

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TUNİKAT *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) TÜRÜNDEN HAYVANSAL
KAYNAKLI NANOKRİSTALİN SELÜLOZ ÜRETİMİ VE FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZGE CESUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN

EDİRNE – 2022

Özge CESUR'un hazırladığı “**TUNİKAT *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) TÜRÜNDEN HAYVANSAL KAYNAKLI NANOKRİSTALİN SELÜLOZ ÜRETİMİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Doç.Dr. Elvan BAKAR

.....

Doç.Dr. Burhan COŞKUN

.....

Dr.Öğr.Üyesi Sevil ERDOĞAN

.....

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN

Tez Danışmanı

.....

Doç. Dr. H. Barış ÖZALP

İkinci Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

.... / /

Özge CESUR

İmza

Tunikat *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) Türünden Hayvansal Kaynaklı Nanokristalin Selüloz Üretimi ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Çanakkale Boğazı'nda dağılım gösteren tunikat *Phallusia mammillata*'nın tuniğinden hidroliz/kraft pişirme/ağartma yöntemiyle hayvansal kaynaklı selüloz izole edilmiş ve bu selülozdan asit hidroliz yöntemi ile nanokristalin selüloz üretilmiştir. Elde edilen selüloz ve nanokristalin selülozun fiziksel ve kimyasal özellikleri Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Termogravimetrik analiz (TGA), X-Işını difraksiyonu (XRD) ve elementel analiz ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *P. mammillata* tuniğinin kuru ağırlık selüloz içeriğinin % 16,84 olduğu belirlenmiştir. FTIR analizi *P. mammillata* selülozünün doğal selüloz I- β kristal yapısında olduğunu göstermiştir. *P. mammillata* selülozu enine kıyasla çok uzun boya sahip nanofibrilli bir yapıya sahipken, asit hidrolizi ile üretilen nanokristalin selülozun ise parçalanmış küçük topaklar oluşturmuş bir görüntü sergilediği ortaya konmuştur. *P. mammillata*'dan elde edilen selüloz ve nanokristalin selüloz için gözlenen maksimum bozunma sıcaklıkları (DTG_{max}) 336-340 °C civarında olup termal kararlılıkları yüksektir. Bununla birlikte, asit hidrolizi ve ultrasonikasyon uygulaması tunikat *P. mammillata* selülozünün termal stabilitesinin azalmasına yol açmıştır. *P. mammillata*'dan üretilen selüloz (%98,26) ve nanokristalin selüloz (%98,59) literatürde verilen tunikat türlerinin selülozundan daha yüksek bir kristalinite göstermiştir. *P. mammillata* selülozünün tutma kapasitesinin kuru ağırlığının 8,5 katı kadar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *P. mammillata* selülozünün yüksek saflıkta olduğu, izole edilen selülozun beyazlığı, FTIR, EDX ve XRD analizleri ile ortaya konmuştur.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 91

Anahtar Kelimeler : Denizel organizma, nanokristalin selüloz, FTIR, TGA, XRD, SEM

Production of animal-derived nanocrystalline cellulose and determination of physicochemical properties from Tunicate *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815)

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

In this study, cellulose was isolated from the tunic of *Phallusia mammillata* distributed in the Çanakkale Strait (Dardanelles) by hydrolysis/kraft cooking/bleaching method, and nanocrystalline cellulose was produced from this cellulose by acid hydrolysis. The physico-chemical properties of the obtained cellulose and nanocrystalline cellulose were determined using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray diffraction (XRD), Thermogravimetric analysis (TGA) and elemental analysis. As a result of the study, the dry weight cellulose content of the tunic of *P. mammillata* was calculated as 16.84%. FTIR analysis showed that *P. mammillata* cellulose was in the natural cellulose I- β crystal form. *P. mammillata* cellulose had a nanofibrillar structure with a very long length compared to the width. The nanocrystalline cellulose produced by acid hydrolysis, on the other hand, appeared to form fragmented small lumps. The maximum decomposition temperatures observed for cellulose and nanocrystalline cellulose produced from *P. mammillata* are around 336 - 340 °C and their thermal stability is high. Acid hydrolysis led to a decrease in the thermal stability of cellulose from *P. mammillata*. Cellulose (98.26%) and nanocrystalline cellulose (98.59%) produced from *P. mammillata* showed a higher crystallinity than the cellulose reported for different tunicate species. *P. mammillata* cellulose has a water holding capacity of 8.5 times its dry weight. In addition, the high purity of *P. mammillata* cellulose was proved by FTIR, EDX and XRD analyses and with the whiteness of the isolated cellulose.

Year : 2022

Number of Pages : 91

Keywords : Marine organism, nanocrystalline cellulose, FTIR, TGA, XRD,
SEM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi sürecinde beni yönlendiren ve tez çalışmam boyunca yardım ve desteğini gördüğüm, danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN'a ve tunikat türlerinin örneklenmesi, türlerin taksonomik olarak teşhiş edilmesi ve saklanmasıyla yanısıra araştırma dalışları ve laboratuvar aşamalarında destek veren ikinci tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Hasan Barış ÖZALP'e (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi) çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her konuda gerek tez yazımı gerek araştırma yapmamda her zaman yanımda olan canım eşim Aziz CESUR ve bu süreçte bizi olgun bir şekilde alttan alan canım kızım Ayşe Gülce CESUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının deniz saha sualtı araştırmaları ve analizleri TÜBAP 2020/142 numaralı, "Çanakkale Boğazı Anthozoa, Porifera, Tunicata ve Bryozoa Türlerinden Biyoaktif Bileşik Eldesi ve Karakterizasyonu" başlıklı proje kapsamında finansal olarak desteklenmiştir.

Özge CESUR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
AMAÇLAR.....	5
BÖLÜM 2	6
GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tunikatlar (Tulumlular)	6
2.2. Türkiye Denizlerinde Yapılan Çalışmalar	11
2.3. <i>P. mammillata</i> (Cuvier, 1815).....	12
2.4. Selüloz.....	13
2.5. Tunikat Selülozunun Uygulamalarına İlişkin Literatür Taraması	16
BÖLÜM 3	20
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Çanakkale Boğazı ve Tunikat Yaşam Alanları Karakteristiği	20
3.1.1. Sualtı Araştırmaları Örneklemeye Çalışmaları	21
3.2. Kimyasallar	23
3.3. Tunikat <i>P. mammillata</i> 'dan Selüloz İzolasyonu.....	23
3.3.1. <i>P. mammillata</i> Selülozundan Nanokristalin Selüloz Eldesi.....	25
3.4. Tunikat Selüloz ve Nanokristalin Selülozun Karakterizasyonu.....	25
3.4.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	26
3.4.2. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)	26
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	27
3.4.4. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	27
3.4.5. X-Işını Kırınımı (XRD).....	28
3.4.6. Elementel Analiz	28
3.4.7. Su Tutma Kapasitesi (STK)	29
3.4.8. Selüloz Verimi (%)	29

BÖLÜM 4	30
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	30
4.1. Kuru Ağırlık Selüloz Verimi.....	30
4.2. FTIR	33
4.3. SEM ve EDX Sonuçları	37
4.4. TGA	43
4.5. XRD	48
4. 6. NMR.....	53
4.7. Elementel Analiz.....	57
4.8. Su Tutma Kapasitesi	57
SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asit hidrolizi ile üretilen selüloz nanokristali
Al ₂ O ₃	Alumina
Au	Altın
bar	Basınç birimi
bar ⁻¹	1/ bar
BC	Bakteriyel Selüloz
C	Karbon
(CH ₃) ₂ CO	Aseton
CesA	Selüloz sentaz
Cl	Klor
cm	Santimetre
cm ⁻¹	1/santimetre (frekans)
cms-1	Santimetre/saniye
CNF	Selüloz Nanofibriller
CN-GM	Selüloz nanokristali ve glukomannan nano kompoziti
CrI	Kristallik İndeksi
CO ₂	Karbon dioksit
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
ECH	Epiklorohidrin
ECN	Enzimatik Hidroliz ile üretilen selüloz nanokristali
EDX	Enerji Dağılımlı X Işını
Fe	Demir
Fe ⁺³	Demir (III) iyonu
FP	Floresan Protein
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
GM	Glukomannan
H	Hidrojen

He	Helyum
H ₂ O	Su
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
kV	Kilovolt
keV	Kilo elektron volt
km	kilometre
L	Litre
LiOH	Lityum hidroksit
m	Metre
m ⁻²	100/ m
mA	Mili Amper
Max	Maksimum
MB	Metilen Mavisi
Min	Minimum
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mm/s	Milimetre/saniye
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
N	Azot
N ₂	Azot gazı
Na	Sodyum
NCC	Nanokristal selüloz
NaClO	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ S	Sodyum sülfid
nm	Nanometre
O	Oksijen
O ₂	Oksijen gazı
Ort	Ortalama
POM	Polarize optik mikroskopi
PNIPAM	Poli(N-izopropilakrilamid)
ppt	Binde bir
Q-TCNCs	Kuaternize Tünikat Selüloz Nanokristalleri

rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
SA	Sodyum Aljinat
SO ₂	Kükürt dioksit
Sn	Kalay
STK	Su Tutma Kapasitesi
TCN	TEMPO aracılı oksidasyon ile üretilen selüloz nanokristali
TCNC	Tunikat Selüloz Nanokristalleri
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il) oksil
TG	Termogravimetrik
TGA	Termogravimetrik Analiz
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
v/v	Hacim/hacim
XRD	X-Işını Difraksiyon
α	Alfa
β	Beta
β -FeOOH	β - ferrik oksihidroksit
θ	Teta
~	Yaklaşık
%	Yüzde
°	Derece
°C	Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1.** *P. mammillata* inceleme-gözlem istasyonları ve ön araştırmalar. 22
- Şekil 3. 2.** *Phallusia mammillata*'nın Çanakkale Boğazı yaşam ortamları karakterinden bir görünüm (Kum-çamur substrat, 30-38 m) (© Özalp 2022). 22
- Şekil 3.3.** *P. mammillata* etil alkolde korunmuş organizmanın a) genel görüntüsü ve b) tunik yapısı. 23
- Şekil 3.4.** Tunikat tuniğinden selüloz üretimi. a) kuru tunik, b) asit uygulaması sonrası, c) kraft cooking sonrası, d) beyazlatılmış selüloz. 24
- Şekil 3.5.** *P. mammillata*'dan selülozundan nanokristalin selüloz eldesi. 25
- Şekil 4.1.** *P. mammillata* selülozunun kızılötesi spektrumu. a) selüloz, b) nanokristalin selüloz. 34
- Şekil 4.2.** Tunikat selülozunun yüzey morfolojisinin SEM görünümü. a) 2000x büyütmede selüloz yapısı, b) 8000x büyütmede selüloz yapısı, c) 20000x büyütmede selüloz yapısı, d) 40000x büyütmede selüloz yapısı, e) 500Kx büyütmede nanokristalin selüloz yapısı, f) 1000Kx büyütmede nanokristalin selüloz yapısı. 39
- Şekil 4.3.** *P. mammillata* selülozunun EDX grafiği. 41
- Şekil 4.4.** *P. mammillata* selülozunun EDX element dağılım haritası. a) EDX analizi için seçilen alan, b) Seçilen alandaki tüm elementlerin dağılım haritası, c) Oksijen elementi dağılım haritası, d) Sodyum elementi dağılım haritası, e) Klor elementi dağılım haritası, f) Karbon elementi dağılım haritası. 42
- Şekil 4.5.** Tunikat *P. mammillata* selülozunun TG/DTA grafiği. a) selüloz b) nanokristalin selüloz. 44
- Şekil 4.6.** Tunikat *P. mammillata*'dan elde edilen selülozun XRD grafiği. a) selüloz (JCPDS kart no. 50-2241), b) nanokristalin selüloz (JCPDS kart no. 50-2241). 49

Şekil 4.7. *P. mammillata* selülozunun a) ^1H -NMR spektrumu ve b) ^{13}C -NMR spektrumu. 55

Şekil 4.8. Tunikat *P. mammillata* selülozu a) yaş ve b) kuru. 58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>P. mammillata</i> bireylerinin boy, kütle ve tunik su içerikleri.	30
Çizelge 4.2. <i>P. mammillata</i> selülozunun element içerikleri ve yüzde oranları.	41

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünya yüzeyinin % 70' inden fazlasını kapsayan denizler ve okyanuslar, dünyanın en büyük ekosistemleridir ve yerküre üzerindeki önemli yaşam alanlarını içermektedir. Denizlerin 34 filuma ait 178.000 canlı türünü barındırdığı (UEPA, 2006), ve bu türlerin en az % 50' sinin bilimsel olarak tanımlanmadığı belirtilmektedir (Trincon, 2017). Deniz ortamı, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, yüksek tuzluluk, yüksek hidrostatik basınç, güçlü asit, güçlü alkali, özel ışıklandırma koşulları ve besin bakımından zengin bölgeler ya da yalnızca birkaç organizmanın yaşayabileceği besinsel olarak kıt bölgeler dahil olmak üzere son derece karmaşık habitatlar barındırmaktadır (Zhang ve Kim, 2010). Deniz ve okyanus ekosistemlerinin doğal karakterleri ve kendine özgü yaşam ortamı oluşturma özellikleri nedeniyle, bu bölgelerde tür çeşitliliğinin dikkat çekici olduğu belirtilebilir. Ekosistem içersinde diğer canlıların barınma, beslenme ve üreme adaptasyonlarını destekleyici mercan resifi, derin su mercan bölgeleri, mangrov, deniz çayırı, sünger fasiyesi, hidrotermal baca bölgeleri, koralijen kommünite, kalkerli alg veya serpulid kayaları gibi canlı habitat alanlarının varlığının, özellikle yüksek denizel biyoçeşitliliğe sahip alanlar oluşturduğu bilinmektedir (Reaka-Kudla, 1997; Field vd., 1998; Duffy, 2006; Maldonado vd., 2015; Muir, Wallace, Pichon ve Bongaerts, 2018; Çınar vd., 2020).

Denizel organizmalar bu koşullara adapte olabilmek için metabolizmalarının yan ürünü olarak karasal organizmalardan farklı özellikte çok çeşitli biyomalzemeler sentezlemektedir. Fakat denizel organizmaların örneklenmelerinin zor ve maliyetli olması nedeniyle bu organizmalar yeterince araştırılmamıştır. Dolayısıyla bunların ürettikleri biyomalzemelerin birçoğu da henüz tanımlanmamış ve yapıları detaylı bir şekilde incelenmemiştir. Denizel türlerin potansiyel kullanım alanlarını belirleyebilmek

için öncelikle bu biyomalzemelerin tanımlanması ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi gereklidir.

Biyolojik kaynaklardan elde edilen malzemelerin çevre üzerinde olumsuz etkilerinin olmaması yada çok düşük olması, olağanüstü fizikokimyasal özellikler sergilemeleri ve katma değerli ürün üretme konusunda çok yüksek potansiyele sahip olmaları son yıllarda ilgiyi doğal biyomalzemelere çekmiştir (Klemm, Heublein, Fink ve Bohn, 2005; Kalia, Kaith ve Kaur, 2011; Klemm vd., 2011; Fernandes, Pires, Mano ve Reis, 2013; Thakur, 2015a; Thakur, 2015b; Trache, Hazwan Hussin, Mohamad Haafiz ve Thakur, 2017). Günümüzde önemi farkedilmiş denizel biyomalzemelerden biri de nanokristalin selülozdur. Selüloz bitkilerin yanı sıra, belirli alg ve bakterilerin hücre duvarlarında da üretilebilmesine rağmen (Habibi, Lucia ve Rojas, 2010), selülozun tek hayvansal kaynağı denizlerde yaşayan tunikatlardır (Zhao ve Li, 2014). Selüloz, biyoyumlu ve biyobozunur olduğundan biyomedikal, enerji, çevre ve su ile ilgili çeşitli uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır (Mondal, 2017). Ha, Quan, Vu ve Si (2013), doğal selüloz kürelerinin biyolojik ayırma, hareketsizleştirilmiş reaksiyon, hücre süspansiyon kültürü ve atık su arıtımı için bir adsorban olarak kullanıldığını bildirmiştir. Biyomedikal alanda ise selüloz, yara iyileşmesi, kemik- kırık rejenerasyonu, dişçilik uygulamaları, enzim immobilizasyonu ve kanser tedavisi gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Ha vd., 2013; Halib vd., 2017).

Tunikatlar su akışını sağlayan iki sifonlu kese benzeri gövdeleri olan süzücü beslenen omurgasız hayvanlardır (Seo vd., 2004; Franchi ve Ballarin, 2017). Larva ve yetişkin vücudunu içine alan deriye benzer bir tulumaya sahip olmalarıyla tanınırlar (Arslan, 2006; Franchi ve Ballarin, 2017). Basit bir vücut planına sahip hareketli bir iribaş larva yoluyla hızla gelişirler (Groppelli, Pennati, Scari, Sotgia ve De Bernardi, 2003). Tunikata alt şubesi, Ascidiacea (bentik ve sapsız), Thaliacea (pelajik) ve Appendicularia (pelajik) olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılan yaklaşık 3.000 türden oluşmaktadır (Seo vd., 2004; Franchi ve Ballarin, 2017). Soliter, koloni veya bileşik şekilde olmak üzere üç formda yaşayabilirler (Hassanzadeh, 2011). Ascidiacea sınıfının ergin bireyleri ince ipliksi uzantılar ya da kök benzeri dallanmış yapıları ile sert bir zemine tutunarak yaşarlar (Dinçaslan ve Öber, 2005). Ascidiacea türleri soğuk sular ve tropik denizler dahil yayılış gösterirlerken, deniz içerisinde de infralittoral zondan hadal zona kadar çok geniş bir

derinlik aralığında dağılım gösterirler (Uysal, 1976). Tunikatlar yüksek üreme oranı ve toksik maddeler ve strese karşı olan yüksek toleranslarından dolayı başarılı rekabetçi organizmalardır (Aslan, 2006). Hızlı nesil sürelerine sahip olmalarından dolayı küresel olarak bentik ekosistemlerin büyük bir bölümünü oluşturmakta ve güçlü biyolojik kirleticiler ve etkili istilacılar olarak kabul edilmektedirler (Vandepas vd., 2015). Ayrıca, primer makrofoulingi oluşturan tunikatlar metalik yüzeyleri aşındırarak su içine batmış tüm yapay substratlara zarar verirler (Aslan, 2006). *Ascidia tuniği* atık bir malzemedir ve *Ascidia* tuniklerinin denize boşaltılması, kıyı çevre kirliliği sorunlarından sorumlu tutulmuştur (Koo, Wang, You ve Kim, 2002). Dunlop, Acharya ve Bissessur (2018), bu istilacı tunikatların, nanokristalin selüloz üretmek için bir kaynak olarak kullanılabilmesini ve biyoekonomiye kazandırılabilmesini bildirmiştir.

Tunikatlar, tunik olarak adlandırılan dış dokularında selüloz ürettiği bilinen tek hayvan türüdür (Trache vd., 2017). Bunun nedeni, tunikat soyunun en temelindeki prokaryotlardan selüloz sentazın lateral gen transferidir (Ocean Bergen, 2020). Tunikatlar, tunik dokularında iskelet yapısı görevi gören nanokristalin selüloz içermektedir (Zhao ve Li, 2014). Tunikat selülozu, epidermin zarında selüloz sentezleyen enzim kompleksleri tarafından farklı mekanizmalar aracılığıyla üretilmektedir ve farklı tunikat ailelerinde ve türlerinde farklı işlevler yerine getirerek farklı yapısal özellikler sergilemektedir (Zhao ve Li, 2014).

Tunikatların ürettiği mükemmel özellikteki nanokristalin selüloz birçok uygulama alanı için oldukça ilgi çekici bir biyomalzemedir. Tunik selüloz nanofiberler, yüksek kristallik ve mekanik sertlikleri nedeniyle yenilenebilir ve çevre dostu mühendislik malzemeleri olarak ilgi çekmektedir (Moon vd., 2021). Tunikatlardan elde edilen nanokristalin selülozun biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, geniş özgül yüzey alanı, yüksek kristallik, iyi termal stabilite, optik şeffaflık ve anizotropi, düşük maliyet, yüksek gerilme mukavemeti, esneklik, düşük yoğunluk ve uyarlanabilir yüzey kimyası gibi çekici fizikokimyasal özellikler sunduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Dufresne, 2012; Habibi vd., 2010; Lagerwall, Schutz ve Salajkova, 2014; Ng vd., 2015; Tang vd., 2015; Oun ve Rhim, 2016; Trache vd., 2017; Dunlop vd., 2018). Bununla birlikte, nanokristalin selüloz ayrıca bariyer filmlerde, fotonik kristallerde, şekil hafızalı polimerlerde, ışıkla iyileşebilen malzemelerde, ilaç dağıtımında kullanılabilir.

(Endes vd., 2016; Dunlop vd., 2018; Thomas vd., 2018; Garces, Aslanzadeh, Boluk ve Ayranci, 2020). Görüldüğü üzere tunikat nanokristalin selülozu eşsiz özellikleri sayesinde çok çeşitli alanlarda uygulama bulabilmektedir.

Bununla birlikte, bu güne kadar tunikatlardan selüloz eldesi ve karakterizasyonuna yönelik çok az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda *Styela clava*, *Ciona intestinalis*, *Microcosmus fulcatus*, *Styela plicata*, *Halocynthia roretzi*, *Ascidia sp.*, *Metandrocarpa uedai*, *Halocynthia papillosa* türlerinden nanokristalin selüloz elde edilmiştir (Helbert, Nishiyama, Okano ve Sugiyama, 1998; Lima, Wong, Paillet, Borsali ve Pecora, 2003; Elazzouzi-Hafraoui vd., 2008; Moon, Martini, Nairn, Simonsen ve Youngblood, 2011; Zhao ve Li, 2014; Dunlop vd., 2018). Ayrıca farklı türlerden elde edilen selüloz miktarı ve kalitesinin hiçbir zaman sistematik olarak rapor edilmediği ve karşılaştırılma yapılmadığı belirtmektedir. Zhao ve Li (2014), tunikat selülozunun farklı tunik aileleri ve türlerinde farklı işlevler gerçekleştirdiğini ve bu nedenle farklı türlerdeki selüloz yapılarının farklı özellikte olduğunu öne sürmüştür. Buna ek olarak, tunikat selülozunun izole edildiği türe ve hazırlama işlemlerine bağlı olarak farklı kimyasal ve morfolojik yapılar sergilediği ve malzeme uygulamaları için farklı özellik ve yapıda biyomalzemeler sağladığı rapor edilmektedir (Zhao ve Li, 2014; Trache vd., 2017; Zhao, Moser, Lindström, Henriksson ve Li, 2017). Bu nedenle bu açığın kapatılması ve değişik özelliklerdeki tunikat selüloz yapılarının ortaya çıkarılarak biyoteknolojik ürünlere dönüştürülebilmesi için bu biyomalzemelerin özelliklerinin bilinmesi gereklidir.

Bu tezde Çanakkale Boğazı'nda dağılım gösteren tunikat türü *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) türünden ilk kez hayvansal kaynaklı nanokristalin selüloz elde edilmesi ve bu nanokristalin selülozun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenerek potansiyel uygulama alanlarına ilişkin bilgiler ortaya konması amaçlanmıştır.

AMAÇLAR

1. Bu çalışmada Çanakkale Boğazı'nda dağılım gösteren tunikat türü *P. mammillata*'dan ilk kez nanokristalin selüloz elde edilmesi ve bu selülozun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.
2. *P. mammillata*'dan elde edilen bu biyomalzemenin olası biyomedikal ve endüstriyel kullanım alanlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.
3. Yüksek biyoçeşitliliğe sahip olması nedeniyle yeni biyomateryallerin keşfi açısından önem arz eden ülkemizin denizel biyomalzeme envanterinin çıkarılmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.
4. Bu çalışma Türkiye'nin denizel biyoteknoloji çalışmalarına öncülük edecek ve daha sonra bu alanda yapılacak araştırmalar için temel verileri sağlayacaktır.
5. İlerleyen süreçte bu biyomalzemelerin katma değerli ürüne dönüştürülmesi çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Tunikatlar (Tulumlular)

Tunikatlar Metazoa aleminin, Eumetazoa dalının, Chordata şubesinin, Tunicata alt şubesine ait olan denizel organizmalardır. Adlarını larva ve yetişkin vücudunu içine alan tuniğe borçlu olan tunikatlar süzücü beslenen kese benzeri omurgasız hayvanlardır (Franchi ve Ballarin, 2017; Seo vd., 2004). Hermafrodit olup iki ay ile bir yıl arasında değişen yaşam sürelerine sahip olan bu organizmalar, yarı saydamdan maviye, yeşile, sarıya, kırmızıya ve kahverengiye kadar farklı renklerde olabilir (Ramesh, Tulasi, Raju, Thakur ve Dufosse, 2021). Tunığın yapısı ve rengi, tür içinde ve türler arasında farklılık gösteren bir özellik olup, ince, kalın, yumuşak, etsi, derimsi, jelimsi ya da sert yapıda olabilir ve pigment içerebilir (Dinçaslan ve Öber, 2005). Soliter türler tuniğin iç kısmında kan damarları ve sinirleri de barındıran kaslı yapıda bir manto tabakasına sahiptirler (Dinçaslan ve Öber, 2005). Ascidia'lar serbest yüzen, iribaş benzeri bir larvaya sahipken, yetişkinlerin su akışına izin veren iki sifonlu (brankial ve atrial sifon) kese benzeri gövdeleri ve filtrasyon için gerekli mukus ağını salgılayan ventral endostil ile donatılmış büyük bir dal sepeti vardır (Franchi ve Ballarin, 2017). Larva aşamasında tam bir omurgalı özelliklerini taşıırken, ergin hale geldiğinde daha çok omurgasızlara benzerlik göstermektedir (Dinçaslan ve Öber, 2004). Larvaların baş kısmında bir yere tutunmalarını sağlayan adhesif yapılar, üreme sistemi ve sindirim sistemi bulunurken, kuyruk kısmında iyi gelişmiş bir sinir kordonu ve altında bir sırt ipliği (notokorda) bulunur (Dinçaslan ve Öber, 2005). Tunikat larvaları, kordalı gruplarından iribaş larvalarına benzer, ancak gelişim esnasında geriye dönük metamorfoz geçirerek notokord ve anal sonrası kuyruğu

kaybederler (Ramesh vd., 2021). Bu özelliklerinden dolayı omurgasızlar ve kordalılar arasındaki evrimsel bağı temsil etmektedirler (Berna ve Alvarez-Valin, 2014).

Tunicata alt şubesi, Ascidiacea (bentik ve sapsız), Thaliacea (pelajik) ve Appendicularia (pelajik) olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılan yaklaşık 3.000 türden oluşmaktadır (Seo vd., 2004; Franchi ve Ballarin, 2017). Shenkar ve Swalla (2011), ise yaklaşık 2815 tunik türü kaydedildiğini rapor etmektedir. Ascidiacea sınıfı bentik ve sapsız türleri içerirken, Thaliacea ve Appendicularia sınıfları pelajik türleri içermektedir (Moon vd., 2011). Appendicularia'da tunik yoktur, ancak selülozik malzemeler salgılar (Kimura, Ohshima, Hirose, Nishikawa ve Itoh, 2001). Tuniklerin görünümü ve işlevi, türe bağlı olarak sınıf içinde çok farklıdır (Zhao ve Li, 2014). Ascidian türleri tropik denizlerden soğuk sulara kadar yayılım gösterirlerken, deniz içerisinde de infralittoral zondan hadal zona kadar çok geniş bir derinlik aralığında yaşarlar (Uysal, 1976). Bununla birlikte, genellikle kıyı sularında nispeten düşük miktarda buldukları rapor edilmiştir (Ramesh vd., 2021). Tunikatlar, çok çeşitli su sıcaklıklarına ve tuzluluğa tahammül edebilmektedirler (Dunlop vd., 2018). Ascidia'ların Doğu Akdeniz'den 86, Batı Akdeniz'den 165 türü rapor edilmiştir (Aslan, 2006). Tunicata subfilumu Türkiye denizlerinde 16 familyaya ait 63 türle temsil edilmektedir (Çınar, 2014).

