

*Research article***Extraction and physicochemical characterization of chitin from *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 (Arachnida: Opiliones)****Fatma SEYYAR\***, **Hakan DEMİR**

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

\*Corresponding author: ozyptila@hotmail.com; biyologfatma1981@hotmail.com

**Abstract:** Chitin is a biomaterial which has a high potential of use in many areas of technology. It is found as a structural material in the outer skeletons of arthropods, the cell walls of mushrooms and the shells of marine invertebrates. It is also the second most abundant biopolymer in nature after cellulose. But when considered the biopolymers with nitrogen in their structure, chitin is the most abundant biopolymer. In recent years, apart from crustaceans and mushrooms, of arachnids, corals and crustacean eggs and even bat guano have been proposed as alternative chitin sources. In this study, it was firstly extracted chitin from external skeleton of an opilionid species, *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758, and the isolated chitin was characterized by FTIR, SEM, TGA and XRD. The obtained chitin has been found to have high thermal stability, nanofiber and nanoporous surface and alpha form, and it is suggested that it can be an alternative chitin source.

**Keywords:** *Phalangium opilio*, Chitin, Opiliones**Citing:** Seyyar, F., & Demir, H. 2020. Extraction and Physicochemical Characterization of Chitin from *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 (Arachnida: Opiliones). *Acta Biologica Turcica*, 33(4): 258-263.***Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 (Opiliones) Türünden Kitin Ekstraksiyonu ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu**

**Özet:** Kitin, teknolojinin birçok alanında yüksek kullanım potansiyeline sahip bir biyomateriyaldir. Eklembacaklıların dış iskeletlerinin, mantarların hücre duvarlarının ve deniz omurgasızlarının kabuklarının temel yapısında bulunmaktadır. Ayrıca, selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci biyopolimerdir. Fakat yapısında azot taşıyan biyopolimer düşünüldüğünde kitin en çok bulunan biyopolimerdir. Son yıllarda deniz kabukluları ve mantarlar dışında böcekler, araknidler, mercan ve kabukluların yumurtaları ve hatta yarası guanosu alternatif kitin kaynakları olarak önerilebilmektedir. Bu çalışmayla bir otbiçen olan *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünün dış iskeletinden ilk kez kitin elde edilmiş ve FTIR, SEM, TGA ve XRD değerlerine bakılarak kitinin karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen kitinin termal karalılığının yüksek, nanofiber ve nanopor yüzeyli ve alfa formda olduğu görülmüş ve alternatif bir kitin kaynağı olabileceği önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Phalangium opilio*, Kitin, Opiliones**Giriş**

Kitin, eklembacaklıların dış iskeletlerinin, mantarların hücre duvarlarının ve deniz omurgasızlarının kabuklarının temel yapısında bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca, yarası guanosu, böcek ve kabuklu yumurtaları vb. gibi doğal yapılarda kitin bulunmaktadır (Kaya ve ark., 2014a).

Kitin, genellikle omurgasız hayvanların vücutlarında bulunan bir biyopolimer olmasına karşın son zamanlarda yapılan bir çalışma da omurgalı canlılarda da varlığı kaydedilmiştir (Tang ve ark., 2015). Yapılan bu çalışmalar göstermektedir ki; dünyadaki tüm canlıların %70'inden fazlasının yapısında kitin bulunmaktadır.

Bir aminopolisakkarit olan ve doğada çok yaygın olarak bulunan kitinin, ticari amaçlarla yıllık selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir. Kitin ve bunun en önemli türevlerinde biri olan 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 ve ark., 2004; Aranaz ve ark., 2009). Kitin ve türevleri üzerine yapılan çalışmaların artması ve bu alanda yeni uygulama alanlarının ortaya çıkmasıyla kitin ve türevlerine daha fazla ihtiyaç duyulmakta ve yeni kitin kaynaklarına yönelim artmaktadır.

