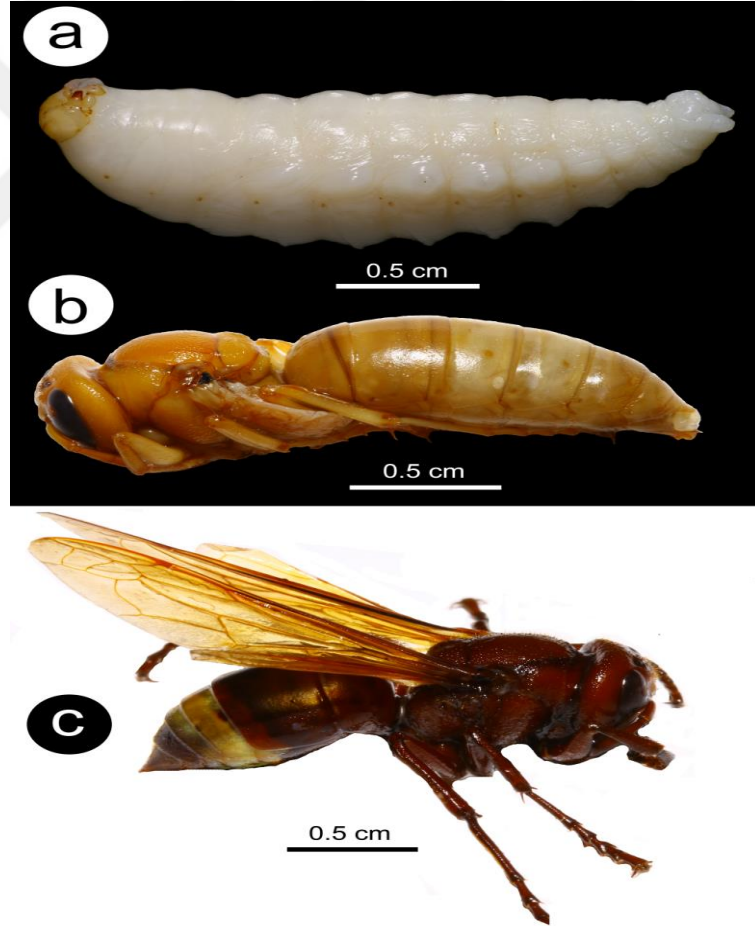
Bu çalışmada kitin atık durumundaki beyaz karidesin farklı vücut kısımlarından (kafa, kuyruk ve kabuk) otoliz enzimatik deproteinizasyon ynlemi ile izole edilmiştir. Elde edilen kitin FT-IR ile karakterize edilmiştir. Sonuçlar bu kitinin kimyasal metotlar ile izole edilen kitinden daha saf olduğunu göstermiştir. Karidesin kitin içeriği % 14.7 olarak bulunmuştur (Sjaifullah ve Santoso, 2016)



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Örneklerin Toplanması

Vespa crabro'nun larva, pupa ve yetişkin örnekleri Irak'ın Süleymaniye şehrinden Haziran 2015 yılında toplanmıştır. Larva, pupa ve yetişkin halindeki 150 birey kitin izolasyonu için kullanılmıştır. Örnekler toplandıktan sonra, laboratuara götürülüp kitin izolasyonu yapılana kadar etanol (%80)-distile su (1:1) çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Deneyler başlamadan önce toplanan örneklerden bir kamera ile alınan görüntüler şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: *Vespa crabro*'nun kamera görüntüsü. (a) larva, (b) pupa ve (c) yetişkin.

3.2 Kitin İzolasyonu

İlk olarak *V. crapro* örneklerinden mineraller uzaklaştırılmıştır. Demineralizasyon aşamasında, toz haline getirilen larva, pupa ve yetişkin örnekleri hassas terazi de 5 g olarak tartılmıştır. Sonra tartılan örnekler, *Vespa* sp. (Bağriaçık, 2011) çalışmasına benzer olarak karbonat, sodyum, magnezyum, potasyum, demir, kalsiyum, silika ve alüminyum gibi minerallerinden uzaklaştırılmak için 1 M HCl çözeltisi (100 ml) içerisinde 50°C’ de 6 saat karıştırılmıştır. Ardından mineralleri uzaklaştırılan örnekler kurutma kağıdı kullanılarak distile su ile nötral pH ya ulaşana kadar birkaç defa süzölmüştür. Deproteinizasyon aşamasında, örnekler 1 M NaOH çözeltisi içerisinde 60°C’ de 16 saat ısıtılmıştır. Bu aşama ile yapıda bulunan proteinlerin birçoğu uzaklaştırılmıştır. Kalan örnekler kurutma kağıdı kullanılarak distile su ile nötral pH ya ulaşana kadar defalarca yıkanmıştır. İzole edilen kitin örnekleri, yapılarında bulunan pigment ve yağlarından ayrılması için oda sıcaklığında distile su (40 ml), metanol (20 ml) ve kloroform (10 ml) çözeltisi içerisinde renksizleştirilmiştir. Bu çözelti içerisinde bulunan kitin örnekleri, manyetik karıştırıcıda 250 rpm de 40 dakika karıştırılmıştır. Örnekler etüve konulmadan önce, renksizleştirme aşaması distile su ile gerçekleştirilen süzme işlemiyle devam etmiştir. Bu örnekler 60°C’ de 1 hafta boyunca kurutulmuştur. Son olarak 3 farklı gelişim aşamasından elde edilen kuru kitin örneklerinin son ağırlıkları tartılmış ve bu kitinler daha sonra gerçekleştirilen analizler için kullanılmıştır.

3.3 Analizler

SEM, FT-IR, TGA, elementel analiz ve kitinaz yıkım testi, larva, pupa ve yetişkin bireylerden elde edilen kitinlerin karakterizasyonu için yapılmıştır.