Tunikatlar soliter, koloni veya bileşik şekilde olmak üzere üç formda yaşayabilirler (Hassanzadeh, 2011). Ascidiacea sınıfının ergin bireyleri ince ipliksi uzantılar ya da kök benzeri dallanmış yapıları ile sert bir zemine tutunarak yaşarlar (Dinçaslan ve Öber, 2005). Ascidia'lar, hareketli bir iribaş larva yoluyla hızla gelişerek kısa bir yüzme periyodundan sonra yerleşerek gelişimlerini devam ettirirler (Groppelli vd., 2003). Ascidiacea sınıfı türleri sualtında kayalık substratlarda, mercan yığınlarında, gemi gövdelerinde, iskele direkleri üzerinde, borular içerisinde, deniz otları ve algere bağlı olarak ya da kumlu veya çamurlu zeminlerde serbest bir şekilde büyürler (Aslan, 2006; Kimura ve Itoh, 2007; Lemaire ve Piette, 2015). Yetişkin tunikatlar süzücü beslenmektedirler. Besinlerini deniz suyunu filtre ederek alırlar (Ha vd., 2013; Franchi ve Ballarin, 2017).

Soliter formlarda üreme genelde gametler ile olurken, koloni formlarda ise tomurcuklanma ile olmaktadır (Dinçaslan ve Öber, 2005). Ascidiacea sınıfı bireylerin embriyoları döllenmeden 18 saat sonra yumurtadan çıkarlar ve çok hızlı bir şekilde, bir

alt tabakaya yerleşmeden önce 24-48 saat içinde yüzen larvalara gelişirler, ardından omurgasız bir vücut planı sergileyen sesil genç bireylere dönüşürler (Lemaire, 2009; Sasakura, Mita, Ogura ve Horie, 2012). Soliter formlarda meydana gelen larva kendini sert bir zemine tespit ederek gelişimini burada tamamlamaktadır (Dinçaslan ve Öber, 2005). En zararlı istilacı türler olan vazo (*C. intestinalis*) ve club (*S. clava*) tunikatlar çok hızlı büyüyerek 10 haftada üreme olgunluğuna erişirler ve 10.000'den fazla yumurta bırakarak çoğalabilirler (Dunlop vd., 2018). Yüksek üreme oranları nedeniyle buldukları bölgeye hızla yayılarak yerel türlerin yaşam alanlarını istila ederler. Böylece biyoçeşitlilik için tehdit oluştururlar. Dunlop vd. (2018), istilacı tunikatların nanokristalin selüloz (NCC) kaynağı olarak kullanılabileceğini ve bu zararlı organizmalardan elde edilecek nanokristalin selülozun biyoekonomiye kazandırılabilceğini öne sürmektedir.

Tunikatlar, yüksek üreme oranlarına sahip olmaları ve toksik maddelere karşı yüksek tolerans göstermeleri nedeniyle başarılı rekabetçilerdir. Stres oranına bağlı olarak azalan diğer türlerin yerini strese dayanabilen türler almakta ve hızla uyum göstererek çoğalmaktadırlar (Aslan, 2006). İstilacı tunikat türü *Diplosoma similis*'in mercanlar üzerinde aşırı büyüyerek % 50 oranında ölümle sonuçlanan bir salgına yol açtığı rapor edilmiştir (Vargas-Ángel, Godwin, Asher ve Brainard, 2009). Ayrıca, tunikatlar, büyümek ve yumurtlamak için midye kabuklarına gereksinim duyduklarından, bu durum midye verimini olumsuz etkilemektedir (Dunlop vd., 2018). Ascidia'lar, primer makrofoulingi oluştururlar ve su içine batmış tüm yapay substratlara zarar verirler. Bu canlıların en yaygın bilinen zararları metalik yüzeylerde korozyona yol açmalarıdır (Aslan, 2006). Sapsız sesil yetişkinler ve serbest yüzen larvalar tekne gövdeleri, balast suları ve yetiştiricilik yoluyla yeni alanlara taşınabilir ve nesil sürelerinin hızlı olmasından dolayı orada istalalara yol açabilirler. Bu nedenle, Ascidia'lar güçlü biyolojik kirleticiler ve etkili istilacılar olarak bilinirler (Vandepas vd., 2015). Bunların dışında Ascidian türleri (*H. roretzi*, *Pyura michaelseni*) Kore gibi ülkelerde kültüre alınarak yetiştirilmekte ve bunların işlenmeden kalan ve atık malzeme olarak denize boşaltılan tunikleri kıyı ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (Oh, Kim ve Heu, 1997; Koo, vd., 2002; Ali ve Tamilselvi, 2016).

Son 40 yılda 1000'den fazla bileşik tunikatlardan izole edilmiştir (Dumollard, Gazo, Gomes, Besnardeau ve McDougall, 2017). Bunlar arasında selüloz, kalsit,

kalsiyum karbonat, kondroitin sülfat, peptidler, alkaloidler, terpenler gibi biyomateryaller bulunmaktadır (Ha vd., 2013; Saha, Yadav ve Rajendran, 2014). *Ascidia* sınıfı tunikatlardan elde edilen bileşiklerin/metabolitlerin, hücre kültürlerinde ve test hayvanlarında antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuar ve antitümör aktivitelerine sahip olduğu ve antitümör ajanlar olarak klinik deneylere giren üç bileşik (Didemnün B, Ecteinascidin 743 ve Aplidin) bulunduğu bildirilmiştir (Bertanha vd., 2014; Dumollard vd., 2017). Bugni, Harper, McCulloch, Reppart ve Ireland (2008), tunikat *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilen ilk antikanser ajanı Trabectedin®'in PharmaMar tarafından pazarlandığını ve Aplidin® olarak adlandırılan ve başka bir tunikat türünden elde edilen antikanser ajanının faz II klinik denemelerinin yapıldığını rapor etmiştir. Dumollard vd. (2017), *Ascidia* biliminin mavi biyoteknoloji çağına girdiğini ve tunikat moleküllerini saflaştırma, karakterize etme ve değerlendirme girişimlerinin başarılı bir şekilde devam ettiğini bildirmiştir. Son olarak, Ramesh vd. (2021), çeşitli tunikat türleri ve ilişkili oldukları mikroorganizmalardan elde edilen toplam 72 farklı biyoaktif bileşiği listelemiş ve bu bileşiklerin antikanser, antitümör, sitotoksik aktivite, antibiofilm, antibakteriyel aktivite, Farnesoid X reseptör antagonisti, antiparazitik, antimikrobiyal, antifungal, antiviral, Protein tirozin fosfataz 1B inhibisyonu, antifouling, plasma stabilitesi, bağırsak yenilenmesi, anti-inflamatuar ve antimetabolik aktivite, antiproliferatif, Matrix metalloproteinaz 2 inhibitörü, caydırıcı aktivite, hemolitik aktivite, nöroaktif, anti-retroviral, anti-HIV ilaç gibi biyoaktivitelerinin araştırıldığını belirtmiştir.

Tunikatlar, selüloz sentezleyebilen tek hayvan grubudur (Trache vd., 2017). Tunığın kuru ağırlığa göre yaklaşık % 60 selüloz içerdiği bildirilmiştir (Zhao ve Li, 2014; Trache vd., 2017). Tunikat sınıfının üyelerinin tip I selüloz mikrofibrilleri ürettiği gösterilmiştir (Kimura vd., 2001). *Ascidia*'larda selüloz epidermiste sentezlenir ve tunik olarak bilinen koruyucu bir kaplamaya dahil edilir (Matthysse vd., 2004). Tunikatların tunikleri, sülfatlanmış polisakkaritler ve lipidlerle yapıştırılmış selüloz-protein fibrilinden yapılmıştır (Zhao ve Li, 2016).

Selülozun tüm tunikatlarda görülmesi, tunikat soyunda selüloz biyosentez yeteneğinin kökeninin çok eskiye dayandığını ve selüloz sentezleme yeteneğinin tunikatların yayılımını destekleyen önemli bir olay olabileceğini düşündürmektedir (Matthysse vd., 2004). Tunikatların selüloz sentezleme yeteneği kazanmaları üzerine

olası senaryolar, ya ürokordatların bağımsız olarak selüloz biyosentez yeteneğini geliştirdiği ya da tunikatların selüloz sentezleme yeteneğini başka bir organizmadan yatay gen transferi yoluyla elde ettikleri yönündedir (Matthysse vd., 2004). *Ascidia* türü *C. intestinalis*' in genom dizilerinde selüloz sentaz benzeri bir gen tanımlanmıştır (Matthysse vd., 2004). Selüloz sentaz (CesA) gen ürünleri, tüm tuniklerin filtre beslenme yapılarında bulunur ve ayrıca *Ascidia* cinsi *Ciona*' daki metamorfozu düzenler (Sagane vd., 2010). Matthysse vd. (2004), diğer tüm metazoan gruplarında selüloz biyosentezinin olmaması ve inceledikleri tunikat türü *Ciona savignyi*'nin selüloz sentazının selüloz üreten organizmalardan gelen enzimlere benzerlik göstermesi nedeniyle, ürokordatların selüloz biyosentetik yolunu yatay gen transferi yoluyla edindiği hipotezini öne sürmektedirler. Iannelli, Griggio, Pesole ve Gissi (2007)'de aşırı plastisiteye sahip iki farklı tunikat cinsi *Phallusia* ve *Ciona*'da kararsız bir mitokondrial genomik pozisyonu gösteren tRNA genlerinin yanısıra, gen düzeni yeniden düzenlemelerinin yüksek sıklıkla görüldüğünü belirtmişlerdir. Iannelli vd. (2007), *Ascidia*'larda hem yüksek taksonomik düzeyde hem de aynı cins içinde majör gen yeniden düzenlemelerinin sık meydana gelmesi nedeniyle, *Ascidia*'ların gen yeniden düzenleme mekanizmalarını incelemek için mükemmel bir model organizma grubu olduğunu belirtmiştir. Ocean Bergen (2020)'de tunikatlardaki selüloz üretiminin nedeninin prokaryotlardan selüloz sentazın lateral gen transferi yoluyla aktarılması olduğunu öne sürmektedir.

Hassanzadeh (2011), tunikatlarda selüloz üretiminden tunik epidermal hücre plazma zarı, tunik damarlardaki kan hücreleri, vücudun mekanik olarak desteklenmesi amacıyla sifonlarda bulunan tunik kordonu gibi yapıların sorumlu olabileceğini öne sürmüştür. Zhao ve Li (2014) ise tunikat selülozunun, epidermisin zarında selüloz sentezleyen enzim kompleksleri tarafından farklı ve tam olarak anlaşılmayan mekanizmalar yoluyla üretildiğini ve farklı tunikat ailelerinde ve türlerinde farklı işlevler yerine getirerek farklı yapısal özellikler sergilediğini ifade etmiştir.

Özellikle son zamanlarda artan küresel ısınma okyanus ısınmasını hızlandırmakta ve istilacı türlerdeki artışı tetiklemektedir (Ramesh vd., 2021). Bu istilacı türlerin kontrol altına alınabilmesi veya sürdürülebilir biyomalzeme ve biyoaktif bileşik kaynağı olarak değerlendirilebilmesi önem arz etmektedir.

2.2. Türkiye Denizlerinde Yapılan Çalışmalar

Akdeniz orijinli türlerin yaşam ortamlarından biri olan Türkiye denizlerinde, tunikatların yoğun dağılım gösterdiği alanlara rastlanmaktadır. Bölgesel olarak değişmekle birlikte bazı alanlarda soliter dağılım yoğunluğu seyrek olsa da belirli lokasyonlarda çok yoğun birey sayısı ve kolonisel fasiyeslerin bulunduğu rapor edilmiştir. Türkiye’de gerçekleştirilen tunikat bazlı araştırmaların daha çok türlerin dağılımsal, ekolojik ve biyolojik özelliklerine yoğunlaştığı bilinmektedir (Demir, 1952; Geldiay ve Kocataş, 1972; Uysal, 1976; Aslan, 2006; Cirik vd., 2007; Dinçaslan, Öber, Çamdal ve Sağıt, 2007; Aslan-Cihangir, Izquierdo Munoz, Pancucci Papadopoulou, Ramos Espla ve Can Yılmaz, 2011; Çınar vd., 2011; Çınar, 2016; Aydın-Önen, 2018; Miroğlu ve Yalçın, 2020). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, Türkiye kıyılarında dağılım gösteren tunikat türlerine ilişkin kontrol listelerinin yayınlandığı çalışmalar bulunmaktadır (Çınar, 2014). Çınar, Bilecenoğlu, Öztürk ve Can (2006), Türkiye'nin Levanten kıyılarından 3 istilacı tunikat türünün (*Phallusia nigra*, *Pyura momus* ve *Sympylegma brakenhielmi*) kaydını vermiştir. Çınar vd. (2020), Türkiye'yi çevreleyen dört denizdeki yabancı türlerin sayısı ve her bir denizde yerleşme başarılarını incelemiş ve bu kapsamda 8 tunikat türü bulunduğunu rapor etmiştir.

Ülkemizde tunikat biyoteknolojisi üzerine yapılan çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Bir çalışmada Ege Denizi tunikatları üzerinde histolojik analizler gerçekleştirildiği bilinmektedir (Dinçaslan ve Öber, 2010). Temiz, Öztürk ve Karahan (2019), Kuzey Doğu Akdeniz'deki *Botrylloides leachii*'nin filocoğrafik çözünürlüğünü mitokondriyal ve nükleer DNA belirteçleri (sitokrom oksidaz alt birimi I –COI ve histon H3) kullanarak incelemişlerdir. Çiftçi vd. (2020), yaptıkları çalışmada Gökçeada kıyılarından örneklenen *Microcosmus sabatieri* tunikat türünün antikanser aktivesini araştırmışlardır. Karahan, Öztürk, Temiz ve Blanchoud (2022), *Boronia anceps* kolonilerini toplamak, türlerini doğrulamak, laboratuarda üretmek ve kriyoseksiyonlarda histolojik boyama yapmak için protokoller sundukları bir kitap bölümü yazmışlardır.

2.3. *P. mammillata* (Cuvier, 1815)

Filum: Chordata

Subfilum: Tunicata

Sınıf: Ascidiacea

Takım: Phlebobranchia

Familya: Ascidiidae

Cins: *Phallusia*

Tür: *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815)

P. mammillata Ascidiidae familyasına ait, yaklaşık 20 cm kadar büyüeyebilen ve soliter yaşıyan bir tunikat türüdür. Tür selüloz içeren kalın bir tuniğe sahiptir (Ruppert, Fox ve Barnes, 2004). Tunik, düzensiz yuvarlak loblar veya tümseklerle kaplı, yarı saydam, mavimsi beyaz renktedir (Doris, 2020, Wikipedia, 2020). Kuzeydoğu Atlantik Okyanusu, Kuzey Denizi, İngiliz Kanalı ve Akdeniz'de yayılış göstermekle birlikte, deniz ve okyanuslar içerisinde kayalık, kumlu veya çamurlu yüzeylerde yaklaşık 200 m derinliğe kadar dağılım göstermektedir (Doris, 2020, Wikipedia, 2020). Türkiye'de ise Marmara Denizi, Ege Denizi ve Akdeniz'in doğu kıyılarında, 0-50 m arasında, yumuşak zeminde buldukları rapor edilmiştir (Çınar, 2014). Hayvan, gelen deniz suyundan filtre ettiği planktonik partikülleri süzerek beslenir (Ruppert vd., 2004). Hermafroditir. Ekshalent sifonu ile yumurtalar serbest bırakılır ve su kolonunda dış döllenme gerçekleşir. Yumurtalar, birkaç gün içinde deniz tabanına yerleşen ve yavrulara dönüşen serbest yüzen, larvalara dönüşürler (Berrill, 1930, Wikipedia, 2020).

P. mammillata türüne ilişkin bugüne kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Groppelli vd. (2003), laboratuvar koşullarında silisli ve karbonlu taşlar kullanarak *P. mammillata*'nın yerleşiminde alt tabakanın mineral içeriğinin oynadığı rolü araştırılmıştır.

Iannelli vd. (2007), Ascidiacea'deki mitokondriyal genomun evrimsel dinamiklerini anlamak için, iki türdeş *Ascidia* türü *P. mammillata* ve *Phallusia fumigata*'nın tam mitokondriyal genomunu sıralamış ve karakterize etmişlerdir. Yazarlar aşırı plastisiteye sahip *Phallusia* ve *Ciona* cinslerinde kararsız bir mitokondriyal genomik

pozisyonu gösteren tRNA genlerinin yanısıra, gen düzeni yeniden düzenlemelerinin yüksek sıklıkla görüldüğünü belirtmişlerdir.

Ueki vd. (2002), *P. mammillata*'nın dondurularak kurutulmuş ve ıslak yaşayan örneklerinde, taşlı yüzük hücrelerinde ve vakuollü amebositlerde lokalize Vanadyum birikimini tarama röntgen mikroskobu ile görselleştirmiştir.

Yasuo ve McDougall (2018, s. 15-24), yumurta ve embriyolarının optik şeffaflığı ve yumurtalara eksojen olarak eklenen mRNA'nın etkili translasyonu gibi benzersiz özellikleri nedeniyle *P. mammillata*'nın floresan protein (FP) tabanlı görüntüleme çalışmaları için uygun bir model organizma olabileceğini belirtmiştir.

McDougall, Hebras, Gomes ve Dumollard (2020, s. 217-230) *P. mammillata*'da sinir kordonunun gelişimini incelemek için CRISPR-Cas9 gen düzenleme tekniğini uygulamak için çalışmalar yapmışlardır.

Karşılaştırmalı genomik ve evrimsel gelişim için model olarak yaygın olarak kullanılan türlerden biri de *P. mammillata*'dır (Delsuc vd., 2018).

2.4. Selüloz

Selüloz yeryüzünde en bol bulunan biyolojik polimerdir ve birçok farklı kaynaktan elde edilebilmektedir. Bitkiler (Trilokesh ve Uppuluri, 2019; Rasheed, Jawaid, Karim ve Abdullah, 2020), algler (Habibi vd., 2010), bakteriler (Gündüz, Aşık, Aydemir ve Kılıç, 2015; Güzel ve Akpınar, 2017), amip (Thomas vd., 2018), tunikatlar (Koo vd., 2002; Zhao ve Li, 2014) dahil olmak üzere birçok yenilenebilir selüloz kaynağı vardır. Selüloz ayrıca sümüksü küfler tarafından da sentezlenmektedir (Delmer, 1999).

Selüloz sürdürülebilir ve yenilenebilir bir biyomalzeme olduğundan çevre dostudur (Moon vd., 2021). Selüloz, karbon bazlı malzemelerden farklı olarak, biyoyumlu ve biyo-güvenli olması sebebiyle genel mühendislik malzemeleri arasında avantaj sunmaktadır (Endes vd., 2016; Ong, Shatkin, Nelson, Ede ve Retsina, 2017). Biyoyumlu ve biyobozunur oluşu onun biyomedikal, enerji, çevre ve su ile ilgili çeşitli uygulamalarda kullanılmasına olanak vermektedir (Mondal, 2017). Biyolojik ayırma, hücre süspansiyon kültürü ve atık su arıtımı için bir adsorban olarak uygulanan selüloz, bunların dışında yara iyileşmesi, kemik-kıkırdak rejenerasyonu, dişçilik uygulamaları,

enzim immobilizasyonu ve kanser tedavisi gibi biyomedikal uygulamalarda ve nanoselüloz da lokal ilaç dağıtım sistemlerinin bileşeni olarak önemli bir potansiyele sahiptir (Ha vd., 2013; Halib vd., 2017).

Nanoselülozlar ilk olarak 1951'de Bengt Rånby tarafından sulu koloidal solüsyonlarda miseller oluşturan selüloz molekülleri demetleri olarak tanımlanmıştır (Rånby, 1951; Rasheed, Jawaaid, Karim ve Abdullah, 2020). En az bir boyutu açısından 100 nm'den küçük olan selüloz parçacıkları nanoselüloz olarak kabul edilmektedir (Trache vd., 2017; Zhu, Zhou, Liu, Sun ve Wang, 2021). Selüloz nanokristalleri (CNC), selüloz nanofibrilleri (CNF) ve bakteriyel selüloz (BC) olmak üzere üç farklı nanoselüloz türü vardır (Guisse ve Fanguero, 2016). Selüloz nanokristaller ve selüloz nanofibriller pamuk, buğday samanı, keten, kenevir, patates yumru, şeker pancarı, dut kabuğu, rami, yosun ve tunikatlardan elde edilmektedir. Nanoselüloz üretimi için en sık araştırılan tunikat türleri *C. intestinalis* (Zhao, Zhang, Lindström ve Li, 2015), *Ascidia sp.* (Zhao ve Li, 2014), *H. roretzi* (Yuan, Nishiyama, Wada ve Kuga, 2006), *M. uedai* (Moon vd., 2011), *S. plicata* (Zhao ve Li, 2014) ve *H. papillosa* (Helbert, Nishiyama, Okana ve Sugiyama, 1998) iken, bakteriyel nanoselüloz üretiminde en yaygın kullanılan bakteri türü gram (-) *Gluconacetobacter xylinus*'tur (Siro ve Plackett, 2010).

Selüloz nanomalzemeler biyoyoumlu, biyobozunur, yenilenebilir, sitotoksisite göstermeyen ve mükemmel mekanik özelliklere sahip olan biyomalzemeler olarak bilinmektedir (Clarkson vd., 2020, Zhu vd., 2021). Bunların dışında nanoselüloz özel morfoloji ve geometrik boyutlar, kristallik, yüksek özgül yüzey alanı, reolojik özellikler, sıvı kristal davranış, hizalama ve yönelim, mekanik güçlendirme, bariyer özellikleri, yüzey kimyasal reaktivitesi, gibi geleneksel malzemelerden farklı özelliklere sahiptir (Lin ve Dufresne, 2014). Yüksek mukavemetli kompozitlerin bağlanması ve güçlendirilmesinde nanoselülozun önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Le, 2015). Biyokompozitlerde arzu edilen düşük ağırlık, yüksek mukavemet, yüksek sertlik ve tercih edilen termal direnç gibi mekanik özelliklerin nanoselüloz sayesinde sağlanabilmesi (Moon vd., 2011) ve ayrıca nanoselülozun biyolojik olarak parçalanabilir, yenilenebilir ve karbon nötr olması bu malzemenin benzersiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Besbes, Villar ve Boufi, 2011; Moon vd., 2011; Peng, Dhar, Liu ve Tam, 2011; Sim, Ryu ve Youn, 2013; Lagerwall vd., 2014; Sim, Youn ve Ahn, 2014).

Doğal kaynaklardan üretilen nanoselülozun uygulamaları arasında şeffaf filmler, antimikrobiyal filmler, bariyer filmler, esnek ekranlar, farklı polimerler için ilave dolgu maddeleri, elyaflar ve tekstiller, elektronik bileşenler için şablonlar, ayırma membranları, piller, süper kapasitörler, elektroaktif gibi uygulamalarda kullanılabileceği rapor edilmektedir (Moon vd., 2011; Zhao ve Li, 2014). Bunların yanısıra, selüloz nanomalzemelerden üretilen nanokompozitler de biyomedikal malzemeler, akıllı malzemeler, paketleme malzemeleri ve enerji depolama malzemelerinin üretiminde kullanılmaktadır (Mu vd., 2019; Zhu vd., 2021). Biyomedikal alanda, nanoselüloz özellikle doku mühendisliği, 3D hücre kültürü, ilaç dağıtımı, kırık replasmanları, kardiyovasküler uygulamalar, yara sargıları ve tıbbi implantlar, hidrojeller, tanı cihazları ve ayırma gibi biyomedikal uygulamalar için kolaylıkla uygulanabilir, düşük maliyetli ve işlemesi kolay bir biyomateryaldir (Guisse ve Fanguero, 2016; Curvello, Raghuvanshi ve Garnier, 2019). Nanoselüloz, gözenekli bir ağ yapısı sağladığı için antibiyotiklerin veya diğer ilaçların yaraya transferi için kullanılabileceği belirtilmiştir (Andresen vd., 2007; Lin ve Dufresne, 2014). Nanoselüloz bazlı yara sargılarına ait bazı örnekler olan Bioprocess®, Biofill®, XCell® ve Nanoskin®, bakteriyel selülozdan üretilmiştir (De Olyveira, Manzine Costa, Basmaji ve Xavier Filho, 2011; Petersen ve Gatenholm, 2011).

Tuniklerden ekstrakte edilen selüloz nanofiberler, saf bileşimlerinin yanı sıra yüksek derecede kristallik ve sertlikleriyle öne çıkmaktadır (Zhao ve Li, 2014; Zhao vd., 2015). Tunik selülozlar neredeyse saf selüloz I- β allomorfundan oluşurken, ahşap selüloz sadece ~ %30 I- α tipi kristallerle lignin veya ksiloz içerir (Zhao vd., 2017). Tunik selülozunun asit muamelesi ile aşırı uzun nanolifler (~20 nm genişlik ve mm veya cm uzunlukta) elde edildiği ve bu nedenle tunik selüloz nanokristallerinin kristal selüloz nanofiberler olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir (Zhao vd., 2017; Dunlop vd., 2018; Moon vd., 2021). Kristalli selüloz nanomalzemeler, yapısal olarak esnek olmalarının yanısıra, aynı zamanda glikozidik polimerik omurgalar ve kristal kafesler boyunca içsel hidroksil grupları arasındaki benzersiz molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları nedeniyle de güçlüdür (Rol, Belgacem, Gandini ve Bras, 2019). Nanokristalin selüloz optik şeffaflık, düşük termal genleşme, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük toksisite ve düşük maliyet gibi birçok benzersiz özelliğe sahip olduğu ve bu eşsiz özellikleri sayesinde bariyer filmlerde, fotonik kristallerde, şekil hafızalı polimerlerde, ışıkla iyileşebilen malzemelerde, ilaç salınımı gibi çok çeşitli

uygulamalarda kullanım olanağı bulunduğu rapor edilmektedir (Endes vd., 2016; Dunlop vd., 2018; Thomas vd., 2018; Garces vd., 2020).

Tunikatlardan elde edilen nanokristalin selülozun biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, geniş özgül yüzey alanı, yüksek kristallik, iyi termal stabilite, optik şeffaflık ve anizotropi, düşük maliyet, yüksek gerilme mukavemeti, esneklik, düşük yoğunluk ve uyarlanabilir yüzey kimyası gibi çekici fizikokimyasal özellikler sunduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Habibi vd., 2010; Dufresne, 2012; Lagerwall vd., 2014; Ng vd., 2015; Tang vd., 2015; Oun ve Rhim, 2016; Trache vd., 2017). Diğer çalışmalarda ise tunikat selülozunun izole edildiği türe ve hazırlama işlemlerine bağlı olarak farklı kimyasal ve morfolojik yapılar sergilediği ve malzeme uygulamalarında kullanılabilen mükemmel biyomalzemeler olduğu rapor edilmektedir (Zhao ve Li, 2014; Trache vd., 2017; Zhao vd., 2017). Tunikat türleri Doğu Asya'da yüksek değerli gıdalar olarak kültüre alınıp üretilmektedir. Kore'de tunikat türü *H. roretzi*'nin üretimini yıllık 25.000 tondan fazla olduğu (Heo, Lee ve Kim, 2018) ve tunikatların gıda olarak tüketimi sonrası tuniklerin genellikle atıl olarak kaldığı bildirilmiştir (George ve Sabapathi, 2015). İşleme sonrası atıl kalan tunikat tuniklerinin kristalin selüloz nanofiberlerine dönüştürülerek biyoteknolojiye kazandırılabilen önerilmektedir (Moon vd., 2021).

2.5. Tunikat Selülozunun Uygulamalarına İlişkin Literatür Taraması

Khandelwal ve Windle (2013), tunik selüloz ve bakteriyel selülozdan türetilen selüloz nano bıyıkların kendi kendine montaj ve izotropik ila sıvı kristal faz geçiş diyagramlarını rapor etmişlerdir. Çalışmada izotropikten sıvı kristale faz geçişi için faz geçiş diyagramı, tüm bu kaynaklardan elde edilen selüloz nanobıyıkları için faz ayırma davranışı ve polarize optik mikroskopi (POM) kaydedilerek geliştirilmiştir. İzotropik fazdan sıvı kristal faza geçişin, süspansiyonlardaki nano-bıyıkların en-boy oranlarına bağlı olduğu bulunmuştur. En yüksek oranlı nanobıyıklara sahip bakteriyel selüloz nanobıyık süspansiyonu, en düşük konsantrasyonlarda faz geçişine maruz kalmıştır.

