



**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

MİKROALGLERİN KİTİN KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra TUNALIER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

TEMMUZ 2022

**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

MİKROALGLERİN KİTİN KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra TUNALIER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mete YILMAZ

TEMMUZ 2022



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Kübra TUNALIER

İmzası :

X X X X



Canum Aileme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın bütün aşamalarında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, istediğim alanda çalışmam için her türlü imkânı sağlayan ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mete YILMAZ'a,

Laboratuvar aşamalarında her daim desteklerini ve yardımlarını gördüğüm değerli ekip arkadaşlarım Araş. Gör. Kübra ŞENTÜRK, V. Esra DÖKÜMCÜOĞLU, ve Araş. Gör. Nazlı SOYDAN'a,

Çalışmamın önemli bir adımında yardımlarını esirgemeyen değerli Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER'e ve doktora öğrencisi Araş. Gör. Elife KILDALI'ya,

Ve hayatım boyunca sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim, beni cesaretlendiren ve bana güvenen sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez Tübitak proje no 121N251 kapsamında gerçekleştirilmiştir. Maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Temmuz 2022

Kübra TUNALIER
(Biyomühendis)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ... ..	1
1.1 Kitin.....	2
1.1.1 Kitin ve türevlerinin kullanım alanları.....	6
1.1.1.1 Biyomedikal uygulamaları	6
1.1.1.2 İlaç ve kozmetik uygulamaları	6
1.1.1.3 Gıda alanı uygulamaları	7
1.1.1.4 Tarım alanı uygulamaları.....	7
1.2 Mikroalgler ve Kitin.....	8
2. MALZEME VE YÖNTEM	11
2.1 Seri Dilüsyon ve Tek Hücre İzolasyonu	11
2.2 Diatom Suşunun Büyüme Koşulları.....	13
2.3 Diatom Suşunda Türün Belirlenmesi ve Genetik Analizler	15
2.3.1 DNA izolasyonu.....	15
2.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	16
2.3.3 Jelde yürütme	17
2.3.4 Jelden DNA ekstraksiyonu.....	17
2.3.5 Filogenetik Analizler.....	18
2.4 Mikroalg Suşlarında Kitin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu ..	18
2.4.1 Kitin izolasyonu	18
2.4.1.1 Kitin eldesi metodu optimizasyonu.....	20
2.4.2 Kitin karakterizasyonu	20
2.4.2.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ile kitin analizi	20
2.5 Kitin Yapısının ve Diatom Hücrelerinin Mikroskopik Olarak Görüntülenmesi	21
2.6 Kitin Çözücüsü ve Testler	22
2.6.1 Kitin çözücüsü.....	22
2.6.2 Sitotoksikite testleri	22
2.6.2.1 Nötral Kırmızı Alım (NKA) yöntemi ile sitotoksikitenin belirlenmesi	22
2.6.2.2 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksikitenin belirlenmesi.....	24

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1 Tek Hücre İzolasyonu ve Büyüme Koşulları	26
3.2 Filogenetik Analizler	27
3.3 Kitin İzolasyonu, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	28
3.3.1 Kitin eldesi metodu optimizasyonu	30
3.3.2 FTIR ile kitin karakterizasyonu	31
3.4 Kitin Yapısının ve Diatom Hücrelerinin Mikroskopik Olarak Görüntülenmesi	33
3.4.1 Sitotoksite testleri	39
3.4.1.1 NKA (Nötral Kırmızısı Alım) testi	39
3.4.1.2 MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi	40
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51



KISALTMALAR

dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
g	: Gram
GlcN	: D-glukozamin
GlcNAc	: N-asetil-D-glikozamin
ITS	: Internal Transcribed Spacer
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NKA	: Nötral Kırmızı Alım
PBS	: Phosphate Buffer Solution
PLA	: Polilaktik asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
sa.	: Saat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
sn.	: Saniye
TBE	: Tris Borate EDTA

SEMBOLLER

°C : Santigrat Derece

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

μ : Mikro



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 : Mikroalglerden, kitin ürettiği bilinen ve genomunda kitin sentez genleri bulunan türler.	10
Çizelge 2.1 : Stok solüsyonları ve miktarları.....	14
Çizelge 2.2 : Eser element solüsyonu içeriği ve miktarları.....	14
Çizelge 2.3 : Vitamin stoğu içeriği ve miktarları.....	15
Çizelge 3.1 : Farklı sürelerde vorteksleme sonucunda elde edilen kitin miktarı (mg/75 ml). Değerler $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.....	29
Çizelge 3.2 : Farklı sürelerde SDS muamelesi ile kitin örneklerinin kuru ağırlığındaki % protein içeriği değişimi	31
Çizelge 3.3 : Kitinin yapısında olan fonksiyonel gruplar ve FTIR spektroskopisinde verdiği dalga sayısı aralıkları.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Kitin kaynağı olan bazı türler 1) Antarctic kril, 2) hamam böceği, 3) sünger, 4) ıstakoz, 5) mantar, 6) yengeç, 7) diatom (<i>Thalassiosira pseudonana</i>)	2
Şekil 1.2 : Sırasıyla, kitinin ve selülozun kimyasal yapıları	3
Şekil 1.3 : Kitin formları 1) alfa-kitin, 2) beta-kitin, 3) gama-kitin	4
Şekil 1.4 : Kitin (üst) ve kitosanın (alt) kimyasal yapısı	5
Şekil 2.1 : Seri dilüsyon plakası	12
Şekil 2.2 : Tek hücre izolasyonu şematik gösterimi	13
Şekil 3.1 : Diatom kültürünün farklı hacimlerde görüntülenmesi	26
Şekil 3.2 : ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 genlerini içeren bölge için Maksimum Olabilirlik (ML) filogenetik ağacı	28
Şekil 3.3 : Diatom kültüründen izole edilen kitin	29
Şekil 3.4 : Bovin serum albumin (BSA) standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve kullanılacak denklem	30
Şekil 3.5 : Elde edilen kitinin FTIR spektroskopisi ile karakterizasyonu	32
Şekil 3.6 : Farklı iki sürede SDS muamelesi ile saflaştırılan kitin örneklerinin FTIR spektroskopisi ile karşılaştırılması	33
Şekil 3.7 : Diatom hücrelerinin ters faz kontrast mikroskobu görüntüleri 1) 40x, 2) 20x büyütme	33
Şekil 3.8 : Diatom hücrelerinin üstten SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (4000x), 2) HCl ile muamele edilen (4000x), 3) H ₂ O ₂ ile muamele edilen (4000x)	35
Şekil 3.9 : Diatom hücrelerinin yandan SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (3000x), 2) HCl ile muamele edilen (5000x), 3) H ₂ O ₂ ile muamele edilen (3500x)	36
Şekil 3.10 : Diatom hücrelerinin SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (1500x), 2) HCl ile muamele edilen (2000x), 3) H ₂ O ₂ ile muamele edilen (1500x)	37
Şekil 3.11 : Diatom hücrelerinden elde edilen kitinin SEM görüntüleri (üst) 5000x, 2) 50000x büyütme	38
Şekil 3.12 : NKA yöntemine göre kitinin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması	39
Şekil 3.13 : MTT yöntemine göre kitinin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması	40

MİKROALGLERİN KİTİN KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

ÖZET

Kitin, *N*-asetil-D-glikozamin (GlcNAc) birimlerinin β 1- β 4 bağlarının bir araya gelmesi sonucu oluşan yapısal bir biyopolimerdir. Kimyasal yapısı selüloza ve en yaygın kullanılan türevi kitosana benzemektedir. Ancak bu üç polimer, ikinci karbonlarında farklı fonksiyonel grupların bulunması sebebiyle birbirlerinden ayrılmaktadır. Kitin, yapısında ikinci karbonuna bağlı asetamid (-NHCOCH₃) grubu içermektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olan kitin; jelleşmiş formda da, katı formda da kullanılabilir. Diatomlar; silika yapılu frustül adı verilen hücre duvarları olan tek hücreli mikroalglerdir ve β -kitin formunda kitin ürettiği kanıtlanmış bazı türleri içermektedir. Bu alanda en çok çalışma bulunan diatom cinsleri *Cyclotella* ve *Thalassiosira*'dır.

Bu tez çalışmasında, sentrik bir diatom türü ile çalışılmıştır. Tek hücre çekilen türden yoğun kültür oluşturulmuş ve bu kültürden kitin izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen diatom türünün genetik karakterizasyonu, kitinin ise yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ve kitinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve ters faz kontrast mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki kitinin fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve Nötral Kırmızı Alım (NKA) testleri ile yorumlanmıştır.

Karakterizasyonlar sonrası; diatom hücresi Thalassiosirales takımına ait bir tür olarak tanımlanmış ve elde edilen malzemenin β formunda kitin olduğu sonucuna varılmıştır. İzole edilen kitin konsantrasyonu yaklaşık olarak 25 mg/L'dir. Sitotoksikite testleri, kitinin 50 μ g/ml'ye kadar toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Diatom, kitin, β -kitin, biyoteknoloji

USAGE OF MICROALGAES AS A SOURCE OF CHITIN

SUMMARY

Chitin is a structural biopolymer formed as a result of β 1- β 4 bonds of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units. Its chemical structure is similar to cellulose and its most widely used derivative, chitosan. However, these three polymers differ from each other due to the presence of different functional groups on their second carbon. Chitin contains acetamide (-NHCOCH₃) group attached to its second carbon in its structure. The chitin, which has a wide range of uses can be used in gel form or solid form. Diatoms are single-celled microalgae with cell walls called frustules made of silica and contain some species proven to produce chitin in the form of β -chitin. The most studied diatom genus in this field are *Cyclotella* and *Thalassiosira*.

In this thesis, a centric diatom species was studied. Intensive culture was formed from the single-celled strain, and chitin was isolated from this culture. The genetic characterization of the obtained diatom species and the structural characterization of chitin were performed. Images of cells and chitin were taken with scanning electron microscopy (SEM) and inverted phase contrast microscopy. The effect of chitin on the viability of fibroblast cells at different concentrations was interpreted by cytotoxicity tests 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red uptake assays.

After characterizations; the diatom cell was defined as a species belonging to the order Thalassiosirales and it was concluded that the material obtained was chitin in the β form. The concentration of isolated chitin was approximately 25 mg/L. The cytotoxicity tests have resulted in chitin not showing any toxic effects up to 50 μ g/ml.

Keywords: Diatom, chitin, β -chitin, biotechnology

1. GİRİŞ

Kitin; yengeç ve ıstakoz gibi kabuklu deniz canlıları ve bazı böcekler tarafından üretilen ve mantarların hücre duvarında bulunan yapısal bir biyopolimerdir. Canlılar bu yapıyı üretmeleri sayesinde dış etkenlere karşı korunmaktadırlar (Spinde ve diğ, 2011).

Kitin, *N*-asetil-D-glikozamin (GlcNAc) birimlerinin β 1- β 4 bağlarının (poli- $[\beta$ -(1-4)-2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukopiranoz]) bir araya gelmesi sonucu oluşur ve yapısal olarak selüloz ve kendi türevi olan kitosana benzemektedir (Shigemasa ve Minami, 1996; Spinde ve diğ, 2011).

Moleküler yapıdaki asetil gruplarının düzenlenmesinden kaynaklı olarak α - (alfa), β - (beta) ve γ - (gama) olmak üzere üç farklı kristal polimorfik formda bulunabilen kitin, canlıdan canlıya göre bulunduğu form değişiklik göstermektedir (Synowiecki ve diğ, 2010; Francesko ve diğ, 2010)

Kitin ve türevleri; yara örtüsü malzemesi, kontakt lens, ameliyat ipliği ve daha pek çok biyomedikal uygulamada, kozmetiklerin, diş macunlarının, el ve vücut kremlerinin bir içeriği olarak bakım uygulamalarında, gıda sektöründe ambalaj üretiminde ve tarım sektörü uygulamalarında kullanılmaktadır. Jel, lif, film gibi formlarda ve yapılarda kullanılabilir. Ancak yaygın üretim kaynağı olarak deniz canlıları görülsede; kaynak miktarının belirsizliği, maliyet, sterilizasyon, saflaştırma gibi problemler ortaya çıkmaktadır (Synowiecki ve diğ, 2010; Anitha ve diğ, 2014). Bunlara alternatif olarak, yapılan çalışmalar bazı alg türlerinin de kitin içerdiğini göstermektedir (Durkin ve diğ, 2009).

