

**Research article****Isolation and physicochemical characterization of chitin and chitosan from  
*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)****Zehra DEMİR<sup>1b</sup>, Osman SEYYAR<sup>\*1b</sup>**

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Niğde, Türkiye

\*Corresponding author e-mail: osmanseyyar@hotmail.com

**Abstract:** In recent years, some studies have emphasized that insects, mushrooms, coral and crustacean resting eggs can be alternative sources of chitin. In order to purpose a new chitin and its derivatives resource, we studied for the first time the spider species, *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802), which has common distribution in Turkey. This chitin and chitosan characterized with SEM, FTIR, XRD and TGA. In result of this study, the chitin in this species is in alpha form, has a high melting temperature and can be recommended as an alternative source of chitin.

**Keywords:** Spider, Chitin, Chitosan

**Citing:** Demir, Z., & Seyyar, O. 2020. Isolation and Physicochemical Characterization of Chitin and Chitosan from *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802). *Acta Biologica Turcica*, 33(4): 252-257.

***Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) Türünde Kitin ve Kitosan İzolasyonu ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu**

**Özet:** Son yıllarda böcekler, mantarlar, mercan ve kabukluların yumurtaları kitin kaynağı olarak önerilebilmektedir. Bu amaçla yeni kitin kaynakları önerebilmek için ilk kez bir örümcek türü olan *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802)'nin SEM, FTIR, TGA ve XRD değerleri çalışılmıştır. Bu çalışma sonunda bu türde bulunan kitinin alfa formunda olduğu, erime sıcaklığının yüksek olduğu ve alternatif kitin kaynağı olarak önerilebileceği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Örümcek, Kitin, Kitosan

**Giriş**

Son zamanların en çok çalışılan biyolojik makromolekülleri kitin ve bunun bir türevi olan kitosandır (Aranaz et al. 2009). Doğada çok yaygın olarak bulunan ve bir aminopolisakkarit olan kitinin, ticari amaçlar için yıllık selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir. Kitin ve kitosanın; doğal bir kaynak olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve çevre kirliliğine neden olmaması, hem bitki hem hayvan dokuları için uyumlu olması ve toksik etkisinin olmaması, biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olması, molekül yapısının değiştirilebilir olması nedeniyle endüstriyel alanda oldukça yaygın bir şekilde

kullanılmaktadır (Dutta et al. 2004, Aranaz et al.2009). Kitin ve kitosan üzerine gerçekleştirilen çalışmaların artması ve bu alanda yeni uygulama alanlarının keşfedilmesiyle kitin ve türevlerine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı yeni kitin kaynaklarına yönelim artmaktadır.

Örümceklerin dünya üzerinde 50 bine yakın (World Spider Catalog 2020), ülkemizde ise 1100'ün üzerinde türü bulunmaktadır (Demir ve Seyyar, 2017). Bu çalışmada kullanılan *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türü, Araneidae familyasına ait bir örümcek türüdür (Şekil 1). Daha çok bitkiler üzerine tekerlek şeklinde ağlar

kurarak genellikle böcekler üzerinden beslenir ve doğal dengenin korunmasına ekolojik açıdan büyük bir katkı sağlar. Ülkemizde geniş bir yayılış alanına sahiptir. Yaygın bir tür olması çalışma materyali olarak seçilmesinin en büyük faktörüdür.

Bu çalışmada daha önce kitin içeriği bilinmeyen bir örümcek türünden ilk kez kitin izolasyonu ve kitosan eldesi yapılarak fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan *Aculepeira ceropegia* örnekleri 2015-2016 yılları arasında 214Z049 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan arazi çalışmaları sonucunda Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplandı (Şekil 1). Eldeki örnekler laboratuvarında aşağıdaki aşamalardan geçirilerek kitin ve kitosan elde edildi.