3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (QUANTA- FEG 250) kullanılarak, yaban arısının larva, pupa ve yetişkin bireylerinden izole edilen kitinlerin yüzey morfolojileri belirlenmiştir. Örneklerin yüzeyi altın ile kaplanırken Gatan Precision Etching Coating Sistemi kullanılmıştır.

3.3.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu (FT-IR)

V. crabro'nun farklı gelişim evrelerinden izole edilen kitinlerin sahip olduğu FT-IR bantları Perkin Elmer cihazı ile belirlenmiştir. Bu cihaz 4000–625 cm⁻¹ aralığında bant vermektedir.

3.3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)

İzole edilen larva, pupa ve yetişkin kitinlerin TG analizleri EXSTAR S11 7300 sistemi ile yapılmıştır. Bu cihaz ile her 10 dakikada bir sıcaklık artırılarak 25 ve 650°C aralığında ölçüm yapılmıştır.

3.3.4 Elementel Analiz

Yaban arısından izole edilen kitin örneklerinin içerdikleri % C, N ve H miktarları, Elemental analyzer Flash 2000 cihazı ile belirlenmiştir. Kitinlerin sahip olduğu asetilasyon dereceleri (DA) Denklem (3.1)'e göre ayrı ayrı hesaplanmıştır (Kucukgulmez vd., 2011);

$$DA = [(C/N - 5.14) / 1.72] * 100 \quad (3.1)$$

C= Kitin örneğinde bulunan karbon elementi miktarı

N= Kitin örneğinde bulunan azot elementi miktarı

3.3.5 Kitinaz Yıkım Testi

Kitinaz yıkım testi yapılırken; ticari kitin (karides kitin, pkod:1001416772, Sigma-Aldrich), kitinaz (*Streptomyces griseus* 'den izole edilmiş, EC 3.2.1. 14, Sigma-Aldrich), Na₂CO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, HCl, etanol (Sigma-Aldrich) ve potasyum hekzasiyanoferrat (III) (Merck) kullanılmıştır.

Kitinin enzimatik hidrolizinde substrat olması için koloidal kitin (%1 w/v) hazırlanmıştır (Zhang vd., 2013). 100 mg kitin (ticari kitin ve *V. crabro* kitinleri) 2 ml soğuk HCl (% 37) çözeltisi içerisinde kitin hidrolizi tamamlanana kadar (24 saat) 4°C'de karıştırılmıştır. Süre sonunda bu karışımın üzerine 5 ml distile su- etanol (1:1) çözeltisi hızlıca karıştırılarak dökülmüştür. Yeni karışım fosfat tamponu (100 mM, pH:7.0) içerisindeki diyaliz torbasında 2 saat bekletilmiştir. Diğer taraftan, enzim çözeltisi 5 mg kitinazın 10 ml fosfat tamponu (100 mM, pH:7.0) içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde belirteç olarak kullanılan potasyum hekzasiyanoferrat (III), 0.5 M Na₂CO₃ çözeltisi (0.5 l) içerisinde çözünmüştür. Enzimatik yıkım olmasından dolayı şeker gruplarındaki azalma

potasyum ferrisiyanür analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz kısaca şöyledir: 1 ml enzim çözeltisi, 2 ml koloidal kitin çözeltisi içerisine eklenmiş ve oda sıcaklığında 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu reaksiyon 5 dakika kaynatılarak sonlandırılmıştır. Kaynatmadan sonra enzim koloidal kitin karışımı 8000 rpm de 15 dakika santirüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alınan 2 ml süpernatant ile hazırlanan belirteç (2 ml) sıcak su banyosunda 20 dakika karıştırılmıştır. Santirüf (8000 rpm, 15 dakika) yapılmasından sonra 420 nm de UV-vis Spektrofotometresinde (Shimadzu, Tokyo, Japan, Model 1601) ölçüm alınmıştır (Imoto ve Yagishita, 1971). Kitinin hidroliziyle son uçlarının miktarının azalması ferrisiyanür absorbansındaki düşüş ile kalorimetrik olarak belirlenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Larva, pupa ve yetişkin *V. crabro*'nun Kitin İçerikleri

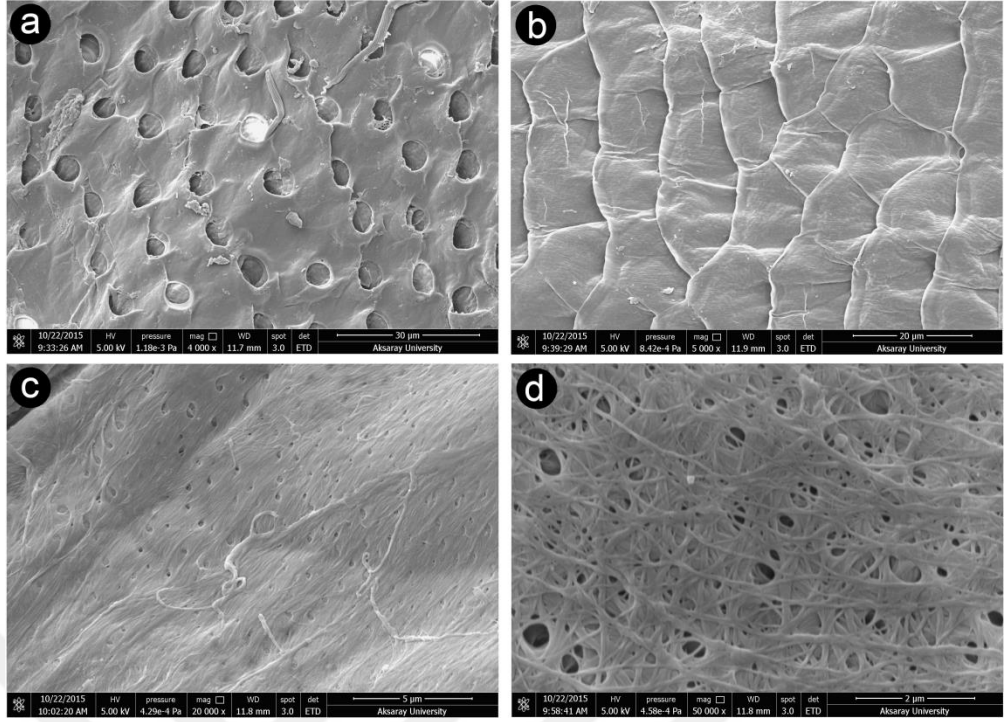
Larva, pupa ve yetişkin *V. crabro*'nun içerdikleri % kitin miktarları sırasıyla 2.2, 6.2 ve 10.3 olarak kaydedilmiştir. Özellikle pupa evresinde önemli bir artış olması, bu evrede yüksek miktarda kitin sentezlendiğini göstermektedir. Beklendiği gibi, larva evresinden yetişkin evresine geçerken, sentezlenen kitin miktarı aşamalı olarak artmıştır ve yetişkin bireylerin en yüksek kitin içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, *V. crabro*'nun gelişim evreleri süresince sentezlediği kitin miktarı hakkında daha fazla bilgiye sahip olunmasını sağlamaktadır. Önceki çalışmalara bakıldığında, yetişkin *V. crabro*'nun kitin içeriği nispeten daha düşük (8.3%) olarak bulunmuştur. Kitin içeriğinin düşük bulunması, bu çalışmada kullanılan izolasyon metodu (uygulanan yüksek kimyasal konsantrasyonu ve kimyasala uzun süre maruz kalma) ile açıklanabilir. Ayrıca, önceki çalışmada kitin izolasyonu için kullanılan bireylerin farklı popülasyondan toplanması da bu durumu etkileyebilir.