Diatomlar, özellikle sentrik yapıdakiler, algal kitin alanında yapılan çalışmalarda yer almakta ve hücre duvarlarından uzanan β -kitin formunda kitin fiberlerini üretmektedirler. Bu alanda en çok çalışma *Thalassiosira* ve *Cyclotella* cinslerine ait türlerdir (Chiriboga ve Rorrer, 2018).

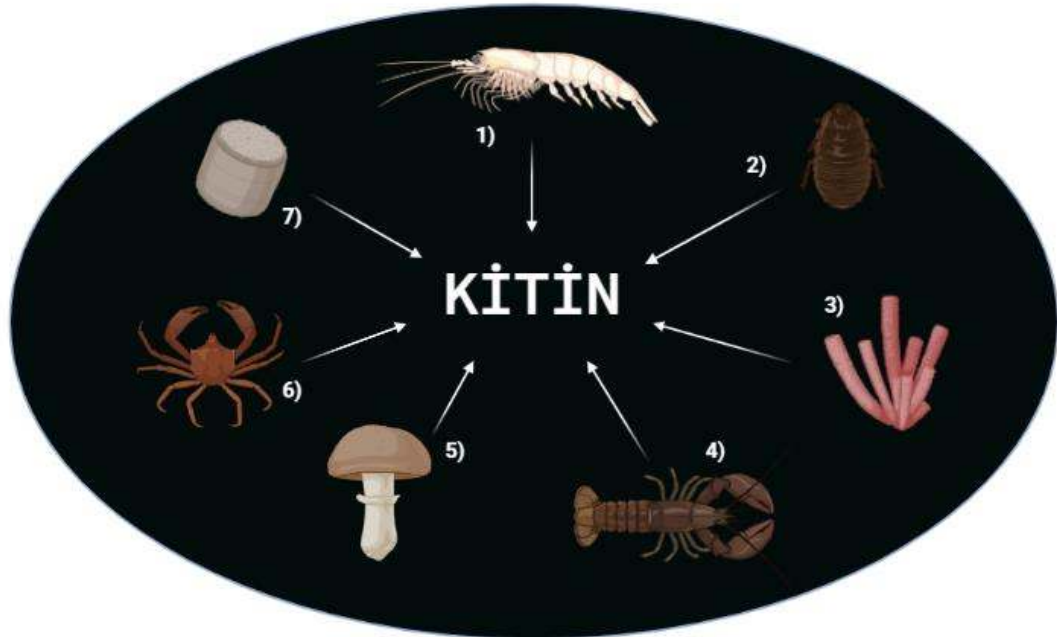
Bu tez çalışmasında, kitin ürettiği düşünülen diatom hücresi tek hücre izolasyonu ile saflaştırılmış ve büyük hacme kadar kültürlenmiştir. İzole edilen diatom hücresinin

genetik karakterizasyonları yapılmıştır. SEM ve ters faz kontrast mikroskobu ile hem hücre hem de elde edilen kitin iplikleri görüntülenmiştir.

Yoğun kültür haline gelen diatom kültüründen kitin izole edilmiş, FTIR spektroskopisi ile kitinin karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen kitinin farklı konsantrasyonlarda sitotoksik aktivitesi incelenmiştir.

1.1 Kitin

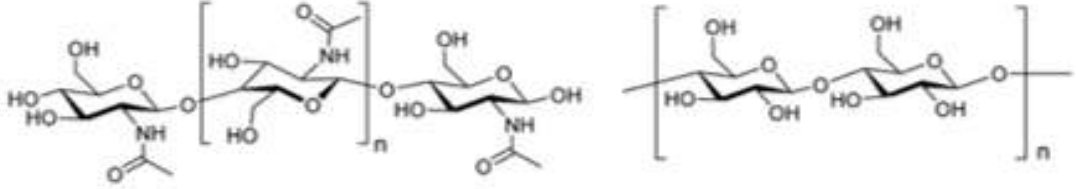
Kitin selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, ıstakoz, karides, kril gibi kabuklu deniz ürünleri ve eklembacaklılarda, yumuşakçalar ve süngerler gibi omurgasız hayvanlarda, mantarlarda, mayalarda ve bazı tek hücreli alg türlerinde (diatomlar) bulunmaktadır (Şekil 1.1). Bu canlılar, iskeletlerini veya hücre duvarlarını kitini kullanarak güçlendirmekte ve kitini destekleyici ve koruyucu bir malzeme olarak görmektedir. Böylece hayatta kalma şanslarını arttırmaktadırlar (Spinde ve diğ, 2011; Durkin ve diğ, 2009).



Şekil 1.1 : Kitin kaynağı olan bazı türler 1) Antarctic kril, 2) hamam böceği, 3) sünger, 4) ıstakoz, 5) mantar, 6) yengeç, 7) diatom (*Thalassiosira pseudonana*).

N-asetil-D-glikozamin (GlcNAc) birimlerinin β 1- β 4 bağlarının (poli- $[\beta$ -(1-4)-2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukopiranoz]) glikozidik bağlar aracılığıyla bir araya gelmesi sonucu oluşan homopolimer yapıdaki kitin, yapısal olarak selüloza benzemektedir. Her ikisi de glikoz türevi olmasıyla birlikte, uzun ve lineer zincirli polimer yapısına

sahiptirler. Ancak kitinde ikinci karbon atomuna (C-2) bağlı asetamid ($-NHCOCH_3$) grubu bulunurken, selülozda bu karbon atomuna bağlı hidroksil ($-OH$) grubu bulunmaktadır. Bu durumda selüloz, yapısında azot (N) içermemesiyle yapısal olarak kitinden ayrılmış olmaktadır (Şekil 1.2) (Shigemasa ve Minami, 1996; Spinde ve diğ, 2011; Jayakumar ve diğ, 2011; Francesco ve diğ, 2010).

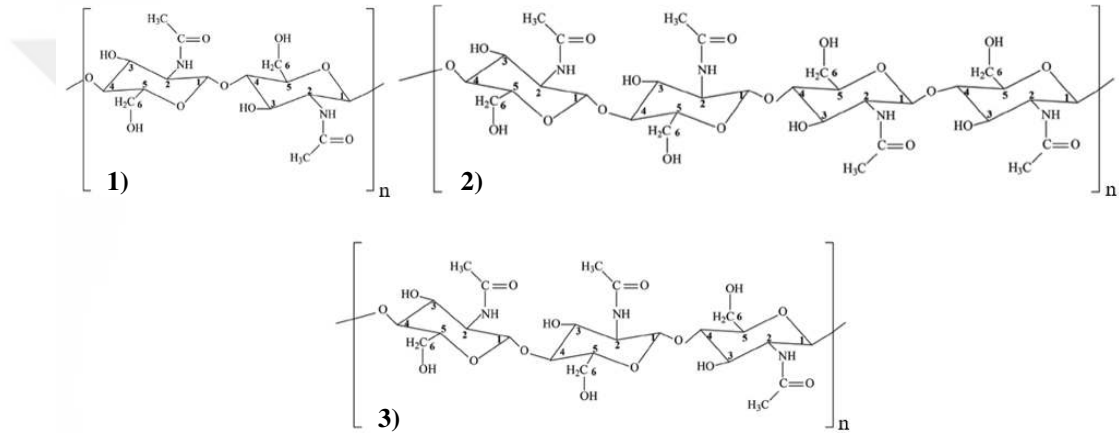


Şekil 1.2 : Sırasıyla, kitinin ve selülozun kimyasal yapıları (Perona ve diğ, 2020).

Kitin, moleküler yapıdaki asetil gruplarının düzenlenmesinden kaynaklı olarak α - (alfa), β - (beta) ve γ - (gama) olmak üzere üç farklı kristal polimorfik formda bulunabilmektedir (Şekil 1.3). Alfa-kitin, doğada en bol bulunan kitin formudur ve zincirler arası farklı yönlerde antiparalel olarak düzenlenmiştir. Yengeç, karides, ıstakoz gibi deniz ürünlerinde, böceklerde ve mantarlarda bu formda kitin bulunmaktadır. Beta-kitin, aynı yönlü iki paralel zincirden oluşan ve doğada nadir olarak bulunan bir kitin formudur. Bazı yumuşakçalarda (kalamar gibi) ve denizel diatomlarda bulunmaktadır. Gama-kitin ise, her iki monomerden sonra gelen üçüncü monomer diğer ikisine göre zıt yöne sahip olacak şekilde düzenlenmiştir. Alfa ve beta kitin formları ile ilgili bu zamana kadar pek çok çalışma yayınlanmasına rağmen, gama kitinin dağılımı ve yapısı hakkında çok az şey bilinmektedir (Francesco ve diğ, 2010; Synowiecki ve diğ, 2010; B. Rufato ve diğ, 2019; Kostag ve El Seoud, 2021; Kaya ve diğ, 2017). Rudall (Rudall, 1962; Rudall, 1963) yaptığı çalışmalar sonucunda hamamböceği, peygamberdevesi gibi böceklerde ve bazı böcek larvalarında gama kitin varlığını tespit etmiştir. Buna ek olarak kalamar ve mürekkepbalığının belli bölgelerinde bu formda kitin olduğu bilinmektedir (Harkin et al., 2019).

Beyaz, sert, elastik olmayan ve yapısında azot bulunan bir polisakkarit olan kitin; üç çeşit reaktif fonksiyonel grup içermektedir. Bunlar; C-2 konumunda bulunan asetamid ($-NHCOCH_3$) grubu, C-6 konumundaki birincil ve C-3 konumundaki ikincil hidroksil ($-OH$) grubudur ve kitinin yapısında bulunan hidrojen bağları aracılığıyla yüksek kristallliğe sahip bir moleküldür (Je ve Kim, 2006; Tamura ve diğ, 2006).

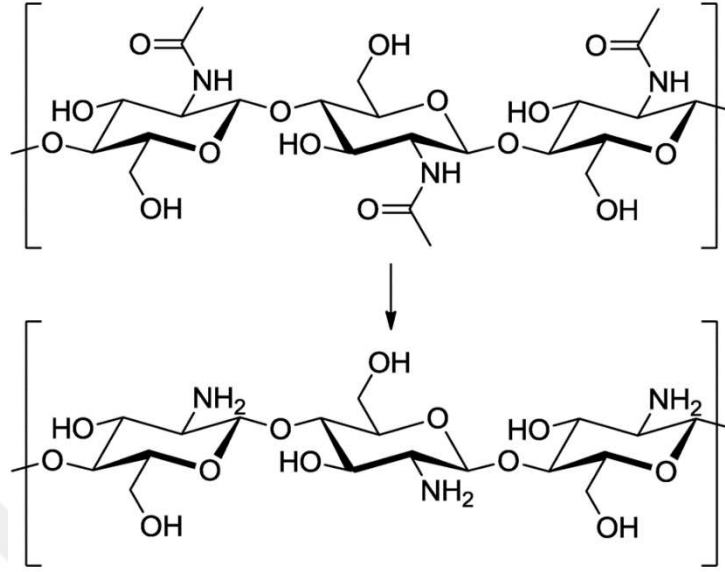
Alfa-kitin formu zincirler arası diziliş farkından kaynaklı olarak, beta-kitin formundan daha sıkı bir kristal yapı oluşturmakta ve yüksek kararlılığa sahip olmaktadır. Alfa-kitin formunda bulunan $C=O \cdots N-H$ arasındaki güçlü hidrojen bağlarının oluşturduğu sıkı ağımsı yapı, zincirler arası mesafeyi sabit tutmaktadır. Bundan kaynaklı olarak polisakkarit formunun geçirgenliği, çözünürlüğü ve sudaki şişme yeteneği sınırlı olmaktadır. Sıkı ağ yapısı beta-kitin formunda bulunmadığından, kristal içi şişmeye ve geçirgenliğe karşı alfa-kitinden daha yatkındır. Böylece alfa-kitin ve beta-kitin oranı, yapısında kitin içeren canlıların kabuklarının esnekliğini, geçirgenliğini ve sertliğini etkilemektedir (Synowiecki ve diğ, 2010; Pillai ve diğ, 2009; Minke ve Blackwell, 1978).



Şekil 1.3 : Kitin formları 1) alfa-kitin, 2) beta-kitin, 3) gama-kitin (Francesco et al., 2010).