Eklembacaklılar şubesinin örümceğimsiler (Arachnida) sınıfına dahil olan otbiçenler (Opiliones) takımı, tür sayısı bakımından örümcekler ve kenelerden sonra gelen üçüncü büyük takımdır. Şimdiye kadar dünya üzerinde yayılış gösteren 6125 türü tespit edilmiştir (Kury 2012). Otbiçenler orman, çayır, fundalık ve tarım arazileri gibi çok farklı habitatlarda uyum sağlamış karasal araknidlerdir. Ülkemizde ise otbiçenlerin 100'e yakın türü bilinmektedir (Kurt ve ark., 2010; 2014) Günümüzde otbiçenler diğer karasal araknidler gibi kara ekosistemlerinde yaşayan böcekler ve diğer eklembacaklıların etkili predatörü olarak bilinirler. Böylece doğal ekosistemlerin dengeli bir şekilde sürdürebilirliğine katkı sağlarlar (Kurt ve ark., 2011; 2017).

Bu tez çalışmanın amacı, ülkemizde geniş bir yayılış alanına sahip bir otbiçen türü olan *P. opilio* türünden dünyada ilk kez kitin izolasyonu yapmak ve elde edilen kitinin FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri kullanılarak karakterize etmektir.

### Materyal ve Yöntem

Bu tez çalışmasında kullanılan *P. opilio* Linnaeus, 1758 türüne ait örnekler, genellikle ülkemizde bu canlılar üzerine uzmanlaşmış olan Doç. Dr. Kemal KURT'un kişisel koleksiyonundan temin edilmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2). Elde edilen bu otbiçen türüne ait örnekler, laboratuvarında aşağıdaki aşamalardan geçirilerek kitin eldesi gerçekleştirilmiştir.

1. Demineralizasyon için yıkanarak öğütülen örnekler HCl ile muamale edildi.

2. Depigmentasyon için HCl çözeltisinden çıkarılan ve yıkanarak nötralleştirilen örnekler yapılarında bulunan organik bileşikler ve pigmentlerin uzaklaştırılması için etanol ile yaklaşık 12 saat karıştırıldı ve sonrasında saf su ile yıkandı.

3. Deproteinizasyon için eldeki numune NaOH ile muamale edildi ve ardından aseton ile ekstraksiyonu yapılarak kurumaya bırakıldı. Kitin elde edildi.



Şekil 1. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünün genel görünüşü (<https://www.naturespot.org.uk/species/phalangium-opilio>)



Şekil 2. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türüne ait örnekler

Elde edilen kitinin karakterizasyonunu belirlemek için Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda FTIR, TGA, XRD ve SEM analizleri yaptırıldı.

**FTIR Analizi:** *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden elde edilen kitinin infrared spektrumları, ölçü Bruker Marka Vertex 70 madel 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:** *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden elde edilen kitin XRD spektrumlar, Rigaku D max 2000 sisteminde 45 ° için 5 ° 2 0 aralığında ölçülmüş elde edilen kitin Kristal index değeri CrI hesaplaması yapılmıştır.