Şekil 1. *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünün genel bir görünüşü

Bu amaçla;

- Materyal yıkandı, öğütüldü sonra HCl ile muamale edilerek demineralizasyonu sağlandı.
- HCl çözeltisinden çıkarılan ve yıkanarak nötrleştirilen örnekler yapılarında bulunan organik bileşikler ve pigmentlerin uzaklaştırılması için etanol ile 12 saat karıştırıldı ve saf su ile yıkandı. Böylece beyaz renkli madde elde edildi.
- Materyal daha sonra NaOH ile muamale edilerek deproteinizasyonu yapıldı, ardından aseton ile ekstraksiyonu yapıldı ve kurumaya bırakıldı.
- Beyazlatılan materyal yıkandı, kurutuldu ve kitin elde edildi. Daha sonra materyal NaOH ile

muamale edilerek deasetilasyonu sağlandı. Son olarak yıkanıp kurutularak kitosan elde edildi.

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden kitin eldesi için gerekli süreç Şekil 2'de verilmiştir. Elde edilen kitin ve kitosanın fizikokimyasal karakterizasyonunu belirlemek için Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri yaptırıldı.

**FTIR Analizi:** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden elde edilen kitinin infrared spektrumları, ölçü Bruker Marka Vertex 70 model FTIR Spektrometre 4000-625 cm frekans aralığında ölçülmüştür. Ayrıca asetilasyon derecesi denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

**TGA:** TGA, Linseis STA PT1600 analiz cihazı kullanılarak 10 ° C/ dk'lık bir ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir. Kitinin termal bozulmasına bağlı olarak TG ve DTG eğrilerinin elde edilmesi için kullanılmıştır.

**XRD:** *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden elde edilen kitin XRD spektrumları, Rigaku D max 2000 sisteminde 45 ° için 5 ° 2 θ aralığında ölçülmüş elde edilen kitin Kristal index değeri Crl hesaplaması yapılmıştır.

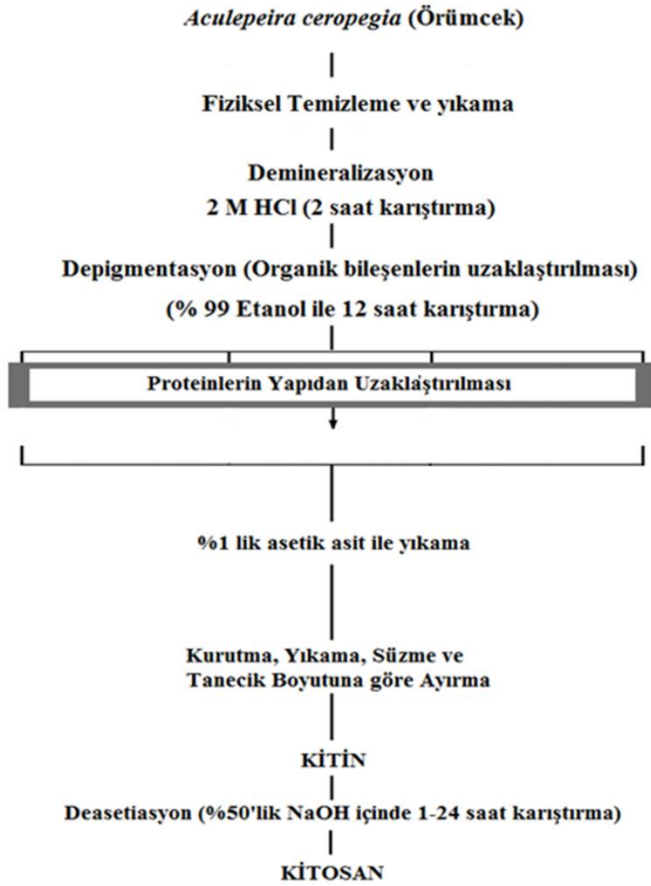
**SEM:** Numulardan elde edilen kitinden daha net görüntü elde etmek için örneklerin yüzeyi Sputter Coater (Cressingto Auto 108) marka altın kaplama cihazı ile altınla kaplanıp daha sonrasında yüzey morfolojisini incelemek için EVO LS 10 ZEISS marka cihaz kullanılarak fotoğraflar çekilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

*Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünde kitin ve kitosan izolasyonu yapılmış olup elde edilen kitin ve kitosanın FTIR, TGA, XRD ve SEM kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada ilk kez bu örümcek türünden kitin ve kitosan eldesi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