4.2 SEM

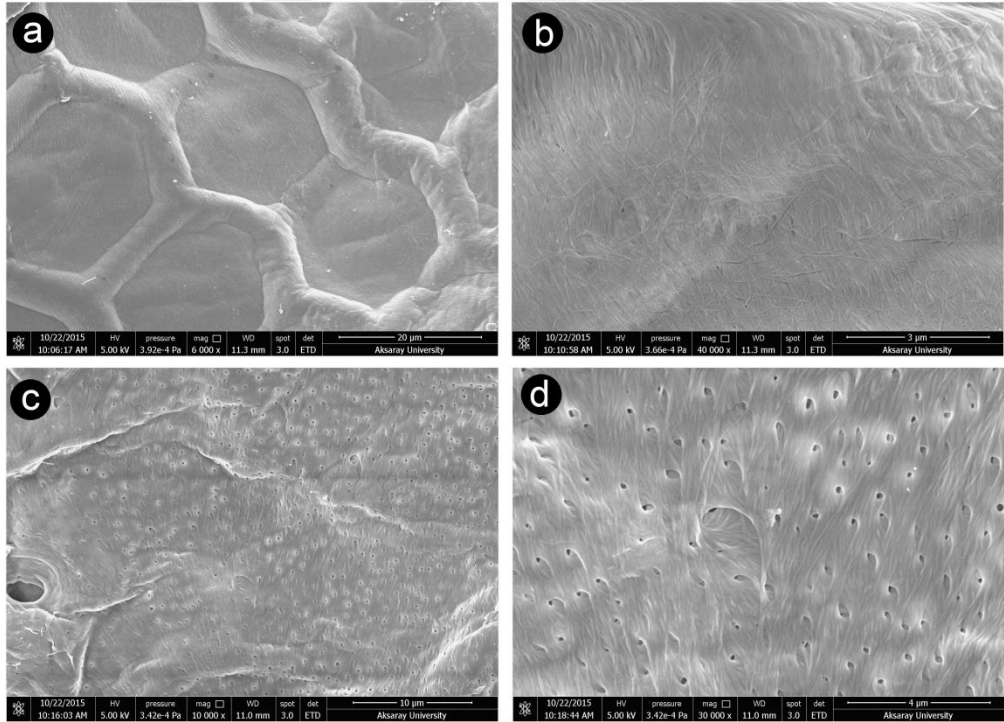
Larva, pupa ve yetişkin *V. crabro*'dan izole edilen kitinlerin yüzey morfolojileri SEM ile incelenmiştir. Yetişkin bireylerden izole edilen kitinlerin 4 farklı yüzey morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1) ve bu morfolojiler şöyledir;

- 1) düz yüzeyde bulunan mikroporlar (3-5 µm aralığında) (Şekil 4.1a).
- 2) balık puluna benzeyen nanofiberli yüzey (Şekil 4.1b).
- 3) nanoporlar ile birlikte bulunan birleşik fiberler (Şekil 4.1c).
- 4) nanoporlardan ayrı bulunan nanofiberler (Şekil 4.1d).