Kitin; katı kristal yapısı, yüksek derecede asetilasyon içeriği ve molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları nedeniyle hidrofobiktir, suda ve çoğu organik çözücüde çözünmemektedir (Shigemasa ve Minami, 1996; Harkin ve diğ, 2019). Her bir çözücü sistemi için; polimer konsantrasyonu, pH, sıcaklık, asetilasyon derecesi, moleküler ağırlık gibi parametreler çözünme prosesini ve solüsyon viskozitesini etkileyebilmektedir. Kullanılan bazı çözücüler; dikloroasetik asit, trikloroasetik asit, heksafloroizopropanol, heksafloroaseton, metan sülfonik asit, lityum klorür/ dimetilasetamid (LiCl/ DMAc), kalsiyum klorür dihidrat-metanol ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - MeOH) olarak bilinmektedir. Bu çözücülerin çoğu toksik, aşındırıcı veya mutajenik olmasından dolayı tıbbi uygulamalar için kullanıma uygun görülmemektedir. Bununla birlikte; kalsiyumun toksik olmamasından dolayı, bu sistemin iyi bir çözücü olduğu düşünülmektedir. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - MeOH çözücü sisteminde kalsiyum kitine koordine olmakta ve oluşan kompleks yapı metanol içerisinde çözünmektedir. Ancak büyük

ölçekli üretim sırasında çözücünden kaynaklı yüksek viskozite, sorun olabilecek bir durum olarak görülmektedir (Synowiecki ve diğ, 2010; Pillai ve diğ, 2009).



Şekil 1.4 : Kitin (üst) ve kitosanın (alt) kimyasal yapısı (Heckel ve diğ, 2013).

Kitin, suda ve diğer çözücülerde çözünürlüğünü arttırmak amacıyla, kimyasal modifikasyonlarla türevlerine dönüştürülebilmektedir. Bunlar arasında en önemli türevi kitosandır. Kitinden farklı olarak kitosan; formik asit, asetik asit ve laktik asit gibi birçok sulu, seyreltik asit çözeltilerinde ve düşük molekül ağırlığına sahip kitosan sulu çözeltilerde çözünmektedir. Kitosan (GlcN), kitinin kısmi deasetilasyonu (molekülden asetil ($-\text{COCH}_3$) grubunun ayrılması) ile elde edilmektedir. Kitinde C-2 konumunda asetamid ($-\text{NHCOCH}_3$) grubu bulunurken, kitosanda bu karbon atomuna bağlı amin ($-\text{NH}_2$) grubu bulunmaktadır (Şekil 1.4) (Kurt ve Zorba, 2005; Shigemasa ve Minami, 1996; Synowiecki et al., 2010). Sodyum hidroksit (NaOH) veya potasyum hidroksit (KOH) solüsyonlarında (%40-60), farklı süre (0,5-24 sa.), sıcaklık (50-130 °C) ve konsantrasyonlarda muamele edilerek deasetilasyon derecesi belirlenmektedir. Bu oran %50'den %95'lere kadar çıkabilmektedir (Schmitz ve diğ, 2019; Moura ve diğ, 2011). Böylece, yapısında farklı oranlarda D-glukozamin (GlcN) ve N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) birimlerini içerebilmektedir. Bu birimlerin hem içeriği hem de sırası, polimerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini ve çözünürlük derecesini etkilemektedir (Kurt ve Zorba, 2005; Anitha ve diğ, 2014).

1.1.1 Kitin ve türevlerinin kullanım alanları

Kitin ve türevleri, N-asetilasyon derecesine bağlı olarak biyobozunur ve biyouyumlu bir malzeme olmasının yanında, antijenik ve toksik değildir (Synowiecki ve diğ, 2010; Morganti ve Li, 2011). Kitin ve türevlerinden; hidrojel, mikro/nanopartikül, membran/film, yapı iskelesi, nanolif veya sünger gibi farklı formlarda malzemeler elde edilmekte ve bu malzemelerin biyoteknoloji, tarım, gıda, kozmetik, veterinerlik, tıp, dişçilik, çevre koruma, ilaç veya tekstil sektörlerinde yoğun bir şekilde araştırmaları devam etmektedir. Aynı zamanda yararlı özelliklerinden dolayı, son zamanlarda kitinin ticari değeri artmaktadır (Synowiecki ve diğ, 2010; Anitha ve diğ, 2014; Jayakumar ve diğ, 2011). Bazı kullanım alanları aşağıda yer almaktadır.

1.1.1.1 Biyomedikal uygulamaları

Kitin ve türevleri; yara örtüsü malzemesi, kontakt lens, ameliyat ipliği ve daha pek çok uygulamada kullanılmaktadır. Kitinin hidrojel, film, yapı iskelesi, sünger gibi formları kolay uygulanabilirlik, esneklik, geçirgenlik ve biyouyumluluk özellikleri göstermektedir. Bunların yanında hidrofilik yapısından kaynaklı olarak yara ve yanık iyileştirici malzemeler olarak kabul edilmektedirler. Ayrıca, kitin filmleri yara üzerindeki su buharı dengesini kontrollü bir şekilde yapabildiği için yara iyileştirmeyi hızlandırmakta ve yaranın kurumasını önlemektedir (Anitha ve diğ, 2014; Jayakumar ve diğ, 2011; Shamshina ve diğ, 2019).

Yara iyileştirme özelliklerini geliştirmek için kitin ve türevleri; aljinat, hyaluronik asit, polietilen glikol diakrilat, poli(vinil alkol), γ -poli (glutamik asit), Ag/ZnO ve 2-hidroksietil metakrilat gibi farklı polimer türleri ile kompozit yapılar haline getirilmektedir. Bu yapılar sayesinde geliştirilen antibakteriyel aktivite, hücre tutunma kabiliyeti ve oksijen geçirgenliğine dayanarak; kitin ve kitosandan elde edilen malzemelerin önemli yara iyileştiriciler olacağı düşünülmektedir (Nakajima ve diğ, 1986; Jayakumar ve diğ, 2011).

1.1.1.2 İlaç ve kozmetik uygulamaları

Kitosan ve türevleri; kozmetiklerin, diş macunlarının, el ve vücut kremlerinin ve saç bakım ürünlerinin bir bileşeni olarak kullanılmaktadır. Moleküler ağırlığına ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak saçları mekanik hasara karşı korumasının ve saç üzerinde anti-elektrostatik bir etki göstermesinin yanında, ciltte nemlendirici bir etki

göstermektedir. Özellikle hassas ciltler için formüle edilen kozmetik ürünlerinin bir bileşeni olarak araştırılmaktadır (Synowiecki ve diğ, 2010).

Jel ve lif gibi formlardaki kitin ise; akne ya da yaşlanma karşıtı kozmetik ürünlerinde ve kemik rejenerasyonu gibi uygulamalarda, tedavi amacıyla kullanılan kimyasallar ile kompleks bir yapı oluşturabilmektedir. Bu tasarlanmış kompleks yapı, tedaviye yönelik olarak laboratuvar ortamında istenen bölgede basit difüzyon yöntemiyle ilacı salmakta ve daha sonra bozunmaktadır. Biyobozunur bir malzeme olması sebebiyle böyle bir ilaç taşıyım sistemi için uygun görülmektedir (Morganti ve Li, 2011).

1.1.1.3 Gıda alanı uygulamaları

Kitin ve/veya kitosan, deasetilasyon derecesine bağlı olarak, gıda sektöründe hem yiyeceklere katılarak hem de ambalaj üretiminde kullanılabilir. Örneğin; mayonez ve fıstık ezmesi gibi yiyeceklerde kıvam arttırıcı olarak kullanıma uygun görülmesinin yanında; polilaktik asit (PLA) gibi polimerlerle karıştırılarak hem ince, şeffaf ve esnek, hem de sert ve daha dayanıklı gıda ambalajları üretilebilmektedir (Harkin ve diğ, 2019; Morganti ve diğer, 2016). Kitin içeren gıda ambalajlarının, yiyeceklerdeki su kaybını kontrollü bir şekilde gerçekleştirmesi sebebiyle bu sektörde umut vadeden bir malzeme olarak görülmektedir (Shamshina ve diğ, 2019).

1.1.1.4 Tarım alanı uygulamaları

Kitin ve kitosanın, bitkilerde kontaminasyona ve çürümeye sebep olan fitopatojenik bakteri ve mantarların büyümesini engelleyici bir etkisinin olduğu ve bu patojenlerle savaşarak bitkilerin hastalıklardan korunmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (Synowiecki ve diğ, 2010). Mantarların hücre duvarındaki kitin, mantar enfeksiyonu esnasında bitkiler tarafından tanınır ve daha fazla mantar hasarını önlemek için bir savunma mekanizması olarak bitkide lignifikasyonu indükler. Çeşitli çalışmalar saf kitin muamelesi ile bitkilerde kitinaz enziminin aktive olduğunu göstermiştir (Asimakis ve diğ, 2022). Dolayısıyla kitin ile muamele bitkide mantar enfeksiyonlarına karşı savunma mekanizmalarını aktive etmektedir. Bu tez kapsamında izole edilen kitin de sonraki çalışmalarda öncelikli olarak bu özelliği açısından incelenecektir.

Tarımda kitinin en yaygın kullanım alanlarından biri de gübreleme sistemidir. Gübrelerdeki besinlerin yavaş yavaş salınımını sağlamasından dolayı aşırı

gübrelemeyi engellemektedir. Ayrıca, bitki büyümesine ve üretkenliğine yardımcı olduğu, bitkinin verimini/ kalitesini arttırmayı sağladığı, topraktaki ağır metalleri uzaklaştırarak toprağı iyileştirdiğı ve biyolojik ve çevresel stres koşullarına karşı bitkinin direncini arttırdığı için mahsül yetiştiriciliğinde gelecekte daha yaygın kullanılacağı öngörülen bir biyomalzeme olarak görölmektedir (Shahrajabian ve diğ, 2021; Shamshina ve diğ, 2020).

1.2 Mikroalgler ve Kitin

Mikroalglerde kitinin, lorika ve hücre duvarı gibi hücre dışı yapılarda bulunduğı geçmiştten bugüne kadar yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Lorika; protoplast etrafındaki, protoplasta genel olarak yapışık olmayan vazo şeklinde bir zardır. Bulunduğı hücreyi sarmakta olan yapı, iç içe geçmiş mikrofibrillerden oluşmaktadır. Hücrelerin büyüyüp çoğalmasıyla birlikte, hücre tarafından salgılanan fibriller aracılığıyla lorika da uzamaktadır. Yapıyı oluşturan fibriller selüloz ya da kitin fibrilleridir (Harkin ve diğ, 2019; Franke ve Herth, 1973). Lorikanın yapısı, türden türe göre değişiklik gösterebilmektedir. Halka biçimli, koni biçimli, dalgalı veya bir tarafa yönelmiş şekilde olabildiğı gibi; kırılğan veya yumuşak, şeffaf veya kalın olabilmektedir (Hilliard, 1971).

Lorika; Ochrophyta şubesinin Chrysophyceae sınıfının bazı cinslerinde (*Dinobryon*, *Chrysococcus* gibi) ve Chlorophyta şubesinin Chlorophyceae sınıfının bazı cinslerinde (*Phacotus*, *Pteromonas* ve *Dysmorphococcus* gibi) bulunmaktadır. *Dinobryon* türlerinde (*Dinobryon borgei*, *Dinobryon cylindricum*, *Dinobryon aciminatum*, *Dinobryon anulatum*, *Dinobryon sertularia*, vs.) bulunan lorika yapısı, ince selüloz fibril sisteminden oluşmaktadır. Lorika yapısının kitin fibrillerinden oluştuğı bilinen tür ise, *Ochromonas malhamensis* (*Poterioochromonas stipitata*) olarak adlandırılan Chrysophyta şubesine ait olan bir türdür (Hilliard, 1971; Herth ve Zugenmaier, 1979).

Diatomlar, silika yapılı hücre duvarlarından çıkan uzun ve ince yapılı kitin fibrilleri ürettiğı kanıtlanmış bazı türleri içermektedir. Diatomlar; silika yapılı frustül adı verilen hücre duvarları olan, karmaşık desenli tek hücreli mikroalglerdir. Hücre bölünmesi için gerekli bir substrat olarak Si(OH)₄ formundaki çözünmüş silikon gereksinimi ile ayırt edilmektedirler (Ozkan ve Rorrer, 2017a; Ozkan ve Rorrer, 2017b).

Diatomlar, sentrik (merkezli) veya pennat yapıda olabilmektedir. Bazı sentrik diatomlarda kitin iplikleri, hücre duvarındaki fultoportula adı verilen özel açıklıklardan uzamakta ve bu iplikler yüksek derecede kristal yapıda olan β -kitin formunda bulunmaktadır. Bu kitin liflerinin, diatom hücrelerinin suda sürüklenmelerini artırarak batma hızını yavaşlattığı düşünülmektedir. Hücre dışı kitin nanoliflerinin sentrik diatom olan *Cyclotella* ve *Thalassiosira* cinsleri tarafından üretildiği bilinmektedir (Wustmann ve diğ, 2020; Chiriboga ve Rorrer, 2018). Ayrıca kitin ürettiği net olarak bilinmemesine rağmen genomunda kitin sentezleyen genlerin olduğu tespit edilen bazı türler de literatürde geçmektedir (Çizelge 1.1) (Durkin ve diğ, 2009).