Zhao vd. (2015), tunikat *C. intestinalis*'ten elde edilen selülozdan, enzimatik hidroliz (ECN), TEMPO aracılı oksidasyon (TCN) ve asit hidroliz (ACN) yöntemleriyle kimyasal ve morfolojik yapılar açısından üç farklı selüloz nanokristalini (CN'ler)

üretmişlerdir. Bu selüloz nanokristalleri film hazırlamak için tek başlarına kullanmışlar veya konjac veya ladinden elde edilen glukomannan (GM) ile karıştırılmışlar. CN-GM nanokompozit filmlerinde her iki bileşen de birbirleriyle güçlü bir şekilde etkileşime girerek güçlendirilmiş bir ağ oluşturmuştur. Kompozit filmler, yüksek çekme mukavemeti ve Young modülü ile mükemmel mekanik özellikler göstermiştir. Filmler ayrıca iyi bir optik şeffaflık ve termal kararlılık sergilemişlerdir. Yazarlar bu polimerik filmlerin, gıda veya ilaç endüstrilerinde biyolojik olarak parçalanamayan filmlerin yerini alabileceğini öne sürmektedir.

Cheng, Ye, Chang ve Zhang (2017), tunikat selülozundan vakum destekli yöntemle süper hidrofilik ve su altı süper oleofobik nano gözenekli selüloz membranlar üretmişlerdir. Tunikat selüloz nanokristal membranları hem su içinde yağ hem de yağ içinde su emülsiyonlarını ayırabilme yeteneği sergilemiştir. Ayrıca, selüloz membranlar, yüksek su akışı, mükemmel mekanik mukavemet, döngü performansı, sıcaklık ve pH direnci sergilemişlerdir. Yazarlar, tunikat selüloz membranların kalınlığı, gözenek boyutu, su akışı ve yağ reddinin, selüloz miktarının ayarlanmasıyla kontrol edilebileceğini belirtmektedirler.

Cao, Yuan, Fu ve Chen (2018), tunik selüloz nanokristallerini iki farklı yaklaşımla doğal kauçuk ile karıştırmışlardır. Daha sonra elde edilen kompozitin ara yüzey etkileşimi, termal performans, morfoloji, mekanik özellikler ve su şişme davranışını incelemişlerdir. Selüloz içeriğinin artmasına bağlı olarak hem nanokompozitlerde oluşan hidrojen bağlarında hem de mekanik özelliklerde iyileşme gözlenmiştir. Tek kap yöntemi ile oluşturulan kompozitlerin çekme mukavemeti, çekme modülü ve kauçuksu depolama modülünde %20,50 ve 85' lik artış elde edilmiştir. Ayrıca, su geçirgenliğini azaltan gelişmiş arayüzey etkileşimi nedeniyle kompozitin su alımının azaldığı gözlenmiştir.

Huang, Zhan, Lia, Tian ve Chang, (2019), yağ/su emülsiyonlarını ayırmak için tunikat selüloz nanokristalleri (TCNC) hem fiziksel (hidrojen bağı oluşumu yoluyla) hem de kimyasal stratejilerle (hidroksil gruplarının epiklorohidrin ile çapraz bağlanmasıyla) ticari filtre kağıdına kaplayarak yeni filtre kağıtları hazırlamışlardır. TCNC ile modifiye edilmiş filtre kağıtlarının, çeşitli yağ/su karışımlarını ve emülsiyonu verimli bir şekilde ayırabilen nanogözenekli yapı ve süperhidrofilik/sualtı süperolefobiklik sergilediği gözlenmiştir. Fiziksel olarak değiştirilmiş filtre kağıtları ile karşılaştırıldığında, kimyasal

olarak TCNC ile değiştirilmiş filtre kağıtlarının, yağ/ su karışımlarının ayrılmasında daha yüksek verimlilik ve daha iyi aşınma önleyici stabilite gösterdiği rapor edilmiştir. Yazarlar, tunikat selülozun yağ/su ayrımı için ticari filtre kağıtlarının özelliklerini geliştirmede kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Cheng vd. (2020), tunik selüloz, alfa-selüloz ve amorf selüloz gibi farklı selüloz türlerinin enzimatik hidroliz ve anti-biyodegradasyon özelliklerini incelemişlerdir. Selülozların selülaz enzimi ile enzimatik hidrolizinden sonra, tunik selülozun kristal yapısının enzimlerin saldırısını önlemek için fiziksel bir bariyer oluşturduğu ve 96 saatlik hidrolizden sonra kristal kafesinin sağlam olduğu bulunmuştur. Yazarlar, tunik selülozun yüksek oranda kristalize edilmiş I kafesi sayesinde yüksek küf önleyici özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tunik selülozun enzimatik hidrolize karşı önemli bir dirence sahip olması ve mikroorganizmalara karşı mükemmel direnci nedeniyle, yenilenebilir ve biyolojik bozunmayı önleyici malzemeler olarak kullanım potansiyeline dikkat çekmişlerdir.

Hu vd. (2020), tunik selüloz nanokristallerinin (TCNC'ler) polimerik ağlarda kilittendiği, ultra yüksek mukavemetli yüksek derecede düzenli nanokompozit hidrojeller üretmişlerdir. Elde edilen hidrojeller, ön gerdirme yönü boyunca ultra yüksek gerilme mukavemeti, elastik modül ve tokluk sergilemiştir. Hem çok işlevli çapraz bağlama ajanları hem de çift fiziksel çapraz bağlı ağların arayüzey uyumlu takviyeleri olarak hizalanmış TCNC'ler, nanokompozit hidrojelin mükemmel mekanik performansına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Oldukça düzenli bir mimariye ve olağanüstü mekanik performansa sahip bu hidrojeller, bağlar ve tendonlar gibi yapay biyomalzemeler olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

Wang vd. (2020), β -FeOOH@tunikat selüloz nanokompozit hidrojelleri sentezlemişler ve fotokatalitik özelliklerini incelemişlerdir. Tunik selüloz hidrojelleri β -FeOOH nanopartikülleri düzgün bir şekilde dağıtıp sıkıca hareketsiz kılmasının yanısıra sürekli akışlı fotokatalitik sistem için yapısal malzemeler olarak işlev görmüştür. Metilen mavisinin (MB) β -FeOOH/selüloz nanokompozit hidrojelleri üzerinde fotokatalitik bozunması, görünür ışık ışması altında 30 dakikada % 99,89' a ulaşmış ve 8 saat boyunca işlemden sonra ~ % 98 kadar yüksek tutulmuştur, bu da MB'nin yüksek verimli bir fotodegradasyonunu göstermiştir. Bu çalışma, organik boyaların tunikat selülozu

kullanılarak fotokatalitik bozunması için önemli bir bilgi sağlamasının yanısıra tunikat selülozun uygulama alanını da genişletmiştir.

Wang, Cheng, Feng, Zhang ve Chang (2021), dayanıklı yapılı renklere sahip selüloz nanokristal (CNC) bazlı duyarlı optik malzemelerin geliştirilmesine yönelik çalışma yapmışlardır. Yazarlar, tunik selüloz nanokristallerin (TCNC'ler) yönlü olarak kesilmesi ve sonra hizalanmış TCNC'lerin poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAM) ağlarına kilitlenmesiyle, tek tip girişim renkleri olan mekanik-termo-kromik hidrojel üretmişlerdir. Çalışma sonucunda, TCNC'lerin daha yüksek en boy oranı ve kristalliği nedeniyle, yanardönerlik çift kırılması daha düşük bir konsantrasyonda gözlenmiştir. Makul bir konsantrasyonda (ağırlıkça ~% 5) kayma yönelimli TCNC'ler, nanokompozit hidrojelini yalnızca tek tip girişim renkleri ile donatmış ve hidrojelinin mekanik özelliklerini geliştirmiştir. Yazarlar, bu çalışmayla, sensörler, çevresel izleme ve sahteciliğe karşı etiketler için TCNC tabanlı sürdürülebilir ve gerilebilir duyarlı optik cihazlar tasarlamaya yönelik yeni bir strateji sunduklarını belirtmiştir.

Xu vd. (2022), tunikten ağartma ve asit hidrolizi ile tunik selüloz nanokristalleri (tCNC) elde etmişler ve sonra bunu Sodyum aljinat (SA) bazlı enterik kapsüllerin hazırlanmasında dolgu maddesi olarak kullanmışlardır. Tunik selüloz nanokristalleri ve SA arasında hidrojen bağlarının oluşması nedeniyle, tCNC-SA kapsüllerinin mekanik özellikleri, su temas açısını ve opaklığı önemli ölçüde iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca, çalışma sonuçları tCNC-SA kapsüllerinin asidik koşullar altında (pH 1,2) zar zor parçalanırken, 6,8'lik bir pH'ta 15 dakikada parçalanabildiklerini göstermiştir. Bu da mükemmel pH duyarlılıklarını ortaya koymuştur. Yazarlar, hazırlanan tCNC-SA kompozitinin enterik kapsüller üretiminde ve tunikat CNC'lerin farmasötik malzeme üretiminde kullanılabileceğini önermişlerdir.

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çanakkale Boğazı ve Tunikat Yaşam Alanları Karakteristiği

Türk Boğazlar Sistemi'nin bir parçası olan Çanakkale Boğazı ülkemizin önemli balık göç yolu olmasının yanında, aynı zamanda da bentik omurgasız biyoçeşitliliğinin zengin olduğu bir bölge özelliğindedir. Boğaza giriş yapan Akdeniz kaynaklı tuzluluğu yüksek dip suları ile Karadeniz kaynaklı Marmara Denizi suları karışım ekosistemini temsil eden Çanakkale Boğazı'nda dip yaşamı tuzluluğa bağlı olarak gelişim göstermiştir. Marmara Denizi'ne 19-21 ppt aralığında giriş yapan Karadeniz kaynaklı suların tuzluluğu Çanakkale Boğazı'nda 22-25 ppt değerlerine ulaşır. Maksimum yüzey suları tuzluluğu Çanakkale Boğazı'ndan Ege Denizi girişine doğru 29,2 ppt'ye, dip suları ise 39 ppt değerlerine yaklaşır (38,89 ppt) (Beşiktepe vd., 1994). Çanakkale Boğazı, 74,1 km uzunluğunda, 1,3-7,5 km genişliğe sahip bir kanal özelliği göstermekte olup, en derin yeri Nara bölgesinde bulunur ve 113 m'dir. Çanakkale Boğazı'nın Ege Denizi çıkışında 60-70 m civarında olan ve belirgin olarak Akdeniz'in tuzlu sularını taşıyan derinlik katmanı, Marmara Denizi Tekirdağ zonu'na doğru 1100 metre maksimum derinliğe çıkar (Gökaşan vd., 2008). Dip bölgede kayalık, kumluk ve çakıl karışımı substratlar çevresinde denizel biyoçeşitliliği temsil eden sünger, mercan, tunikat, yosun hayvancık, çift kabuklu yumuşakçalar, poliket-serpulid fasiyesleri gibi denizel omurgasızlar ile koralijenler, denizel çiçekli bitkiler ve algler yaşam sürer. Bununla birlikte dip bölgenin zengin denizel yaşamına ve biyolojik çeşitliliğine balık, ıstakoz, ahtapot, böcek, karides veya kalamar gibi aktif hareket eden canlıların da katkısı yüksek olmaktadır (Özalp, 2013; Özalp ve Alparslan, 2016).

Çanakkale Boğazında daha çok kayalık ve poliket (serpulid) fasiyes alanların olduğu bölgelerde tunikat yoğunluğunun fazla olduğu bilinmektedir. Kumluk ve çakıllı bölgeler de yaşam sürdüğü raporlanmış olan tunikatların, fotosentetik alglerin yoğun olduğu sünger veya koralijen topluluklarının bulunduğu bazı alanlarda da özel dağılım karakteri gösterdiği bildirilmiştir (Özalp, 2013).

Çanakkale Boğazında yapılan tunikat özelindeki çalışmaların oldukça sınırlı olduğu belirtilebilir. Bugüne kadar incelenen boğaz istasyonlarında yeni tür kayıtları ile birlikte bazı türlerin dağılım ve yaşam ortamlarındaki ekolojik karakterlerine değinen çalışmalara rastlanmaktadır (Cirik vd., 2007; Özalp, Alparslan, Okudan-Aslan, Aysel ve Aysel, 2017).

3.1.1. Sualtı Araştırmaları Örneklemeye Çalışmaları

Analizlere uygun tunikat birey örnekleme süreci öncesinde Çanakkale Boğazı'nda gerçekleştirilen ön araştırmalarda, daha önceki yıllarda tespit edilen (Özalp, 2013) ve *P. mammillata*'nın dağılımlarının keşfedildiği 10 istasyon bölgesi incelenmiş ve türün en yoğun olduğu alanlar ve popülasyonların sağlık durumları gözlenmiştir. Bilimsel araştırma dalışlarının yapıldığı bu çalışmalarda 0-30 m derinlik zonunda Scuba; 30 m derinliklerin üzerindeki bölgelerde ise teknik dalış destekli Scuba ekipmanları kullanılmış ve dip bölgede kayalık, kumluk ve çamur substralardaki bireylerin ön ekolojik ve morfolojik incelemeleri ile dağılım durumları izlenmiştir. Bu çalışmalar sırasında bölgelerde 24 araştırma dalışı gerçekleştirilmiştir. Ön sualtı araştırmaları ve bölge karakter gözlem çalışmalarından sonra, tür bireylerinin en yoğun olduğu popülasyon bölgeleri belirlenmiş ve analizlere uygun örnekleme çalışmaları başlamıştır.

Bu teze konu olan tunikat türü *P. mammillata* (Cuvier, 1815)'ya ait örnekler Doç. Dr. H. Barış ÖZALP tarafından Çanakkale Boğazı'nda Nisan 2021 sualtı araştırmaları döneminde 30-38 m derinlik zonundaki açık suda yer alan kum-çamur ve algli substratlardan örneklenmiştir (Şekil 3.1). Araştırma sürecinde ayrıca Dardanos bölgesi infralittoral zonundan da (40°03'20,30"N ve 26°21'09,73"E) örnekleme gerçekleştirilmiştir. Bilimsel araştırma dalışları sürecinde doğal ortamdan örneklenen tunikat bireylerinin ayrıca sualtında fotoğraf ve video kayıtları alınmış ve dijital arşiv oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Su altında örneklenen bireyler canlı tarafından bırakılan

vücut sıvısı ve deniz suyu ile birlikte % 95 etanole alınarak hava temasını engelleyecek şekilde kavanozlanmış ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Teknolojileri Meslek Yüksekokulu Dardanos Sualtı Araştırma ve Uygulama Birimi Bilimsel Örnek Veri Toplama Alanı'na taşınmıştır. Örnekler daha sonra -16 derecede muhafaza edilerek incelenmek üzere Trakya Üniversitesi Keşan Meslek Yüksekokulu Analiz laboratuvarına aktarılmıştır. Tunikat türlerinin taksonomik analizlerinde Aydın ve Onen, (2018) ve Ulman, (2016) referanslarından yararlanılmıştır. Tür teşhisi Doç. Dr. H. Barış ÖZALP tarafından yapılmıştır.



Şekil 3.1. *P. mammillata* inceleme-gözlem istasyonları ve ön araştırmalar.



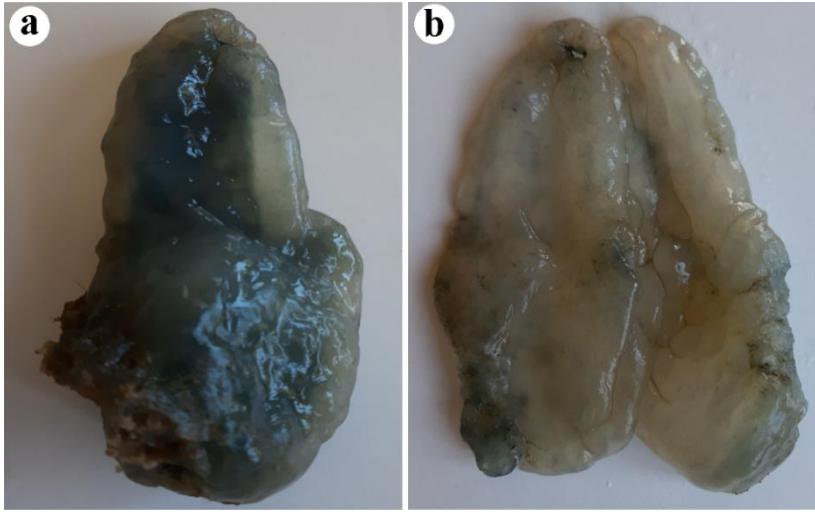
Şekil 3. 2. *P.mammillata*'nın Çanakkale Boğazı yaşam ortamları karakterinden bir görünüm (Kum-çamur substrat, 30-38 m) (© Özalp 2022).

3.2. Kimyasallar

Araştırmada kullandığımız Sülfürik asit (H_2SO_4) (Merc, Ürün kodu: 100731.2500), Sodyum sülfür (Na_2S) (Tekkim Kimya Sanayi Tic. Ltd. Şti., Ürün kodu: TK.201782), Sodyum hidroksit ($NaOH$) (Tekkim Kimya Sanayi Tic. Ltd. Şti., Ürün kodu: TK.170511), Sodyum hipoklorit ($NaClO$) (Volkan Temizlik Ürünleri San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.) ve aseton ($CH_3)_2CO$) (ISOLAB, Ürün Kodu: 901.027) ülkemizdeki ticari firmalardan temin edilmiştir.

3.3. Tunikat *P. mammillata*'dan Selüloz İzolasyonu

Tunikat bireyleri dondurularak muhafaza edildiği %95'lik etil alkol solüsyonundan alındı ve saf su ile yıkandı. Sonra boy ve ağırlıkları ölçüldü. Ardından hayvanların toprağa tutundukları kök kısımları kesilerek uzaklaştırıldı. Diseksiyon makası ile kesilerek iç organları çıkarıldı ve tunikler ayrıldı (Şekil 3.3). Tunikler saf suda yıkanarak temizlendikten sonra kurulandı ve yaş ağırlıkları tartıldı. Sonra fırında $50\text{ }^{\circ}C$ de 2 gün boyunca kurutuldu ve kuru ağırlıkları ölçüldü.

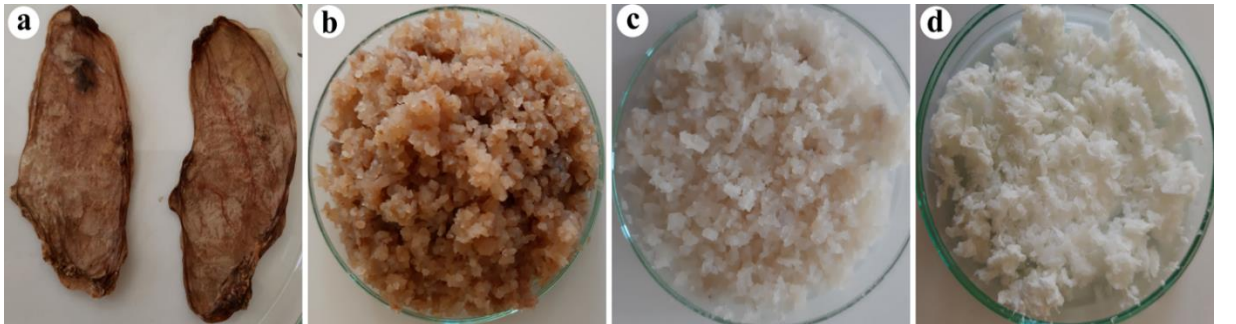


Şekil 3.3. *P. mammillata* etil alkolde korunmuş organizmanın a) genel görüntüsü ve b) tunik yapısı.

Tunikat *P. mammillata*'dan kristalin selüloz izolasyonu Koo vd., (2002); Zhao ve Li (2014) ve Dunlop vd. (2018) metotlarında bazı modifikasyonlar yapılarak prehidroliz-kraft pişirme-ağartma yöntemine göre gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Prehidroliz-kraft pişirme ağartma işlemleri serisi, lipitleri, sülfatlanmış mukopolisakkaritleri, glikanları,

proteinleri ve pigmentleri uzaklaştırmada etkili bir yöntem olup, kimyasal olarak saf selüloz elde edilmesini sağlamaktadır (Zhao ve Li, 2014).

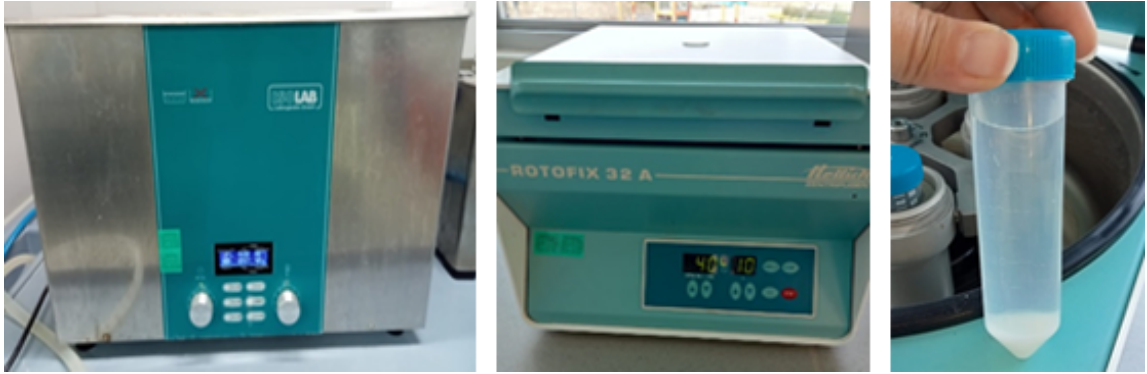
Kurutulmuş tunikat tunikleri öğütücüden geçirilerek toz haline getirildi. Total 15,73 g öğütülmüş kuru tunik ile izolasyona başlandı. İlk aşamada öğütülmüş tunikler %1'lik 250 mL H₂SO₄ çözeltisi ile 180 °C sıcaklıkta 2 saat 45 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda 700 rpm de karıştırılarak muamele edildi. Bu aşama ön hidroliz olarak adlandırılmaktadır. Hidroliz aşamasında lipidler, glikoz olmayan şeker, amorf selüloz ve kül ayrıştırılmaktadır (Dunlop vd., 2018). Sonrasında örnek pH nötr olana dek aseton/saf su (1:1, v/v) karışımı ile yıkanarak adi süzgeç kağıdından süzüldü. Çözünmeyen parçalar toplanarak 50 °C'de etüvde kurutuldu. Asit uygulamasından sonra kuru ağırlığı 4,70 g olarak ölçüldü. Ardından ikinci aşama olan "kraft pişirme" aşamasına geçildi. Kraft pişirme adımı protein ve glikoz olmayan şeker uzaklaştırılır (Dunlop vd., 2018). Bu aşamada 4,70 g kuru materyal 100 mL sulu NaOH/Na₂S (% 9/3) çözeltisi ile 180 °C'de 700 rpm de 2,5-3 saat boyunca karıştırılarak muamele edildi. Bu aşamadan sonra tekrar aseton: safsu karışımı ile pH nötr olana kadar yıkama ve süzme işlemleri gerçekleştirildi ve sonrasında süzüntü fırında 50 °C'de kurutuldu. Sonra yine kuru tartım alındı. Ağırlığı 2,71 g geldi. Tartımdan sonra üçüncü aşama olan ağartma aşamasına geçildi. Ağartma aşamasında örnek % 3'lük NaClO çözeltisi içinde 75 °C'de 1 saat boyunca muamele edildi. Ağartma işlemi sırasında ilave protein ve kromoforlar uzaklaştırılarak nihai selüloz elde edildi (Ma, Hsiao ve Chu, 2012). Sonrasında saf su ile yıkanarak süzüldü ve ardından 50 °C' de fırında kurutuldu. Böylece tunikat türünden selüloz elde edilmiş oldu. Sonra bu selüloz tartıldı ve ağırlığı kaydedildi. Selüloz miktarı 2,65 g geldi.



Şekil 3.4. Tunikat tuniğinden selüloz üretimi. a) kuru tunik, b) asit uygulaması sonrası, c) kraft cooking sonrası, d) beyazlatılmış selüloz.

3.3.1. *P. mammillata* Selülozundan Nanokristalin Selüloz Eldesi

Tunik selüloz nanokristalleri elde etmek için 2,037 g kuru tunikat selülozu ağırlıkça %70'lik 200 mL sülfürik asitte (H₂SO₄) manyetik karıştırıcıda 60 °C ve 700 rpm de 60 dakika süreyle karıştırılarak hidrolize edildi (Şekil 3.5). Ardından hidroliz işlemi durdurmak için 10 kat saf su eklenerek asit oranı seyreltilti. Daha sonra elde edilen sulu süspansiyon 10 dakika boyunca 4500 rpm de santrifüj edilerek asit ve su uzaklaştırıldı. Sonra çökeltiye saf su eklenerek yıkama işlemine devam edildi. Örneğin pH'sı nötr olana dek yıkama ve santrifüjleme tekrarlandı. Bu işlemden sonra nanokristalin selüloz içeren tortu sonikatör (WiseClean, Daihan Scientific, WUC-D06H 230 V, 60 Hz) ile 37 kHz'de 1 saat sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Sonra 10 dakika santrifüj (Rotofix 32A) edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından tortu tekrar 56 kHz'de 1 saat daha sonikasyon işlemine tabi tutuldu ve santrifüj edildi. Çökelti haldeki nanokristalin selüloz fırında 50 °C'de 12 saat kurutuldu. Asit hidrolizden sonra öğütme işlemine tabi tutuldu. Kurutulmuş nanokristalin selülozun son ağırlığı 1,400 g olarak ölçüldü.



Şekil 3.5. *P. mammillata*'dan selülozundan nanokristalin selüloz eldesi.

3.4. Tunikat Selüloz ve Nanokristalin Selülozun Karakterizasyonu

Tunikat *P. mammillata*'dan ekstrakte edilen nanoselülozun konformasyonel özelliklerini incelemek için polimer, mikroskobik (SEM) ve spektroskopik yöntemler (FTIR, NMR, TGA, XRD) kullanılarak karakterize edildi. Element kompozisyonu elementel analiz ile belirlendi. Ayrıca tunikat selülozünün su tutma kapasitesi ölçüldü.

3.4.1. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi, dipol momente sahip polar moleküllerin molekül içi bağları üzerine düşürülen kızılötesi ışınların soğurulmasına dayanan analitik bir yöntemdir. Moleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimleri nedeniyle meydana gelen yapısal değişiklikleri algılayarak moleküllerin yapısındaki bağların tanımlanmasını sağlar. Bu tekniğin, organik bileşiklerin yapısı ve kimyasal değişimleri hakkında hızlı bilgi elde etmek için çok kullanışlı bir araç olduğu rapor edilmiştir (Koo vd., 2002).

Bu çalışmada, FTIR spektroskopisi ile tunikat *P. mamillata*'dan elde edilen selüloz moleküllerindeki fonksiyonel gruplar tanımlanmış ve spektrumlarında selüloza özgü karakteristik piklerinin gözlenmesi ile izole edilen biyomateryalin selüloz olduğunu doğrulamıştır. FTIR spektrumları Perkin–Elmer marka ATR FT-IR (Model: Frontier FT-IR/FIR, Instrument Serial Number: 95029) cihaz ile 4000–450 cm^{-1} arasında değişen dalga boyunda 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte 10 taramada elde edilmiştir.

3.4.2. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

Nükleer Manyetik Rezonans doğal bileşiklerin, organik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında ve kimyasal özelliklerine ilişkin bilgi edinmede kullanılan spektroskopik bir analiz yöntemidir. Bileşiğin yapısındaki farklı fonksiyonel grupların ayırt edici sinyalleri sayesinde incelenen bileşiğin kimliğinin doğrulanmasında kullanılır. Atom çekirdeğinin manyetik karakterine bağlı olarak sıvı veya katı örneklerin yapısı, atomların bağlanma şekilleri ve molekül formülü hakkında bilgi vermektedir. NMR spektroskopisinin çalışma prensibi, kuvvetli bir manyetik alan içerisine yerleştirilen bir molekülün bazı atom çekirdeklerinin elektromanyetik ışınları absorblaması esasına dayanır.

Tunikat selülozunun içeriğini, saflığını ve moleküler yapısı NMR analiziyle belirlendi. Ölçümlerde Varian VNMRS 600 MHz cihazı kullanılmıştır. NMR deneylerinde çözücü olarak döteryumlu dimetil sülfoksit (DMSO-d₆) kullanılarak oda sıcaklığında kaydedildi. ¹H ve ¹³C NMR için 5 mm çok çekirdekli sıvı prob kullanılmıştır. ¹H ve ¹³C NMR deneyleri 90° sinyal genişliği kullanılarak alınmıştır.