**FT-IR:** Örümcek kitini ve kitosanının FT-IR analizi sonuçları Şekil 3' de verilmiştir. Canlılardan elde edilen kitinin FT-IR analizi sonucu amide I bandının 1656 cm<sup>-1</sup> ve 1619.5 cm<sup>-1</sup> (C=O ikinci amide gerilimi) olmak üzere ikiye ayrıldığı görülmüştür. Literatüre göre ikiye ayrılmış amide I bandı kitinin alfa formunda olduğunu işaret etmektedir. Bölünmemiş (tek) amide I bandı ise kitinin beta formunda olduğunu gösterir (Jang et al., 2004a). Amide II (N-H bend, C-N stretch) 1552 cm<sup>-1</sup>'de ve amide III (CH<sup>2</sup> wagging) ise 1308.3 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmiştir. 3426.2

cm<sup>-1</sup>'de O-H gerilmesi görülmüştür. Tüm bu sonuçlar örümcekte kitinin oldukça başarılı bir şekilde elde edildiğini kanıtlamaktadır. Kitin için kaydedilen diğer tüm bandlar Şekil 3'de gösterilmiştir.

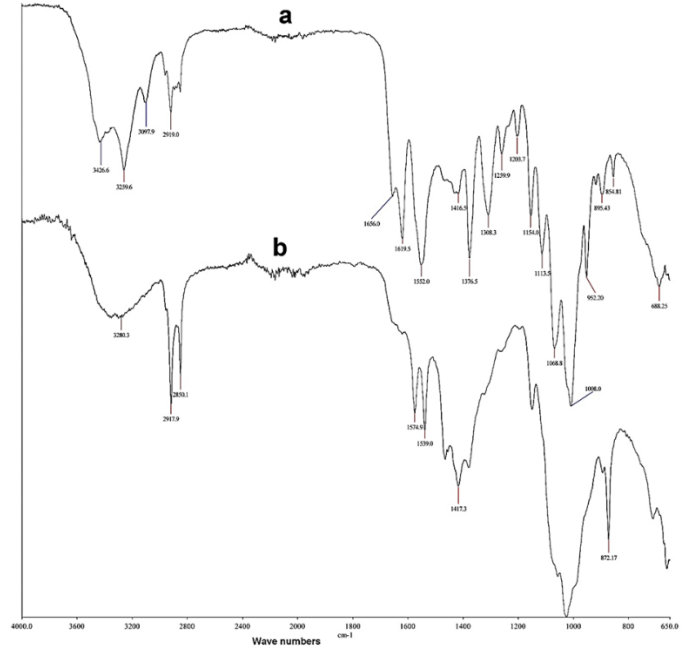


Şekil 2. Örümcek dış iskeletinden kitin ve kitosan eldesi.

Kitinin yüksek baz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklıkta deasetile edilmesi sonucu kitinde 1552 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen amide II bandı 1574.9 cm<sup>-1</sup> (ν (NH<sup>2</sup>) in NHCOCH<sup>3</sup> group)'e kaymıştır. Kitinde ikiye ayrılmış amide I bandı kitosana dönüşünce tek band olarak gözlenmiştir. Kitosana ait gözlenen diğer FT-IR bandları Şekil 3'de verilmiştir.

**TGA:** Termogravimetrik analiz elde edilen malzemenin sıcaklığa olan dayanımını öğrenmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Dutta et al., 2004). Mevcut çalışmada da örümcekte elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin sıcaklıkla olan bozulmalarını ortaya koymak için TGA analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar kitinin kitosana göre daha kararlı olduğunu ortaya koydu (Şekil 4). Hem kitin hemde kitosan için iki basamakta yapıdan kütle kaybı olduğu gözlemlendi. İlk basamakta 100 C civarındaki kütle kayıpları yapıdan uzaklaşan sudan kaynaklanmaktadır. İkinci basamakta gözlenen önemli

kütle kayıpları ise ilk örnekte kitinin bozulmasına (Şekil 4a) ve ikinci örnekte ise kitosanın bozulmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4b). Literatür taraması sonucu farklı organizmalardan izole edilen kitinlerin ve üretilen kitosan örneklerinin de mevcut çalışmadaki gibi iki farklı basamkata kütle kaybı gözlenmiştir (Jang et al., 2004b; Juárez-de la Rosa et al., 2011; Sajomsang and Gonil, 2010). Bu sonuçlarda mevcut çalışmada örümcekte kitin ve kitosanın başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.