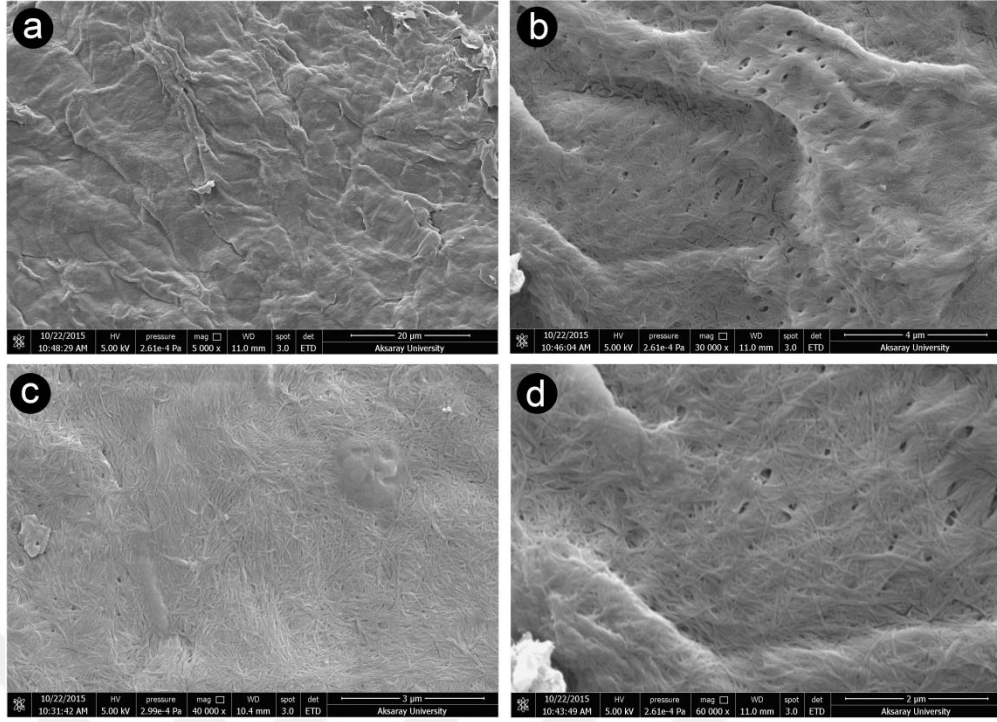
Pupa kitin için, 2 farklı yüzey morfolojisi bulunmuştur ve bu morfolojiler şöyledir; 1) altıgen şeklindeki nanofiberler (Şekil 4.2a,b) ve 2) nanofiber ve nanoporlar (Şekil 4.2c,d). Larva kitini için de 1) por ve fiberlere sahip yüzey (Şekil 4.3 b,d) ve 2) por olmadan sadece fibere sahip yüzey (Şekil 4.3c) olmak üzere 2 farklı yüzey morfolojisi gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 1: Yetişkin *Vespa crabro*'dan izole edilen kitin örneklerinin SEM görüntüleri.



Şekil 4. 2: *Vespa crabro*'nun pupasından izole edilen kitin örneklerinin SEM görüntüleri.



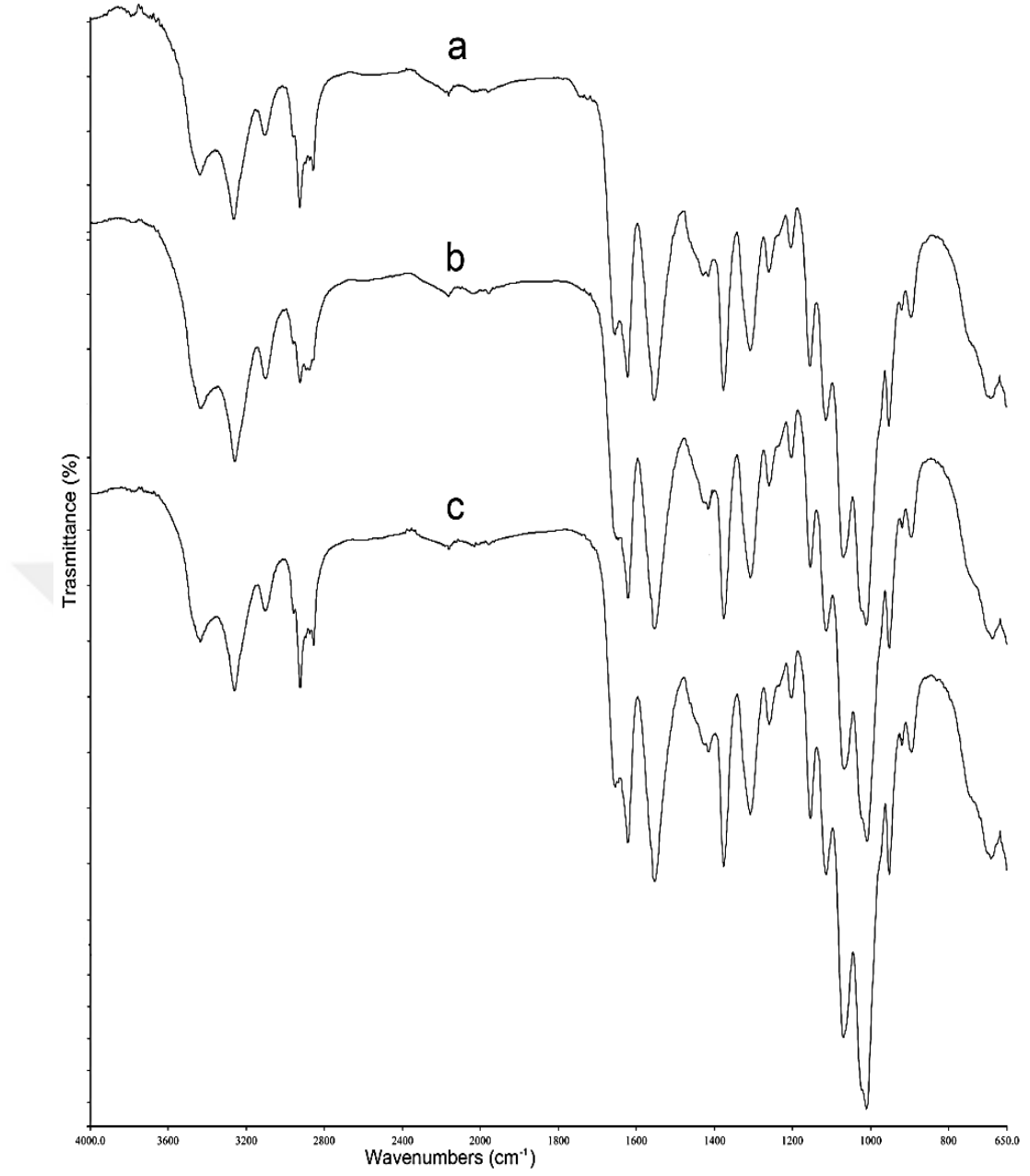
Şekil 4.3: *Vespa crabro*'nun larvasından izole edilen kitin örneklerinin SEM görüntüleri.