3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

İncelenen numunenin topografik ve morfolojik yapısını ve boyutlarını ortaya koymak için kullanılan bir tekniktir. Yöntem, yüksek enerjili elektronların numune üzerine gönderilerek, elektron-numune etkileşmesi sonucu farklı açılarda saçılan elektronların detektör tarafından toplanması esasına dayanır. Böylece örnekteki mikro ve nano yapılar görüntülenebilmektedir. Ayrıca SEM cihazına bağlı EDX ataçmanı ile örneğin içerisindeki elementler belirlenerek haritalandırma tekniği ile elementlerin dağılımı gözlenebilmektedir.

Tunikat *P. mammillata*'dan izole edilen selüloz ve nanokristalin selülozun yüzey morfolojisi FEİ marka QUANTA FEG 250 model cihaz ile incelenmiş ve biyomateryal yüzeyindeki mikro fiber yapıların çeşitli büyütmelerde görüntüleri alınmıştır. Ayrıca cihaza bağlı EDS dedektörü ile tunikat selülozunun element dağılımı haritalandırılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu ile nanokristalin *P. mammillata* selülozunun kimyasal bileşimi ve numunenin dış morfolojisi belirlenmiştir.

3.4.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik (TG) analiz sıcaklığın sabit oranda ve programlı olarak artırılması veya azaltılması ile analiz edilen maddenin kütleinde meydana gelen değişimlerin zamana göre kaydedilmesi esasına dayanır. Bunun sonucunda sıcaklık artışına bağlı olarak kütlede meydana gelen değişim termogram veya termal bozunma eğrilerine dönüştürülür. Termogravimetrik analizde sıcaklık 25-1600 °C arasında tercih edilen sürelerde istenildiği kadar arttırılabilir. Bu teknik polimer maddelerin bozunma mekanizması hakkında bilgi verir.

Diferansiyel Termal Analiz (DTA) yöntemi ile polimerlerin erime, kaynama ve parçalanma sıcaklıkları tespit edilerek polimerik yapıda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişimler gözlenebilir. İncelenecek örnek ve termal açıdan inert referans maddeye aynı sıcaklığın uygulanması sonucu, örnekteki faz değişimi, kimyasal tepkime veya yapısal bir bozunma sonucu oluşan sıcaklık ile referans maddenin sıcaklıkları arasındaki diferansiyel termal fark kaydedilir ve DTA eğrisi oluşturulur.

P. mammillata'dan izole edilen selüloz ve nanokristalin selülozun termal dayanımı ve yapısındaki su ve kül içerikleri NETZSCH STA 449F3 cihazı ile 20/10,0 (K/min) ısıtma hızında 800° C'ye kadar ısıtılarak gerçekleştirildi. DTA analizinde 11,810 mg selüloz örneği 11,106 mg referans madde (Al₂O₃) ile test edildi.

3.4.5. X-Işını Kırınımı (XRD)

X-ışını kırınımı (XRD), tek kristal, poli kristal ve amorf malzemeleri analiz etmek için kullanılan hızlı bir analitik tekniktir. X-ışınları bir elektron demetinin maddeye çarpmasından doğar. Kendine özgü atomik dizilişlere sahip olan her bir kristalin faz, X-ışınlarını kendine özgü karakteristik bir düzen içerisinde kırar. Bu kırınım profilleri her bir kristalin faz için karakteristiktir ve o kristali tanımlar.

Tunikat *P. mammillata* türünden ekstrakte edilen selüloz ve nanokristalin selülozun X-ışını kırınım desenleri Bruker Smart Apex II Quazar marka, X-Işını Tek Kristal Kırınım cihazı (Bakır hedefli X-ışını tüpüne sahip, K α : 0.71073 Å) ile 40 kV, 40 mA değerinde radyasyon kaynağı ve APEX II CCD Dedektör kullanılarak görüntülendi. XRD pikleri 2 θ , 5°-45° tarama açısı ile ölçüldü. Referans kart numarası (JCPDS) 50-2241'dir. *P. mammillata* selülozunun kristalinitesini değerlendirmek için kristallik indeksi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Zhao ve Li, 2014):

$$CrI = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad \text{Denklem 3.1}$$

CrI= Kristalinite indeksi

I₂₀₀, kafes düzleminin 2 θ = 22,8°deki yoğunluğudur.

I_{am}, 2 θ = 18° deki amorf fazdan gelen yoğunluktur.

3.4.6. Elementel Analiz

Elementel analiz anorganik ve organik maddelerin yapısındaki Karbon (C), Hidrojen (H), Azot (N) ve Kükürt (S)'ün yüzde olarak tayin edildiği bir analizdir. Temel prensip 1 ila birkaç mg ağırlıktaki örneklerin yüksek sıcaklıklarda (800-1200 °C) yanması

esasına dayanır. Yanarak gaz haline gelen örnekler inert, taşıyıcı bir gaz (He) ile kromatografi kolonuna aktarılır ve kolonda oksijen (O₂) ile yakılır. Yanma sonucu karbon CO₂'ye dönüşürken, Hidrojen H₂O'ya Azot N₂'ye ve Kükürt SO₂ gazlarına dönüşmektedir. Oluşan bu gazlar özel tutucu kolonlarda tutulduktan sonra her birinin örnekteki miktarı termal iletkenlik dedektörü aracılığıyla belirlenmektedir. Her bir gazın miktarı ile orantılı olarak kaydedilen elektrik sinyalleri spektrumda elde edilen eğri alanlarıyla orantılı olarak örneğin elementel bileşiminin yüzdesini verir (Ak, 2022).

Tunikat *P. mammillata*'dan ekstrakte edilen nanoselülozun içeriğindeki C, H ve N elementlerinin yüzdeleri Thermo Finnigan marka, Flash 1112 Series EA model elementel analiz cihazıyla belirlenmiştir.

3.4.7. Su Tutma Kapasitesi (STK)

Önceden kurutulmuş *P. mammillata* selüloz örneği gece boyunca distile su içerisinde bekletildi. Ertesi gün 20 dakika boyunca 45° eğimli bir düzlemde bekletilerek fazla suyun süzülmesi sağlandı. Sonra örneklerin yaş ağırlıkları tartıldı ve örnekler etüvde 50 °C'de ağırlığı sabitleninceye kadar kurutuldu. Tunikat selülozunun su tutma kapasitesi Aşık (2016) tarafından açıklanan yöntemin modifiye edilerek kullanımına ve Shezad, Khan, Khan ve Park (2010)'un kullandığı aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$STK = \frac{\text{Selüloz yaş ağırlığı (g)} - \text{Selüloz kuru ağırlığı (g)}}{\text{Selüloz kuru ağırlığı (g)}} \times 100 \quad \text{Denklem 3.2}$$

STK= Su tutma kapasitesi

3.4.8. Selüloz Verimi (%)

P. mammillata tuniğinin selüloz içeriği, izolasyon öncesi kuru tunik ağırlığının ölçülmesi ve izolasyon sonrasında elde edilen selülozun kuru ağırlığının ölçülmesiyle belirlendi. Tunik selüloz verimi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\%W = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad \text{Denklem 3.3}$$

% W: Yüzde selüloz verimi

W1: İzolasyon öncesi kuru tunik ağırlığı

W2: İzolasyon sonrasında elde edilen selülozun kuru ağırlığı

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Kuru Ağırlık Selüloz Verimi

Tez çalışması kapsamında Çanakkale Boğazı'nda 30-38 m derinlik aralığından örneklenen 24 adet *P. mammillata* bireyine ait ölçümler Çizelge 4.1'de verilmektedir. *P. mammillata* örnekleri farklı büyüklüklerde papillalar taşıyan mavimsi beyaz, yarı şeffaf, yumuşak ve esnek bir tuniğe sahipti. Bireylerin boy ortalaması 10,12 cm olarak ölçülürken, ortalama kütleleri 54,19 g olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.1). *P. mammillata*'nın tunik kuru kütlesi yaş kütlelerinin % 4,45'i civarında iken, tunik su yüzdesi % 95,54 olarak hesaplanmıştır. Bir çalışmada, tunikat türleri *C. intestinalis*, *H. roretzi*, *Ascidia sp.* ve *S. plicata*'nın boy uzunlukları sırasıyla 13,3 cm, 12,7 cm, 7,5 cm ve 3,6 cm ve kütleleri sırasıyla 24,5 g, 70,4 g, 6,95 g ve 1,96 g olarak rapor edilmiş, ayrıca tunik su içeriklerinin %81-95 arasında değiştiği bildirilmiştir (Zhao ve Li, 2014).

Çizelge 4.1. *P. mammillata* bireyelerinin boy, kütle ve tunik su içerikleri.

<i>P. mammillata</i>	Min	Max	Ort
Total boy (cm)	5	13,5	10,12
Total kütle (g)	20,84	108,89	54,19
Tunik boyu (cm)	5	13	9,54
Tunik yaş kütlesi (g)	12,52	61,48	35,11
Tunik kuru kütlesi (g)	0,61	2,95	1,45
Tunik % kuru kütle	2,28	10,86	4,45
Tunik % su içeriği	89,13	97,71	95,54

Selüloz, tunikat *P. mammillata* örneklerinden 3 aşamada izole edildi. Başlangıçta 15,73 gr öğütülmüş kuru tunik ile başlayan izolasyon sürecinin prehidroliz aşamasından sonra kuru kütlesi 4,70 g olarak ölçüldü. Kraft pişirme aşamasından sonra ise ölçülen kuru kütle 2,71 gram'a düştü. Ağartma işlemi uygulandıktan sonra elde edilen selüloz kuru kütlesi ise 2,65 g olarak ölçüldü. Tunikat *P. mammillata* tuniğinin kuru kütle selüloz yüzdesi % 16,84 olarak hesaplandı. Selüloz ekstraksiyonunda uygulanan bu aşamalar tunik yapısındaki lipidlerin, sülfatlanmış glikanların ve mukopolisakkaritlerin ön hidroliz yoluyla ve proteinin kraft pişirme yoluyla uzaklaştırılmasını sağlamış ve ağartma ile saflaştırılmış lifli selülozun üretilmesini sağlamıştır (Zhao ve Li, 2014). Dunlop vd. (2018), vazo tunikat *C. intestinalis*'in tunik kütlesinin hidroliz sonrası % 67, kraft pişirme sonrası % 56 ve ağartma sonrası ise % 44'e düştüğünü bildirirken, club tunikat *S. clava*'nın tunik kütlesinin ise hidroliz sonrası % 57, kraft pişirme sonrası % 42 ve ağartma sonrası ise %32'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada bambu lifinden asit hidrolizi, kraft hamurlaştırma ve NaClO ile ağartma yöntemi kullanılarak mikrokristalin selüloz izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bambu liflerinin selüloz oranı %54,61 olarak hesaplanmıştır (Rasheed vd., 2020). Yazarlar, selüloz eldesinin her aşamasında rengin adım adım kahverengiden beyaza dönüşmesinin hemiselüloz, lignin ve diğer safsızlıkların liflerden ayrıldığına bir işareti olduğunu belirtmişlerdir.

Bu güne kadar *C. intestinalis*, *Ascidia sp.*, *H. roretzi*, *S. plicata*, *S. clava*, *H. papillosa*, *Cnemidocarpa finmarkiensis*, *Pyura haustor*, *Corella willmeriana*, *Ascidia paratropa*, *M. uedai*, *Eudistoma sp.*, *Polycarpa reniformis* ve *P. nigra* türlerinden tunik selülozu izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (Kimura ve Itoh, 1996; Helbert vd.,1998; Koo vd., 2002; Elazzouzi-Hafraoui vd., 2008; Iwamoto, Kai, Isogai ve Iwata, 2009; Nakashima, Sugiyama ve Satoh, 2008; Sacui vd., 2014; Zhao ve Li, 2014; Zhao ve Li, 2016; Zhao vd., 2017; Dunlop vd., 2018; Moon vd., 2021; Chanthathamrongsiri, Petchsomrit, Leelakanok, Siranonthana ve Siriak, 2021). Koo vd. (2002), tunikat *Cynthia roretzi* için beyazlatma sonrası nihai selüloz verimini %32 olarak hesaplamıştır. Nakashima vd. (2008) tunikat türleri *C. finmarkiensis*, *P. haustor*, *C. willmeriana* ve *A. paratropa*'dan elde edilen selüloz verimlerini sırasıyla, % 17,29, % 18,99, % 31,22 ve % 54,47 olarak rapor etmiştir. Zhao ve Li, (2014) ise kimyasal olarak saf selülozun üretim verimlerini *C. intestinalis*, *Ascidia sp.*, *H. roretzi* ve *S. plicata* için sırasıyla %12,35, % 2,54, % 20,99 ve % 23,92 olarak kaydetmiştir. Bir başka çalışmada vazo tunikat *C.*

intestinalis'in ve club tunikat *S. clava*'nın gömleklerinden elde edilen nanokristalin selülozun ortalama verimlerinin sırasıyla 44 ± 8 ve 32 ± 7 olduğu bildirilmiştir (Dunlop vd., 2018). Chanthathamrongsiri vd. (2021), tunikat *Eudistoma sp.*, *P. reniformis* ve *P. nigra* türlerinin ağartma işlemi sonrası selüloz verimlerini sırasıyla, %4,51, %23,42 ve % 21,38 olarak tespit etmişlerdir. Bu türlerle kıyaslandığında *P. mammillata* 'dan elde edilen selülozun veriminin daha düşük olduğu görülmektedir. Koo vd. (2002), asit ve alkali çözeltilerin konsantrasyonunun artmasıyla ve bu çözeltilerle işlem sürelerinin artmasıyla selüloz veriminin önemli ölçüde azaldığını rapor etmiştir. Zhao ve Li (2014), selüloz veriminin canlı türü, tuniğin kalınlığı ve sertliği, selüloz izolasyon yöntemleri ve saflaştırma aşamalarına bağlı olarak değiştiğini ve izole edilen selülozların farklı kimyasal ve morfolojik yapılar sergilediğini öne sürmüştür. Yazarlar daha sert ve daha kalın tuniğe sahip olan türlerin tuniklerinin selüloz verimlerinin, yumuşak ve ince tuniğe sahip olan türlerinkinden çok daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Daha yumuşak ve ince bir tuniğe sahip olan *P. mammillata*'nın selüloz içeriğinin diğer türlerden düşük olmasının nedenlerinden biri budur. Bununla birlikte, *P. mammillata* 'nın selüloz verimi literatürde belirtilen diğer tunikat türlerinden az olmakla birlikte *C. intestinalis* ve *Eudistoma sp.*'ninkinden yüksektir. Literatür verilerinin ortaya koyduğu gibi tunikat türleri arasında selüloz verimlilikleri açısından farklılıklar gözlenmektedir.

Tunikatlar yüksek üreme oranlarına sahip olmaları nedeniyle hızla yayılarak buldukları alanları işgal ederler. Bölgedeki doğal türlerin yaşam alanlarını ele geçirerek biyoçeşitlilik için tehdit oluştururlar. Bazı araştırmacılar istilacı tunikat türlerinin biyoteknolojik bir ürün olan nanokristalin selülozun kaynağı olarak biyoekonomiye kazandırılabilirliğini öne sürmüştür (Dunlop vd., 2018; Ramesh vd., 2021). *C. intestinalis* gibi bazı tunikat türlerinin üç boyutlu deniz çiftliklerinde büyük ölçekte başarılı bir şekilde üretildiği ve yüksek kaliteli selülozun izole edildiği bildirilmiştir (Zhao ve Li, 2014; Zhao ve Li, 2016).

Doğu Asya'da etleri için yüksek değerli gıdalar olarak çeşitli tunikat türleri üretilmektedir. *H. roretzi*, *P. michaelsoni* gibi tunikat türlerinin Kore'de kültüre alınarak yetiştirildiği (Heo vd., 2018), bunların işlenmeden kalan tuniklerinin ise atık malzeme olarak denize boşaltıldığı (George ve Sabapathi, 2015) ve dolayısıyla çevre kirliliğine neden oldukları rapor edilmiştir (Oh vd., 1997; Koo, vd., 2002; Ali ve Tamilselvi, 2016).

Örneğin, tunikat *H. roretzi* Kore'de yıllık olarak 25,000 tondan fazla üretilmektedir (Heo vd., 2018). Moon vd. (2021), kültüre alınarak seri üretimi yapılan tunikatlardan elde edilecek tunik kristalin nanofiberlerinin mühendislik malzemelerine dönüştürülerek kullanım alanı bulabileceğini önermiştir.

Bu çalışmada incelenen tunikat türü *P. mamillata*'da sürdürülebilir yüksek kaliteli kristalin selüloz kaynağı olarak kullanılabilir ve biyoteknolojik bir ürün olan nanokristalin selüloza dönüştürülerek biyoekonomiye kazandırılabilir.

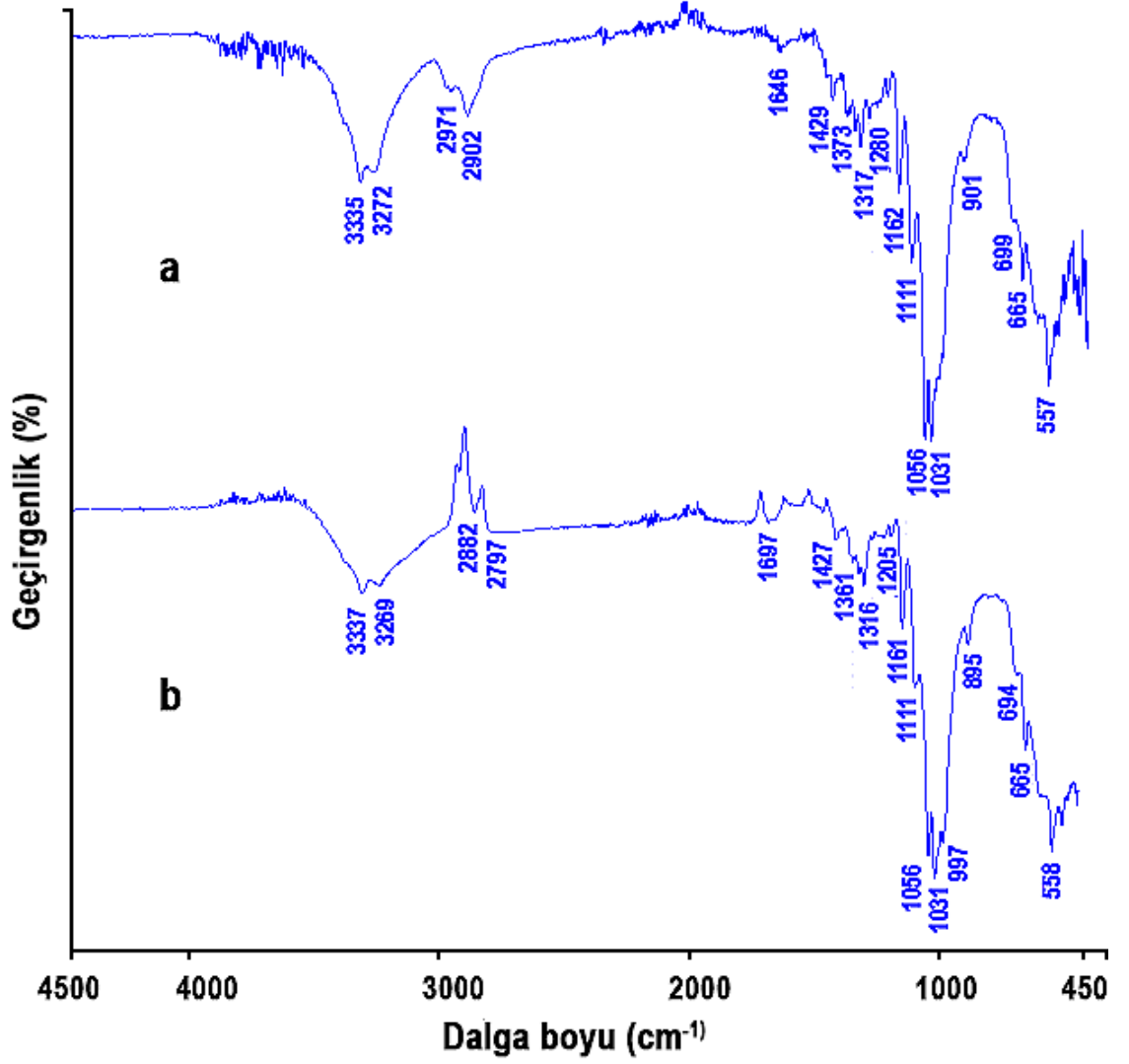
4.2. FTIR

Tunikat *P. mamillata* selülozunun kimyasal bağ yapısı, moleküllerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini incelemekte kullanılan güçlü araçlardan biri olan FTIR analizi ile incelenmiş ve kızılötesi absorpsiyon spektrumu Şekil 4.1'de sunulmuştur. Şekil 4.1a'da görüldüğü üzere, *P. mamillata* selülozu 3335 cm⁻¹ (-OH gerilmesi), 3272 cm⁻¹ (O-H titreşimi), 2971 cm⁻¹ (CH₂ asimetrik gerilmesi), 2902 cm⁻¹ (C-H gerilmesi), 1646 cm⁻¹ (emilen suyun -OH titreşimi) ve 1056 cm⁻¹ (C-O gerilmesi)'de absorpsiyon pikleri sergilemiştir. *P. mamillata* selülozunun FTIR analizinde görülen 3334 cm⁻¹, 2905 cm⁻¹ ve 1056 cm⁻¹ civarındaki titreşimler selüloza ait tipik pikler olup, *P. mamillata* selülozunun doğal selüloz I yapısında olduğunu gösterdi. *P. mamillata* selülozunda 3272 cm⁻¹ ve 699 cm⁻¹ de gözlenen absorpsiyon pikleri ise, *P. mamillata* selülozunun I-β kristal yapısına sahip olduğunu ortaya koydu.

P. mamillata selülozundan asit hidrolizi ile üretilen nanokristalin selülozun absorpsiyon spektroskopisi ise Şekil 4.1b'de sunulmuştur. Nanokristalin selülozun kızılötesi spektroskopisinde selüloza özgü pikler korunmakla birlikte bazı pik kaymaları gözlenmektedir. Bunlardan selülozda 3272 cm⁻¹ de görülen pik nanokristalin selülozda 3269 cm⁻¹'ye, 2902 cm⁻¹ deki pik 2882 cm⁻¹ ye, 1429 cm⁻¹ deki pik 1427 cm⁻¹ ye ve 1373 cm⁻¹ deki pik ise 1361 cm⁻¹ ye indirgenmiştir. Ayrıca, nanokristalin selülozda 1697 cm⁻¹ ve 997cm⁻¹ de ise iki yeni pik gözlenmiştir.

Cheng vd. (2020), selülozların FTIR spektrumlarında 3700-2500 cm⁻¹ ve 1750-500 cm⁻¹ olmak üzere iki bölgede geçirgenlik bantları gözlendiğini belirtmiştir. Yazarlar, FTIR spektrumundaki 2904 cm⁻¹'e yakın iletim bandının, polisakkaritlerdeki tüm hidrokarbon bileşenlerinin C-H germe titreşimine, 1638 cm⁻¹'de bulunan bandın selülozda

emilen su moleküllerinin O-H bükülme titreşimine ve 1057 cm^{-1} 'deki geçirgenlik bandının selülozdaki C-O ve C-C bağlarının gerilme titreşimlerine atfedildiğini rapor etmektedirler.



Şekil 4.1. *P. mammillata* selülozünün kızılötesi spektrumu. a) selüloz, b) nanokristalin selüloz.

Koo vd. (2002), tunikat *C. roretzi*'den kimyasal yöntemle izole ettikleri selüloz numunesinin FTIR spektrumunda 3400 cm^{-1} civarında güçlü bir O-H germe absorpsiyon bandı ve 2900 cm^{-1} civarında C-H germe absorpsiyon bandı gözlemlemişlerdir. Tunikat *C. intestinalis*'ten elde edilen selülozün FTIR spektrumunda ise, selüloz nanokristallerinin sırasıyla 3334 cm^{-1} , 2901 cm^{-1} ve 1057 cm^{-1} 'deki O-H, C-H ve C-O

germe titreşimleri ile selüloza özgü yapısal özellikler sergiledikleri bildirilmiştir (Zhao vd., 2015). Bunların dışında, *C. intestinalis* selüloz nanokristallerinin 1638 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki, emilen suyun OH bükülme titreşimine, 1609 cm^{-1} deki belirgin pik, emilen suyun OH eğilme titreşimi ile örtüşen asimetrik bir karboksilat COO- titreşimine, 1160 cm^{-1} civarındaki pik ise sülfürik asit hidrolizi ile üretilen selüloz zincirleri üzerinde yüklü sülfat ester bağlarına atfedilmiştir. Diğer çalışmalarda tunik selülozu için O-H germe titreşimi 3333 ve 3342 cm^{-1} de, C-H simetrik gerilme titreşimi 2900 cm^{-1} ve 2904 cm^{-1} de ve C-O antisimetrik köprü gerilmesi 1057 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1159 ve 1161 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Han, Zhou, Wu, Liu ve Wu, 2013; Zhao vd., 2017; Cheng vd., 2020; Moon vd., 2021). Bunlara ek olarak, saf tunikat selülozunun FTIR spektrumunda 1112 cm^{-1} 'de (C-OH iskelet titreşimi), 1054, 1057 ve 1030, 1031 cm^{-1} 'de (C-O-C piranoz halkası iskelet titreşimi), 895 cm^{-1} 'de (halka titreşimli glikozidik -CH deformasyonu ve selülozdaki glikozlar arasındaki β -glikosidik bağlantılarda -OH bükülmesi) ve 664 cm^{-1} 'de (C-H fonksiyonel grubunun düzlem dışı deformasyonu) geçirgenlik bantları tespit edilmiştir (Zhao vd., 2017). *P. mammillata* selülozunun FTIR spektrumundan elde edilen absorpsiyon pikleri diğer tunikat selülozlarının FTIR pikleriyle uyum içindeydi (Zhao vd. 2015; Cao vd., 2018; Cheng vd., 2020; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Bu çalışmalarda belirtilen selüloz için karakteristik absorpsiyon pikleri *P. mammillata*'dan izole edilen selüloz (3335 cm^{-1} , 2902 cm^{-1} ve 1056 cm^{-1}) ve nanokristalin selüloz (3337 cm^{-1} , 2882 cm^{-1} ve 1056 cm^{-1}) için gözlenmiş olup, sülfürik asit hidrolizinden kaynaklı sülfat ester bağlarına atfedilen absorpsiyon bandı selüloz için 1162 cm^{-1} ve nanokristalin selüloz için 1161 cm^{-1} de gözlenmiştir.

Jak meyvesi kabuğu selülozunun FTIR spektrumunun α -selülozun karakteristik absorpsiyon paternlerini sergilediği ve FTIR spektrumunda 1641 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} , 1384 cm^{-1} , 1174 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} ve 905 cm^{-1} 'de absorpsiyon bantları sergilediği belirtilmiştir (Trilokesh ve Uppuluri, 2019). Bambu liflerinden elde edilen mikrokristalin selülozun FTIR spektrumunda ise 3338 cm^{-1} 'de (O-H germe titreşimleri), 2900 cm^{-1} ve 2905 cm^{-1} 'de (C-H gerilme titreşimleri) ve işlenmiş selüloz numuneleri için parmak izi bölgelerini temsil eden 1160 cm^{-1} 'de (C-O-C glikozit bağları simetrik), 1050 cm^{-1} 'de (C-OH gerilmesi) ve 896 cm^{-1} de (β -glikosidik bağların bükülmesi) önemli tepe noktaları kaydedilmiştir (Rasheed vd., 2020). Zhao vd. (2017), ahşap selüloz nanofiberlerinin 3327-3331 cm^{-1} 'de -OH gerilmesi için, 2893-2897 cm^{-1} 'de C-H simetrik germe için,

1159-1161 cm^{-1} 'de C-O antisimetrik köprü gerilmesi için, 1023-1028 cm^{-1} 'de C-O-C piranoz halkası iskelet titreşimi için ve 661 cm^{-1} 'de C-H fonksiyonel grubunun düzlem dışı deformasyonu için gösterdiği bu karakteristik zirvelerin yapıda kalan lignin ve hemiselülozların varlığından kaynaklanabileceği ve selülozlar, lignin ve hemiselülozlar tarafından hala çapraz bağlı olup, tunikatın saf selülozundan dalga numarası kaymaları gösterebileceğini rapor etmiştir.