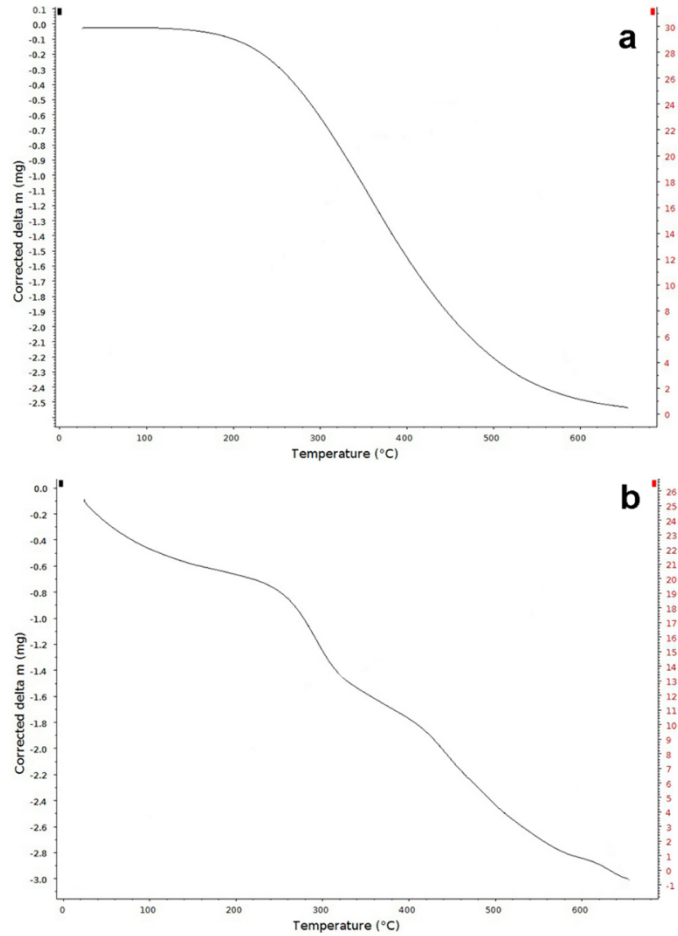


Şekil 3. Örümcekte izole edilen kitin ve üretilen kitosanın FT-IR spektrası (a. kitin, b. kitosan).

**XRD:** Örümcekte izole edilen kitinin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın XRD analiz sonuçları Şekil 4'de gösterilmiştir. Literatüre bakıldığında kitin ve türevlerinin XRD analizleri sonucu 9° ve 19° civarında iki keskin pik gözlenmiştir (Jang et al., 2004a; Liu et al., 2012; Sajomsang and Gonil, 2010). Bu piklerden 19° civarında olan 9° civarında olana göre daha şiddetlidir. Bunlar kitin ve türevlerinin anlaşılmasında kullanılan karakteristik XRD pikleridir.

Kitinin XRD analizi sonucu 9.31° ve 19.38°'de iki keskin pik ile birlikte 12.78°, 23° ve 26.2°'de üç de zayıf pik gözlenmiştir. Bu pikler literatürde tanımlanan kitin pikleri ile oldukça benzerlik göstermektedir (Jang et al., 2004b). Kitosanın için de yine 10.7° ve 20.13° de iki keskin pik gözlenmiştir (Şekil 5). Fakat bu iki keskin pik ile birlikte 29.6°'da farklı bir keskin pik gözlenmiştir. Bu

istenmedik keskin pik kitosanın saf olmadığını ve içerisinde bazı kalıntıların olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. Örümcekte izole edilen kitin ve bu kitinden üretilen kitosanın TGA analizi (a. kitin ve b. kitosan).