Yetişkin kitinin yüzey morfolojisinde, larva ve pupadan izole edilen kitinlere göre daha fazla çeşitlilik gözlenmiştir. Yetişkin kitinin yüzey morfolojisinde gözlenen bu çeşitliliğin sebebi, muhtemelen yetişkin bireyin sahip olduğu ekstra ekstremitelerdir (kanat, ayak ve anten). Bu ekstremiteler larva ve pupa evrelerinde gelişir. Farklı kaynaklardan kitin izolasyonu yapılan önceki çalışmalarda, bazı kitinlerin sadece fiberden oluşan (Kaya vd., 2015a), bazılarının fiber ve pordan oluşan (Mushi vd., 2014) ve bazı kitinlerin de fiber veya por içermeyen (Yen ve Mau, 2007) yüzey morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir. Mevcut çalışma da ise izole edilen kitinler sadece fiberden veya fiber ve pordan oluşan yüzey morfolojisine sahiptirler.

4.3 FT-IR

FT-IR analizi larva, pupa ve yetişkin *Vespa crabro*'dan izole edilen kitinlerin yapısal farklılıklarının belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). FT-IR analizi sonucunda, larva, pupa ve yetişkin *V. crabro* kitinlerinde çok büyük farklılık olmadığı görülmüştür. Önemli bir pik olan 3436 cm^{-1} , O-H (3) . . . O (5) arasındaki molekül içi bağın gerilimini yansıtır. Buna rağmen, 2 keskin pik olan 3258 cm^{-1} ve 3100 cm^{-1} —C=ONH— arasındaki bağdan sorumludur (Hajji vd., 2015). Literatürde, α kitin Amid I (C=O ikincil amid gerilimi) ve Amid II (N-H kırılması,

C–N gerilmesi) bantlarından sorumlu 3 pik (1650 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} ve 1554 cm^{-1}) ile karakterize edilmiştir (Kaya vd., 2013). Mevcut çalışmada da kitin örneklerinin hepsinde -larva için 1654 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} ve 1553 cm^{-1} , pupa için 1649 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} ve 1553 cm^{-1} ve yetişkin için 1654 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} ve 1553 cm^{-1} olarak bahsedilen karakteristik pikler kaydedilmiştir. Bu sonuçlar izole edilen kitin örneklerinin α formda olduğunu açığa çıkarmaktadır. 1375 cm^{-1} piki simetrik CH_3 bükülmesini ve CH kırılmasını temsil ederken, keskin bir pik olan 1008 cm^{-1} , C-O gerilmesini tahsis eder (Du vd., 2014). FT-IR analizinde gözlenen, *V. crabro* kitinlerinin (larva, pupa ve yetişkin) diğer önemli pikleri Çizelge 4.1’ de verilmiştir. Çeşitli kaynaklardan kitin izole edilen önceki çalışmalar incelendiğinde, bütün çalışmalarda birbirine yakın FT-IR piklerinin kaydedildiği ispatlanmıştır. Önceki çalışmalar şöyledir; karides kabuğu 3450 cm^{-1} , 3262 cm^{-1} , 3114 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} ve 1632 cm^{-1} piklerine (Mohammed vd., 2013), bal arısı 3441 cm^{-1} , 3256 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} , 1008 cm^{-1} ve 951 cm^{-1} piklerine (Kaya vd., 2015c) ve farklı deniz canlılarının kabukları 3264 cm^{-1} , 3107 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} ve 1430 cm^{-1} piklerine (Al Sagheer vd., 2009) sahiptir. Önceki çalışmalara bakıldığında *V. crabro*’dan (larva, pupa ve yetişkin) izole edilen kitinlerin neredeyse tamamen saf olduğu belirtilir.



Şekil 4. 4: *Vespa crabro*'dan izole edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumları
(a) larva, (b) pupa ve (c) yetişkin.

Çizelge 4. 1: FT-IR spektrumunun fonksiyonel grupları ve *Vespa crabro*'dan izole edilen kitinlerin vibrasyon modları.

Fonksiyonel grup ve vibrasyon modu	Dalga sayısı frekansı (cm ⁻¹)		
	Larva	Pupa	Ergin
O-H gerilmesi	3435	3436	3433
N-H gerilmesi	3260	3258	3259
simetrik CH ₃ ve asimetrik CH ₂ bükülmesi	2923	2923	2923
simetrik CH ₃ bükülmesi	2853	2877	2853
C=O ikincil amid gerilimi	1654	1649	1654
C=O ikincil amid gerilimi	1621	1621	1621
N-H bandı ve C-N gerilimi	1553	1553	1554
CH ₂ ucu ve CH ₃ deformasyonu	1413	1427	1428
CH bandı, CH ₃ simetrik deformasyonu	1375	1375	1376
CH ₂ sallanması	1307	1307	1307
Asimetrik oksijen gerilim köprüsü	1154	1154	1154
Asimetrik aynı evreli halka gerilim modu	1113	1113	1113
Aynı evreli halka C-O-C asimetrik gerilimi	1069	1067	1069
Aynı evreli halka C-O simetrik gerilimi	1009	1008	1010
CH ₃ sallanması	952	952	952
CH halka gerilimi	895	895	894