Bakteriyel selülozun karakteristik pik değerleri 3400-3440 cm^{-1} 'de hidroksil grupları (-OH), 2800-2900 cm^{-1} 'de metilen gerilme titreşimi (-CH₂-), 1620-1640 cm^{-1} 'de karboksilik gruplar (COOH), 1420-1440 cm^{-1} 'de karbonil grupları (C=O), 1160 cm^{-1} 'de C-O-C ve 1040-1068 cm^{-1} 'de şeker halkasının CO-C ve C-O-H germe titreşimi ile temsil edilmektedir (Güzel ve Akpınar, 2017). *P. mammillata* tunik selülozunun FTIR spektrumunda gözlenen absorpsiyon bantları hem bitkisel selüloz hem de bakteriyel selülozunkilere benzerlik göstermekle birlikte bazı dalga numarası kaymaları göstermektedir.

Koo vd. (2002), 1540 cm^{-1} civarında gözlenen absorpsiyon bandının N-H gerilmesine, 1500 ve 1600 cm^{-1} civarındaki geçirgenlik bantlarının da ligninin aromatik iskelet titreşimine atfedildiğini belirtmiş ve izole edilen tunik kimyasal selülozunda bu geçirgenlik bantlarının kaybolmuş olmasının tunik selülozundaki protein ve lignin bileşenlerinin yapıdan uzaklaştırıldığına göstergesi olduğunu belirtmiştir. Aynı şekilde Rasheed vd. (2020), bambu liflerinden elde ettikleri selülozun FTIR spektrumunda ligninin karboksil gruplarının ester bağına, lignindeki C=C titreşimine ve hemiselülozların asetil ve üronik ester gruplarına da karşılık gelen 1722,16 cm^{-1} deki absorpsiyon bandı ve 1533 cm^{-1} 'deki karakteristik C-O germe titreşiminin ortadan kalkmasının izole edilen selülozun saflığına işaret ettiğini söylemişlerdir. Tunikat türlerinden ekstrakte edilen selülozların yüksek saflıkta olup lignin, hemiselüloz veya protein kalıntıları içermediği daha önceki çalışmalarda *C. intestinalis* (Zhao vd., 2017) ve *Eudistoma sp.*, *P. reniformis* ve *P. nigra* (Chanthathamrongsiri vd., 2021), türlerinden elde edilen selüloz nano fiberleri için kanıtlanmıştır. Tunikat *P. mammillata*'dan izole ettiğimiz selülozun ve bu selülozdan türetilen nanokristalin selülozun FTIR spektrumlarında 1500 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1} dalga boyları arasında herhangi bir absorpsiyon bandı gözlenmemektedir. Bu da bu çalışmada izole edilen selülozun ve nanokristalin

selülozun lignin ve proteinden arınmış olduğunu göstermektedir. Selüloz izolasyonunun her bir basamağında rengin adım adım kahverengiden beyaza dönmesinin de hemiselüloz, lignin ve diğer safsızlıkların liflerden uzaklaştırıldığına göstergesi olduğu bilinmektedir (Rasheed vd., 2020). Ekstrakte edilen *P. mammillata* selülozunun rengi oldukça beyaz bir renge sahip olması da saflığının kanıtlarından biridir.

Makarem vd. (2019), selüloz I- β için 3270 cm^{-1} 'deki pikin, selüloz I- α için ise 3240 cm^{-1} pikin karakteristik pikler olduğunu belirtmiştir. Yazarlar, selüloz I- β 'nin 576 cm^{-1} ve 1265 cm^{-1} 'de pik göstermezken, diğer kristalli selüloz allomorfların 576 cm^{-1} ve 1265 cm^{-1} 'de fark edilebilir piklere sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Tunikat türlerinden izole edilmiş selüloz numunelerinde gözlemlenen 898 cm^{-1} 'deki tepe noktasının β -bağlantısından kaynaklandığı ve aynı şekilde 3270 ve 709 cm^{-1} civarında gözlenen iki geçirgenlik bandının selülozun I- β fazını gösterdiğini ve bu bantların α -selüloz ve amorf selülozda bulunmadığı rapor edilmiştir (Cheng vd., 2020; Chanthathamrongsiri vd., 2021). *P. mammillata* selülozunda I- β fazını temsil eden tepe noktaları selüloz için 3272 cm^{-1} ve 901 cm^{-1} 'de nanokristalin selülozda için ise 3269 cm^{-1} ve 895 cm^{-1} de gözlenmiştir (Şekil 4.1a ve 1b).

4.3. SEM ve EDX Sonuçları

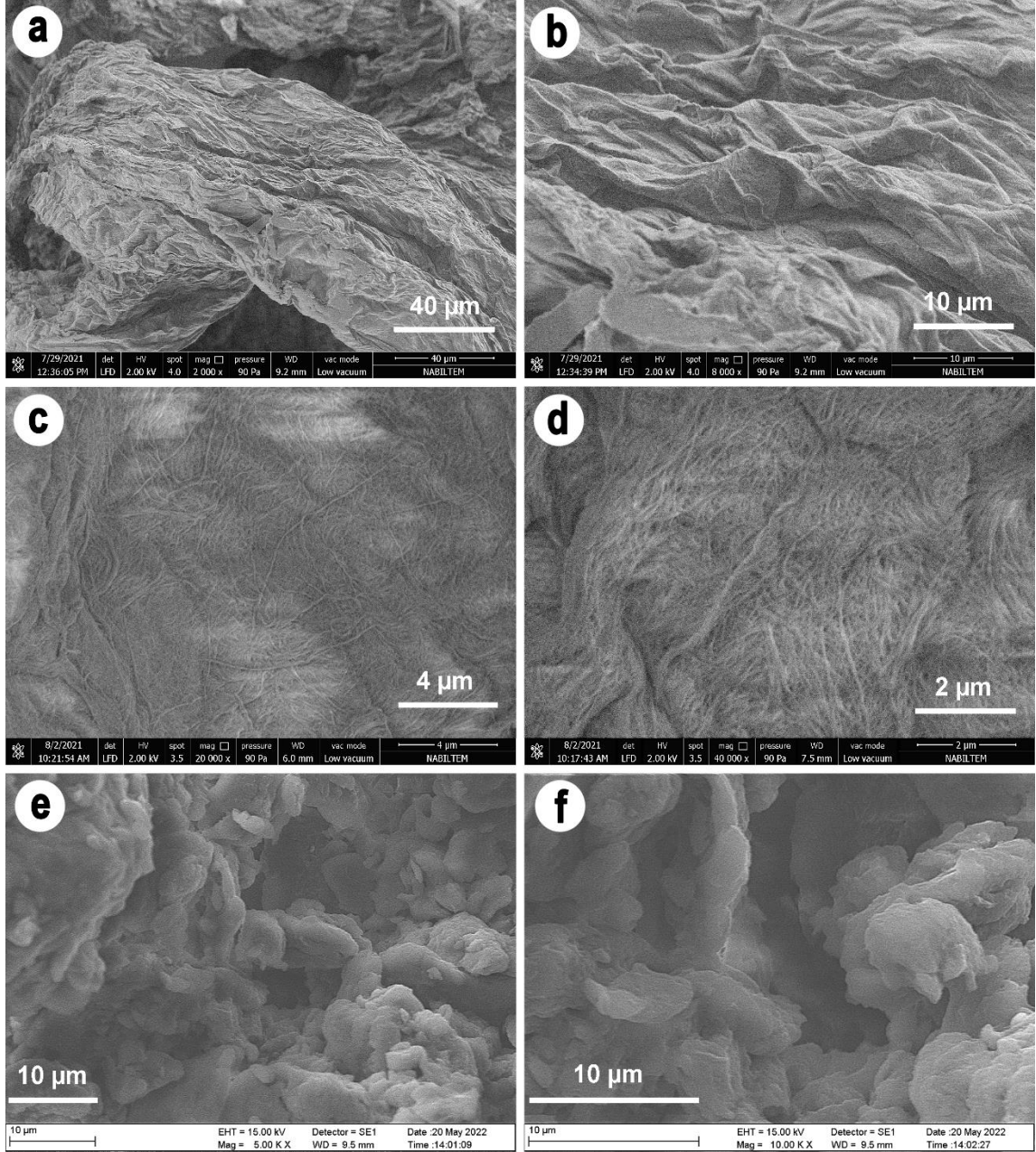
Tunikat *P. mammillata*'dan ekstrakte edilen selülozun yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopuyla çeşitli büyütmelerde incelenmiş olup Şekil 4.2'de sunulmaktadır. Düşük büyütmelerde (2000X ve 8000X) selülozun yüzeyi kırışık bir çarşaf benzeri yapı sergilemektedir (Şekil 4.2a ve 2b). Daha yüksek büyütmede (20000X ve 40000X) ise tunikat *P. mammillata* selülozu enine kıyasla çok uzun boya sahip nanofibrilli bir yapı sergilemektedir (Şekil 4. 2c ve 2d). Bu özellikler diğer tunikatlardan izole edilen selülozların morfolojik yapısına benzerlik göstermektedir (Koo vd., 2002; Zhao ve Li, 2014; Zhao vd., 2017; Dunlop vd., 2018; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Önceki bir çalışmada, *C. intestinalis*'ten hazırlanan tunik selülozünün birbirine sıkıca paketlenmiş, güçlü ve çok karmaşık molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ile stabilize edilmiş uzun selüloz mikrofibrillerden oluşan bir morfolojiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Zhao vd., 2015). Ağartılmış tuniklerin SEM görüntüsünde selülozun mikrofibriller şeklinde toplandığı ve zincirlerin sıkı bir ağ gibi dokunduğu

gözlemlenmiştir (Chanthathamrongsiri vd., 2021). *P. mammillata* selülozu da bu özellikleri aynen yansıtmaktadır. Sert ve kalın tuniklerin mikrofibrillerinin yumuşak tuniklerden daha fazla demetlendiğini rapor eden Zhao ve Li (2014)'nin bulgularının aksine tunikat *P. nigra*'nın kalın tuniğinden elde edilen selüloz mikrofibrillerinin, yumuşak tuniğe göre daha az demetlenme gösterdiği gözlenmiştir (Chanthathamrongsiri vd., 2021). Trilokesh ve Uppuluri (2019), ise jak meyvesinin kabuklarından elde edilen selüloz liflerinin yüzey hidroksil grupları arasındaki güçlü interfibriller çekim nedeniyle kendiliğinden oluşan yapılar sergilediğini rapor etmişlerdir. *P. mammillata* yumuşak bir tuniğe sahip olduğundan Zhao ve Li (2014)'nin belirttiğine benzer şekilde gevşek bir demetlenme sergilemiştir.

Tunikat selülozunun mikrofibril demetinin şekli ve boyutları türlere göre değişiklik gösterdiği ve genellikle yüksek mikrofibril en boy oranı, sergilediği önceki çalışmalarda ortaya konmuştur (Zhao ve Li, 2014; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Zhao vd. (2017), tunik selülozun ~20 nm genişlik ve mm veya cm uzunluğa sahip inanılmaz derecede yüksek en boy oranı gösterdiğini beyan ederken, Dunlop vd. (2018), nanokristalin club tunikat (*S. clava*) selülozunda 90 ± 57 nm en ve 1567 ± 638 nm boy, nanokristalin vazo tunikat (*C. intestinalis*) selülozunda 80 ± 60 nm en ve 1374 ± 600 nm boy oranları ölçmüştür. Farklı bir selüloz kaynağı olarak *Gluconacetobacter hansenii* bakterisinin ürettiği bakteriyel selülozun SEM görüntülerinde selüloz zincir çaplarının 20 nm-75 nm arasında olduğu ölçülmüştür (Gündüz vd., 2015). *P. mammillata* selülozunun en boy oranı Dunlop vd. (2018) tarafından belirtilen değerlere yakındır. Farklı boyutlardaki tunikat fibrillerinin, belirli uygulamalara özel çeşitli özellikler taşıyabileceği düşünülmektedir (Zhao vd., 2017).

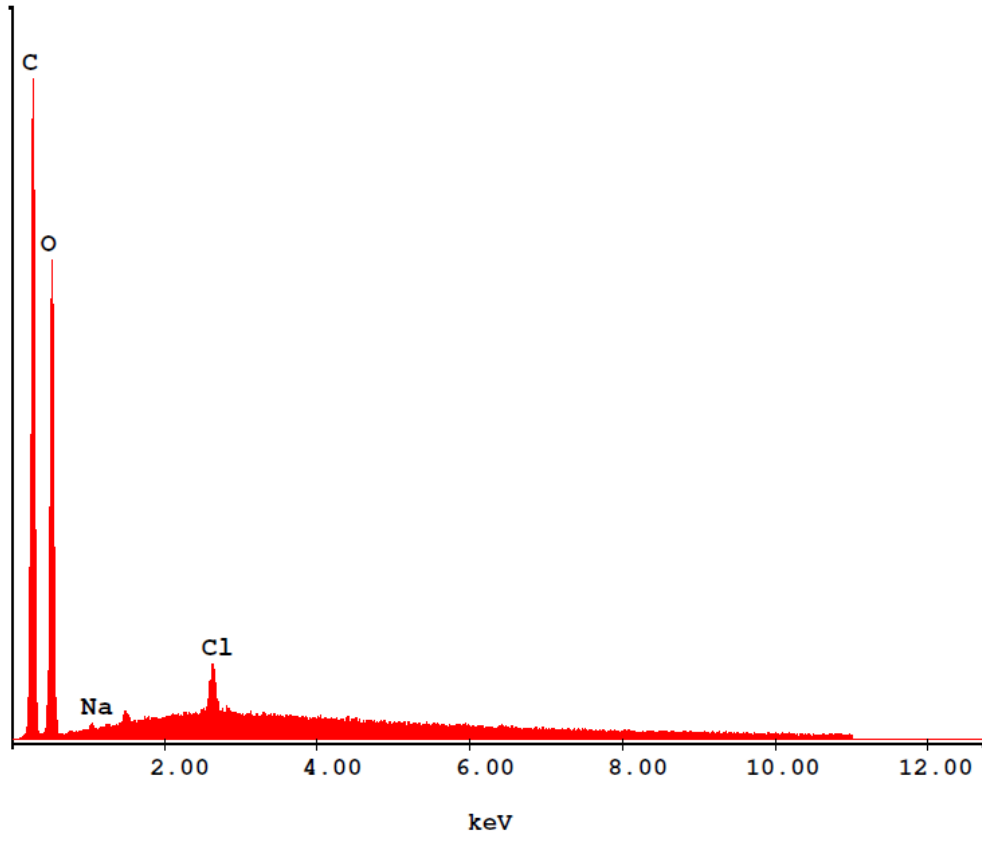
Asit hidrolizi ile hazırlanan *P. mammillata* nanokristalin selülozu ise düşük büyütmelelerde (500X ve 1000X) parçalanmış küçük topaklar oluşturmuş bir görüntü sergilemektedir (Şekil 4.2e ve 2f). Bu haliyle Şekil 4.2a ve 2b'de sunulan *P. mammillata* selülozunun çarşafı görüntüsüne benzememektedir. Bu durum konsantre sülfürik asidin (%70 H₂SO₄) selülozu parçalamasından kaynaklanmaktadır. Trilokesh ve Uppuluri (2019) jak meyvesinin kabuklarından elde ettikleri selülozdan asit hidrolizi yöntemiyle 130 nm çapında yumuşak, lifsiz yapılı, aglomere olmayan küresel şekilli selüloz nanokristalleri üretmişlerdir. Jonoobi vd. (2015)'de selülozun mekanik işlemler

vasıtasıyla ciddi şekilde bozulmaya uğramadan, bazı morfolojik ve boyut farklılıkları meydana getirerek üretilebileceğini belirtmektedir. *P. mammillata*'dan nanokristalin selüloz eldesinde kullanılan öğütme işleminin selülozu boyut olarak küçültürken morfolojik olarak değişikliğe yol açtığı görülmüştür.



Şekil 4.2. Tunikat selülozunun yüzey morfolojisinin SEM görünümü. a) 2000x büyütmede selüloz yapısı, b) 8000x büyütmede selüloz yapısı, c) 20000x büyütmede selüloz yapısı, d) 40000x büyütmede selüloz yapısı, e) 500 K x büyütmede nanokristalin selüloz yapısı, f) 1000 K x büyütmede nanokristalin selüloz yapısı.

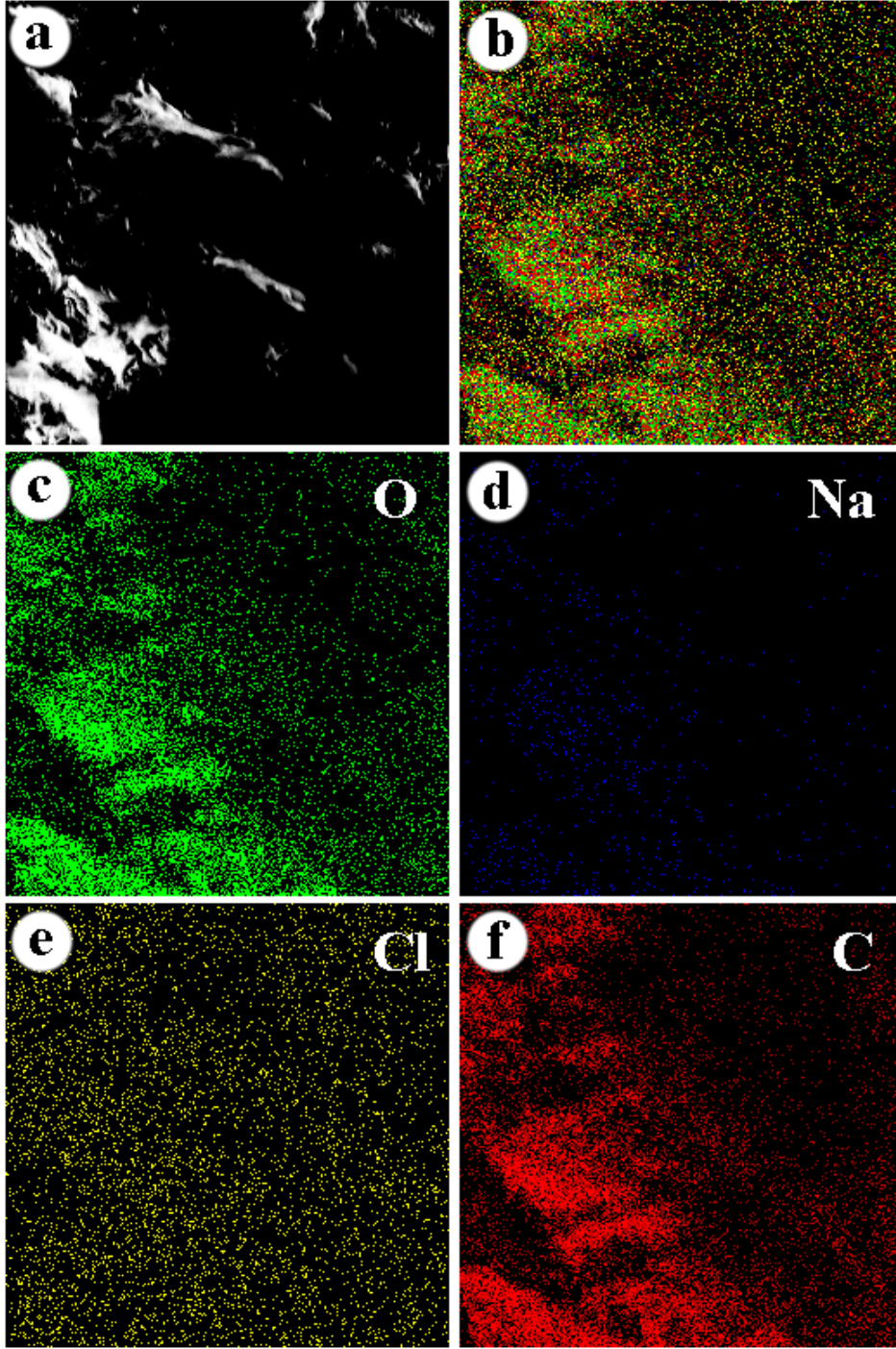
EDX analizi *P. mammillata*'dan elde edilen selüloz numunesinin ağırlıkça % 48,46 Karbon (C), % 50,83 Oksijen (O), % 0,36 Sodyum (Na) ve % 0,35 Klor (Cl) içerdiğini ortaya koydu (Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.2). Koo vd. (2002) tunikat *C. roretzi*' den elde ettikleri selülozda % 42,6 Karbon, % 6,02 Hidrojen (H), % 51,3 Oksijen, % 0,01 Silisyum (Si), % 0,15 Sodyum (Na), % 0,02 Demir (Fe), % 0,05 Kalsiyum (Ca), % 0,13 Krom (Cr) ve % 4,5 Bakır (Cu) elementleri tespit etmişlerdir. Dunlop vd. (2018), ise vazo tunikattan (*C. intestinalis*) elde ettikleri selülozun EDX spektrumunda C, O, Na, Si, Cl ve K elementlerine rastlarken, clup tunikattan (*S. clava*) izole ettikleri selülozun EDX spektrumunda C, O, Na, Altın (Au), Cl ve Kalay (Sn) elementlerine rastlamışlardır. Bu rapor edilen bu verilerle kıyaslandığında *P. mammillata* selülozunun kimyasal olarak oldukça saf bir şekilde izole edildiği görülmektedir. Rasheed vd. (2020), bambu fiberlerinden ekstrakte ettikleri mikrokristalin selülozun EDX spektrumlarında selülozun bileşimindeki ana elementlerden Karbon (% 31,34) ve Oksijen (% 67,37) piklerini yoğun olarak gözlemlerken, az miktarda Sodyum ve Klor elementlerine de rastlamışlardır. Yazarlar ayrıca, mikrokristalin selülozun saflaştırılmasıyla birlikte delignifikasyon işlemine bağlı olarak Oksijen içeriğinin biraz daha yoğun hale geldiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki *P. mammillata* selülozunda Koo vd. (2002) ve Dunlop vd. (2018)'un tunikat selülozundan rapor ettikleri kadar çeşitli elemente rastlanmamıştır. Karbon ve Oksijen selülozun yapı taşı oluşturur elementlerdir ve Sodyum ve Klor da deniz suyunun temel bileşenleri olup *P. mammillata*'nın doğal ortamında bulunmaktadır. *P. mammillata* selülozunun EDX haritasında Cl ve Na'a rastlanması, ekstraksiyon esnasında bu tuzların yapıdan tamamen uzaklaştırılmadığını göstermektedir. EDX analiz sonucu daha önce rapor edilen çalışmalardan farklı olarak tunikat *P. mammillata*'dan elde edilen selülozda ağır metal vs. bulunmadığını ortaya koydu. Bu durum *P. mammillata*'dan izole edilen selülozun biyomedikal uygulamalarda güvenli bir şekilde kullanılabilmesine işaret etmektedir.



Şekil 4.3. *P. mammillata* selülozünün EDX grafiği.

Çizelge 4.2. *P. mammillata* selülozünün element içerikleri ve yüzde oranları.

Element	Ağırlıkça %	Atomik %	K-Oranı	Z	A	F
C	48,46	55,75	0,2414	1,0077	0,4942	1,0004
O	50,83	43,90	0,0951	0,9936	0,1883	1,0000
Na	0,36	0,22	0,0007	0,9335	0,1961	1,0000
Cl	0,35	0,14	0,0029	0,9136	0,9148	1,0000
Total	100,00	100,00				



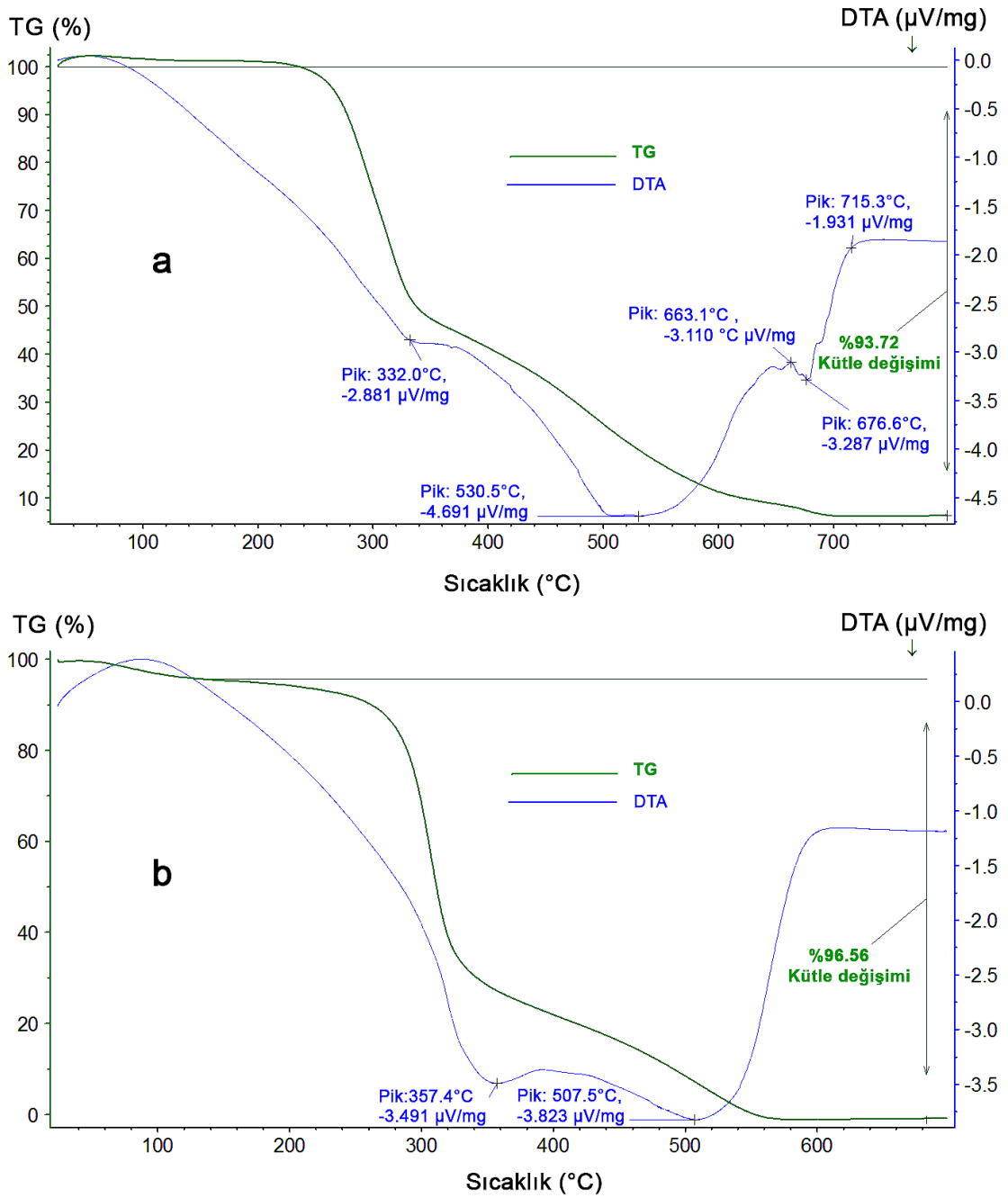
Şekil 4.4. *P. mammillata* selülozünün EDX element dağılım haritası. a) EDX analizi için seçilen alan, b) Seçilen alandaki tüm elementlerin dağılım haritası, c) Oksijen elementi dağılım haritası, d) Sodyum elementi dağılım haritası, e) Klor elementi dağılım haritası, f) Karbon elementi dağılım haritası.

4.4. TGA

Tunikat *P. mammillata* selülozunun termal bozunma eğrisi Şekil 4.5'te sunulmaktadır. Şekil 4.5a'da görüldüğü gibi *P. mammillata* selülozu 3 aşamada kütle kaybına uğramıştır. *P. mammillata* selülozu 25-240 °C arasında yapıdaki suyun uzaklaşmasından dolayı % 0,44'lük kütle kaybına uğramıştır. Sonraki aşamada sıcaklık 336 °C'ye ulaştığında selüloz depolimerizasyonundan kaynaklanan % 48,93'lük bir kütle kaybı daha gözlenmiştir. Daha sonra selüloz bozunma hızı azalarak bozunmaya devam etmiş ve sıcaklık 700 °C'ye çıktığında ise toplam kütle kaybı % 93,77'e ulaşmıştır. Bozunma sonucunda kalan kül miktarı ise % 6,23 olmuştur.