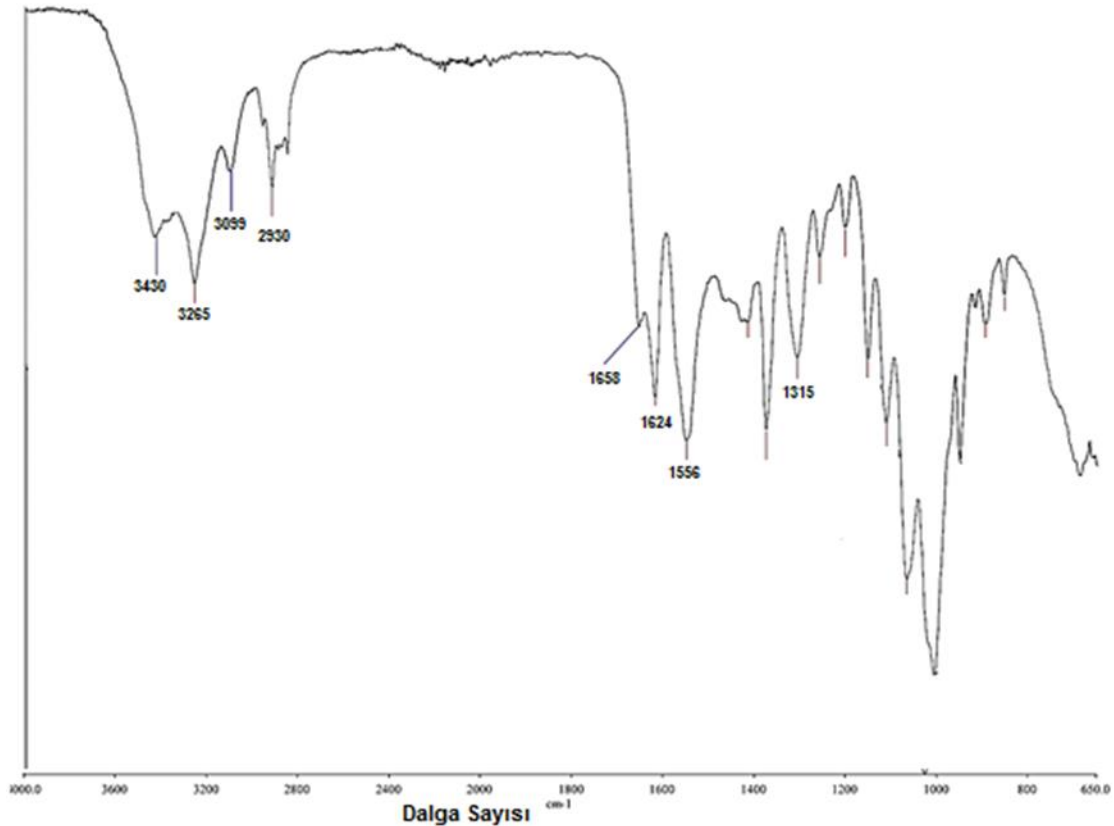
**SEM:** Numulardan elde edilen kitinden daha net görüntü elde etmek için örneklerin yüzeyi Sputter Coater (Cressingto Auto 108) marka altın kaplama cihazı ile altınla kaplanıp daha sonrasında yüzey morfolojisini incelemek için EVO LS 10 ZEISS marka cihaz kullanılarak fotoğraflar çekilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

*Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünde kitin eldesi yapılmış ve elde edilen kitinin FTIR, TGA, XRD ve SEM kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

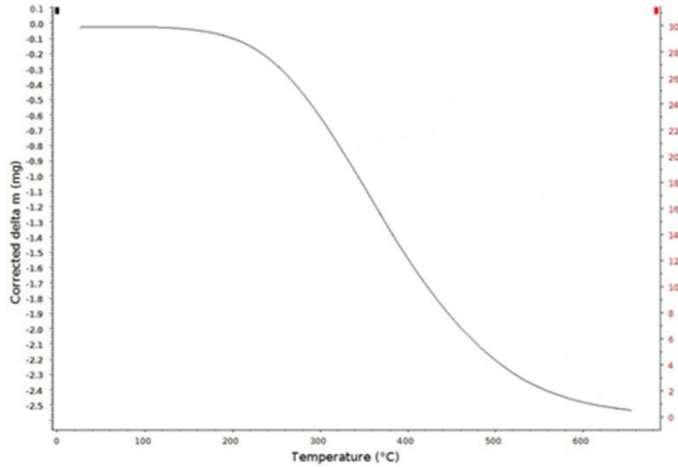
Çalışmada otbiçenlerden ve bu türden ilk kez kitin eldesi yapılmış ve bu kitin karakterize edilmiştir.

**FT-IR:** *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden elde edilen kitinin FT-IR analizi sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 3' de verilmiştir. Spektrumlardan da görüldüğü gibi kitinin belirli karakteristik pikleri vardır ve spektrumlarda bu pikler açıkça görülmektedir. 3400 cm<sup>-1</sup> ile 3200 cm<sup>-1</sup> bölgesinde yer alan bu pikler, kitinin yapısında da bulunan -O-H, -N-H gruplarına ait gerilme titreşimleri ve moleküller arası hidrojen bağlarına ait gerilme titreşimlerine ait piklerdir. 1556 ve 1315 cm<sup>-1</sup> de görülen iki pik, sırasıyla amid II (-N-H) bükülme ve amid III (-C-N) gerilme pikleridir. Kitine ait spektrumda 1624 cm<sup>-1</sup> de görülen pik amid I gerilimine, 1658 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik ise yapıda bulunan -C=O (karbonil) grubuna ait spesifik gerilme pikleridir. Literatüre göre ikiye ayrılmış amide I bandı kitinin alfa formda olduğunu işaret etmektedir. Bölünmemiş (tek) amide I bandı ise kitinin beta formda olduğunu gösterir (Jang vd., 2004a). Kitinin deasetilasyonu sonrasında 1556 cm<sup>-1</sup> de görülen pik, yeni oluşan NH<sub>2</sub> gruplarına ait bükülme pikleridir. Tüm bu sonuçlar bu otbiçen türünden kitinin oldukça başarılı bir şekilde elde edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 3. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden izole edilen kitinin FT-IR spektrasi