Kitin nanolifleri, geniş bir uygulama alanına sahiptir. Şu anda her ne kadar kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından elde edilen kitin kullanımı yaygın olsa da; mevcut kaynakların tahmin edilememesi, son ürünün saflaştırılmasının maliyetli olması ve rafine edilmesi gereken artık alerjenlerin ve kontaminantların varlığı gibi çeşitli sorunlar bulunmaktadır. Ayrıca, ham kitinin sadece küçük bir kısmının saflaştırılabilmesinden dolayı bu kaynaklardan izole edilen kitin nanolifleri tek tip olmamaktadır. Bu bağlamda, diatomlardan izole edilen saf kitin nanolifleri, orantılı boyutları, tekdüzelikleri ve saflıkları nedeniyle gelecekte değeri artacak bir biyomalzeme olarak umut vadetmektedir (Ozkan ve Rorrer, 2017a; Chiriboga ve Rorrer, 2018).

Bu tez çalışmasında, mikroalglerin kitin kaynağı olarak kullanılma potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Mudanya'dan alınan su örneklerinden izole edilmiş olan diatom suşu genetik olarak karakterize edilmiş ve *Thalassiosirales* takımına ait bir diatom türü olduğu sonucuna varılmıştır. Bu suştan elde edilen kitin fibrilleri saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Sitotoksisite testleri ile farklı konsantrasyonlarda kitinin fibroblast hücreleri üzerindeki aktivitesi incelenmiştir.

Çizelge 1.1 : Mikroalglerden, kitin ürettiği bilinen ve genomunda kitin sentez genleri bulunan türler.

Şube	Sınıf	Takım	Familya	Cins	Tür	Konum	Kaynaklar
Ochrophyta	Chrysophyceae	Ochromonadales	Ochromonadaceae	<i>Ochromonas</i>	<i>O. malhamensis</i>	Lorika	1
Bacillariophyta	Mediophyceae	Stephanodiscales	Stephanodiscaceae	<i>Cyclotella</i>	<i>C. meneghiniana</i>	Hücre duvarı	2
					<i>C. cryptica</i>		2,3
					<i>C. nana</i>		2
		Thalassiosirales	Thalassiosiraceae	<i>Thalassiosira</i>	<i>T. pseudonana</i>		4,5,6
					<i>T. guillardii</i>		7
					<i>T. punctigura</i>		7
					<i>T. weissflogii</i>		7
					<i>T. minuscula</i>		7
					<i>T. oceanica</i>		7
					<i>T. fluviatilis</i>		3
					<i>T. rotula</i>		8
			Skeletonemataceae	<i>Skeletonema</i>	<i>S. costatum</i>	Genom	7
		Bacillariales	Phaeodactylaceae	<i>Phaeodactylum</i>	<i>P. tricornutum</i>		7
		Chaetocerotales	Chaetocerotaceae	<i>Chaetoceros</i>	<i>C. socialis</i>		7
		Lithodesmiales	Lithodesmiaceae	<i>Lithodesmium</i>	<i>L. undulatum</i>		7

NOT: 1) (Herth ve diğ, 1977), 2) (Herth ve Barthlott, 1979), 3) (Blackwell, 1967) 4) (Brunner ve diğ, 2009a), 5) (Wustmann ve diğ, 2020), 6) (Tesson ve diğ, 2008), 7) (Durkin ve diğ, 2009), 8) (Brunner ve diğ, 2009b). Taksonomik sınıflandırma algaebase.org (Guiry ve Guiry, 2022) aracılığıyla yapılmıştır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

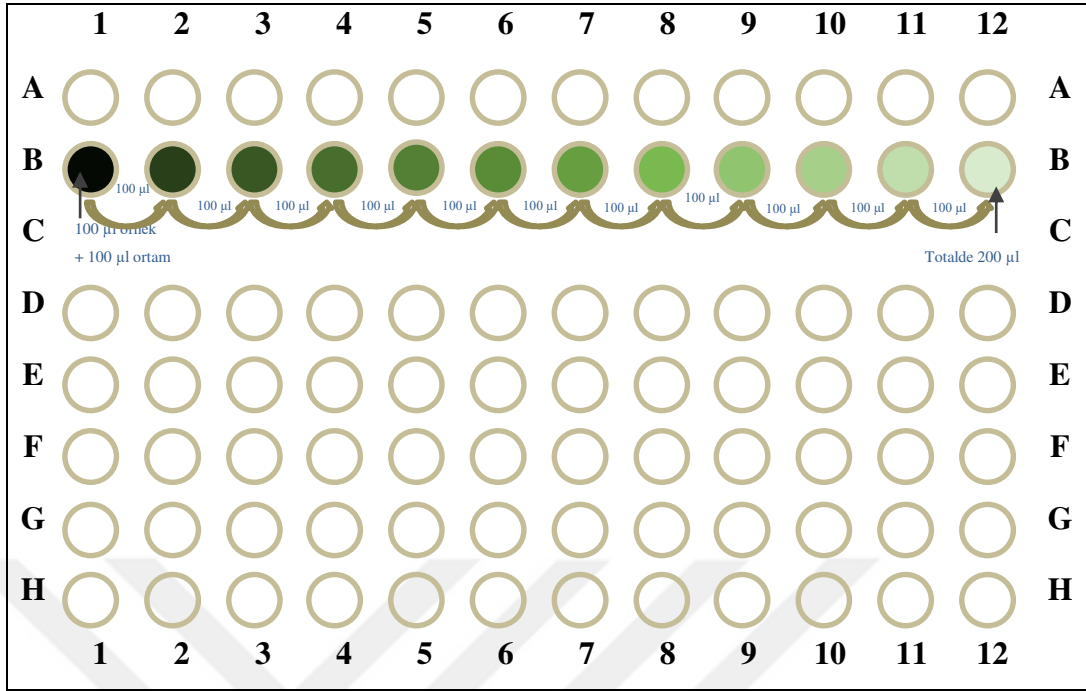
2.1 Seri Dilüsyon ve Tek Hücre İzolasyonu

2021 yılı Haziran ayında Mudanya’da toplanan örneklerin, müsilaj içeriği yoğun olan kısımdan ve sıvı kısımdan 96 kuyucuklu plakalara 22 ppt silikalı f/2 ve 22 ppt silikalı L1 ortamlarına seri dilüsyon yapılmıştır (sıvı kısım 1:1 oranında, katı kısım yaklaşık 1:10 oranında). Plakadaki türler 12 sa. gece/ 12 sa. gündüz ayarlı 23 °C sıcaklığa sabitlenmiş iklim kabininde 10 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde büyümeye bırakılmıştır ve içeriğinde bulunan türlerin çoğalması düzenli aralıklarla ters faz kontrast mikroskobu ile gözlemlenmiştir.

NOT: Seri dilüsyon: Herhangi bir kaynaktan alınan su örneğinin, 96 kuyucuklu plakalara belli ortamlarda (tatlı sulardan alınan örnekler için: Azot içeren ve içermeyen BG11 ortamları, Zarrouk ortamı gibi; tuzlu sulardan alınan örnekler için: Silikalı f/2 (f/2+Si) ve L1 (L1+Si) ortamları gibi) seyreltilerek, türlerin büyümelerini gözlemlmek ve tek hücre izolasyonu yapabilmek amacıyla ekim yapılması işlemidir. Seyreltme yapılacak örneğin yoğunluğuna göre seyreltme oranı değişebilmektedir.

Örneğin 1:1 oranında f/2+Si ortamına seyreltme yaparken;

Şekil 2.1’deki plakada görüldüğü gibi B satırındaki tüm kuyucuklara 100 μL f/2+Si ortamı mikropipet yardımıyla koyulur ve 1. kuyucuğa 100 μL seri dilüsyon yapılacak olan örnekten koyulur. Yavaşça pipetaj yapılarak eşit bir şekilde karıştırılan örnekten 100 μL alarak 2. kuyucuğa aktarılır. Yine pipetaj ve 100 μL yan kuyucuğa aktarma işlemleri yapılır ve bu işlem 12. kuyucuğa kadar tekrar eder. Böylece 12. kuyucukta 200 μL örnek kalmış olur. Eğer iklim kabininde buharlaşma fazla oluyorsa tüm kenar kuyucuklara 200 μL otoklavlanmış saf su konulur. Böyle bir durumda seri dilüsyon B satırı boyunca B2-B11 kuyucukları arasında yapılmış olur.



Şekil 2.1 : Seri dilüsyon plakası.

Ortalama 1 ay takip edilen plakalarda karışık bir şekilde bulunan türlerden istenilen diatom türünün, müsilajın katı tabakasından yapılan seri dilüsyon kuyucuğunda $f/2+Si$ ortamında çoğalmaya başladığı gözlemlenmiştir. Tek hücre çekimi yapmak amacıyla lam üzerine 5-6 farklı noktaya 20 μl $f/2+Si$ ortamı damlatılmıştır. Damlalardan birine, diatomun çoğaldığı kuyucuktan yaklaşık 5 μl eklenmiş ve 10 μl 'lik mikropipet yardımıyla inverted faz kontrast mikroskopta görüntüleyerek tek hücre çekimi yapılmıştır. Çekilen tek hücre lam üzerindeki diğer $f/2+Si$ ortamlarında yıkanmış ve içerisinde temiz $f/2+Si$ ortamı bulunan yeni bir kuyucuğa aktarılmıştır. Türün tek hücre çekildiğine emin olmak amacıyla tek hücre izolasyonu 4-5 kez tekrarlanmış ve farklı kuyucuklara alınmıştır (Şekil 2.2). Aynı işlemler yapılarak türün $L1+Si$ ortamında da çoğaltılması takip edilmiştir.

Tek hücre plakası ters faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiş, hücreler belli yoğunluğa ulaştıktan sonra içinde $f/2+Si$ ortamı bulunan 15 ml'lik falkonlara alınmıştır. İklim kabini içerisine bırakılan falkonlar sırası ile yoğunluğuna bağlı olarak 250, 500 ve 1000 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Kültürlere yaklaşık olarak her hafta ortam eklenmiştir ve 600 ml hacme ulaşan diatom kültürü yoğunlaştırılmak üzere ortam eklemekten 3 ay iklim kabini içerisinde kültürlenmiştir.



Şekil 2.2 : Tek hücre izolasyonu şematik gösterimi (Ortam eklemek, yeni kültür oluşturmak, büyük hacme almak gibi bütün işlemler biyogüvenlik kabini içerisinde ateşe yakın bir şekilde çalışılarak yapılmıştır.).

2.2 Diatom Suşunun Büyüme Koşulları

Diatom kültürü tek hücre plakasında ve büyük hacme alındığında 12 sa. gece/ 12 sa. gündüz ayarlı 23 °C sıcaklığa sabitlenmiş iklim kabininde 10 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde kültürlenmiştir. Bütün kültürlerde f/2+Si ortamı (Guillard ve Ryther 1962, Guillard 1975) kullanılmıştır.

f/2+Si ortamı hazırlarken ihtiyaç duyulan deniz suyunun filtreleneşi, Millipore membran filtrasyon sistemi ile üç farklı gözenek çaplı filtre kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak 2 μm gözenek çaplı Millipore naylon membran filtreden, ardından 1,2 μm gözenek çaplı Whatman Grade GF/C mikrofiber filtre kağıdından geçirilmiş ve son olarak da 0,22 μm gözenek çaplı PVDF vakum filtreden geçirilmiştir. Kullanılana kadar +4 °C’de saklanmıştır.

f/2+Si ortamı hazırlama aşamaları aşağıdaki gibidir:

950 ml filtreleneşi deniz suyuna vitamin stoku dışındaki tüm stoklar eklenmiş (Çizelge 2.1), deniz suyuyla 1 L’ye tamamlanarak otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası oda sıcaklığına gelen f/2+Si ortamına vitamin stoku da eklenmiştir. Hazır olan ortam +4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 2.1 : Stok solüsyonları ve miktarları.