P. mammillata selülozundan asit hidrolizi ile üretilen nanokristalin selüloz da benzer bir bozunma eğrisi oluşturmuştur (Şekil 4.5b). İlk aşamada 25-160° C arasında yapıdaki suyun uzaklaşmasından dolayı % 4,81 oranında bir kütle kaybı gözlenmiştir. İkinci aşamada ise selüloz depolimerizasyonundan kaynaklanan 160-340 °C arasında % 65 oranında bir kütle kaybı daha gözlenmiştir. Sonrasında 551 °C'ye kadar kütle kaybı ve bozunma devam etmiş ve toplam kütle kaybı % 99,81'e ulaşmıştır. Sıcaklık 551 °C'ye ulaştığında bozunma tamamlanmış ve bozunma sonrası kalan kütle % 0,19 olmuştur.

Asit hidrolizi uygulamasının tunikat *P. mammillata* selülozunun termal stabilitesini azalttığı görülmüştür. Termal bozunmaya başlama sıcaklığı 240 °C' den 160 °C'ye düşmüş ve termal bozunmanın tamamlandığı sıcaklık 700 °C'den 551 °C'ye düşmüştür. Ayrıca selüloza kıyasla nanokristalin selülozun bozunma oranı daha yüksek olmuş ve bozunma sonrası kalıntı miktarı selülozda % 6,23 iken, bu oran nanokristalin selülozda % 0,12'ye düşmüştür.



Şekil 4.5. Tunikat *P. mamillata* selülozünün TG/DTA grafiği. a) selüloz b) nanokristalin selüloz.

Selülozik bileşenlerin bozunması 150 °C’de başlar ve selüloz ve hemiselüloz parçalarında dekarboksilasyon, depolimerizasyon ve ayrışma meydana geldiğinde 385 °C’ye kadar sürer. Biyokütle, 385 °C sıcaklığın ötesinde aromatisasyon, ayrışma, yanma, lignin pirolizi ve kömür kalıntısı oluşumuna tabi tutulur (Rasheed vd., 2020).

Zhao ve Li (2014), tunikat türleri *Ascidia sp.*, *C. intestinalis*, *S. plicata*, ve *H. roretzi* tuniklerinden izole ettikleri selüloz numunelerinin bozunma başlangıç sıcaklıklarının sırasıyla 207 °C, 226 °C, 261 °C ve 269 °C olduğunu rapor etmişler ve tüm selüloz numunelerinin 354-369 °C arasında benzer bir maksimum bozunma sıcaklığına sahip olduklarını belirtmişlerdir. Dunlop vd. (2018), hem club tunikat *S. clava* hem de vazö tunikat *C. intestinalis*'ten elde edilen nanokristalin selülozun selülozik materyallerin termal bozunma sıcaklık aralığı (280-400 °C) içerisinde yer alan 300±25 °C sıcaklık aralığında % 80'den fazla kütle kaybı gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra yazarlar tunikat nanokristalin selüloz için 300 °C-450 °C arasında ilave bir % 17'lik kütle kaybı daha gözlemlemişlerdir. Yazarlar, saf nanokristalin selülozun termogramında gözlenmemesi gereken bu ek kütle kaybının tunik selülozünün içerdiği C, O, Cu, Si, Na ve K gibi inorganik tuzların yanı sıra ağır metal iyonları gibi inorganik metallerin oksidasyonuna bağlı olabileceğini belirtmişlerdir (Dunlop vd., 2018). Chanthathamrongsiri vd. (2021), çeşitli tunikat türlerinden izole ettikleri selüloz nanokristallerinin adsorbe edilen suyun buharlaşmasından kaynaklanan % 0,7-1,8 civarında küçük kütle kaybına (60 °C-80 °C) uğradıklarını ve selüloz nanokristallerinin degradasyonunun 187-265 °C civarındaki sıcaklıklarda başladığını belirtmişlerdir. Yazarlar, selüloz nanokristallerinin maksimum bozunma sıcaklıklarının düşük (Tmax 237-294 °C) olduğunu rapor etmişlerdir.

Bitkisel kökenli selüloz olan jak meyvesi selülozünün suyun buharlaşması (150 °C'ye kadar), selülozun depolimerizasyonu (200-380 °C) ve karbon kalıntılarının hızlı depolimerizasyonu (380 °C'nin yukarısında) sonucu meydana gelen kütle kayıpları olmak üzere üç aşamalı bir termal bozunma gösterdiği rapor edilmiştir (Trilokesh ve Uppuluri, 2019). Trilokesh ve Uppuluri (2019), jak meyvesi selülozünün 100 °C'nin altında % 7'lik bir kütle kaybına uğradığını ve bundan sonra 180 °C'ye kadar herhangi bir bozunma kaydedilmediğini, sonrasında ise 312-350 °C arasında termal bozunma göstererek 300-350 °C arasında ağırlığının yaklaşık %85'inin kaybettiğini belirtmektedirler. Rasheed vd. (2020), bambu fiberlerinden elde ettikleri mikrokristalin selülozun termal bozunmasının iki aşamada gerçekleştiğini, ilk aşamada yapıdaki suyun buharlaşması sonucu selülozun %10'luk kütle kaybına (35-305 °C) uğradığını belirtti. Yazarlar, mikrokristalin selülozun kristalin yapısından dolayı termal bozunma için daha yüksek bir enerji gerektirdiğini ve 315 °C'de bozunmaya başladığını, maksimum kütle

kaybının 353 °C’de gerçekleştiğini ve termal bozunmanın 450 °C’de sona erdiğini rapor etmişlerdir (Rasheed vd., 2020).

Bakteriyel selülozun termal bozunma eğrisinin bitkisel selülozun termal bozunma eğrisine benzer olduğu ve 0-100 °C, 200-250 °C ve 360-390 °C olmak üzere üç aşamada kütle kaybına uğradığı rapor edilmiştir (Güzel ve Akpınar, 2017). Çalışmada, ilk bölgede örneklerde absorbe suyun buharlaşması nedeniyle hafif bir kütle kaybı, ikinci bölgede hidroksil grupları ve metil hidroksil grupları gibi küçük molekül ağırlıklı kısımların uzaklaşmasından kaynaklanan kütle kaybı ve üçüncü bölgede ise polimerik zincirler ve piran yapılarının bozunmasından kaynaklı % 70-80 arasında bir kütle kaybı gözlenmiştir. Gündüz vd. (2015), bakteriyel selülozun toplam kütle kaybını % 88,9 olarak hesaplarken, maksimum degradasyon sıcaklığını da 344,3 °C olarak ölçmüşlerdir.

Bu çalışmada tunikat *P. mammillata*’dan izole edilen selüloz ve nanokristalin selülozun su içerikleri, Chanthathamrongsiri vd. (2021)’nin de belirttiği gibi oldukça düşüktür. Oysa Rasheed vd. (2020), bambu fiberlerinden izole ettikleri mikrokristalin selülozunun yüksek oranda su içerdiğini (%10), ve bunun selülozdaki amorf bölgelerde daha fazla süstitüe edilmemiş hidroksil grubunun bulunması nedeniyle moleküllerin daha fazla su tutmasından kaynaklandığını belirtmişler ve kristallik ne kadar fazlaysa su emiliminin o kadar az olduğunu öne sürmüşlerdir. Tunikat selülozu kristalinitesinin yüksek oluşuyla diğer selülozlardan farklılık göstermektedir. Bu durum *P. mammillata*’nın su içeriğinin düşük olmasını desteklemektedir.

Bu çalışmada *P. mammillata* selüloz ve nanokristalin selüloz için gözlenen DTG_{max} değerleri 336 °C ve 340 °C’dir. Yumuşak bir tuniğe sahip olan *P. mammillata*’dan elde edilen selüloz Zhao ve Li (2014), tarafından incelenen tunikat türlerinininkinden daha düşük termal stabiliteye sahipken Chanthathamrongsiri vd. (2021), tarafından tunikat türleri için bildirilenlere kıyasla daha yüksek termal stabiliteye sahiptir. Bitkisel selüloz ve bakteriyel selülozun maksimum bozunma sıcaklıklarıyla kıyaslandığında *P. mammillata* selülozunun termal stabilitesinin bitki ve bakteriyel selülozun termal stabilitesine benzer olduğu görülmektedir. Zhao ve Li (2014), tunik selülozların termal kararlılığının onların kristallinitesiyle doğru orantılı olduğunu ve selülozun kristallik indeksi ne kadar yüksekse, selüloz zincirlerinin paketlenmesi o kadar iyi olduğunu ve dolayısıyla termal ayrışmanın başlaması için daha fazla enerji

gerektirdiğini açıklamışlardır. Sülfürik asit hidrolizi kullanılarak üretilen tunikat selüloz nanokristallerinin, sülfat grubunun selüloz yüzeyine sokulması nedeniyle selülozun amorf içeriğindeki artışa neden olduğu ve dolayısıyla termostabiliteyi azalttığı rapor edilmiştir (Chanthathamrongsiri vd., 2021). Bu çalışmada da asit hidrolizi uygulaması tunikat *P. mammillata* selülozunun termal stabilitesini azaltmıştır.

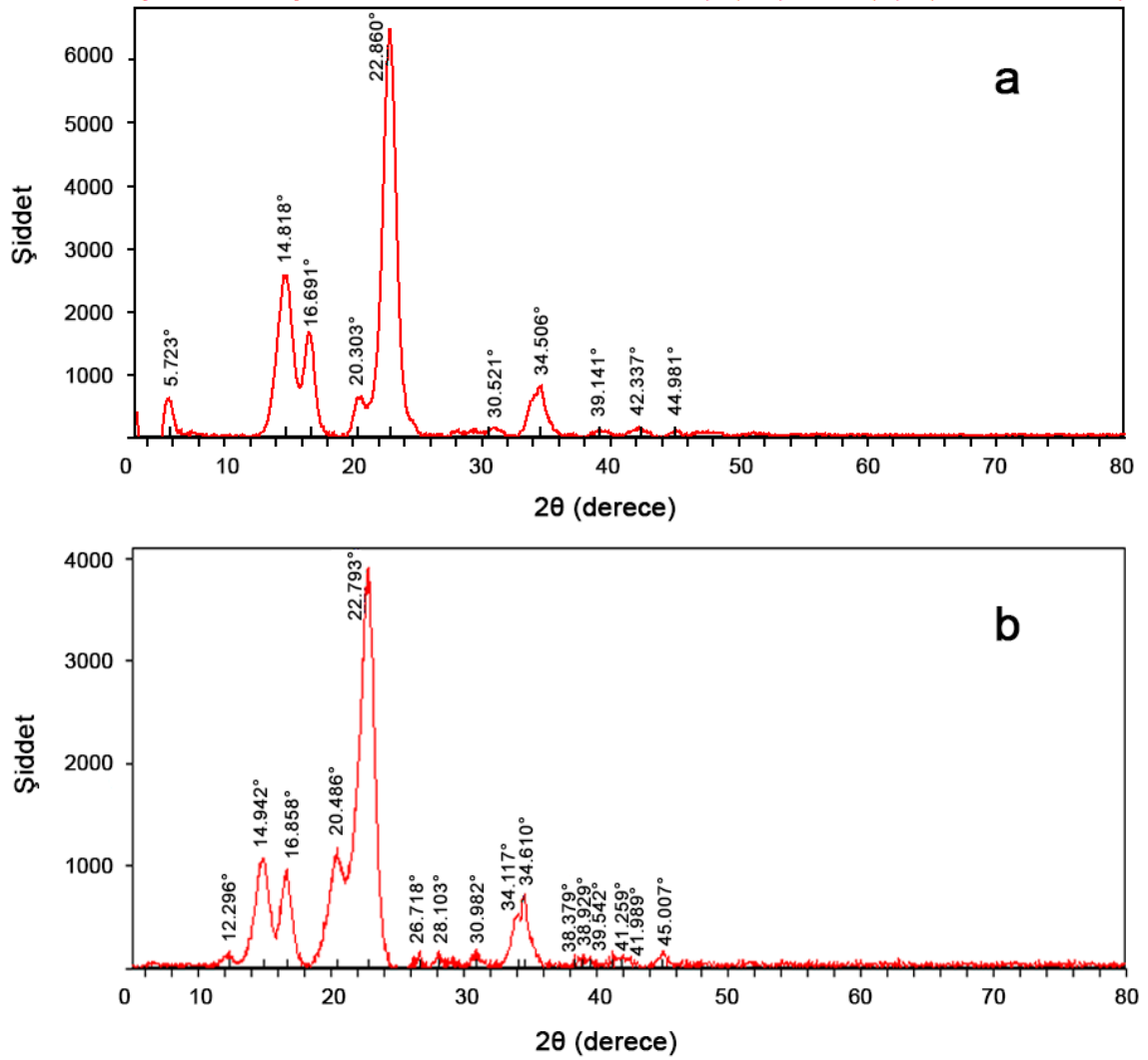
Dunlop vd. (2018), *S. clava*'dan elde edilen nanokristalin selülozun TGA termogramında yaklaşık %88 oranında kütle kaybı ve %9 kalıntı gözlerken, *C. intestinalis*'ten izole edilen selülozda yaklaşık %20 kalıntı ile %65 civarında bir kütle kaybı gözlemişlerdir. Chanthathamrongsiri vd. (2021), tunik selülozunun yüksek kül içeriğinin deniz suyunun dokuya nüfuz etmesine izin veren daha gevşek ve yumuşak tunik yapı nedeniyle tunikte biriken çeşitli inorganik bileşiklerden kaynaklanabileceğini belirtmektedir. Bambu fiberlerinden üretilen mikrokristalin selülozun çar kalıntısı ağırlığının %6,9 olduğu ve çar kalıntısının düşük olmasının mikrokristalin selülozun yüksek saflığının göstergesi olduğu rapor edilmiştir (Rasheed vd., 2020). Bu çalışmada *P. mammillata* selülozunun termal bozunma sonrası kül kalıntısı %6,23'tür. Asit uygulaması sonrası elde edilen nanokristalin selülozun kül kalıntısı ise %0,19 olup, nanokristalin selüloz nerdeyse tümüyle bozunmuştur. Termal ayrışma sonucu kalıntı miktarının çok düşük olması, *P. mammillata* selülozunun organik kısmının fazla olduğunu ayrıca EDX sonuçlarıyla da kanıtlandığı gibi inorganik madde içeriğinin düşük olduğunu ve ağır metal vs. bulundurmadığını ve saflığını onaymaktadır.

Yüksek termal stabiliteye sahip olan selülozun, daha yüksek sıcaklıklarda işlenmesi gereken polimerik kompozit uygulamalarında kullanım için elverişli olabileceği ve biyokompozit ambalaj malzemelerinde uygulama alanı bulabileceği belirtilmektedir (Rasheed vd., 2020). Zhao ve Li (2014), ise tunikat selülozlarının yüksek termal kararlılığa sahip olmaları nedeniyle, termal olarak kararlı malzemeler üretmek için iyi aday malzemeler olduklarını öne sürmektedir. *P. mammillata* selülozunun da termal stabilitesi nispeten yüksektir. Bu nedenle biyokompozit uygulamalar için elverişli olabileceği düşünülmektedir.

4.5. XRD

P. mammillata'dan ekstrakte edilen selülozun kristal ve amorf yapısı X-ışını kırınımı analiziyle belirlenmiş olup XRD kırınım grafiği Şekil 4.6a'da verilmiştir. *P. mammillata* selülozünün XRD diyagramında selüloza özgü kristalin pikler 14,8°, 16,6° ve 22,8°'de gözlenmektedir. Bunların haricinde 5,7°, 20,3° ve 34,5° civarlarında 3 tane keskin pik ve 30° ile 45° arasında 4 tane zayıf pik gözlenmiştir. *P. mammillata* selülozünün kristalinitesi % 98,26 olarak hesaplanmıştır.

P. mammillata selülozundan asit hidrolizi ile üretilen nanokristalin selülozun XRD spektrumunda selülozunkine benzer biçimde 14,9°, 16,8°, 20,4°, 22,7° ve 34,6° da şiddetli pikler gözlenmiştir (Şekil 4. 6b). Bununla birlikte, nanokristalin selülozun XRD piklerinin şiddetinde selülozunkilere kıyasla azalma gözlenmiştir. Selülozun XRD diyagramından farklı olarak nanokristalin selülozunkinde 5,723°'deki pik kaybolmuş, 12,2°'de yeni bir pik ortaya çıkmıştır. Ayrıca, 26°-31° ve 38°-45° arasında çok sayıda zayıf pik gözlenmiştir. *P. mammillata* selülozundan üretilen nanokristalin selülozun kristalinitesi % 98,59 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Tunikat *P. mammillata*'dan elde edilen selülozün XRD grafiği. a) selüloz (JCPDS kart no. 50-2241), b) nanokristalin selüloz (JCPDS kart no. 50-2241).

Selüloz yapısını oluşturan selüloz zincirleri, kristal ve amorf bölgelere sahip olup, kristal kısım XRD spektrumunda keskin kırınım pikleri verirken, amorf kısım ise dağınık pikler vermektedir (Güzel ve Akpınar, 2017). Jonoobi vd. (2015), doğal selüloz I için genel olarak $2\theta = 14,9^\circ$ 'da (110), $2\theta = 16,6^\circ$ 'da (110) ve $2\theta = 22,7^\circ$ 'de (200) üç kristal pik gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Yarı kristalin yapıdaki α -selülozün kristal desenine göre (101), (101) ve (002) kafes düzlemleri konumundaki pik değerleri sırasıyla $2\theta = 12,1^\circ$, $20,2^\circ$ ve $22,1^\circ$ iken, amorf selülozda ise bu kristal kafes düzlemlerine karşılık gelen tüm tepe noktaları kaybolmuş ya da güçlü bir şekilde azalmıştır ve tipik amorf selüloz yapısı gösteren $2\theta = 21^\circ$ bölgesinde genişlemiş bir tepe göze çarpmaktadır (Cheng vd., 2020).

Zhao ve Li (2014), tunikat selülozlarının X-ışını kırınım modellerinin sırasıyla (110⁻) ve (110) yansımaları ile bağlantılı $2\theta = 14,7^\circ$ ve $2\theta = 16,8^\circ$ 'de bir ikili tepe ve (200) kırınımına atfedilen $2\theta = 22,8^\circ$ 'de bir tekli tepe noktası sergileyen saf selüloz I allomorfları olduğunu belirtmektedir. Enzimatik hidroliz, TEMPO aracılı oksidasyon ve asit hidroliz yöntemleriyle hazırlanan tunikat selüloz nanokristallerinin X-ışını kırınım eğrileri de sırasıyla, (110⁻), (110) ve (200) kristal düzlemlerine karşılık gelen $14,7^\circ$, $16,8^\circ$ ve $22,8^\circ$ 'de güçlü kristal tepeler ile tipik bir selüloz I yapısı sergilemiştir (Zhao vd., 2015). Bir başka çalışmada da tunik selülozun iyi bir kristal yapıya sahip olduğunu gösteren $22,9^\circ$ 'daki dar ve keskin yön pikleriyle birlikte, tipik (002), (101) ve (101) kafes düzlemleri için sırasıyla $2\theta = 22,9^\circ$, $16,6^\circ$ ve $14,8^\circ$ 'de tepe değerleri gözlemlenmiştir (Cheng vd., 2020). Chanthathamrongsiri vd. (2021), tunikat selüloz nanokristallerinin X-ışını difraktogramlarında $15,1^\circ$, $16,9^\circ$ ve $23,2^\circ$ 'de doğal selüloz tip I pikleri gözlemlenmişler ve bunların yanısıra ağartılmış *Eudistoma sp.* selülozunda, mineral deniz suyu tutulmasına atfedilebilecek ek kristalin piklerine rastlamışlardır. *P. mammillata* selülozu ve bundan asit hidrolizi ile üretilen nanokristalin selülozun X-ışını difraktogramlarında gözlenen kristalin pikler, tüm bu çalışmalarda belirtilenlere benzerdir. Bunun yanısıra, pik kayması gözlenmemesi ve $22,7^\circ$ ve $22,8^\circ$ 'deki şiddetli, dar ve keskin piklerin kanıtladığı gibi elde edilen selüloz ve nanokristalin selüloz yüksek saflıktadır.

Jak meyvesi kabuğundan elde edilen selülozun XRD kırınım desenleri kafes düzlemleri 110, 200 ve 004'e karşılık gelen, selüloz için karakteristik pikler olan $2\theta = 15,7^\circ$, $22,6^\circ$ ve $35,19^\circ$ 'de kaydedilmiştir (Trilokesh ve Uppuluri, 2019). Bambu fiberlerinden ekstrakte edilen mikrokristalin selülozun sırasıyla (110), (200) ve (004) kristalografik düzlemlerine karşılık gelen $16,1^\circ$, $22,8^\circ$ ve $44,2^\circ$ civarında ana kırınım pikleri sergilediği gözlenmiş ve bu piklerden $16,1^\circ$ ve $22,8^\circ$ deki tepe noktalarının daha keskin iken $44,2^\circ$ deki tepe noktasının yoğunluğunun azaldığı kaydedilmiştir (Rasheed vd., 2020). Zhao vd. (2017), yumuşak ve sert ağaç selüloz nanofiberlerinin tunikat selülozuna benzer kırınım desenleri göstermekle beraber, kristal düzlemlerinin tepe noktalarının yaklaşık $2\theta = 15,0-15,6^\circ$ (110⁻), $16,3-16,5^\circ$ (110) ve $22,3-22,6^\circ$ (200)'ye kaymış olmasının selüloz yapısındaki hemiselüloz kalıntısı ve ligninin varlığından kaynaklandığını öne sürmüştür. Bakteriyel selülozun ise karakteristik 2θ açıları olan $14,00^\circ-16,78^\circ$ ve $22,60^\circ$ kristal düzlemlerine karşılık gelen selüloz I kırılma profili gösterdiği rapor edilmiştir (Güzel ve Akpınar, 2017). *P. mammillata* selülozu ve

nanokristalin selülozunun kristal yapısı bakteriyel selüloza benzer olmakla birlikte, bitkisel selülozdan farklılık göstermektedir. Bitkisel selülozda gözlenen 15,7° ve 44,2°'deki kristalin pikler *P. mammillata* selülozunda nerdeyse kaybolmuş durumdadır. Bu durum *P. mammillata* selülozu ve nanokristalin selülozunun saf oluşunu desteklemektedir.

Tuniklerden ekstrakte edilen selüloz nanofiberleri, saf bileşimlerinin yanı sıra yüksek derecede kristallik ve sertlikleriyle bilinmektedir (Zhao ve Li, 2014; Zhao vd., 2015 ve 2017; Moon vd., 2021). Tunikat selülozlarının XRD spektrumlarından hesaplanan kristallik indeksi, *C. intestinalis*, *Ascidia sp.*, *H. roretzi* ve *S. plicata* selülozları için sırasıyla %89, %70, %95 ve %95 olarak hesaplanmıştır (Zhao ve Li, 2014). Enzimatik hidroliz, TEMPO aracılı oksidasyon ve asit hidroliz yöntemleriyle hazırlanan tunikat selüloz nanokristallerinin kristallik indekleri sırasıyla %82,8, %87,5 ve %90,7 olarak ölçülmüştür (Zhao vd., 2015). Soliter ve kolonyal gömlekli tunikatlardan elde edilen nano selülozların sırasıyla %97 ve %35'in üzerinde kristallik indeksleri gösterdiği rapor edilmiştir (Chanthathamrongsiri vd., 2021). Dunlop vd. (2018), *S. clava* tuniklerinden elde edilen nanokristalin selülozun kristallik derecesinin (%89±%7) *C. intestinalis* selülozunun kristallik derecesinden (%73± %6) daha yüksek olduğunu ve *C. intestinalis* tuniklerinin difraktogramlarının daha amorf bir karakter gösterdiğini rapor etmiştir. Yazarlar, bunun nedeninin amorf selülozun bir kısmının hidrolize edilmemesinden kaynaklandığını ve daha konsantre asit kullanımı veya daha uzun reaksiyon süresi ile bunun iyileştirilebileceğini belirtmektedirler (Dunlop vd., 2018). Tunik selüloz yüksek oranda kristallidir (%85-100) ve I-β kristal yapısı içerir (Moon vd., 2011; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Dunlop vd. (2020), tunikat *S. clava*'dan elde edilen selüloz nanokristallerinin kristalinite indeksini %75 olarak hesaplarken, ahşaptan elde edilen selüloz nanokristallerininkini %66 olarak hesaplamışlardır. Cheng vd. (2020), kırmızı resif tunikatı (*Rhopalaea abdominalis*) tunik selülozunun kristalin indeks değerinin %93,9 olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada *P. mammillata*'dan izole edilen selüloz ve bu selülozdan asit hidroliziyle üretilen nanokristalin selüloz literatürde verilen tüm bu tunikat türlerinin selülozundan daha yüksek bir kristalinite göstermiştir. Bunun sebebi ekstrakte edilen selülozun saflığı olabilir.

Ahşap selülozu amorf kabul edilen hemiselüloz ve lignin içermesi nedeniyle daha düşük bir kristalin indekse (%75-%77) sahip olurken, tunik selülozu düzenli kristal yapı sergilemesi ve ahşap selülozuna kıyasla daha yüksek bir saflığa sahip olması nedeniyle daha yüksek kristalinite (%86-90) sergilemektedir (Zhao vd., 2017). Jak meyvesi kabuğundan izole edilen küresel şekilli selüloz nanokristallerinin kristallik indeksi %83,42 olarak hesaplanmıştır (Trilokesh ve Uppuluri, 2019). Bambu lifinden hazırlanan mikrokristalin selüloz ise yüksek bir kristallik indeks (%82,6) sergilemiştir (Rasheed vd., 2020). Bakteriyel selülozun kristalinite derecesi %87,47 olarak hesaplanmıştır (Güzel ve Akpınar, 2017). Tunikat selülozlarının kristallik indeksi, bakteriyel selülozunki (%65-79) ve odun veya diğer bitkilerden elde edilen selülozlarınkilerden (% 44-65) çok daha büyüktür (Zhao ve Li, 2014).

Selülozdaki amorf bölgelerin, asit hidrolizi sonucunda yapıdan çıkarıldığı, bunun da glikozidik bağların hidrolitik bölünmesini tetikleyerek bireysel kristalitlerin serbest bırakılmasına yol açtığı öne sürülmüştür (Rasheed vd., 2020). Selüloz nanokristalleri hazırlama sırasında hidroliz yüzdesi ne kadar yüksek olursa, kalan amorf bölgelerin kapsamı o kadar düşük olmakta, bu da selüloz nanokristallerinin uzunluğunun daha kısa olmasına ve daha yüksek kristallığe yol açmaktadır (Zhao vd., 2015). Chanthathamrongsiri vd. (2021), *Eudistoma sp.*'den üretilen selülozun %89,6 olan kristallik indeksinin selüloz nanokristallerinin sülfürik asit ile hidrolizinden sonra % 35,7'ye düştüğünü, bunun da selüloz kristallerinin çözünmesinden dolayı amorf bir forma dönüşmesinden kaynaklandığını ifade etmiştir. Bu çalışmada *P. mammillata* selülozunun zaten yüksek olan kristalinitesinde (%98,26) asit hidrolizi sonucu göze çarpan bir değişiklik olmamış, asit hidrolizi sonrasında üretilen nanokristalin selülozun kristalinitesi %98,59 olarak ölçülmüştür. Bu durum tunik selülozun enzimatik hidrolize karşı önemli bir dirence sahip olmasından kaynaklanabilir (Cheng vd., 2020).

Selülozun mekanik ve termal özellikleri, kristal özellikleri tarafından belirlenmektedir (Trilokesh ve Uppuluri, 2019). Zhao ve Li (2014), tunikat selülozlarının çok kompakt selüloz molekül paketlerine sahip olmasından dolayı mükemmel mekanik özellikler sergilediklerini ve kompozit filmleri güçlendirmek için kullanılanlar gibi yeni nesil selüloz bazlı malzeme uygulamaları için büyük potansiyel sergilediklerini belirtmektedir. Yüksek kristalin indekse sahip olan mikrokristalin selüloz biyokompozit

ambalaj malzemelerinde uygulama bulabilmektedir (Rasheed vd., 2020). Oldukça yüksek kristalin indeks değerine sahip olan *P. mammillata* selülozu (%98,26) ve nanokristalin selülozu (%98,59) çeşitli biyokompozitlerde mekanik güçlendirici olarak kullanılabilir.