**TGA:** Termogravimetrik analiz elde edilen malzemenin sıcaklığa olan dayanımını öğrenmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Dutta vd., 2004). Mevcut çalışmada da *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden elde edilen kitinin sıcaklıkla olan bozulmalarını ortaya koymak için TGA analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar kitinin sıcaklık etkisi altında iki basamakta kütle kaybı yaşadığını göstermektedir. İlk basamakta 100°C'ye kadar olan kütle kayıpları yapıdan uzaklaşan sudan kaynaklanmaktadır. İkinci basamakta gözlenen önemli kütle kayıpları ise kitinin bozulmaya başladığını göstermektedir (Şekil 4). Literatür taraması sonucu farklı organizmalardan izole edilen kitinlerin de mevcut çalışmadaki gibi iki farklı basamakta kütle kaybı gözlenmiştir (Jang ve ark., 2004b., Juarez-de la Rosa ve ark., 2011; Sajomsang ve Gonil 2010). Bu sonuçlarda mevcut çalışmada *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden kitinin başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.



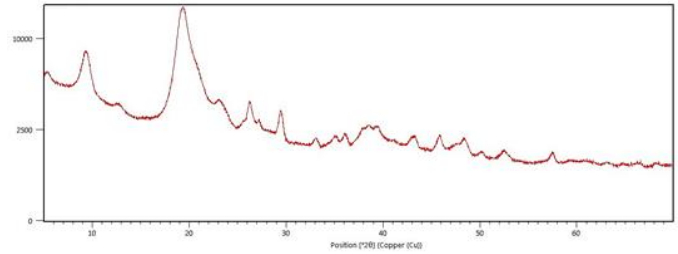
Şekil 4. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden izole edilen kitinin TGA analizi

**XRD:** *P. opilio* Linnaeus, 1758 türünden izole edilen kitinin XRD analiz sonuçları Şekil 5'de gösterilmiştir. Literatüre bakıldığında kitin ve türevlerinin XRD analizleri sonucu 9° ve 19° civarında iki keskin pik gözlenmiştir (Jang ve ark., 2004a., Liu ve ark., 2012; Sajomsang ve 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 ve ark.,

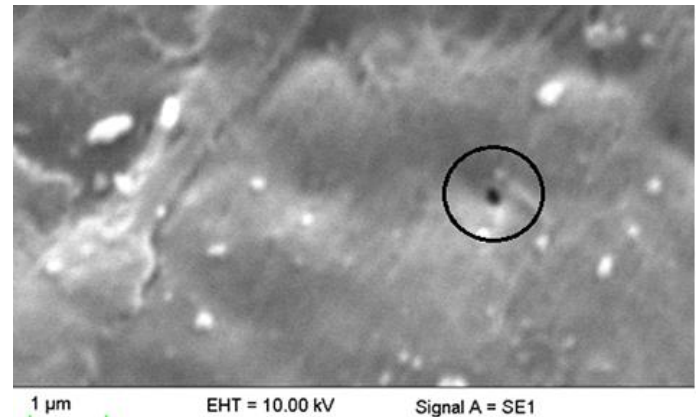
2004b). Ayrıca elde edilen kitinin kristaline indeks değerleri hesaplanmış ve %69.6 olarak bulunmuştur.

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 ve ark., 2004).



Şekil 5. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden izole edilen kitinin XRD analizi

**SEM:** *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden saflaştırılan kitinin yüzey morfolojisi SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 6). Kitinin yüzeyinin ince nanofiberlerden oluştuğu görülmektedir. Ayrıca, Şekil 6'da kitinin yüzeyinde nanofiberlerin yanı sıra azda olsa nanoporların (gözeneklerin) olduğu da görülmektedir.