Kitin ve kitosanın kristaline indeks değerleri hesaplanmış ve kitin için %69.6, kitosan için %51.6 olarak bulunmuştur. Literatürde de açıklandığı üzere kitinin kitosana dönüşmesi esnasında (deasetilasyonu sırasında) kristal yapısı ve termal kararlılığı düşmektedir (Rinaudo, 2006). Mevcut çalışmada da kitinin kitosana dönüşmesi sırasında kristalin indeksinin düşmesi kitosan oluşumunu desteklemektedir. Yine şekilden de anlaşılacağı gibi, kitinde gözlenen 9° ve 19° daki keskin pikler deasetilasyon sonrası 10° ve 20°'ye kaymıştır. Bu kaymada kitinden kitosan elde edildiğini desteklemektedir (Dutta et al., 2004).

**SEM:** Örümcekte saflaştırılan kitin ve bu kitinden elde edilen kitosan örneklerinin yüzeyleri SEM ile araştırılmıştır (Şekil 6). Kitinin yüzeyinin ince nanofiberlerden oluştuğu ve kitosanın yüzeyinin ise yine zayıf ve çok net olarak görülemeyen fiberlerden oluştuğu

görülmektedir. Ayrıca Şekil 6'da görüldüğü gibi kitinin yüzeyinde nanofiberler ile birlikte azda olsa nano porların (gözeneklerin) varlığı da görülmektedir.

Daha önceki yapılan çalışmalara bakıldığında kitinin yüzeyinin izole edilen canlı grubuna göre oldukça farklılık gösterdiği ortaya konmuştur (Kaya et al., 2015a; Kaya and Baran, 2015; Kaya et al., 2014a; Kaya et al., 2014b; Kaya et al., 2016; Kaya et al., 2015b). Şuana kadar kaydedilen kitin yüzeylerine bakıldığında;

- nanofiber ve porların görülmediği düz bir yüzey. Bu tür kitin yüzeyi genellikle mantarlardan elde edilen kitin ve kitosanda gözlenmiştir (Yen and Mau, 2007a; Yen and Mau, 2007b).
- Yalnızca nanofiberlerden oluşan yüzey (Kaya et al., 2014a).
- Nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzey (Kaya et al., 2013).
- Nanofiberler ile birlikte nanopor ve mikro porların birlikte görüldüğü yüzey (Kaya et al., 2014c).
- Yalnızca nanoporlardan oluşan yüzey, gibi çeşitlilikler gözlenmiştir (Kaya and Baran, 2015).

Mevcut çalışmada ise kitin için nanofiber ve nanoporların birlikte bulunduğu bir yüzey gözlenmiştir. Kitosan da ise kısmen liflerin bulunduğu düz bir yüzey görülmüştür.

Şu ana kadar iki farklı örümcek türünden (*Geolycosa vultuosa* ve *Hogna radiata*) kitin izolasyonu yapılmıştır (Kaya et al., 2014d). Bu iki türden de izole edilen kitinlerin farklı yüzey morfolojilerine sahip olduğu ortaya konmuştur. *G. vultuosa*'dan elde edilen kitinin yüzeyinin nanofiberler ile birlikte nanopor ve mikro porların birlikte bulunduğu yüzey gözlenmiştir. *H. radiata* kitininin nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzeyden oluştuğu ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada da *H. radiata*'da olduğu gibi nanofiber ve nanoporların birlikte görüldüğü yüzey gözlenmiştir.