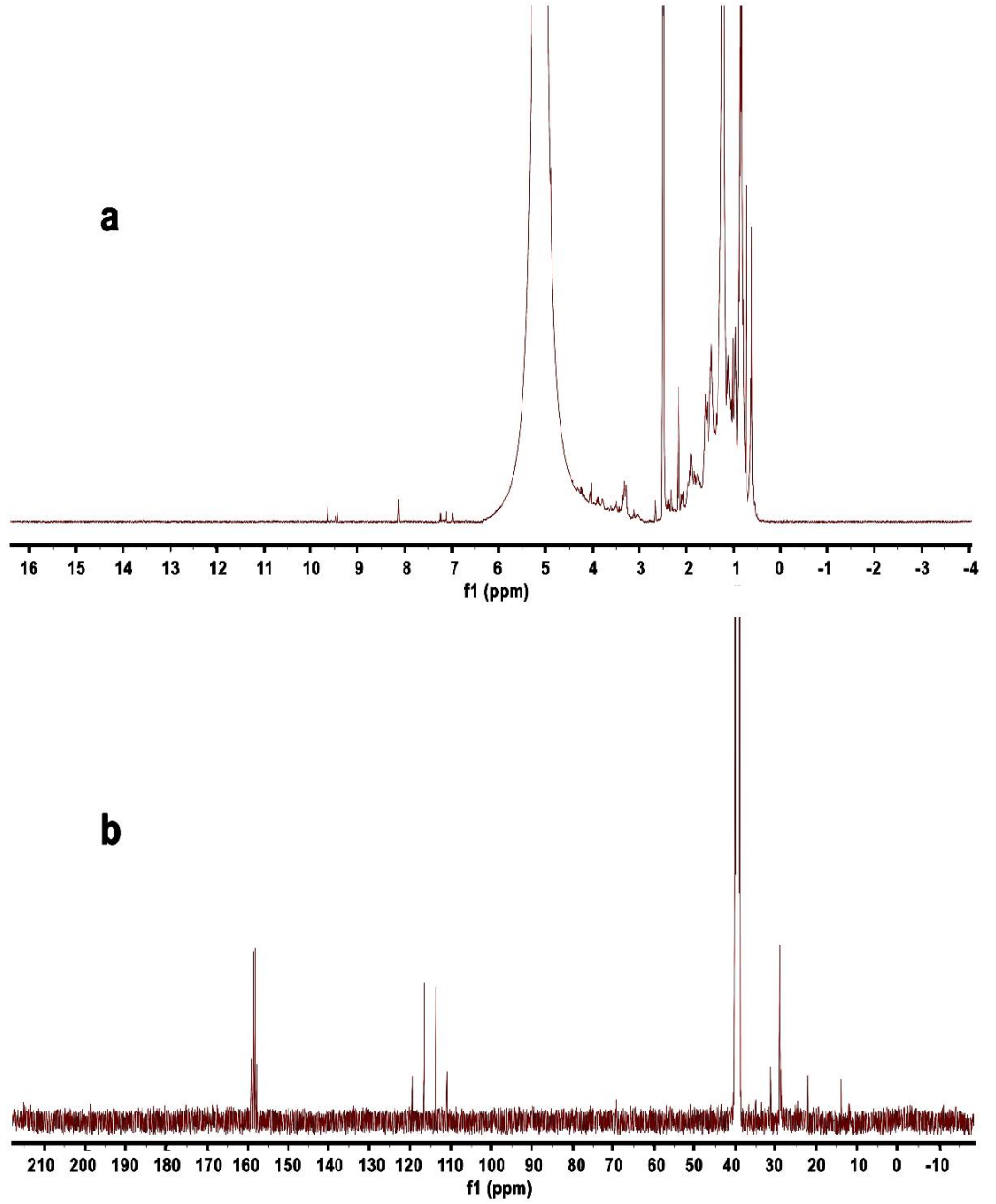
4. 6. NMR

P. mammillata'dan elde edilen selülozun kimyasal yapısı, Şekil 4.7'de sunulduğu gibi $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ ile aydınlatıldı. NMR spektrumları DMSO-d₆ içerisinde çekildi.

P. mammillata selülozunun $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 4,5-5,5 ppm arasında geniş ve şiddetli bir pik ve ayrıca 0,5 ppm ile 2,5 ppm arasında şiddeti yüksek (0,8 ppm, 1,2 ppm ve 2,5 ppm) ve düşük olan çok sayıda pik görülmektedir (Şekil 4.7a). Bunların dışında, $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 3,3 ppm'de bölünmüş düşük şiddette bir başka sinyal ve ayrıca, 7 ppm civarında 3'lü sinyal ve 8 ppm ve 9,5 ppm civarında tekli sinyaller gözlenmektedir. Sakamoto ve Stoyanov (2020), DMSO-d₆'da çözülmüş O-(2-hidroksipropil) selüloz'un $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 1,23 ppm, 2,55 ppm ve 3,79 ppm'de keskin proton sinyalleri kaydetmişlerdir. Yazarlar, CH₃ grubuna ait tekli proton sinyallerini 1,02 ppm'de CH₂ ve CH gruplarına ait sinyalleri 3,05-3,89 ppm civarında multipler olarak, C1'e bağlı Hidrojen'e ait proton sinyalini 4,39 ppm'de ve OH grubuna ait iki geniş tekli sinyali de 4,22 ve 4,42 ppm'de gözlemişlerdir. Khanjani vd. (2018), [P4444][OAc]/DMSO-d₆'da çözünen selüloz örneği için 1-3 pmm arasındaki çoklu sinyallerin çözücüye ve selüloz yapısındaki diğer safsızlıklara ait olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yazarlar, DMSO sinyallerinin (0.8-2,8 ppm) civarında gözlendiğini belirtmiştir. Yüksek saflıktaki I- α ve I- β selülozların siyanobakteri *Glaucocystis*'in hücre duvarından ve tunikatların tuniklerinden elde edilebilmelerine rağmen, tamamen saf I- α ve I- β selülozların hiçbir bitki ve hayvan türünden elde edilemediğini bildirmiştir (Kono, Hashimoto, ve Shimizu, 2002). Bu çalışmada, piklerin yoğun olduğu bu bölge selülozdaki eser miktarda protein kalıntısı veya mineral tuzlar gibi safsızlara işaret edebilir.

P. mammillata selülozunun $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda 14 ppm, 22 ppm ve 31 ppm'de tekli sinyaller, 28,7 ve 29 ppm'de ikili sinyal, 110 ppm ve 120 ppm arasında bir 4'lü sinyal ve 158 ppm'de bölünmüş bir sinyal gözlendi (Şekil 4.7b). Çözücü DMSO.d₆'ya ait olan uzun ve şiddeti yüksek pik ise NMR spektrumunda 40 ppm'de gözlendi. Kono vd. (2002), $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda yeşil alg *Cladophora* selülozunun

C1 karbonunun saf I- α fazı için 106 ppm civarında tek bir sinyal verirken, saf I- β fazı ve tunikat selülozunun C1 karbonlarının sırasıyla 105 ppm ve 107 ppm'de ikili sinyaller verdiğini gözlemlemiştir. Yazarlar C2, C3 ve C5 karbonları için *Cladophora* selülozunun I- α fazı için 72,6 ppm ve 76,5 ppm civarında ve *Cladophora* selülozunun I- β fazı ve tunikat selüloz için 73-76,8 ppm civarında ikili sinyaller, C4 karbonu karbonu için 90 ppm civarında ikili sinyaller ve C6 için de 67 ppm civarında tekli sinyaller kaydetmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise yalnızca, 70 ppm'de zayıf bir sinyal gözlenmekte ve 105-107 ppm arasında gözlenmesi beklenen sinyaller ise 110-120 ppm arasında gözlenmektedir.



Şekil 4.7. *P. mamillata* selülozunun a) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ve b) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.

Holding vd. (2016), $^1\text{H-NMR}$ 'da 5-4 ppm civarındaki kaymaların ve $^{13}\text{C-NMR}$ 'da 90-110 ppm civarındaki kaymaların gözlendiği anomerik bölgenin, polisakkarit alifatik bölgedeki sinyallerle yüksek oranda örtüşmesi nedeniyle bu bölgelerin numunelerdeki şekerlerin parmak izi olduğunu bildirmektedir. Bunu destekleyen çalışmalar aşağıda sunulmuştur. Bir çalışmada, DMSO- d_6 'da çözülmüş selülozun $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda

H1, H2, H3, H4, H5, H6 ve H6' protonları için sırasıyla 4,40 ppm, 3,11 ppm, 3,41 ppm, 3,41 ppm, 3,36 ppm, 3,73 ppm ve 3,65 ppm'de sinyaller gözlenirken, ¹³C-NMR spektrumunda C1, C2, C3, C4, C5, ve C6 karbonlarına ait pikler sırasıyla 102,1 ppm, 72,9 ppm, 74,0 ppm, 78,9 ppm, 74,8 ppm ve 60,1 ppm'de gözlenmiştir (Kono vd., 2015). Yazarlar, DMSO-d₆'ya ait pikin ise 40 ppm civarında olduğunu kaydetmişlerdir. Diğer çalışmada, DMSO.d₆'da çözülmüş (1-4-)D-Glukopiranoz ünitesinin ¹H-NMR spektrumunda I-α formu için C1'e bağlı H için 4,92 ppm'de, C2'ye bağlı H için 3,1 ppm'de, C4'e bağlı H için 3,27 ppm'de sinyaller kaydedilirken, I-β formu için ise C1'e bağlı H için 4,19-4,37 ppm arasında, C2'ye bağlı H için 3,02 ve 3,08 ppm'de, C3'e bağlı H için 3,26 ve 3,44 ppm'de, C4'e bağlı H için 3,15-3,33 ppm arasında, C5'e bağlı H için 3,23 ppm'de ve C6'ya bağlı H için 3,65 ve 3,75 ppm'de sinyaller kaydedilmiştir (Holding vd., 2016). Aynı çalışmada, (1-4-)D-Glukopiranoz ünitesinin ¹³C-NMR spektrumunda I-α formu için 91,84 ppm (C1), 74,74 ppm (C2) ve 81,08 ppm'de (C4) sinyaller gözlenirken, I-β formu için 97,77-102,83 ppm'de (C1), 72,68 ve 77,58 ppm'de (C2), 74,32 ve 74,74 ppm'de (C3), 69,32-81,08 ppm'de (C4), 75,46 ppm'de (C5) ve 59,99 ppm'de (C6) sinyaller gözlenmiştir.

Yukarıdaki çalışmalarda, selüloza ait ¹³C-NMR spektrumlarında Karbon atomlarına ait sinyallerin genel olarak 60-70 ppm ve 105-107 ppm civarında gözlemlendiği rapor edilmektedir. Aynı şekilde, ¹H-NMR spektrumlarında da selüloza özgü proton sinyallerinin genel olarak 3-5 ppm arasında gözlemlendiği rapor edilmektedir. Fakat tunikat *P. mammillata* selülozunun ¹H-NMR spektrumunda 2,5-4,5 ppm arasında zayıf proton pikleri gözlenirken diğer sinyaller baskılandığı için tespit edilememiştir (Şekil 4.7a). Aynı şekilde, ¹³C-NMR spektrumunda selüloz bölgesine ait Karbon piklerinden sadece 70 ppm de zayıf bir sinyal gözlemlendi ve diğer 106 ppm de gözlenmesi gereken sinyallerin 110-120 ppm civarına kaydığı ve 60-70 ppm arasındaki sinyallerin baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.7b). Muhtemelen tunikat selülozunun DMSO.d₆'da yeterince iyi bir şekilde çözünmemesi nedeniyle yeterli data sağlanamamıştır. Tunik selülozu oldukça sert ve kristalin yapıdadır ve kristal kafesler boyunca içsel hidroksil grupları arasındaki kuvvetli molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları nedeniyle selüloz fibrillerinin paketlenmesi oldukça sıkıdır. NMR analiz sonuçları tunikat selülozunun yapı aydınlatması için sıvı NMR analizinin uygun olmadığını, bu nedenle katı NMR analizinin tunikat selülozu için daha uygun bir yapı çözümleme analizi olacağını ortaya koymuştur.

4.7. Elementel Analiz

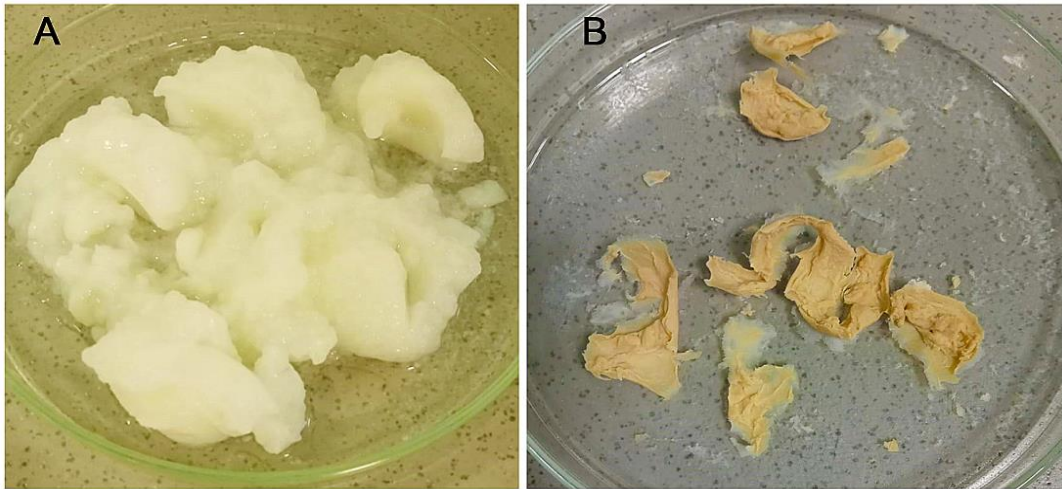
Tunikat *P. mammillata*'dan izole edilen selülozun % Azot (N), % Karbon (C) ve % Hidrojen (H) değerleri elementel analiz cihazıyla sırasıyla <%1, %43,64 ve %6,33 olarak belirlenmiştir. Daha önce yayınlanan bir çalışmada selülozun karbon içeriğinin ağırlıkça %44,4 olduğu rapor edilmiştir (Bengtsson vd., 2020). Bu çalışmanın EDX analizi *P. mammillata* selülozünün ağırlıkça %48,46 Karbon ve %50,83 Oksijen içerdiğini ortaya koymuştur. Corradi Pereira vd. (2013) *Eucalyptus* türlerinin elementel içeriğini incelemiş ve azot içeriğinin %0,09-0,12 arasında, karbon içeriğinin %43,76-47,11 arasında, hidrojen içeriğinin %5,58-5,96 arasında ve oksijen içeriğinin % 46,83-50,55 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Dadile, Sotande, Zira, Garba ve Yakubu (2020), yakacak odun olarak kullanılan bazı ağaç türlerinin elementel içeriklerini incelemişler ve ortalama Karbon içeriğinin %49,54-50,98, Hidrojen içeriğinin %3,99-4,66, Azot içeriğinin %0,31-1,00, Oksijen içeriğinin %40,22-43,16 ve Kükürt içeriğinin %0,24-0,93 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada tunikat selülozu için tespit edilen element içerikleri literatür verileriyle uyumluluk göstermektedir. Selüloz yapısında çok düşük miktarda da olsa azota rastlanması yapıda eser miktarda protein kalıntısı olabileceğine işaret etmektedir.

4.8. Su Tutma Kapasitesi

Tunikat *P. mammillata* selülozünün kuru ağırlığı 2,03 g olarak tartılırken, yaş ağırlığı 17,42 g olarak ölçülmüştür. *P. mammillata* selülozu kuru ağırlığının 8,5 katı kadar su tutmuştur (Şekil 4.8). Su tutma kapasitesi %858 olarak belirlenmiştir. Tunik selülozünün su tutma kapasitesinin bitkisel kökenli selülozdan daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir (Zhao, Moser ve Henriksson, 2018; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Wei, Chen, Song, Wu ve Xu, (2021) ise selüloz ve kuaternize tunikat selüloz nanokristallerin (Q-TCNCs) üzerlerindeki büyük miktardaki hidrofilik gruplar nedeniyle, hidrojellerde mükemmel su emme kapasitesi sergilediklerini rapor etmiştir. Gündüz vd. (2015), bakteriyel selülozun su tutma kapasitesinin ise kuru ağırlığın 91-109 katı olduğunu rapor etmişlerdir. Tsouko vd. (2015), bakteriyel selüloz numunelerinin su tutma kapasitesilerinin 102 ± 6 g/g ile 138 ± 9 g/g arasında değiştiğini ve yenilenebilir kaynaklardan ürettikleri bakteriyel selüloz numunelerinin de su tutma

kapasitelerinin %99'dan yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar bakteriyel selülozlardaki su tutma kapasitesindeki farklılıkların selüloz numunesinin gözenekliliği ve yüzey alanı ile ilişkili olduğunu ve bu parametrelerin boyutu ne kadar büyükse bakteriyel selüloz matrisine nüfuz eden ve sıkışan suyun miktarının o kadar büyük olduğunu öne sürmüşlerdir (Tsouko vd., 2015). Rasheed vd. (2020) ise selülozdaki amorf bölgelerde daha fazla süstitüe edilmemiş hidroksil grubunun bulunması nedeniyle moleküllerin daha fazla su tuttuğunu belirtmişler ve selülozun kristalliliği ne kadar fazlaysa su emiliminin o kadar az olduğunu öne sürmüşlerdir. *P. mammillata* selülozu oldukça yüksek kristaliniteye (%98,2) sahip olmasına rağmen su tutma kapasitesinin yüksek olduğu görülmektedir.

Wei vd. (2021), tunikat selülozunun taşıdığı hidrofilik gruplar nedeniyle sahip olduğu mükemmel su emme kapasitesinden yararlanmak amacıyla, kuaternize tunikat selüloz nanokristalleri kullanarak biyobozunur ve süper emici hidrojeller hazırlamışlardır. Yazarlar hazırlanan hidrojellerin mükemmel su emme kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bakteriyel selülozun su tutma kapasitesi, onun yara örtüsü malzemesi olarak biyomedikal uygulamasına ilişkin en önemli fiziksel özelliklerinden biri kabul edilmektedir (Tsouko vd., 2015). *P. mammillata*'dan izole edilen selüloz ve nanokristalin selülozda yüksek su tutma kapasitelerine sahip olduklarından, emici hidrojeller ve yara örtü malzemelerinin geliştirilmesi için hazırlanan kompozitlerde kullanım potansiyeline sahiptir.



Şekil 4.8. Tunikat *P. mammillata* selülozu a) yaş ve b) kuru.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tunikat *P. mammillata* tuniğinden selüloz ve nanokristalin selüloz izole edildi. *P. mammillata* tuniğinin kuru ağırlık selüloz içeriğinin %16, 84 olduğu ortaya kondu. FTIR analizi ile *P. mammillata* selülozünün doğal selüloz I- β kristal yapısında olduğu belirlendi. SEM analizi *P. mammillata* selülozünün enine kıyasla çok uzun boya sahip nanofibrilli bir yapıya sahip olduğunu ortaya koydu. *P. mammillata* selüloz ve nanokristalin selülozu yüksek termal kararlılık (DTG_{max}: 336 °C-340 °C) sergiledi. Bununla birlikte, asit hidrolizi uygulaması tunikat *P. mammillata* selülozünün termal stabilitesinin azalmasına yol açmıştır. *P. mammillata* selülozünün (%98,26) ve bu selülozundan üretilen nanoselülozünün (%98,59) kristaliniteleri literatürde rapor edilenlerden oldukça yüksekti. *P. mammillata* selülozünün su tutma kapasitesi % 858 olarak belirlenmiştir. *P. mammillata* selülozünün saflığı, izole edilen selülozun beyazlığı, FTIR, EDX, TGA ve XRD analizleriyle ortaya konmuştur.

Literatürde, tunik selülozun, saflığı, yapısal ve morfolojik özellikleri, kalitesi, moleküler ağırlık, mekanik özellikler, su tutma kapasitesi, geçirgenlik ve termal stabilite açısından bitki bazlı selülozdan üstün olduğu önceki çalışmalarda vurgulanmıştır (Moon vd., 2011; Sacui vd., 2014; Zhao ve Li, 2014; Zhao, Moser ve Henriksson, 2018; Moon vd., 2021; Chanthathamrongsiri vd., 2021). Bakteriyel selülozdan da daha yüksek kristallik göstermesi ve bu nedenle mekanik mukavemetinin ve termal stabilitesinin yüksek olması bakımından üstünlük göstermektedir (Zhao ve Li, 2014; Zhao vd., 2015 ve 2017). Enzimatik hidrolize karşı önemli bir direnç göstermesi nedeniyle, tunik selülozun potansiyel anti-biyodegradasyon malzemeleri olarak uygulanabileceği ve yüksek oranda kristalize edilmiş I kafesi sayesinde küf önleyici malzeme olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Cheng vd., 2020). Ayrıca, tunik selülozun yüksek oranda reaktif yüzey alanına sahip olmasının, onu diğer cihazlar ve biyomedikal uygulamalarla çapraz bağlanabilecek mükemmel bir malzeme yaptığı ifade edilmiştir (Mariano, El Kissi ve Dufresne, 2014). Nanokristalin selülozun ise bariyer filmlerde, fotonik kristallerde, şekil hafızalı polimerlerde, ışıkla iyileşebilen malzemelerde, ilaç

uygulama alanı bulabileceği bildirilmiştir (Endes vd., 2016; Dunlop vd., 2018; Thomas vd., 2018; Garces vd., 2020).

P. mammillata selülozu ve nanokristalin selülozu oldukça yüksek kristalinitesi, yüksek termal stabilitesi ve yüksek su tutma kapasiteleri nedeniyle biyokompozitlerde mekanik güçlendirici olarak, emici hidrojeller ve yara örtü malzemelerinin geliştirilmesinde ve çeşitli kompozit malzemelerde kullanım potansiyeline sahiptir.

1. Bu çalışma, tunikat *P. mammillata*'nın alternatif nanokristalin selüloz kaynağı olarak kullanılabilirliğini ve biyoteknolojik ürüne dönüştürülerek biyoekonomiye kazandırılması gerektiğini önermektedir.
2. *P. mammillata*'dan elde edilen selülozun, saflığı, yüksek kristalinitesi, termal dayanımı, yüksek su tutma kapasitesinden dolayı yara örtüsü ve ilaç salınımı için hidrojel üretiminde, anti-biyodegradasyon malzemeleri olarak paketlemede, kozmetik ve biyokompozitler gibi uygulama alanlarında kullanılabilirliği önerilmektedir.
3. Selüloz ve benzeri polisakkaritler başta sağlık olmak üzere birçok alanda potansiyel kullanıma sahiptir. Dolayısıyla ülkemizin biyomalzeme potansiyeli değerlendirilmeli ve bu biyomalzemelerin ekstraksiyonu, saflaştırılması gibi çalışmalara ağırlık verilmelidir.
4. Tunikat türleri ve tunikatlarla simbiyotik yaşam süren mikroorganizmalardan biyolojik aktiviteye ve ilaç olma potansiyeline sahip çok sayıda biyoaktif bileşik tanımlanmıştır. Bu nedenle Türkiye denizlerinde dağılım gösteren tunikat türlerinden sekonder metabolitlerin ve diğer biyoaktif bileşiklerin eldesine ve tanımlanmasına yönelik çalışmalara ağırlık verilmelidir.
5. Türkiye denizlerinde dağılım gösteren istilacı omurgasızlar biyomalzeme kaynağı olarak değerlendirilebilir ve biyoteknolojiye kazandırılabilirler.
6. Uzun ve denizel organizmaları kültüre alacak koyların bulunması nedeniyle hızlı üreyen tunikat türleri kültüre alınabilir ve nanokristalin selüloz kaynağı olarak üretilebilir. Mühendislik alanında değerlendirilebilir.
7. Ayrıca, doğal biyomalzemelerin sürdürülebilir üretimini sağlamak için denizlerimizin korunmasına yönelik tedbir alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ak, I. (2022). Elementel analiz. (2022, 15 Haziran). 15.06.2022 tarihinde <https://slideplayer.biz.tr/slide/12876505/>. Adresinden erişildi.
- Ali, A. J. H., & Tamilselvi, M. (2016). *Ascidians in Coastal Water: A Comprehensive Inventory of Ascidian Fauna from the Indian Coast*; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 9783319291185.
- Andresen, M., Stenstad, P., Moretro, T., Langsrud, S., Syverud, K., Johansson, L. S., & Stenius P. (2007). Nonleaching antimicrobial films prepared from surface-modified microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules*, 8, 2149-2155.
- Aslan Cihangir H., Izquierdo Muñoz A., Pancucci Papadopoulou M. A., Ramos Esplá A., & Can Yılmaz E. (2011). *Microcosmus polymorphus* Heller, 1877 (Tunicata: Ascidiacea: Pyuridae)- A new addition to the fauna of the Turkish coasts. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 163-165.
- Aslan, H. (2006). Ascidianlar ve Akdeniz Havzasındaki Dağılımları. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23,(1/1), 29-31.
- Aşık N. (2016). Farklı Besi Ortamı ve Yüzey-Hacim Oranları Kullanılarak Bakteriyel Selüloz Üretimi Ve Karakterizasyonu. Bartın Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Bartın.
- Aydin-Onen, S. (2018). Distribution of Ascidiaceans with a New Record of the Non-Indigenous Species *Polyclinum constellatum* Savigny, 1816 from the Aegean Coast of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 1077-1089.
- Bengtsson, A., Hecht, P., Sommertune, J., Ek, M., Sedin, M., & Sjöholm, E. (2020). Carbon Fibers from Lignin–Cellulose Precursors: Effect of Carbonization Conditions. *ACS Sustainable Chemistry ve Engineering*, 8, 6826-6833.
- Berna, L., & Alvarez-Valin, F. (2014). Evolutionary genomics of fast evolving tunicates. *Genome Biology and Evolution*, 6, 1724-1738.
- Berrill, N. J. (1930). Studies in Tunicate Development. Part I. General Physiology of Development of Simple Ascidiaceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 218 (450–461): 73.

- Bertanha, C. S., Januário, A. H., Alvarenga, T. A., Pimenta, L. P., Silva, M. L., Cunha, W. R., & Pauletti, P. M. (2014). Quinone and hydroquinone metabolites from the ascidians of the genus *Aplidium*. *Marine Drugs*, *12*(6), 3608-3633.
- Besbes, I., Vilar, M.R., & Boufi, S. (2011). Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: Preparation, characteristics and reinforcing potential. *Carbohydrate Polymers*, *86*, 1198-1206.
- Beşiktepe, Ş. T., Sur, H. İ., Özsoy, E., Latif, M. A., Oğuz, T., & Ünlüata, Ü. (1994). The circulation and hydrography of the Marmara Sea. *Progress in Oceanography*, *34*, 285-334.
- Bugni, T. S., Harper, M. K., McCulloch, M. W. B., Reppart, J., & Ireland, C. M. (2008). Fractionated Marine Invertebrate Extract Libraries for Drug Discovery. *Molecules*, *13*, 1372-1383.
- Cao, L., Yuan, D., Fu, X., & Chen, Y. (2018). Green method to reinforce natural rubber with tunicatecellulose nanocrystals via one-pot reaction. *Cellulose*, *25*, 4551-4563.
- Chanthathamrongsiri, N., Petchsomrit, A., Leelakanok, N., Siranonthana, N., & Sirirak, T. (2021). The comparison of the properties of nanocellulose isolated from colonial and solitary marine tunicates. *Heliyon*, *7*, e07819.
- Cheng, Q., Ye, D., Chang, C., & Zhang, L., (2017). Facile fabrication of superhydrophilic membranes consisted of fibrous tunicate cellulose nanocrystals for highly efficient oil/water separation. *Journal of Membrane Science*, *525*, 1-8.
- Cheng, Y. Mondal, A. K., Wu, S., Xu, D., Ning, D., Ni, Y., & Huang, F. (2020). Study on the Anti-Biodegradation Property of Tunicate Cellulose. *Polymers*, *12*, 3071.
- Cirik, Ş., Büyükkateş, Y., Akbulut, M., Aslan, H., İnanmaz, Ö.E., vd., 2007. Denizel biyolojik çeşitlilik ve nesli tükenmekte olan türler. Project Report. <http://doi.org/10.3906/zoo-1405-70>.
- Clarkson, C. M., Azrak, S. M. E. A., Forti, E. S., Schueneman, G. T., Moon, R. J., & Youngblood, J. P. (2020). Recent Developments in Cellulose Nanomaterial Composites. *Advanced Materials*, 2000718.
- Corradi Pereira, B. L., Carneiro, A. C. O., Carvalho, A. M. M. L., Colodette, J. L., Costa Oliveira, A., & Fontes, M. P. F. (2013). Influence of Chemical Composition of Eucalyptus Wood on Gravimetric Yield and Charcoal Properties. Wood chemistry and charcoal, *BioResources*, *8*(3), 4574-4592.
- Curvello, R., Raghuwanshi, V. S., & Garnier G. (2019). Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, *267*, 47-61.