Şekil 6. *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden izole edilen kitinin SEM ile elde edilmiş yüzey morfolojisi



Literatür çalışmalarına bakıldığında kitinin yüzeyinin canlı grubuna göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde daha çok mantarlardan elde edilen kitinin morfolojisinde nanofiber ve porların görülmediği ve kitin yüzeyinin düz olduğu gözlemlenmiştir (Yen ve Mau 2006; 2007). Bazı canlı gruplarından elde edilen kitinin yüzey morfolojisinin sadece nanofiber yapıda olduğu, diğer bazı grup canlılarda ise kitin yüzeyinin hem nanofiber hem de nanoporlar içerdiği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Kaya ve ark., 2013). Çok az canlı grubunda ise nanofiber, nanopor ve mikroporların birlikte bulunduğu kitin yüzeyi de gözlemlenmiştir (Kaya ve ark., 2014b). Ayrıca, Kaya ve Baran (2015) yaptıkları çalışmalarında sadece nanoporların bulunduğu kitin yüzeyinin varlığını da ortaya koymuşlardır.

Şuana kadar ülkemizde ve dünyada araknid grularından sadece örümcekler ve akrelerin birkaç türü üzerinden kitin çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan, bir akrep türü olan *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) türünün kitosan yüzey morfolojisi SEM ile incelendiğinde yoğun nanofiber ve porlardan oluştuğu bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2015; 2016). Ayrıca, ülkemizde iki farklı örümcek türünden (*Geolycosa vultuosa* ve *Hogna radiata*) kitin izolasyonu yapılmış farklı yüzey morfolojilerine sahip olduğu ortaya konmuştur

## Sonuç

Sonuç olarak bu çalışma, *Phalangium opilio* Linnaeus, 1758 türünden elde edilen kitinin, FTIR, XRD, TGA ve SEM analizleriyle karakterizasyonunu ve bazı fizikokimyasal özelliklerini ortaya koyan bir araştırmadır. FTIR spektrumundan elde edilen bulgular, bu otbiçen türünden elde edilen kitinin alfa formunda olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüler kitin yüzeyinin ince nanofiber ve nadir nanoporların oluşturduğu yapıda olduğunu göstermektedir. Termogravimetrik analizler sonucunda ise elde edilen kitinin termal kararlılığının, bilinen birçok böcek ve kabuklularınkinden yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Elde edilen ve karakterizasyonu yapılan kitin otbiçenlerden ve bu türünden ilk kez yapılmış olup elde edilen bu biyomateryal özellikleri bakımından eczacılık, tıp, tekstil ve ziraat v.b. gibi endüstrinin pek çok alanına alternatif kitin kaynağı olarak önerilebilir.

## Etik Onay

Yazarlar etik onay belgesi sunmamışlardır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyanında bulunmamışlardır.

## Mali Destek

Yazarlar herhangi bir mali destek beyanında bulunmamışlardır.

## Teşekkür

Bu çalışma, birinci yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir. Otbiçen örneklerinin temini konusunda yardımlarını gördüğümüz Doç. Dr. Kemal KURT'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.
- 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., 2015. 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., Baublys, V., Sargin, I., Satkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelyte, V., Baran, T., 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. 2015. 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., 2014b. A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 553-558.
- Kaya, M., 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.
- Kurt, K. 2014. Updated checklist of harvestmen Arachnida Opiliones in Turkey. *Archives of Biological Sciences*, 66 (4): 1617-1631.
- Kurt, K., Erman, Ö.K., Demir H., Seyyar, O. 2010. The Turkish Harvestmen Opiliones with zoogeographical remarks. *Serket*, 12 (2): 33-44.
- Kurt, K., Erman, Ö.K., Demir, H., Seyyar, O. 2017. Türkiye Otbıçen Opiliones Faunasının Endemizm Durumu. *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5 (13): 1744-1749.
- Kurt, K., Snegovaya, N. Y., Demir H., and Seyyar, O. 2011. New Data on the Harvestmen Arachnida Opiliones Fauna of Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 63 (1): 145-149.
- Kury, A.B. 2012. A synopsis of catalogs and checklists of harvestmen (Arachnida, Opiliones). *Zootaxa*, 3184: 35-58.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., Yang, Q. 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17: 4604-4611.
- 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.
- Yen, M., Mau, J., 2006. Preparation of fungal chitin and chitosan from shiitake stipes”, *Fungal Science* 21(1, 2), 1–11.
- Yen, M., Mau, J., 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes, *LWT - Food Science and Technology* 40, 472-479.