4.4 TGA

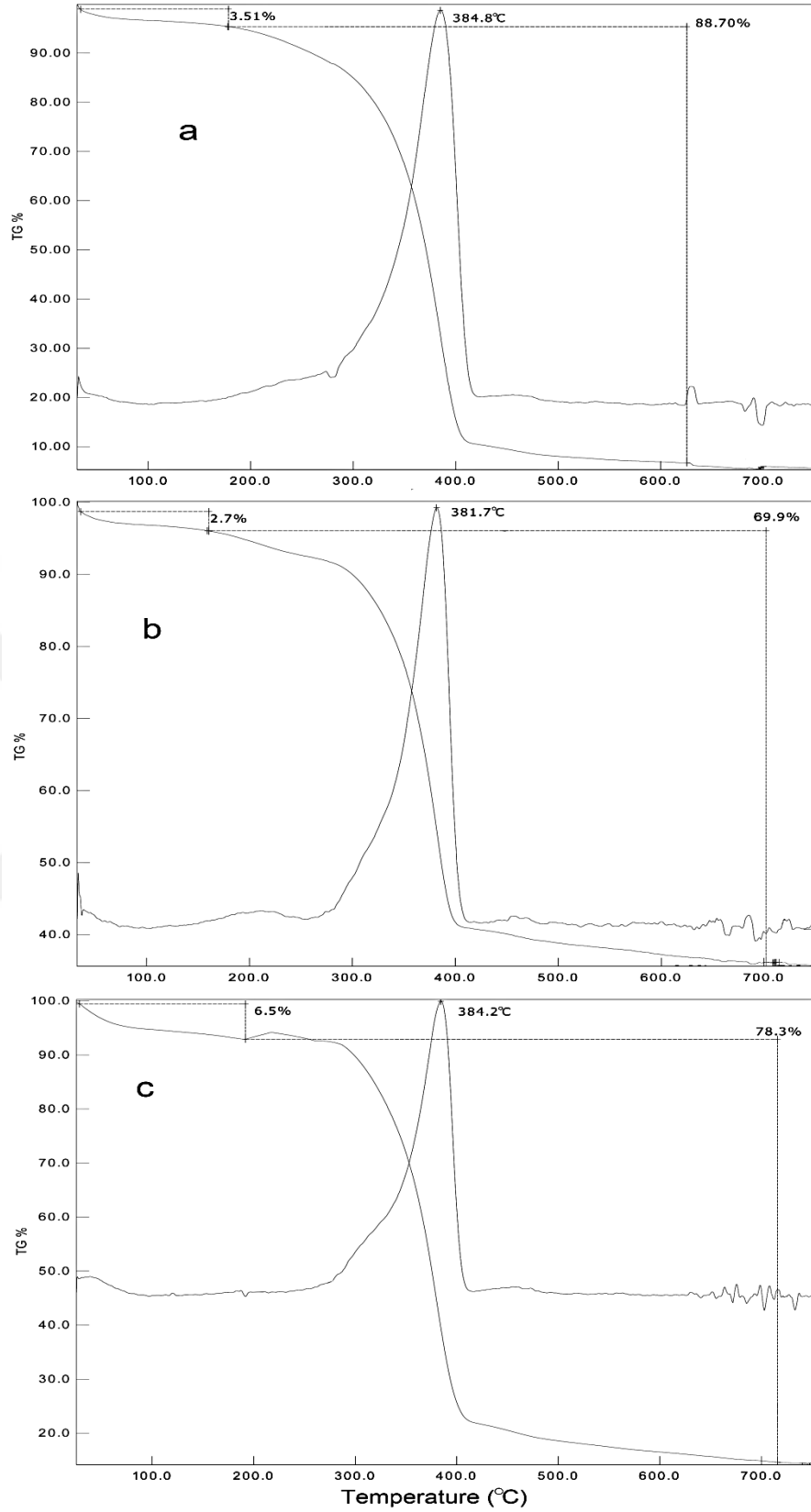
Termogravimetrik Analiz, *V. crabro*'dan (larva, pupa ve yetişkin) izole edilen kitinlerin sahip oldukları termal kararlılıklarını ve yıkılma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla yapılmıştır ve termogramlar oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Termogramlar, *V. crabro*'dan izole edilen bütün kitinler (larva, pupa ve yetişkin) için iki yıkılma aşaması olduğunu göstermektedir. Sıcaklık değerinin 30°C' den 180°C 'ye çıktığı birinci yıkılma aşaması boyunca, kaybedilen kütleler larva için %3.51, pupa için % 2.7 ve yetişkin için % 6.5 olarak kaydedilmiştir. Bu birinci kütle kaybı, kitin yapılarında bulunan suyun buharlaşması olabilir (Ifuku vd., 2010). İkinci kütle kaybı ise larva, pupa ve yetişkin için sırasıyla % 88.70, % 69.9 ve % 78.3 olarak kaydedilmiştir. Bu ikinci kütle kaybı şeker yapısının bozunmasına, suyun sakkarid halkasından ayrılmasına ve kitin yapısının asetillenmesi ve deasetillenmesi sonucu yıkılmasına işaret edebilir (Shankar vd., 2015).

Larva, pupa ve yetişkin kitinlerinin maksimum yıkılma sıcaklıkları (DTG_{max}) sırasıyla 384.8°C, 381.7°C ve 382.4°C olarak bulunmuştur. *V. crabro*'nun larva,

pupa ve yetişkininden izole edilen kitinlerin termal kararlılıkları bakımından çok önemli farklılık olmadığı görülmüştür.

nceki çalışmalarda, farklı kaynaklardan izole edilen kitinlerin DTG_{max} değerlerinin; yengeç kabuğu kitini için $381^{\circ}C$ (Shankar vd., 2015), *Cervimunida johi* ıstakozu için $380^{\circ}C$ (Salaberria vd., 2015) ve ıyan kitini için $380.8^{\circ}C$ (Zelencova vd., 2015) olduğu ve bu değerlerin şimdiki çalışmaya oldukça yakın olduğu görülmektedir. Literatürdeki nceki kaynaklar, *V. crabro*'dan (larva, pupa ve yetişkin) izole edilen kitinlerin termal kararlılıklarının oldukça yüksek olduğunu belirtmektedir.





şekil 4. 5: *Vespa crabro*'dan izole edilen kitinlerin TG Analizi sonuçları.

(a) larva, (b) pupa ve (c) yetişkin.