- Çınar, M. E., Bilecenoğlu, M., Öztürk, B., & Can, A. (2006). New records of alien species on the Levantine coast of Turkey. *Aquatic Invasions*, 1(2), 84-90.
- Çınar, M. E., Bilecenoğlu, M., Öztürk, B., Katağan, T., Yokeş, M. B., Aysel V., Dağlı, E., Açıık, S., Özcan, T., & Erdoğan, H. (2011). An updated review of alien species on the coasts of Turkey. *Mediterranean Marine Science*, 12, 257-315.
- Çınar, M. E. (2014). Checklist of the phyla Platyhelminthes, Xenacoelomorpha, Nematoda, Acanthocephala, Myxozoa, Tardigrada, Cephalorhyncha, Nemertea, Echiura, Brachiopoda, Phoronida, Chaetognatha, and Chordata (Tunicata, Cephalochordata, and Hemichordata) from the coasts of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 698-722.
- Çınar, M. E. (2016). The alien ascidian *Styela clava* now invading the Sea of Marmara (Tunicata: Ascidiacea). *Zookeys*, 563, 1-10.
- Çınar, M. E., Féral, J. P., Arvanitidis, C., David, R., Taşkin, E., Sini,..... & Önen, M. (2020). Coralligenous assemblages along their geographical distribution: Testing of concepts and implications for management. *Aquatic Conservation, Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(8), 1578-1594.
- Ciftci, H. I., Can, M., Ellakwa, D. H., Suner, S. C., Ibrahim, M. A., Oral, A.,... & Radwan, M. O. (2020). Anticancer activity of Turkish marine extracts: a purple sponge extract induces apoptosis with multitarget kinase inhibition activity. *Investigational New Drugs*, 38, 1326-1333.
- Dadile, A. M., Sotande, O. A., Zira, B. D., Garba, M., & Yakubu, I. (2020). Evaluation of Elemental and Chemical Compositions of Some Fuelwood Species for Energy Value. *Hindawi International Journal of Forestry*, 3457396. <https://doi.org/10.1155/2020/3457396>.
- De Olyveira, G. M., Manzine Costa, L. M., Basmaji, P., & Xavier Filho, L. (2011). Bacterial Nanocellulose for Medicine Regenerative. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 2, 034001.
- Delmer, D. P. (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 245-276.
- Delsuc, F., Philippe, H., Tsagkogeorga, G., Simion, P., Tilak, M. K., Turon, X., López-Legentil, S., Piette, J., Lemaire, P., & Douzery, E. J. P. (2018). A phylogenomic framework and timescale for comparative studies of tunicates. *BMC Biology* 16, 39.
- Demir, M. (1952). Boğazlar ve adalar sahillerinin omurgasız dip hayvanları. *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobioloji Araştırma Enstitüsü Yayını*, 3, 1-615.

- Dinçaslan, Y. E., & Öber, A. (2004). İzmir Körfezinde Yaşayan Bazı Ascidiacea (Tunicata) Üyelerinin Dorsal Tüberkül Yapısı. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21(1-2), 119-121.
- Dinçaslan, Y. E., & Öber A. (2005). Ascidiacea (Tunicata) Sistematüğinde Ayırt Edici Özellikler. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 22 (3-4), 457-461.
- Dinçaslan, Y. E., Öber, A., Çamdal, E., & Sağıt, M. (2007). İzmir Körfezi'ndeki *Ascidiella aspersa* (Müller, 1776) (Ascidiacea: Tunicata)'nın Farinks Yapısının Morfolojik İncelenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 24 (3-4), 279-282.
- Dinçaslan, Y. E., & Öber A. (2010). Histological Investigations on the Neural Complexes in Some Tunicates (Ascidiacea) Live in Izmir Bay From Turkey. *Journal of FisheriesSciences.com*, 4(1), 91-98.
- Doris, (2020). *Phallusia mammillata*, <https://doris.ffessm.fr/Especies/Phallusia-mammillata-Ascidie-blanche-319> (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Duffy, J. E. (2006). Biodiversity and the functioning of seagrass ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 311, 233-250.
- Dufresne, A. (2012). Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials, Berlin, Boston: De Gruyter, 2012. <https://doi.org/10.1515/9783110254600>.
- Dumollard, R., Gazo, I., Gomes, I. D. L., Besnardeau, L., & McDougall, A. (2017). Ascidiacs: An Emerging Marine Model for Drug Discovery and Screening. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17, 000-000.
- Dunlop, M. J., Acharya, B., & Bissessur, R. (2018). Isolation of nanocrystalline cellulose from tunicates. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 4408-4412.
- Dunlop, M. J., Clemons, C., Reiner, R., Sabo, R., Agarwal, U. P., Bissessur, R., Sojoudiasli, H., Carreau, P. J., & Acharya, B. (2020). Towards the scalable isolation of cellulose nanocrystals from tunicates. *Scientific reports*, 10(1), 19090.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J., Heux, L., Dubreuil, F., & Rochas, C. (2008). The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules*, 9, 57-65.
- Endes, C., Camarero-Espinosa, S., Mueller, S., Foster, E. J., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Weder, C., & Clift, M. J. D. (2016). A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 78.
- Fernandes, E. M., Pires, R. A., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2013). Bionanocomposites from lignocellulosic resources: Properties, applications and future trends for their use in the biomedical field. *Progress in Polymer Science*, 38, 1415-1441.

- Field, C. B., Osborn, J. G., Hoffman, L. L., Polsenberg, J. F., Ackerly, D. D., Berry, J. A., Bjorkman, O., Held, A., Matson, P. A., & Mooney, H. A. (1998). Mangrove Biodiversity and Ecosystem Function. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 7(1), 3-14.
- Franchi, N., & Ballarin, L. (2017). Immunity in Protochordates: The Tunicate Perspective. *Frontiers in Immunology*, 8, 674.
- Garces, I. T., Aslanzadeh, S., Boluk, Y., & Ayranci, C. (2020). Cellulose nanocrystals (CNC) reinforced shape memory polyurethane ribbons for future biomedical applications and design. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 33(3), 377-392.
- Geldiay, R., & Kocataş, A. (1972). İzmir Körfezi'nin Bentosu Üzerine Preliminer Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Monografiler Seri: 12*, 1-34.
- George, J., & Sabapathi, S. N. (2015). Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. *Nanotechnology, Science and Applications*, 8, 45-54.
- Gökaşan, E., Ergin, M., Özyalvaç, M., Sur, H. İ., Tur, H., Görüm, T.,...& Özturan, Ö. (2008). Factors controlling the morphological evolution of the Çanakkale Strait (Dardanelles, Turkey), *Geo-Marine Letters*, 28, 107-129.
- Groppelli, S., Pennati, R., Scari, G., Sotgia, C., & De Bernardi, F. (2003). Observations on the settlement of *Phallusia mammillata* larvae: effects of different lithological substrata. *Italian Journal of Zoology*, 70, 321-326.
- Guisse, C., & Figueiro, R. (2016). Biomedical Applications of Nanocellulose, R. Figueiro and S. Rana (eds.), *Natural Fibres: Advances in Science and Technology Towards Industrial Applications*, RILEM Bookseries 12, DOI 10.1007/978-94-017-7515-1_12.
- Gündüz G., Aşık N., Aydemir D., & Kılıç A. (2015). Bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. *Ormancılık Dergisi*, 10(2), 1-10.
- Güzel, M., & Akpınar, Ö., (2017). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu. *GIDA*, 42 (5), 620-633.
- Ha, T. L. B., Quan, T. M., Vu, D. N., & Si, D. M. (2013). Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. Editör: Andrades, J. A., InTech, doi: 10.5772/55668.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110, 3479-3500.

- Halib, N., Perrone, F., Cemazar, M., Dapas, B., Farra, R., Abrami, M.,....& Grassi, M. (2017). Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field. *Materials*, 10, 977.
- Han, J., Zhou, C., Wu, Y., Liu, F., & Wu, Q. (2013). Self-assembling behavior of cellulose nanoparticles during freeze-drying: effect of suspension concentration, particle size, crystal structure, and surface charge. *Biomacromolecules*, 14(5), 1529-1540.
- Hassanzadeh, M. (2011). Composition and Application Potentials of Scandinavian Tunicates. 20 October 2011, Master Thesis Report, KTH Chemical Science and Engineering. 03.06.2022 tarihinde chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:565784/FULLTEXT01.pdf adresinden erişildi.
- Helbert, W., Nishiyama, Y., Okano, T., & Sugiyama, J. (1998). Molecular imaging of *Halocynthia papillosa* cellulose. *Journal of Structural Biology*, 124, 42-50.
- Heo, S. J., Lee, N. S., & Kim, D. Y. (2018). A study on the structural change of sea squirts aquaculture industry and directions for countermeasures. *Korea Maritime Institute*, 30 (3), 850-860.
- Holding, A. J., Makela V., Tolonen, L., Sixta, H., Kilpelainen, I., & King, A. W. T. (2016). Solution-State One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy of High-Molecular-Weight Cellulose. *ChemSusChem*, 9, 880-892.
- Hu, D., Cui, Y., Mo, K., Wang, J., Huang, Y., Miao, X., Lin, J., & Chang, C., (2020). Ultrahigh strength nanocomposite hydrogels designed by locking oriented tunicate cellulose nanocrystals in polymeric networks. *Composites Part B*, 197, 108118.
- Huang, Y., Zhan, H., Lia, D., Tian, H., & Chang, C. (2019). Tunicate cellulose nanocrystals modified commercial filter paper forefficient oil/water separation. *Journal of Membrane Science*, 591, 117362.
- Iannelli, F., Griggio, F., Pesole, G., & Gissi, C. (2007). The mitochondrial genome of *Phallusia mammillata* and *Phallusia fumigata* (Tunicata, Ascidiacea): high genome plasticity at intra-genus level. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 155.
- Iwamoto, S., Kai, W., Isogai, A., & Iwata, T. (2009). Elastic modulus of single cellulose microfibrils from tunicate measured by atomic force microscopy, *Biomacromolecules*, 10 (9), 2571-2576.
- Jonoobi, M., Oladi, R., Davoudpour, Y., Oksman, K., Dufresne, A., Hamzeh, Y., & Davoodi, R. (2015). Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. *Cellulose*, 22, 935-969.

- Kalia, S., Kaith, B., & Kaur, I. (2011). Cellulose fibers: bio-and nano-polymer composites: green chemistry and technology. Springer Science ve Business Media, 2011.
- Karahan, A., Öztürk, E., Temiz, B., & Blanchoud, S. (2022). Studying Tunicata WBR Using *Botrylloides anceps*. In: Blanchoud S., Galliot B. (eds) Whole-Body Regeneration. Methods in Molecular Biology, vol 2450. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2172-1_16
- Khandelwal, M., Windle, A. H. (2013). Self-assembly of bacterial and tunicate cellulose nanowhiskers. *Polymer*, 54, 5199e5206.
- Khanjani, P., King, A. W. T., Partl, G. J., Johansson, L. S., Kostianen, M. A., & Ras, R. H. A. (2018). Superhydrophobic Paper from Nanostructured Fluorinated Cellulose Esters. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10, 11280-11288.
- Kimura, S., & Itoh, T. (1996). New cellulose synthesizing complexes (terminal complexes) involved in animal cellulose biosynthesis in the tunicate, *Metandrocarpa uedai*. *Protoplasma*, 194, 151-163.
- Kimura, S., Ohshima, C., Hirose, E., Nishikawa, J., & Itoh, T. (2001). Cellulose in the house of the appendicularian *Oikopleura rufescens*. *Protoplasma*, 216, 71-74.
- Kimura, S., & Itoh, T. (2007). Biogenesis and Function of Cellulose in the Tunicates. In: Brown R.M., Saxena I.M. (eds) Cellulose: Molecular and Structural Biology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5380-1_13.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 3358-3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 5438-5466.
- Kono, H., Yunoki, S., Shikano, T., Fujiwara, M., Erata, T., & Takai, M. (2002). CP/MAS ¹³C NMR Study of Cellulose and Cellulose Derivatives. 1. Complete Assignment of the CP/MAS ¹³C NMR Spectrum of the Native Cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 7506-7511.
- Kono, H., Hashimoto, H., & Shimizu, Y. (2015). NMR characterization of cellulose acetate: Chemical shift assignments, substituent effects, and chemical shift additivity. *Carbohydrate Polymers*, 118, 91-100.
- Koo, Y. S., Wang, Y. S., You, S. H. & Kim, H. D. (2002). Preparation and properties of chemical cellulose from ascidian tunic and their regenerated cellulose fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 85, 1634-1643.

- Lagerwall, J. P. F., Schütz, C., Salajkova, M., Noh, J. H., Park, J. H., Scalia, G., & Bergström L. (2014). Cellulose nanocrystal based materials: from liquid crystal self-assembly and glass formation to multifunctional thin films. *NPG Asia Materials*, 6, e80.
- Le, V. H. (2015). Nanocellulose from Different Cellulose Sources and Their All-Cellulose Composite Properties, Program in Paper Technology Engineering, Department of Bio-Based Materials, Graduate school Chungnam National University, May 2015.
- Lemaire, P. (2009). Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. *Developmental Biology*, 332(1), 48-60.
- Lemaire, P., & Piette, J. (2015). Tunicates: exploring the sea shores and roaming the open ocean. A tribute to Thomas Huxley. *Open Biology*, 5(6), 150053.
- Lima, M. M. D., Wong, J. T., Paillet, M., Borsali, R., & Pecora, R. (2003). Translational and rotational dynamics of rodlike cellulose whiskers. *Langmuir*, 19, 24-29.
- Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, *European Polymer Journal*, 59, 302-325.
- Ma, H. Y., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2012). Ultrafine cellulose nanofibers as efficient adsorbents for removal of UO₂²⁺ in water. *ACS Macro Letters*, 1, 213-216.
- Makarem, M., Lee, C. M., Kafle, K., Huang, S., Chae, I., Yang, H., Kubicki, J. D., & Kim, S. H. (2019). Probing cellulose structures with vibrational spectroscopy. *Cellulose*, 26, 35-79.
- Maldonado, M., Aguilar, R., Bannister, R. J., Bell, J. J., Conway, K. W., Dayton, P. K.,...& Young, C. M. (2015). Sponge Grounds as Key Marine Habitats: A Synthetic Review of Types, Structure, Functional Roles, and Conservation Concerns. In: Rossi S., Bramanti L., Gori A., Orejas Saco del Valle C. (eds) *Marine Animal Forests*. pp. 1-39. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5_24-1
- Mariano, M., El Kissi, N., & Dufresne, A. (2014). Cellulose Nanocrystals and Related Nanocomposites: Review of some Properties and Challenges. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 52, 791–806.
- Matthysse, A. G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A. R., & Smith, W. C. (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *PNAS*, 101(4), 986-991.
- McDougall, A., Hebras, C., Gomes, I., & Dumollard, R. (2020). Gene Editing in the Ascidian *Phallusia mammillata* and Tail Nerve Cord Formation. Chapter in *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), DOI: 10.1007/978-1-0716-0974-3_13.

- Miroğlu, A. & Yalçın, M. (2020). Ordu İli (Türkiye) Ascidiacea (Tunicata, Chordata) Faunası Üzerine Bir Araştırma. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10 (1), 624-635.
- Mondal, S. (2017). Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials. *Carbohydrate Polymers*, 163, 301-316.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40, 3941-3994.
- Moon, S. M., Heo, J. E., Jeon, J., Eom, T., Jang, D., Her, K., Cho, W., Woo, K., Wie, J. J., & Shim, B. S. (2021). High crystallinity of tunicate cellulose nanofibers for high-performance engineering films. *Carbohydrate Polymers*, 254, 117470.
- Mu, R., Hong, X., Ni, Y., Li, Y., Pang, J., Wang, Q., Xiao, J. & Zheng, Y. (2019). Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 136-144.
- Muir, P. R., Wallace, C. C., Pichon, M., Bongaerts, P. (2018). High species richness and lineage diversity of reef corals in the mesophotic zone. *Proceedings of the Royal Society B*, 285, 20181987.
- Nakashima, K., Sugiyama, J., & Satoh, N. (2008). A spectroscopic assessment of cellulose and the molecular mechanisms of cellulose biosynthesis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Marine Genomics*, 1, 9-14.
- Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., & Rahmat, A. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites, Part B*, 75, 176-200.
- Ocean Bergen, 2020. Marine culture. (2020, 10 Ekim). 10.10.2020 tarihinde <https://www.oceanbergen.no/concept/> adresinden erişildi.
- Oh, K. S., Kim, J.S., & Heu, M. S. (1997). Food Constituents of Edible Ascidiaceans *Halocynthia roretzi* and *Pyura michaelseni*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 29, 955-962.
- Ong, K. J., Shatkin, J. A., Nelson, K., Ede, J. D., & Retsina, T. (2017). Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization, *NanoImpact*, 6, 19-29.
- Oun, A. A., & Rhim, J. W. (2016). Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 150, 187-200.

- Özalp, H.B., 2013. Taxonomic and Ecological Characteristics of Hard Coral Species (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia) distributed in the Dardanelles. PhD Thesis, Çanakkale Onsekiz Mart University.
- Özalp, H. B., & Alparslan, M. (2016). Scleractinian diversity in the Dardanelles and Marmara Sea (Turkey): morphology, ecology and distributional patterns. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 45(2), 259-285.
- Ozalp, H. B., Alparslan, M., Okudan-Aslan, E. S., Aysel, O., & Aysel, V. (2017). A Preliminary Biodiversity Survey in Three Shipwrecks in the Dardanelles (Marmara Sea, Turkey). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(12), 6986-6991.
- Peng, B. L., Dhar, N., Liu, H. L., & Tam, K. C. (2011). Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: A nanotechnology perspective. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(5), 1191-1206.
- Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1277-1286.
- Ramesh, C., Tulasi, B. R., Raju, M., Thakur, N., & Dufossé, L. (2021). Marine Natural Products from Tunicates and Their Associated Microbes. *Marine Drugs*, 19, 308.
- Rånby, B. G. (1951). Fibrous macromolecular systems. Cellulose and muscle. The colloidal properties of cellulose micelles. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 158-164.
- Rasheed, M., Jawaid, M., Karim, Z., & Abdullah, L. C. (2020). Morphological, Physiochemical and Thermal Properties of Microcrystalline Cellulose (MCC) Extracted from Bamboo Fiber. *Molecules*, 25, 2824.
- Reaka-Kudla, M. L. (1997). The global biodiversity of coral reefs: A comparison with rainforests. In: Reaka-Kudla, M. L., D. E. Wilson, and E. O. Wilson (eds.), *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Natural Resources*, pp.83-108. Joseph Henry/National Academy Press, Washington, D. C.
- Rol, F., Belgacem, M. N., Gandini, A., & Bras, J. (2019). Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. *Progress in Polymer Science*, 88, 241-264.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S., & Barnes, R. D. (2004). *Invertebrate Zoology*, 7th edition. Cengage Learning. p. 940. ISBN: 978-81-315-0104-7.
- Sacui, I. A., Nieuwendaal, R. C., Burnett, D. J., Stranick, S. J., Jorfi, M., Weder, C., Foster, E. J., Olsson, R. T. & Gilman, J. W. (2014). Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods. *ACS Applied Materials & Interfaces* 6 (9), 6127-6138.

- Sagane, Y., Zech, K., Bouquet, J. M., Schmid, M., Bal, U., & Thompson, E. (2010). Functional specialization of cellulose synthase genes of prokaryotic origin in chordate larvaceans. *Development*, *137*, 1483-1492.
- Saha, A., Yadav, R., & Rajendran, N. (2014). Biomaterials from Sponges, Ascidians and Other Marine Organisms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *27*(2), 100-109.
- Sakamoto, N., & Stoyanov, E. (2020). Differential Analysis of O-(2-hydroxypropyl) cellulose by Using Two-Dimensional ¹H-NMR Spectroscopy. *Journal of Biomedical Sciences and Engineering*, *6*(1), 010-015.
- Sasakura, Y., Mita, K., Ogura, Y., & Horie, T. (2012). Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Development, Growth & Differentiations*, *54*(3), 420-437.
- Seo, H. C., Edvardsen, R. B., Maeland, A. D., Bjordal, M., Jensen, M. F., Hansen, A., Flaate, M., Weissenbach, J., Lehrach, H., & Wincker, P. (2004). Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature*, *431*, 67-71.
- Shenkar, N., & Swalla, B. J. (2011). Global Diversity of Ascidiacea. *PLoS ONE*, *6*(6), e20657.
- Shezad, O., Khan, S., Khan, T., & Park, J. K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, *82*, 173-180.
- Sim, K., Ryu, J., & Youn, H. J. (2013). Effect of the Number of Passes through Grinder on the Pore Characteristics of Nanofibrillated Cellulose Mat. *Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry*, *45*, 35-41.
- Sim, K., Youn, H. J., Ahn, J., Lee, J., Lee, H., & Jo, Y. (2014). Surface Modification of Nanofibrillated Cellulose by LbL (Layer-by-Layer) Multilayering and its Effect on the Dewatering Ability of Suspension. *Journal of Korea Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, *46*, 46-55.
- Siro, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, *17*, 459-494.
- Tang, Y., Shen, X., Zhang, J., Guo, D., Kong F., & Zhang, N. (2015). Extraction of cellulose nano-crystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Carbohydrate Polymers*, *125*, 360-366.

- Temiz, B., Öztürk, E., & Karahan, A. (2019). Phylogeographic resolution of *Botrylloides leachii* (Savigny, 1816) from the North-eastern Mediterranean Sea. *Ecology and Evolutionary Biology*, Ankara, Türkiye, 10 - 12 Temmuz 2019, ss.42.
- Thakur, V. K. (2015a). *Lignocellulosic polymer composites: Processing, characterization, and properties*, John Wiley and Sons.
- Thakur, V. K. (2015b). *Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons.
- Thomas, B., Raj, M. C., Joy, J., Moores, A., Drisko, G. L., & Sanchez, C. (2018). Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications. *Chemical reviews*, 118(24), 11575-11625.
- Trache, D., Hazwan Hussin, M., Mohamad Haafiz, M. K., & Thakur, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production, *Nanoscale*, 5.
- Trilokesh, C., & Uppuluri, K. B. (2019). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from jackfruit peel. *Scientific Reports*, 9, 16709.
- Trincone, A. (2017). Enzymatic Processes in Marine Biotechnology. *Marine Drugs*, 15(4), 93.
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V., & Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 14832 - 14849.
- Ueki, T., Takemoto, K., Fayard, B., Salomé, M., Yamamoto, A., Kihara, H., Susini, J., Scippa, S., Uyama, T., & Michibata, H. (2002). Scanning X-ray Microscopy of Living and Freeze-Dried Blood Cells in Two Vanadium-Rich Ascidian Species, *Phallusia mammillata* and *Ascidia Sydneiensis samea*. *Zoological Science* 19, 27-35.
- UEPA, (2006). UEPA (United States Environmental Protection Agency), Marine ecosystems. 10 Ekim 2020 tarihinde <http://www.epa.gov/bioiweb1/aquatic/marine.html>. adresinden erişildi.
- Ulman, A. (2016). *Aylin's Mediterranean Alien Species (Macroinvertebrates) Identification Booklet*. file:///C:/Users/ASUS/Downloads/Aylin%E2%80%99s-Mediterranean-Alien-Species-Macroinvertebrates-Identification-Booklet.pdf (Erişim tarihi: 30.05.2022)
- Uysal, A. (1976). Ascidiens in Turkish Waters (in Turkish). *İ.Ü. Fen Fakültesi Hidrobiyoloji, Araştırma Enstitüsü Yayınları*, 15 (29).

- Vandepas, L. E., Oliveira, L. M., Lee, S. S. C., Hirose, E., Rocha Ri M., & Swalla, B. J. (2015). Biogeography of *Phallusia nigra*: is it really black and white? *Biology Bulletin*, 228(1), 52-64.
- Vargas-Ángel, B., Godwin, L. S., Asher, J., & Brainard, R. E. (2009). Invasive didemnid tunicate spreading across coral reefs at remote Swains Island, American Sāmoa. *Coral Reefs*, 28, 53.
- Wang, J., Lia, X., Cheng, Q., Lva, F., Chang, C., & Zhang, L. (2020). Construction of β -FeOOH@tunicate cellulose nanocomposite hydrogels and their highly efficient photocatalytic properties. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115470.
- Wang, J., Cheng, Q., Feng, S., Zhang, L., & Chang, C. (2021). Shear-aligned tunicate-cellulose-nanocrystal-reinforced hydrogels with mechano-thermo-chromic properties. *Journal of Materials Chemistry C*, 19, 2021.
- Wei, P., Chen, W., Song, Q., Wu, Y., & Xu, Y. (2021). Superabsorbent hydrogels enhanced by quaternized tunicate cellulose nanocrystals with adjustable strength and swelling ratio. *Cellulose*, 28, 3723-3732.
- Wikipedia, (2020). *Phallusia mammillata*. (2016, 13 Mayıs). Wikipedia, The free Encyclopedia içinde. 10. Ekim 2020 tarihinde https://en.wikipedia.org/wiki/Phallusia_mammillata adresinden erişildi.
- Xu, D., Cheng, Y., Wu, S., Zou, Q., Mondal, A. K., Ning, D., & Huang, F. (2022). Study on the effect of tunicate cellulose nanocrystals in the preparation of sodium alginate-based enteric capsule. *Cellulose*, 29, 2497-2511.
- Yasuo, H., & McDougall, A. (2018). Practical Guide for Ascidian Microinjection: *Phallusia mammillata*. In: Sasakura, Y. (eds) Transgenic Ascidians. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1029. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7545-2_3
- Yuan, H., Nishiyama, Y., Wada, M., & Kuga, S. (2006). Surface acylation of cellulose whiskers by drying aqueous emulsion. *Biomacromolecules*, 7, 696-700.
- Zhang, C., & Kim, S. K. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine Drugs*, 8(6), 1920-1934.
- Zhao, Y., & Li, J. (2014). Excellent chemical and material cellulose from tunicates: diversity in cellulose production yield and chemical and morphological structures from different tunicate species. *Cellulose*, 21, 3427-3441.
- Zhao, Y., Zhang, Y., Lindström, M. E., & Li, J. (2015). Tunicate cellulose nanocrystals: Preparation, neat films and nanocomposite films with glucomannans. *Carbohydrate Polymers*, 117, 286-296.

- Zhao, Y., & Li, J. (2016). Ascidian Bioresources: Common and Variant Chemical Compositions and Exploitation Strategy - Examples of *Halocynthia roretzi*, *Styela plicata*, *Ascidia* sp. and *Ciona intestinalis*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 71, 165-180.
- Zhao, Y., Moser, C., Lindström, M. E., Henriksson, G., & Li, J. (2017). Cellulose Nanofibers from Softwood, Hardwood, and Tunicate: Preparation–Structure–Film Performance Interrelation. *ACS Applied Materials Interfaces*, 9, 13508-13519.
- Zhao, Y., Moser, C., & Henriksson, G. (2018). Transparent composites made from tunicate cellulose membranes and environmentally friendly polyester. *ChemSusChem* 11(10), 1728-1735.
- Zhu, Q., Zhou, R., Liu, J., Sun, J., & Wang, Q. (2021). Recent Progress on the Characterization of Cellulose Nanomaterials by Nanoscale Infrared Spectroscopy. *Nanomaterials*, 11, 1353.

ÖZGEÇMİŞ

Özge CESUR 1991 yılında Düzce/Merkez’de dünyaya geldi. İlköğretimi İsmetpaşa İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini Düzce Arsal Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya bölümünden mezun oldu. 2014-2017 yılları arasında Düzce Nobel İlaç San. Tic. A.Ş.’de Kalite Kontrol Uzman Yardımcısı, 2018-2020 yılları arasında Kırklareli Farma-Tek İlaç San. Tic. LTD. ŞTİ’de Kalite Kontrol Uzmanı ve 2020-2021 yılları arasında Tekirdağ Polifarma İlaç San. Tic. A.Ş.’de Ar-ge Uzmanı olarak çalıştı. 2021 yılından beri Kocaeli Santa-Farma İlaç San. Tic. A.Ş.’de Ar-Ge Farmasötik Analitik Geliştirme Analisti olarak çalışmaya devam etmektedir. 2019’da Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başlamış olup, tez aşamasındadır.