Stok	İçerik	Stok Solüsyonu (g/L dH ₂ O)	Ortam hazırlarken
Stok 1	NaNO ₃	75	1 ml
Stok 2	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5	1 ml
Stok 3	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30	1 ml
Stok 4	Eser metal solüsyonu	Çizelge 2.2	1 ml
Stok 5	Vitamin solüsyonu	Çizelge 2.3	0,5 ml

Stok 4'ün hazırlanması;

950 ml dH₂O içerisinde FeCl₃ · 6H₂O ve Na₂EDTA · 2H₂O gerekli miktarda çözdürülmüştür. İçerisine takip eden tüm solüsyonlardan 1'er ml koyulmuş ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak eser element stoku hazırlanmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 : Eser element solüsyonu içeriği ve miktarları.

Stok	İçerik	Stok Solüsyonları (g/L dH ₂ O)	Stok Solüsyonu İçerik Miktarı
Stok 4	<u>Eser metal solüsyonu</u>		
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	-	3,15 g
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	4,36 g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180	1 ml
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22	1 ml
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10	1 ml
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,8	1 ml
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,3	1 ml

Stok 5'ün hazırlanması;

950 ml dH₂O içerisinde tiamin · HCl gerekli miktarda çözdürülmüştür. İçerisine diğer vitamin stoklarından 1'er ml koyulmuş ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır (Çizelge 2.3). Karıştırılan stok solüsyonu 0,22 µm'lik şırınga filtresinden geçirilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.3 : Vitamin stoğu içeriği ve miktarları.

Stok	İçerik	Stok Solüsyonları (g/L dH ₂ O)	Stok Solüsyonu İçerik Miktarı
Stok 5	<u>Vitamin solüsyonu</u>		
	Tiamin · HCl (B1 vitamini)	-	200 mg
	Biotin (H vitamini)	1	1 ml
	Siyanokobalamin (B12 vitamini)	1	1 ml

NOT: Müsilaj örnekleri ve deniz suyunun Mudanya'dan olması sebebiyle ortam hazırlarken tuzlulukla ilgili herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Kültürleme yaparken, 22-24 ppt tuzluluk arasındaki Mudanya deniz suları ile hazırlanan f/2+Si ortamı kullanılmıştır. Ayrıca ortam hazırlarken kolaylık olması açısından vitamin stoku 2 ml'lik ependorf tüplerine paylaştırılmıştır.

2.3 Diatom Suşunda Türün Belirlenmesi ve Genetik Analizler

2.3.1 DNA izolasyonu

Diatom suşundan DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak yapılmıştır. Diatomlara özel bir protokolü olmadığından mayalar için olan protokol temel alınmıştır. DNA izolasyonu aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Kültürden 2 ml alarak ependorf tüpüne aktarılmış, $16\ 000 \times g$ 'de 3 dk. santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatant atılmış, pelet 500 µl Yeast lysis buffer ile karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 1 sa. inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası $3000 \times g$ 'de 10 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
4. Pelet üzerine 180 µl Digestion Solution eklenerek karıştırılmıştır. 20 µl Proteinase K Solution da eklendikten sonra vortekslenmiş, ardından 56 °C'de 45 dk. inkübe edilmiştir.
5. Örnek üzerine inkübasyon işlemi bittikten sonra 20 µl RNase A Solution eklenerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır.

6. 10 dk. sonunda 200 µl Lysis Solution eklenmiş, homojen bir karışım olana kadar (~15 sn.) vortekslenmiştir.
7. Örnek üzerine 400 µl % 50'lik etanol eklenmiş, vortekslenildikten sonra GeneJET Genomic DNA Purification kolonuna bütün örnek yüklenmiştir. 6 000 × g'de 1 dk. santrifüj sonrası altındaki toplama tüpü yenisiyle değiştirilmiştir.
8. Kolon içerisine 500 µl Wash Buffer I 'den eklendikten sonra 8 000 × g'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Toplama tüpüne biriken Wash Buffer I dökülmüş ve tüp kolona tekrar takılmıştır.
9. Kolon içerisine 500 µl Wash Buffer II 'den eklendikten 16 000 × g'de 3 dk. santrifüj sonrası toplama tüpü atılmış ve kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpüne takılmıştır.
10. Kolonun ortasına denk gelecek şekilde 200 µl ultra saf su (otoklavlanmış, 0,22 µm filtreden geçerek -20 °C'de tutulan) eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildikten sonra 8 000 × g'de 1 dk. santrifüjlenmiştir.
11. Ependorf tüpü üzerinden kolon çıkarılıp atılmış ve tüp içerisinde bulunan saflaştırılmış DNA, kullanılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

2.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Diatom suşunun genomik DNA'larının ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi tayini ve çoğaltılması için polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi için rRNA küçük alt grubunun 3' ucuna bağlanan TW81 primeri ve rRNA büyük alt birimine bağlanan AB28 primerleri kullanılmıştır.

PZR reaksiyonları BioRad T100 thermal cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR deney prosedürü aşağıdaki gibidir;

1X Karışım (25 µl için)

- 10X Ammonium tampon solüsyonu (AMPLIQON) = 2,5 µl
- MgCl₂ solüsyonu (25 Mm, AMPLIQON) = 0,5 µl
- dNTP solüsyonu (10 mM, AMPLIQON) = 0,5 µl
- TW81 (10 µM stok) = 1 µl
- AB28 (10 µM stok) = 1 µl
- Taq polimeraz (5 U/µl, AMPLIQON) = 0,125 µl
- Steril Ultra Saf Su = 14,375 µl

- Genomik DNA = 5 µl

PZR döngüsü, 1 döngü: 95 °C’de 5 dk.; 5 döngü: 90 °C’de 1 dk., 50 °C’de 2 dk.; 1 döngü: 72 °C’de 1 dk.; 30 döngü: 90 °C’de 1 dk, 60 °C’de 1 dk, 72 °C’de 1 dk. ve son çoğaltma 72 °C’de 10 dk. olacak şekilde yapılmıştır. Reaksiyon sonrası örnekler kullanılabilecek kadar -20 °C’de saklanmıştır.

2.3.3 Jelde yürütme

% 1,5’lik agaroz çözeltisi hazırlamak için 0,75 g agaroz tartılmış, 50 ml 1x Tris Borate EDTA (TBE) tampon solüsyonu ile karıştırılarak mikrodalga fırında 5 dk. kapağı gevşek kapalı bir şişede kaynatılmıştır. Mikrodalgadan alınan çözelti dikkatli bir şekilde çalkalayarak soğutulmuş ve içerisine yürütme işleminin görünürlüğünü sağlamak amacıyla 2 µl SERVA DNA Stain G boyası eklenerek karıştırılmıştır. Çözelti jel tankına dikkatli bir şekilde (baloncuk olmamasına dikkat edilmeli) döküldükten sonra jelleşmenin gerçekleşmesi için 30 dk. beklenmiştir. Donan jel 1X TBE solüsyonu ile doldurulmuş küçük elektroforez tankına yerleştirilmiş, üzerini 3-5 mm geçene kadar 1X TBE solüsyonu koyulmuştur.

PCR yapılan 50 µl DNA örneği ile 11 µl 6X jel yükleme boyası (mavi) karıştırıldıktan sonra kuyucuklara bütün örnekler yüklenmiş, ilk kuyucuğa ise 6 µl marker eklenmiştir. 100 V’da 45 dk. yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel, BIORAD jel görüntüleme cihazı ile kontrol edilmiştir.

2.3.4 Jelden DNA ekstraksiyonu

Jelden kesilen DNA parçacıkları 2 ml’lik ependorf tüpü içerisine toplanmış, saflaştırma Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction kit ile yapılmıştır. Jel üzerine 1:1 oranında Binding Buffer (100 mg jele, 100 µl tampon) eklendikten sonra 60 °C’de 10 dk. inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası ependorf tüpü içerisindeki örnek GeneJET saflaştırma kolonuna alınmış, 16 000 x g’de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Kolonda biriken tampon çözeltisi boşaltılıp kolon tekrar takıldıktan sonra üzerine 700 µl Wash Buffer eklenmiş ve 16 000 x g’de 1 dk. santrifüjlenmiştir (Wash Buffer’ı tamamen uzaklaştırmak için 2 kez yapılmıştır).

Santrifüj sonrası kolonun alt kısmı atılmış, saflaştırma kolonu 1,5 ml’lik ependorf tüplerine takılmıştır. Üzerine 30 µl ultra saf su (otoklavlanmış, 0,22 µm filtreden

geçerek -20 °C’de tutulan) eklenmiştir. 16 000 x g’de 1 dk. santrifüjlenen örnek üzerinden saflaştırma kolonu uzaklaştırılmış ve 1,5 ml’lik ependorf tüpü içerisinde biriken örnekten DNA ölçümü yapılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünün dizilenmesi hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

2.3.5 Filogenetik Analizler

Diatom suşuna ait ileri ve geri gen dizisi okumaları Mega 11 (Tamura ve diğ, 2021) yazılımında düzenlenmiştir. Düzeltilmiş ve ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 genlerini içeren dizinin hangi cins ve türe ait olduğunu tespit etmek için öncelikle BLAST analizi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yapılmıştır. BLAST analizinde elde edilen sonuçlardan güvenilir olanlar (Ör: iyi bir dergide basılmış ve/veya güvenilir bir kültür koleksiyonu suşlarına ait gen dizileri) Mega 11 yazılımı (Tamura vd. 2021) vasıtasıyla indirilmiş ve bir hizalama dosyası oluşturulmuştur. Hizalama Mega 11 yazılımında Muscle kullanılarak yapılmıştır. Hizalanmış veri seti için en uygun model Mega 11 kullanılarak belirlenmiş; bu model kullanılarak maksimum olabilirlik (ML) ağacı yine Mega 11’de 1000 bootstrap ile oluşturulmuştur.

2.4 Mikroalg Suşlarında Kitin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

2.4.1 Kitin izolasyonu

3 ay içerisinde yoğun hale gelen diatom kültüründen kitin izolasyonu yapmak amacıyla Paul LeDuff ve Gregory L.Rorrer’ın (2019) metodundan yararlanılmıştır.

1. Yoğun halde olan kültürden 50 ml’lik falkona 25 ml aktarılmış (Üç tekrarlı üç farklı süre ile çalışılacağı için 9 adet 25 ml’lik örnek hazırlanmıştır), 1 dk. el ile kuvvetli bir çalkalama yapılmıştır. Çalkalamadan sonra kaç dakika vorteks sonucunda en yüksek verimde kitin elde edileceğini anlamak amacıyla üç farklı sürede vorteksleme işlemi yapılmıştır. 1. üç tekrarlı örnek 5 dk., 2. üç tekrarlı örnek 9 dk. ve 3. üç tekrarlı örnek ise 13 dk. vortekslenmiştir. Böylece kitin iplikleri diatomlardan ayrılmıştır.
2. Vorteksleme sonucunda hücrelerden koparılan kitini toplamak amacıyla bütün örnekler 1500 × g’de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Böylece kitin iplikleri hafif olduğu için supernatantta, diatom hücreleri ise ağır olduğu için pelette toplanmıştır.

3. Kitini saflaştırmak amacıyla santrifüj sonrası 9 örneğin süpernatantları ayrı ayrı falkonlara alınmış, diatom hücreleri ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Ependorf tüplerine paylaştırılan süpernatantlar, 16 000 × g'de 30 dk. santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj sonrası hafif olan kitin pelette toplanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış, pelette kalan kitin ultra saf su ile yıkanarak 16 000 × g'de 20 dk. santrifüjlenmiştir.
5. Yıkanan peletin süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra pelete, kalsiyum karbonat tuzlarını çözmek amacıyla manyetik karıştırıcı üzerinde 70 °C'de 1.0 M HCl (oda sıcaklığında, ~ 1:1 oranda) ile beher içerisinde 30 dk. karıştırılarak muamele edilmiştir. Muamele sonrası tekrar ependorflara alınan örnekler 16 000 x g'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatatları uzaklaştırılmıştır.
6. Pelete, kitin ipliklerine adsorbe olmuş protein ve früstül kalıntıları varsa uzaklaştırmak için kuru ağırlıkta % 0,5 sodyum dodesil sülfat (SDS, oda sıcaklığında, ~ 1:1 oranda) ile beher içerisinde 5-30 dk. karıştırılarak muamele edilmiştir. Muamele sonrası ependorflara alınan örnekler 16 000 × g'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatatları uzaklaştırılmıştır.
7. Diğer kalan organik safsızlıkları uzaklaştırmak için pelete, % 95'lik etanol (oda sıcaklığında, 2:1 oranında) ile 5 dk. karıştırarak muamele edilmiştir. Muamele sonrası tekrar ependorflara alınan örnekler 16 000 × g'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır.
8. Son olarak pelette net bir şekilde görülen kitin fiberleri, etanol ile tekrar yıkanarak 16 000 × g'de 20 dk. santrifüjlenmiştir. Bu yıkama ve sonrasında santrifüjleme işlemleri 2-3 kez tekrarlanarak 25 ml örnekten çıkan tüm kitin ipliklerin bir ependorfta toplanması sağlanmıştır.
9. Sonuç olarak başta hazırlanan 9 adet 25'er ml'lik örnekteki kitinler 9 adet ependorf tüpünde toplanmıştır. Santrifüj sonrası etanol kitin ipliklerine değmeden uzaklaştırılmıştır. Etanolü uzaklaştırarak kitin ipliklerinin tamamen kuruması amacıyla etüvde 45-55 °C'de 8-16 sa. kurutulmuştur.