4.5 Elementel Analiz

Kitinlerin içerdikleri C, H ve N oranlar; larva kitin için 45.6, 6.5 ve 6.5, pupa kitini için 46.2, 6.4 ve 6.3 ve yetişkin kitini için 45.5, 6.3 ve 6.49 olarak kaydedilmiştir. Larva, pupa ve yetişkin kitinlerinin DA değerleri sırasıyla % 109.1, % 127.5 ve % 108.8 olarak hesaplanmıştır. Teorik olarak, saf kitinin % 6,89 oranında N içerdiği ve DA değerinin %100 olduğu kabul edilir (Sajomsang ve Gonil, 2011). Bu tez çalışmasında, kitinlerin içerdiği N ve DA değerleri teorik değerlerden biraz farklıdır çünkü mevcut çalışmada izole edilen kitinler yapılarında su bulundurdıklarından dolayı tamamen aynı teorik değerlerin alınması zordur. %N içeriği ve DA değerleri teorik değerlerden çok uzak değildir öyleyse mevcut çalışmada böceğin larva, pupa ve yetişkininden izole edilen kitinlerin saf olduğu söylenebilir.

Önceki çalışmalarda yapılan Elementel Analiz sonucuna göre saf kitinin % 118, işlenmemiş yengeç kabuğu kitinin % 152 (Yen vd., 2009), balarısı kitininin % 133, karides kitininin % 237 (Majtan vd., 2007), yengeç kabuğu kitininin % 104.2 ve ağustos böceği kabuğu kitininin % 102 (Sajomsang ve Gonil, 2010) DA değerlerine sahip olduğu hesaplanmıştır. Önceki çalışmalarla kıyaslandığında, bu çalışmada daha iyi DA değerlerine ulaşılmıştır.

4.6 Kitinaz Yıkım Testi

İzole edilen kitinlerin enzimatik yıkımı kitinaz ile yapılmıştır. Kitin örnekleri kitinaz enzimi tarafından neredeyse tamamen hidrolizlenmiştir ve larva (% 96.7), pupa (% 96.9) ve yetişkin (% 95.1) için oldukça yüksek yıkım oranları gözlenmiştir. Bu bulgular kitin izolasyonu için kullanılan metodun etkin olduğunu ve kitin örneklerinin yüksek saflığa sahip olduklarını kanıtlamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ilk defa bir organizmanın üç farklı gelişim evresinde (larva, pupa ve yetişkin) bulunan kitinin fizikokimyasal özelliklerinin nasıl değiştiğini aüğe çıkarmıştır. FT-IR analizi, kitinaz yıkım testi ve elementel analiz sonuçları kitin örneklerinin saf olduğunu ispatlamıştır. Kitin örneklerinin termal kararlılıklarında büyük farklılıklar görülmemiştir. Diğer taraftan, izole edilen kitinlerin yüzeyleri farklı yüzey karakteristikleri sergilemiştir. Yetişkin kitininin sahip olduğu farklı yüzey morfolojileri, yetişkin bireylerde tamamen gelişen kanat, ayak ve anten ekstremiteler yapılarından kaynaklanmıştır. Larvadan yetişkin evresine geçilirken bireylerin içerdiği kitin miktarında büyük artış gözlenmiştir. Aslında bu durum beklenmekteydi fakat bu çalışma ile bir böceğin gelişim evreleri (*V. crabro*; larva, pupa ve yetişkin) boyunca sentezlediği kitin miktarları açıkça kıyaslanmıştır. Özellikle larva evresinden pupa evresine geçerken sentezlenen kitin miktarında üç kat artış olduğu gözlenmiştir.

Genel bir özetle, bu tez kapsamında ilk kez bir canlının (yaban arısının) üç farklı gelişim evresinden (larva, pupa ve yetişkin) kitinler izole edilmiştir. Bu kitinlerin fizikokimyasal özellikleri SEM, FT-IR, TGA, elementel analiz ve kitinaz yıkım testi ile belirlenmiştir. Analizler sonucunda bu kitinlerin oldukça saf olarak izole edildiği, gelişim evrelerinde canlının farklı kitin içeriğine sahip olduğu ve bu kitinlerin oldukça farklı fizikokimyasal özelliklere (yüzey morfolojisi) sahip oldukları gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, R. M., Hrdina, R. Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M. Soliman, A. Y. Mohamed, F. K. ve Pinto, T. D, 2015. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity, International Journal of Biological Macromolecules, 80, 107-120.
- Al Sagheer, F. A. M. A. Al-Sughayer, S. Muslim, ve M. Z. Elsabee, 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, Carbohydrate Polymers, 77, 2, 410-419.
- Bagriaçik, N, 2011. Determination of some structural features of the nest paper of *Vespa orientalis* 250 Linneaus, 1771 and *Vespa crabro* Linneaus, 1758 (Hymenoptera: Vespinae) in Turkey, Archives of Biological Sciences, 63, 2, 449-455.
- Barbehenn, R. V. ve J. Stannard, 2004. Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars, Journal of Insect Physiology, 50, 9, 783-790.
- Bo, M. Bavestrello. G. Kurek. D. Paasch, S. Brunner, E. Born. R. ve Vyalikh, D, 2012. Isolation and identification of chitin in the black coral *Parantipatheslarix* (Anthozoa: Cnidaria), International Journal of Biological Macromolecules, 51, 1, 129-137.
- Du, Q. J. J. K. Sun, Y. H. Li, X. X. Yang, X. H. Wang, Z. H. Wang, ve L. H. Xia, 2014. Highly enhanced adsorption of congo red onto graphene oxide/chitosan fibers by wet-chemical etching off silica nanoparticles, Chemical Engineering Journal, 245, 99-106.

- Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G. Kljajic, Z., Carballo, J. L. Schiaparelli, S., Ereskovsky, A., Schupp, P., Born, R., Worch, H. Bazhenov, V. V. Kurek, D. Varlamov, V. Vyalikh, D., Kummer, K., Sivkov, V. V. Molodtsov, S. L. Meissner, H. Richter, G., Steck, E. Richter, W. Hunoldt, S. Kammer, M., Paasch, S. Krasokhin, V. Patzke, G. ve Brunner, E, 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.
- 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.
- 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.
- Hajji, S. Ghorbel-Bellaaj, O. Younes, I. Jellouli, K. ve Nasri, M, 2015. Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 167-173.
- Ifuku, S. Nogi, M., Yoshioka, M., Morimoto, M., Yano, H. ve Saimoto, H., 2010. Fibrillation of dried chitin into 10-20 nm nanofibers by a simple grinding method under acidic conditions, *Carbohydrate Polymers*, 81, 1, 134-139.
- Ifuku, S. Nomura, R. Morimoto, M. ve Saimoto, H., 2011. Preparation of chitin nanofibers from mushrooms, *Materials*, 4, 8, 1417-1425.
- Imoto, T. ve Yagishita, K, 1971. A simple activity measurement of lysozyme, *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, 7, 1154-1156.
- Imai, T. Watanabe, T. Yui, T. ve Sugiyama, J, 2003. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit, *Biochem. J*, 374, 755-760.