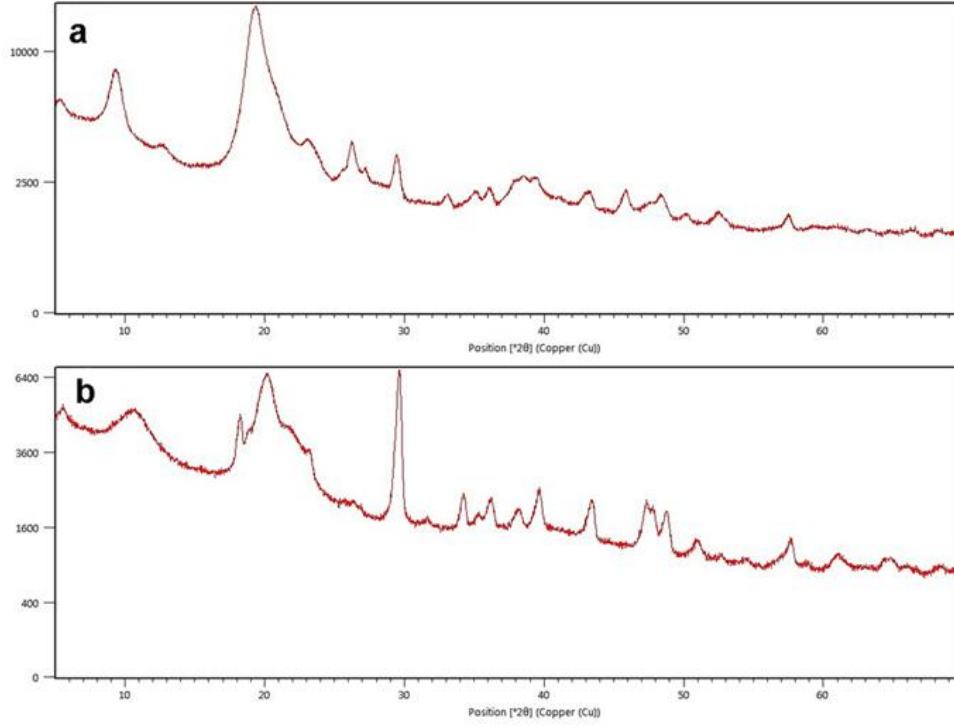
## Sonuç

Sonuç olarak bu çalışma, *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünün kitin ve kitosan içeriği ve onun FTIR, XRD, TGA ve SEM analizleriyle fizikokimyasal özelliklerini ortaya koyan bir çalışmadır. Yapılan analizler sonucunda bu örümcek türünde alfa formda kitin yapısının olduğu, kitinin ve kitosanın ince nanofiber ve az da olsa nanopor yapıda olduğu