NOT: 500 ml 1.0 M HCl çözeltisi hazırlarken;

$$M = \frac{\% \cdot d \cdot 10}{MA} \quad M = \frac{37 \cdot 1,19 \cdot 10}{36,5} \quad M = 12 \text{ M}$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2 \quad 12 \text{ M} \cdot V_1 = 1 \text{ M} \cdot 500 \text{ ml} \quad V_1 = 41,2 \text{ ml HCl} \quad V_2 = 458,3 \text{ ml dH}_2\text{O}$$

d (yoğunluk) = 1,19 g/cm³

% (kütlece derişim) = % 37'lik HCl

MA (Molekül Ağırlığı) = 36,5 g

M_1 = Hazır HCl molaritesi

M_2 = Hazırlanmak istenen HCl molaritesi

V_1 = 500 ml solüsyon hazırlamak için kullanılacak olan hazır HCl hacmi

V_2 = 500 ml solüsyon hazırlamak için kullanılacak olan dH₂O hacmi

2.4.1.1 Kitin eldesi metodu optimizasyonu

Kitin izole edildikten sonra saflaştırma aşamasında SDS muamelesi, proteinlerin ne kadar SDS muamelesi ile daha çok uzaklaştığını anlamak amacıyla, iki denemede farklı sürelerde yapılmıştır. İlk denemede 5 dk., ikinci denemede ise 30 dk. SDS ile muamele edilmiştir.

İki deneme sonucuna göre elde edilen kitin örneklerinin protein tayini için Lowry metodu (Barbarino, 2005), örneklerin karakterizasyonunu ve protein miktarındaki değişimi anlayabilmek amacıyla Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi (PerkinElmer, Massachusetts, U.S.A) cihazı kullanılmıştır.

2.4.2 Kitin karakterizasyonu

İzole edilen kitinin karakterizasyonu Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi ile yapılmıştır.

2.4.2.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ile kitin analizi

Farklı protein içeriği olan kitin numunelerinin yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi (PerkinElmer, Massachusetts, U.S.A) kullanılmıştır. Analizlerde kitin karakterizasyonundan sorumlu özellikle C-O-C, C-O ve β -kitini gösteren bölgeler incelenmiştir; a) 1146-1156 cm⁻¹, b) 1073-1014 cm⁻¹ ve c) 1455-1374 cm⁻¹ (Dahmane ve diğ, 2014; Vallejo-Domínguez ve diğ, 2021).

2.5 Kitin Yapısının ve Diatom Hücrelerinin Mikroskopik Olarak Görüntülenmesi

Diatom hücreleri ters faz kontrast mikroskobu ile 4x, 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde incelenmiş ve hücrelerin görüntüleri alınmıştır. Ayrıca hücreler ve izole edilen kitin iplikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. SEM analizi için örneklerin hazırlanması aşağıdaki gibidir.

Sadece filtreleme: 15 ml yoğun diatom kültürü 2 µm gözenek çaplı Millipore naylon membran filtreden geçirilmiştir. Üzerinde hücreler bulunan filtre, bir petri üzerine alınarak kapağı kapatılmadan 35 °C etüvde 24 sa. kurutulmuştur. Kurutulmuş olan örnek SEM görüntülemenden önce 11 nm altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

HCl muamelesi: 15 ml yoğun diatom kültürü santrifüjlenmiş ve hücreler pelette toplanmıştır. Yaklaşık 30 ml % 15'lik HCl ile beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 1 sa. boyunca 110 °C'de kaynatılmıştır. Ardından 15 ml'lik falkonlara alınan örnek soğutulmuş ve 3-5 kez saf su ile yıkandıktan sonra 2 µm gözenek çaplı Millipore naylon membran filtreden geçirilmiştir. Üzerinde hücreler bulunan filtre, bir petri üzerine alınarak kapağı kapatılmadan 35 °C etüvde 24 sa. kurutulmuştur. SEM görüntülemenden önce örnek, 15 nm altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır (Saad ve diğ, 2020).

H₂O₂ muamelesi: 15 ml yoğun diatom kültürü santrifüjlenmiş ve hücreler pelette toplanmıştır. Yaklaşık 50 ml % 15'lik H₂O₂ ile beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 12 sa. boyunca 60 °C'de ısıtılmıştır. Ardından 15 ml'lik falkonlara alınan örnek soğutulmuş ve 3-5 kez saf su ile yıkandıktan sonra 2 µm gözenek çaplı Millipore naylon membran filtreden geçirilmiştir. Üzerinde hücreler bulunan filtre, bir petri üzerine alınarak kapağı kapatılmadan 35 °C etüvde 24 sa. kurutulmuştur. SEM görüntülemenden önce örnek, 15 nm altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır (Saad ve diğ, 2020).

Kitin iplikleri: İzole edilen kitinden daha temiz bir görüntü elde etmek amacıyla ~ 1 mg kitin 2ml saf suyla karıştırılmış ve 14 000 kDa molekül ağırlığında olan diyaliz membranında saf suya karşı bir gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak diyaliz yapılmıştır. Diyaliz sonrası kitin iplikleri liyofilize edilmiş ve SEM analizine kadar desikatörde muhafaza edilmiştir. SEM görüntülemenden önce örnekler 15 nm altın-paladyum karışımı ile kaplanmıştır.

NOT: Kurutulmuş örnekler SEM analizine kadar desikatörde muhafaza edilmiştir. Analizden önce örneklerin kaplama kalınlığının farklı olmasında özel bir sebep bulunmamaktadır. Cihazın durumuna göre kaplama kalınlığına karar verilmiştir.

2.6 Kitin Çözücüsü ve Testler

2.6.1 Kitin çözücüsü

Kitin ipliklerini çözmek amacıyla $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - MeOH çözücüsü hazırlanmıştır (Tamura ve diğ, 2006). Çözücü konsantrasyonu 1 L metanolde 850 g kalsiyum klorür dihidrat olacak şekilde hesaplanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak hazırlanan çözücü bir gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Katı maddenin yoğunluğundan oluşan bulanıklık ve çökmeyi gidermek amacıyla buharlaştırıp yoğunlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Metanolün kaynama noktasından daha yüksek bir sıcaklık olan 100 °C’de 15-30 dk. manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırarak saydam hale getirilmiştir. 1 ml çözücü içerisinde 4 g kitin 45 °C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak 60 saatte çözdürülmüştür.

NOT: 15 ml’den fazla hazırlanan çözücüler birkaç gün içerisinde kristalize olmaktadır. Bu durumda tekrar 100 °C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak saydam ve homojen hale getirilebilmektedir.

2.6.2 Sitotoksite testleri

Kitinin L929 hücre hattı (fare fibroblast) üzerindeki sitotoksik etkileri, nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksite testleriyle incelenmiştir.

2.6.2.1 Nötral Kırmızı Alım (NKA) yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

1. L929 hücreleri hızla su banyosunda çözülmüş ve DMEM (%10 FBS, %1 Penisilin- Streptomisin) besi yeri içeren yatay hücre kültürü şişesine alınmıştır. Hücreler, CO₂ inkübatöründe 37 °C’de 2-3 gün inkübe edilmiştir.
2. Ters faz kontrast mikroskobu ile hücrelerin canlılığı ve kontaminasyon durumu kontrol edildikten sonra hücre kültür süspansiyonu, yatay hücre kültürü şişesinden şişe tabanına değmeden dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
3. Hücreler 2 kez 10 ml Dulbecco’s Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra hücrelerin tabandan tamamen ayrılmasını sağlamak

amacıyla şişeye 3 ml tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. İnkübatörde 5 dk. bekletilmesinin ardından tripsin etkisini durdurmak amacıyla şişeye 3 ml besi yeri eklenmiştir.

4. Yatay hücre kültürü şişesindeki hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkona aktarılmış, hücrelerin çökmesi için 25 °C'de 400 × g'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış, ardından hücre peleti 5 ml besi yeri ile karıştırılarak yeni bir hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.
5. Sayım yapmak amacıyla, bir ependorf tüpü içerisine 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0,4 a/h) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışımdan yaklaşık 10 µl Thoma lamına (sayım lamı) alınmış ve ışık mikroskobu altında (lamı oluşturan karelerin kenar çizgileri hariç) parlak ve renksiz olan, yaşayan hücreler sayılmıştır.
6. Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, besi yeri ile seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 200 µl (10.000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde ekim yapılarak CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 sa. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besi yeri atılmıştır.
7. 1 ml 4 mg/ml konsantrasyonunda olan kitin-Ca çözücüsü çözeltisi, 19 ml besi yeri ile karıştırılmış ve en yüksek kitin konsantrasyonu 200 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış, daha sonra seyreltilerek sırasıyla 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml toplamda 6 farklı uygulama konsantrasyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya her bir numune 8 tekrarlı olmak üzere 200 µl/kuyu eklenmiştir.
8. Ayrıca üç adet kontrol grubu hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak hiçbir madde muamelesi yapılmayan besi yeri ortamı, pozitif kontrol olarak % 0,1 triton x-100 uygulama grubu ve % 5'lik Ca çözücüsü ile hazırlanan çözücü kontrol grubudur. Kontrol grupları kuyucuklara eklendikten sonra, plaka CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 sa. inkübasyona bırakılmıştır.
9. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besi yeri atılmış, NK standart stok çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 3 sa. daha inkübe edilmiştir.
10. 3 sa. sonunda kuyucuklardaki NK çözeltileri atılmış ve kuyucuklar üç kez 200 µl PBS ile yıkanmıştır. Her bir yıkamadan sonra kuyucuklardaki PBS atılarak plaka kurutulmuştur.

11. Tüm kuyucuklara fiksasyon çözeltisinden (% 50 etanol, % 1 asetik asit, % 49 su) 200 µl eklendikten sonra plakalar 15 dk. yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalama sonrasında kuyucuklarda oluşan renk şiddeti BioTek Epoch mikropilaka okuyucu ile 540 nm'de ölçülmüştür.
12. Her bir maddenin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve inhibisyon konsantrasyonları hesaplanmıştır.
13. Çalışmalar ayrı zamanlarda iki kez tekrarlanmış ve hesaplamalar iki çalışmanın ortalaması olarak belirlenmiştir.

NOT: Hücrelerin kontamine olmaması açısından test aşamaları steril çalışma kabini içerisinde yapılmıştır. CO₂ inkübatörü % 5 CO₂ ve % 95 nem içermektedir.

2.6.2.2 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

1. NKA yöntemindeki anlatıldığı şekilde L929 hücre kültürü hazırlanmıştır. Ardından 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler, üzerine Ca çözücüsü ile çözünen kitin örneğinin 6 farklı konsantrasyonu ve kontrol örnekleri 8 tekrarlı olacak şekilde eklendikten sonra CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 sa. inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonrası madde çözeltileri atıldıktan sonra ve her bir kuyucuğa 100 µl besi yeri ve hazırlanan MTT çözeltisinden (5 mg thiazolyl blue tetrazolium bromide, 1 ml PBS içerisinde çözülmüş ve 9 ml besi yeri ile karıştırılarak hazırlanmıştır) 10 µl eklenmiştir. Plaka CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 4 sa. daha inkübasyona bırakılmıştır.
3. 4 sa. inkübasyon sonrasında MTT çözeltisi atılmış, kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Çözünmeyi sonlandırmak için plaka yatay çalkalayıcıda 10 dk. çalkalanmıştır.
4. Çalkalama işlemi sonrasında kuyucuklarda oluşan renk şiddeti BioTek Epoch mikropilaka okuyucu cihazında 570 nm'de ölçülmüştür.
5. Her bir maddenin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

6. Çalışmalar farklı zamanlarda 2 kez tekrarlanmış ve sonuçlar 2 çalışmanın ortalaması olarak hesaplanmıştır.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Tek Hücre İzolasyonu ve Büyüme Koşulları

Yapılan literatür çalışmalarına dayanarak ve deniz suyu kullanılarak hazırlanan f/2+Si ve L1+Si ortamlarına seri dilüsyon yapılmıştır (Andersen, 2005). Tek hücre izolasyonu yapılarak f/2+Si ve L1+Si ortamlarında büyümesi takip edilen diatom türünün plakalarda her iki ortamda da çoğaldığı gözlemlenmiştir. Kitin üreten diatom türlerinin kültürlenmesinde iki ortamın da kullanıldığı görülmektedir (LeDuff ve Rorrer, 2019; Ogawa ve diğ, 2011). Diatom türü bu aşamada henüz genetik olarak analiz edilmediğinden dolayı plakalardaki hücre yoğunluğuna ve büyük hacme alındığındaki durumuna göre devam edilecek ortam türü seçilmiştir. L1+Si ortamında büyük hacme alınan diatom türünün sağlıklı büyümediği, ancak f/2+Si ortamında daha sağlıklı ve dengeli bir şekilde büyüdüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle f/2+Si ortamında kültürlenmeye devam edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Diatom kültürünün farklı hacimlerde görüntülenmesi.