- Jennings, D. T. ve Sferra, N. J, 2002. An arthropod predator-prey-kleptoparasite association, *Northeastern Naturalist*, 9, 3, 325-330.
- Kaya, M., Tozak, K. O. Baran, T. Sezen, G. ve Sargin, I, 2013. Natural Porous and Nano Fiber Chitin Structure from *Gammarus argaeus* (GammaridaeCrustacea), *Excli Journal*, 12, 503-510.
- Kaya, M., Baran, T. Erdogan, S. Menten, A. Ozusaglam, M. A. ve Cakmak, Y. S, 2014. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 45, 72-81.
- Kaya, M. Baublys, V. Šatkauskienė, I. Akyuz, B. Bulut, E. ve Tubelytė, V, 2015a. 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., Bitim, B., Mujtaba, M. ve 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. Mujtaba, M. Bulut, E. Akyuz, B. Zelencova, L. ve Sofi, K, 2015c. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee, *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16.
- Kovac, H. ve Stabentheiner, A, 2012. Does size matter? - Thermoregulation of 'heavyweight and lightweight' wasps (*Vespa crabro* and *Vespula* sp.), *Biology Open*, 1, 9, 848-856.
- Kucukgulmez, A. Celik, M., Yanar, Y. Sen, D. Polat, H. ve Kadak, A. E, 2011, Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells, *Food Chemistry*, 126, 3, 1144-1148.
- Kumari, S. and Rath, P. K, 2014. Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeorohit*) fish scales. *Procedia Materials Science*, 6, 482-489.

- Ma, J. Xin, C. ve Tan, C, 2015. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue, *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 547-556.
- Majtan, J. Bilikova, K. Markovic, O. Grof, J. Kogan, G. ve Simuth, J, 2007. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 3, 237-241.
- Merzendorfer, H., 2006. Insect chitin synthases: a review, *Journal of Comparative Physiology B*, 176, 1, 1-15.
- Mohammed, M. H., Williams, P. A. ve Tverezovskaya, O, 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan, *Food Hydrocolloids*, 31, 2, 166-171.
- Mushi, N. E. Butchosa, N. Salajkova, M. Zhou, Q. ve Berglund, L. A, 2014. Nanostructured membranes based on native chitin nanofibers prepared by mild process, *Carbohydrate Polymers*, 112, 255-263.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 7, 603-632.
- Sajomsang, W. ve Gonil, P., 2010. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs, *Materials Science and Engineering: C*, 30, 3, 357-363.
- 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 & Functional Polymers*, 89, 31-39.
- Setoguchi, T., Kato, T., Yamamoto, K. ve Kadokawa, J. I, 2012. Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 3, 861-864.
- Shankar, S. Reddy, J. P. Rhim, J. W. ve Kim, H. Y., 2015. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of chitin nanofibrils reinforced carrageenan nanocomposite films, *Carbohydrate Polymers*, 117, 468-475.

- Shushizadeh, M. R., Pour, E. M., Zare, A. ve Lashkari, Z., 2015. Persian gulf β -chitin extraction from *sepia pharaonis* sp. cuttlebone and preparation of its derivatives, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6, 2, 133-142.
- Sjaifullah, A. ve Santoso, A. B., 2016. Autolytic Isolation of Chitin from White Shrimp (*Penaues Vannamei*) Waste, *Procedia Chemistry*, 18, 49-52.
- Wysokowski, M., Bazhenov, V. V, Tsurkan, M. V, Galli, R., Stelling, A. L., Stöcker, H. ve Ilan, M., 2013. Isolation and identification of chitin in three-dimensional skeleton of *Aplysina fistularis* marine sponge, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 94-100.
- Yen, M. T. ve Mau, J. L., 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes, *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 3, 472-479.
- Yen, M. T., Yang, J. H. ve Mau, J. L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells, *Carbohydrate Polymers*, 75, 1, 15-21.
- Youn, D. K. No, H. K. ve Prinyawiwatkul, W., 2009. Physicochemical and functional properties of chitosans prepared from shells of crabs harvested in three different years. *Carbohydrate Polymers* 78, 1, 41-45.
- Younes, I. Hajji, S. Rinaudo, M. Chaabouni, M. Jellouli, K. ve Nasri, M, 2016. Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 246-253.
- Zelencova, L. Erdogan, S. Baran, T. ve Kaya, M., 2015. Chitin extraction and chitosan production from Chilopoda (*Scolopendracinulata*) with identification of physicochemical properties, *Polymer Science Series A*, 57, 4, 437-444.
- Zhang, M., Haga, A. Sekiguchi, H. ve Hirano, S, 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 1, 99-105.

Zhang, J. Kopparapu, N. K. Yan, Q. Yang, S. ve Jiang, Z, 2013. Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity, *Food Chemistry*, 138,2, 1225-1232.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Karwan AZEEZ SOFI GHAFOR

Doğum Tarihi ve Yeri :01.06.1987-SULAIMANİ

E-posta adresi :karwansofi99@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Sulaimani Üniversitesi, 2009-2013

Yüksek Lisans :Aksaray Üniversitesi, 2014-2016

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I. ve 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.

SCI, SCI EXPANDED KAPSAMINDAKİ DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALELER

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

ULUSLARARASI SEMPOZYUMDA SUNULAN BİLDİRİLER

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