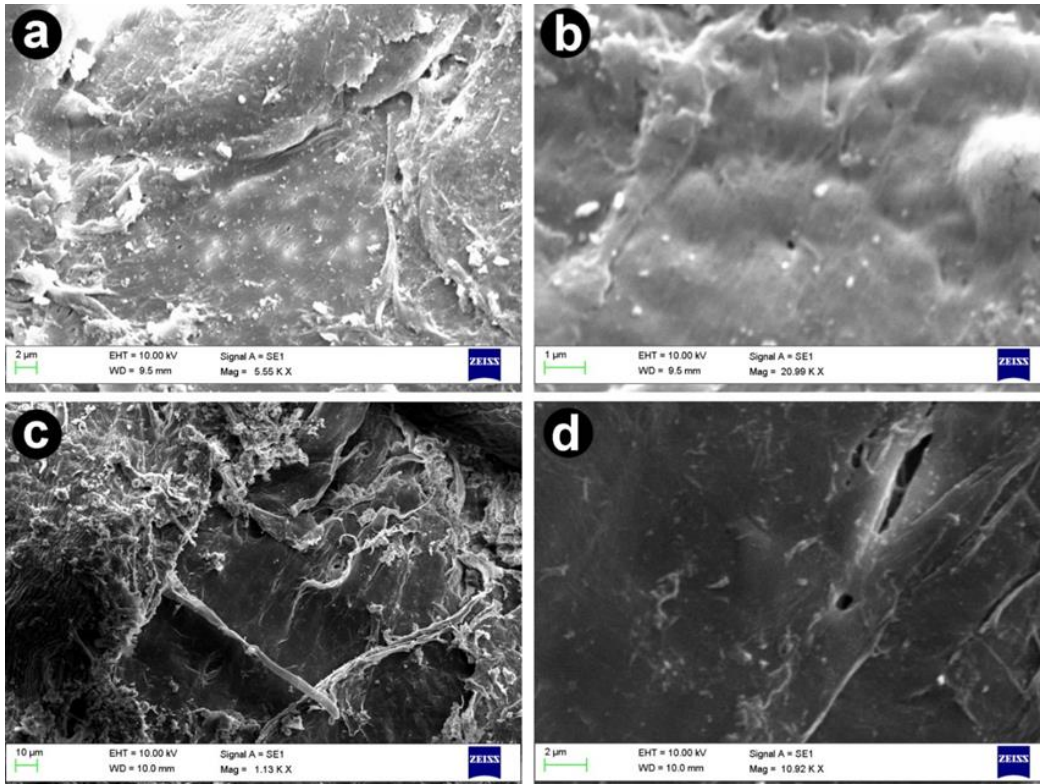


belirlenmiştir. Elde edilen kitinin ayrıca termal kararlılığı bilinen çoğu böcek ve kabuklu kitininden yüksektir. Elde edilen ve karakterizasyonu yapılan kitin ve kitosan bu örümcek türünde ilk kez yapılmış olup elde edilen

biyomateryaller eczacılık, tıp, tekstil ve ziraat v.b gibi endüstrinin pek çok alanına alternatif kitin kaynağı olarak önerilebilir.



Şekil 5. Örümcekten izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın XRD analizi (a. kitin ve b. kitosan).



Şekil 6. *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802) türünden izole edilen kitin ve bu kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın SEM ile elde edilmiş yüzey görüntüleri (a,b. kitin; c,d. kitosan)

## Etik Onay

Yazarlar etik onay belgesi sunmamışlardır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyanında bulunmamışlardır.

## Mali Destek

Bu çalışma, birinci yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir ve Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje No: FEB 2016/02-BAGEB). Ayrıca, tür materyallerinin temini 214Z049 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında toplanmıştır.

## Teşekkür

Mali desteklerinden dolayı Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimine ve TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.
- Demir, H., Seyyar, O. 2017. Annotated checklist of the spiders of Turkey. *Munis Entomology & Zoology*, 12 (2): 433-469
- Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V., 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63: 20-31.
- Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H., Nah, J.W. 2004. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42: 3423-3432.
- Juarez-de la Rosa, B.A., Quintana, P., Ardisson, P.L., Yanez-Limon, J.M., Alvarado-Gil, J.J. 2011. Effects of thermal treatments on the structure of two black coral species chitinous exoskeleton. *Journal of Materials Science*, 47: 990-998.
- Kaya M., Seyyar, O., Baran T., Türkeş, T. 2014a. Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. *Frontiers in Zoology*, 11: 59, doi:10.1186/s12983-014-0059-8.
- Kaya, M., Baran, T. 2015a. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 75C: 7-12.
- Kaya, M., Baran, T., Mentis, A., Asaroglu, M., Sezen, G., Tozak, K.O. 2014c. Extraction and Characterization of  $\alpha$ -

Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates. *Food Biophysics*, 9: 145-157.

- Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Satkauskienė, I., Bitim, B., Tubelyte, V., Baran, T. 2014b. Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology*, 133: 285-293.
- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Satkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelyte, V., Baran, T. and Seyyar, O., 2016. "How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin", *Food Biophysics*, 11, 10-19.
- Kaya, M., Lelesius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E., Bitim, B. 2015b. Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species. *PloS One* 10, e0115531, 1-14.
- Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Erdogan, S., Kar, M., 2014d. A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 553-558.
- Kaya, M., Tozak, K. Ö., Baran, T., Sezen, G., Sargin, I. 2013. Natural porous and nano fiber chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea). *EXCLI Journal*, 12: 503-510.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31: 603-632.
- Sajomsang, W., Gonil, P. 2010. Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs. *Materials Science and Engineering: C*, 30: 357-363.
- World Spider Catalog. 2020. World Spider Catalog. Version 21.5. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on {20.08.2020}. doi: 10.24436/2
- Yen, M., Mau, J. 2006. Preparation of fungal chitin and chitosan from shiitake stipes. *Fungal Science*, 21(1, 2): 1-11.
- Yen, M.-T., Mau, J.-L. 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 472-479.