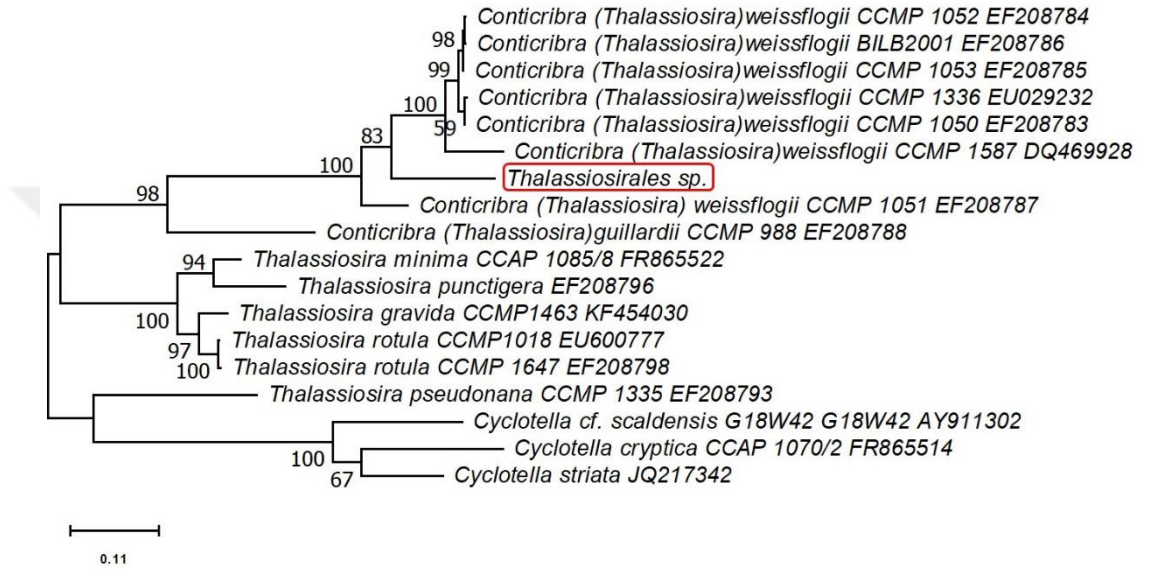
Diatomlar fotosentezden sorumlu olan klorofil pigmentine ek olarak, altın-kahverengi renklerinden sorumlu olan ksantofil pigmentini içerirler. Böylece hücre kültürleri bu renklerde olmaktadır (Gerardi ve Lytle, 2015). Tez çalışmasında büyük hacme alınan diatom kültürü, kültürleme işleminin başlarında daha saydamken ve hücreler kahverengimsi bir renkte gözüküyorken, hücre yoğunluğunun artmasıyla birlikte saydamlığın azaldığı ve daha bulanık bir görüntü oluştuğu gözlemlenmiştir. Diatom hücrelerinin ürettikleri hücre dışı polisakkarit olan kitin ipliklerinin yoğunluğu da hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. İpliklerin oluşmasından dolayı, kültürün bulanık olarak görüldüğü düşünülmektedir.

Diğer mikroalg suşlarında olduğu gibi diatom suşlarının kültürleme koşulları da hücrenin büyüme hızını, morfolojik yapısını, ürettiği hücre dışı polisakkarit miktarını etkilemektedir. Bu tez çalışmasında literatüre benzer şekilde 20-25 °C sıcaklıkta, 12 sa. gece/ 12 sa. gündüz ışık döngüsünde kültürleme yapılmıştır. Ancak literatürde kitin üreten diatomlar için ışık şiddeti 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ değerindeyken, tez çalışmasında 10 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ile devam edilmiştir (Ozkan ve Rorrer, 2017a; Ogawa ve diğ, 2011). Kültürleme yapılan diatom suşunun yeni izole edilmiş olması, büyüme koşullarının bilinmemesi ve tek hücre plakasından itibaren büyük hacme alındığında da bu ışık şiddetinde sağlıklı bir şekilde çoğalıyor olmasından dolayı ışık şiddetinde değişiklik yapılmamıştır. Literatüre dayanarak, yaklaşık 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddetine ayarlı iklim kabininde kültürleme denenmiş olsa da kültürün sağlıklı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumun; ışık şiddeti değerleri arasındaki yüksek fark sebebiyle hücrelerin strese girmiş olmasından ve hızlıca ölüm fazına geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.2 Filogenetik Analizler

BLAST analizinde diatom suşuna ait gen dizisine en yakın benzerlik % 90 ile bir *Conticribra* (*Thalassiosira*) *weissflogii* suşunda (CCMP 1051) elde edilmiştir. Gen bankasında yer alan diğer güvenilir *C. weissflogii* suşlarının da aynı gen bölgesi için birbirlerine benzerliklerinin % 90 ve üzeri olduğu görülmüştür. Şekil 3.2’de verilen Maksimum Olabilirlik (ML) filogenetik ağacı tez çalışmasında izole edilen suşu (*Thalassiosirales* sp.) *Conticribra weissflogii* suşları ile gruplandırmış ve diğer *Thalassiosira* spp. ve *Cyclotella* spp. suşlarından ayırmıştır. Bu veriler izole edilen diatomun *Conticribra weissflogii* olabileceğini işaret etse de, en yakın benzerliğin %

90'da kalması ve *Thalassiosira*'nın parafiletik ve/veya polifiletik yapısı (Stachura-Suchoples ve Williams, 2009) ilave genetik ve morfolojik çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır. Ayrıca kültürlenmiş diatom suşundan elde edilen SEM görüntüleri ile *Conticribra weissflogii* SEM görüntüleri karşılaştırılmış ve yapısal olarak farklı olduğu görülmüştür (Bknz. bölüm 3.4). Özellikle bu diatoma ait küçük ve büyük alt ünite rRNA gen dizilerinin de belirlenmesi faydalı olacaktır. Bu sebeple izole edilen suş tez çalışmasında *Thalassiosira* sp. olarak verilmektedir.

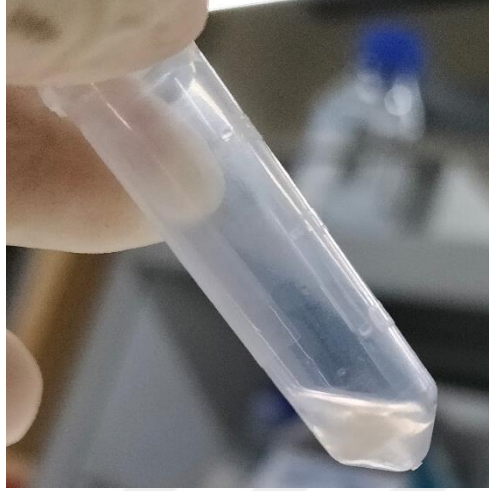


Şekil 3.2 : ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 genlerini içeren bölge için Maksimum Olabilirlik (ML) filogenetik ağacı. Ağaç, Maksimum Olabilirlik yöntemi ve Kimura 2 parametre modeli kullanılarak oluşturulmuştur. İlişkili taksonların bir arada kümelendiği ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Bölgeler arasındaki değişim hızı farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gama dağılımı kullanılmıştır (5 kategori (+G, parametre = 0.6155)). Oran varyasyon modeli, bazı bölgelerin değişmez olmasına izin vermiştir ([+I], %25.72 siteler). Ağaç köksüzdür ve ölçekli çizilmiştir.

3.3 Kitin İzolasyonu, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Yoğunlaşan diatom kültüründen elde edilen kitin kurutulmak üzere daha önceden tartılmış olan ependorf tüplerine aktarılmıştır (Şekil 3.3). Bu aşamada kitinin kuruması için kullanılan/ tercih edilen malzemenin küçük, dar ve uzun olması kitinin kurumasını geciktirmiş ve miktar analizi yaparken dipte veya kenarlara yapışan kitin olma ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle elde edilen üründe kayıp olabileceği

öngörülmüştür. Gelecek çalışmalarda kurutma aşamasında çapı büyük (~ 2 cm), boyu kısa (~ 0,5-1 cm) bir malzeme tercih edilmesi planlanmaktadır.



Şekil 3.3 : Diatom kültüründen izole edilen kitin.

Kitin izolasyonunun en önemli ve elde edilen kitin miktarını en çok etkileyen aşaması hücrelerden kitin ipliklerinin koparılması aşamasıdır. Yoğun kültürden alınan örnekler çalkalama sonrası 5, 9 ve 13 dk. vortekslenmiştir. Her bir deneme üç tekrarlı çalışılmış ve her bir tekrar sonucunda elde edilen kitin miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1 : Farklı sürelerde vorteksleme sonucunda elde edilen kitin miktarı (mg/75 ml). Değerler $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

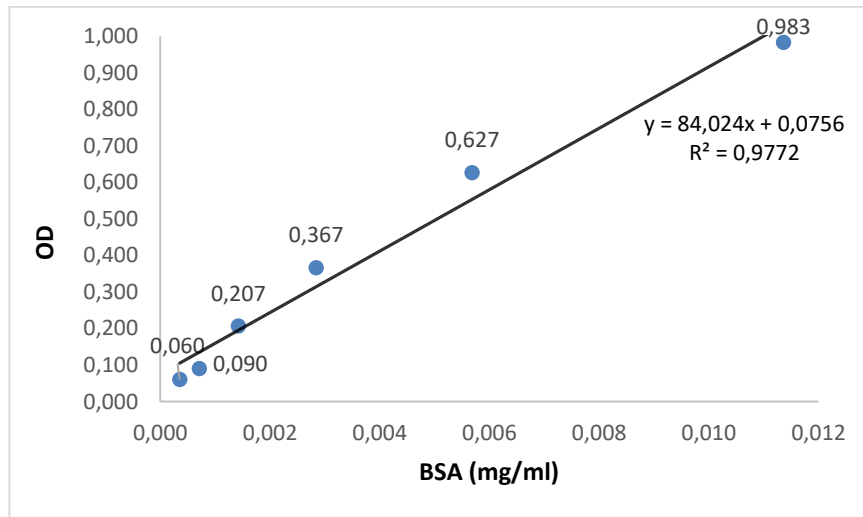
	5 dakika	9 dakika	13 dakika
Kitin miktarı	1,93 $\pm$ 0,23	1,6 $\pm$ 0,26	2,03 $\pm$ 0,35

Diatomlardan üç farklı süre ile vortekslenerek ekstrakte edilen kitin miktarı çok fazla değişmemekle birlikte az da olsa arttığı gözlemlenmiştir. 9 dk. vorteks sonucunda elde edilen kitin miktarının ortalamasının düşük olması, vorteksleme sonrasındaki saflaştırma aşamalarındaki kayıplardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Çizelge 3.1). Bu verilere göre, izole edilen kitin ipliklerinin kurutma sonrasında net ağırlığı litrede 25 mg hesaplanmıştır. Ancak; bu sürelerle göre elde edilen değerlerin birbirine çok yakın olmasından, çok küçük miktarlarda çalışıldığından ve vorteksleme sonrası diatomlardan izole edilen kitin ipliklerinin saflaştırma aşamalarının uzun olmasından dolayı vorteksleme süresinin 5 dk. olmasına karar verilmiştir. Gelecek çalışmalarda farklı sürelerin de denenmesiyle bu sürenin değişiklik gösterebileceği öngörülmektedir.

Kültür ortamına hava vermek, bir reaktör içerisinde kültürleme yapmak veya düzenli aralıklarla çalkalama yapmak, hücre yoğunluğunun artışı hızlandırmakta ve kültür içerisindeki hava ve nütrient sirkülasyonunu dengeli tutmaktadır. Literatüre göre, hava vererek kültürlen diatom hücrelerinde kitin ipliklerinin genel olarak hücrelerden ayrı bir şekilde bulunduğu; ancak hava verilmediğinde hücrelere yapışık pozisyonda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca reaktör içerisinde kültürlen ve bu kültürden alınan 500 ml örnekten kuru ağırlıkta 30 mg kitin elde edildiği görülmektedir (LeDuff ve Rorrer, 2019). Yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen kitin miktarının az olması, ışık şiddeti dışındaki diğer koşulların benzer olduğu göz önünde bulundurularak, kültür ortamına hava verilmemiş olmasından ve bu sebepten dolayı kitin ipliklerinin tamamının diatom hücrelerinden koparılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.3.1 Kitin eldesi metodu optimizasyonu

Kitin metodunu optimize etmek amacıyla, protein içeriği spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Toplam protein miktarı bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4). Hesaplama, eğriden elde edilen formül esas alınmıştır.



Şekil 3.4 : Bovin serum albumin (BSA) standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve kullanılacak denklem.

Farklı sürelerde SDS (sodyum dodesil sülfat) ile muamele edilmiş kitin örneklerinin kuru ağırlıkta % protein içerikleri değişiklik göstermektedir (Çizelge 3.2). SDS muamelesi süresinin, kitin içeriğindeki protein miktarını etkilediği ve muamele süresi arttıkça protein miktarının azaldığı görülmüştür.

Çizelge 3.2 : Farklı sürelerde SDS muamelesi ile kitin örneklerinin kuru ağırlığındaki % protein içeriği değişimi.

SDS ile muamele edilen süre	Kuru ağırlıkta (%) protein
5 dakika	7,58
30 dakika	5,03

SDS muamelesi kitinin kalitesini arttırmak için önemli bir aşamadır. Muamele sonrası protein ve früstül kalıntılarının uzaklaştırılmasıyla kitinin kalitesi artmakta ve kitini biyomedikal uygulamalar için daha elverişli hale getirmektedir (Demir ve diğ, 2009). Tez çalışması sonucuna göre, protein kalıntılarının tamamen giderilmesi için yapılan muamele süresinin uzatılması gerektiği düşünülmektedir.

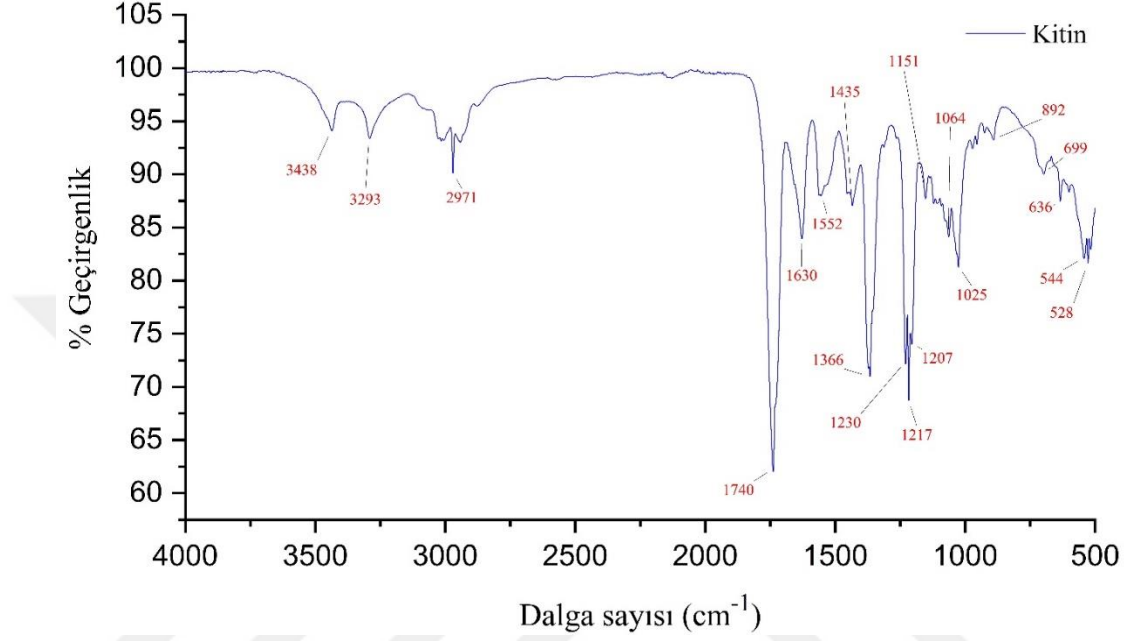
3.3.2 FTIR ile kitin karakterizasyonu

Kitin karakterizasyonu ve iki farklı sürede SDS muamelesi sonrası protein içeriği değişimi incelenmesi FTIR spektroskopisi ile yapılmıştır (Çizelge 3.3). Analizler 4000-400 cm^{-1} spektral aralığında yapılmıştır.

FTIR ile kitin karakterizasyonunda; C-O-C, C-O, C-H, OH, NH_2 (amit I), NH (amit II), C=O ve protein kalıntı bantlarının yapmış olduğu pikler incelenmiştir. Kitinin spesifik bantları olan; C-O-C bandı 1151 cm^{-1} olarak ve C-O bandı 1025 cm^{-1} olarak pik vermiştir. C-H bandının 892 cm^{-1} 'de, OH bandının 3438 cm^{-1} 'de, NH_2 bandının 1630 cm^{-1} 'de ve NH bandının 1552 cm^{-1} 'de pik verdiği gözlemlenmiştir (Dahmane ve diğ, 2014; Vallejo-Domínguez ve diğ., 2021; Balitaan ve diğ, 2020) (Şekil 3.5).

β -kitinde, 1455-1374 cm^{-1} arasındaki pik şiddetinin 1200-950 cm^{-1} 'dekilere (C-O-C ve C-O) yakın şiddette olduğu ve bunun alfa-kitin formunda gözlenmediği literatürde geçmektedir (Kumirska ve diğ, 2010). 1435 cm^{-1} 'de görünen pik, izolasyon sonrası elde edilen kitinin β -kitin formunda olduğunu göstermekte ve 3293 cm^{-1} 'de görülen pik ise polimer zincirleri arasındaki molekül içi hidrojen bağlarını ifade etmektedir (Balitaan ve diğ, 2020). Brunner ve arkadaşlarının (2009b) sünger ve diatom ile yapmış olduğu çalışmada; diatom türünden (*Thalassiosira rotula*) elde edilen kitin formunda C-O-C/C-O fonksiyonel gruplarını işaret eden ve β -kitin formunda 1025 ve 1151 cm^{-1} arasında düşük şiddetli yoğun titreşimler görülmekte, ancak bu titreşimlerin yoğunluğunun α -kitin formunda daha az olduğu görülmektedir. Tez çalışmasındaki FTIR sonucunda da, elde edilen kitinin β -kitin formunda olduğunu işaret eden düşük

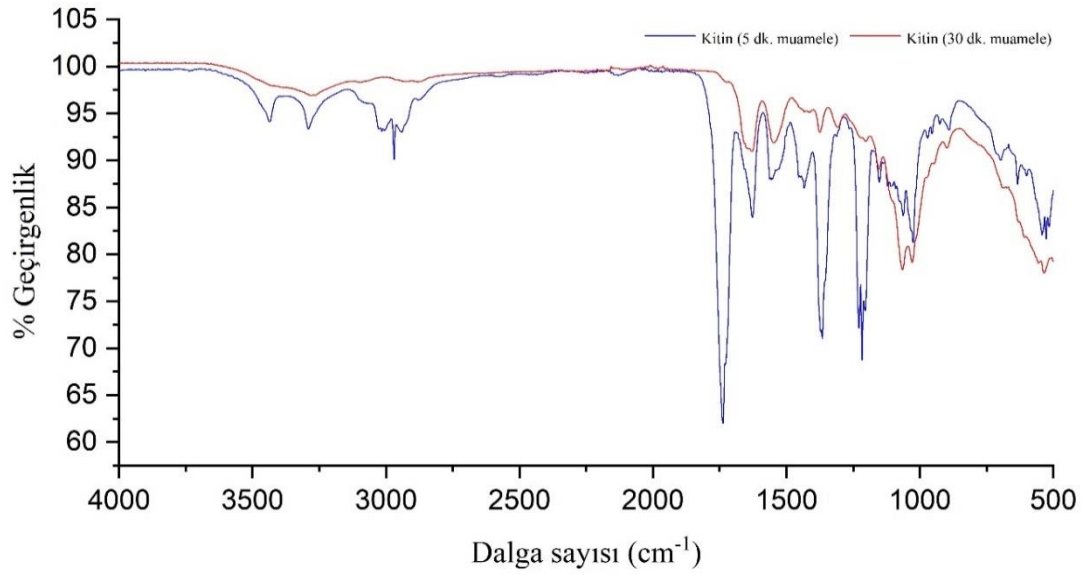
şiddetli yoğun titreşimler görülmüştür. Ayrıca Brunner ve arkadaşlarının (2009b) yaptığı çalışmada β -glikozidik bağın CH deformasyonunu gösteren karakteristik işaretin, β -kitin formunda 890 cm^{-1} 'de, α -kitin formunda 895 cm^{-1} 'de olduğu görülmektedir. Bu karakteristik işaret tez çalışmasında 892 cm^{-1} görülmüş ve β -kitin formuna daha yakın olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.5 : Elde edilen kitinin FTIR spektroskopisi ile karakterizasyonu.

Çizelge 3.3 : Kitin yapısında olan fonksiyonel gruplar ve FTIR spektroskopisinde verdiği dalga sayısı aralıkları.

Fonksiyonel Grup	Dalga sayısı (cm^{-1})
C-O-C	1146-1156
C-O	1073-1014
C = O	1650-1700
C-H	883-897
OH	3431-3484
NH ₂ (amit I)	1624-1659
NH (amit II)	1315-1556
COOH ucundaki C=O grupları (proteinlerin karakteristik piki)	1650-1700
Protein kalıntısı	1700-1758

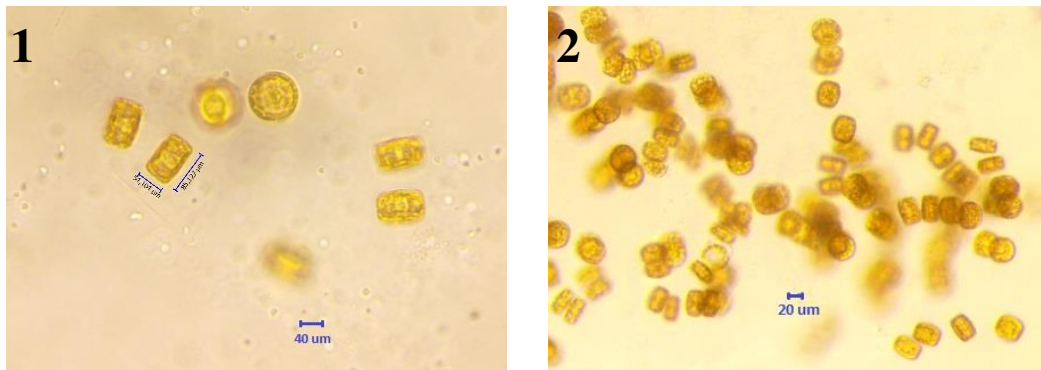


Şekil 3.6 : Farklı iki sürede SDS muamelesi ile saflaştırılan kitin örneklerinin FTIR spektroskopisi ile karşılaştırılması.

Farklı sürelerde muameleler sonrası elde edilen kitinlerin spektroskopik karakterizasyonu sonucuna göre; 5 dk. SDS muamelesi sonrası 1740 cm^{-1} olarak çok şiddetli pik veren protein kalıntısı bandının, 30 dk. SDS muamelesinden sonra neredeyse yok olduğu ve 699 cm^{-1} 'de görülen früstül kalıntısının (diatomların silanol gruplar (Si-OH) bakımından zengin olan silika yapılı kabuk yapısı) azaldığı görülmektedir (Şekil 3.6) (Viji ve diğ, 2014).

3.4 Kitin Yapısının ve Diatom Hücrelerinin Mikroskopik Olarak Görüntülenmesi

Tek hücre izolasyonundan yoğun kültür haline gelen diatom hücreleri faz kontrast mikroskobu ve SEM kullanılarak görüntülenmiştir.



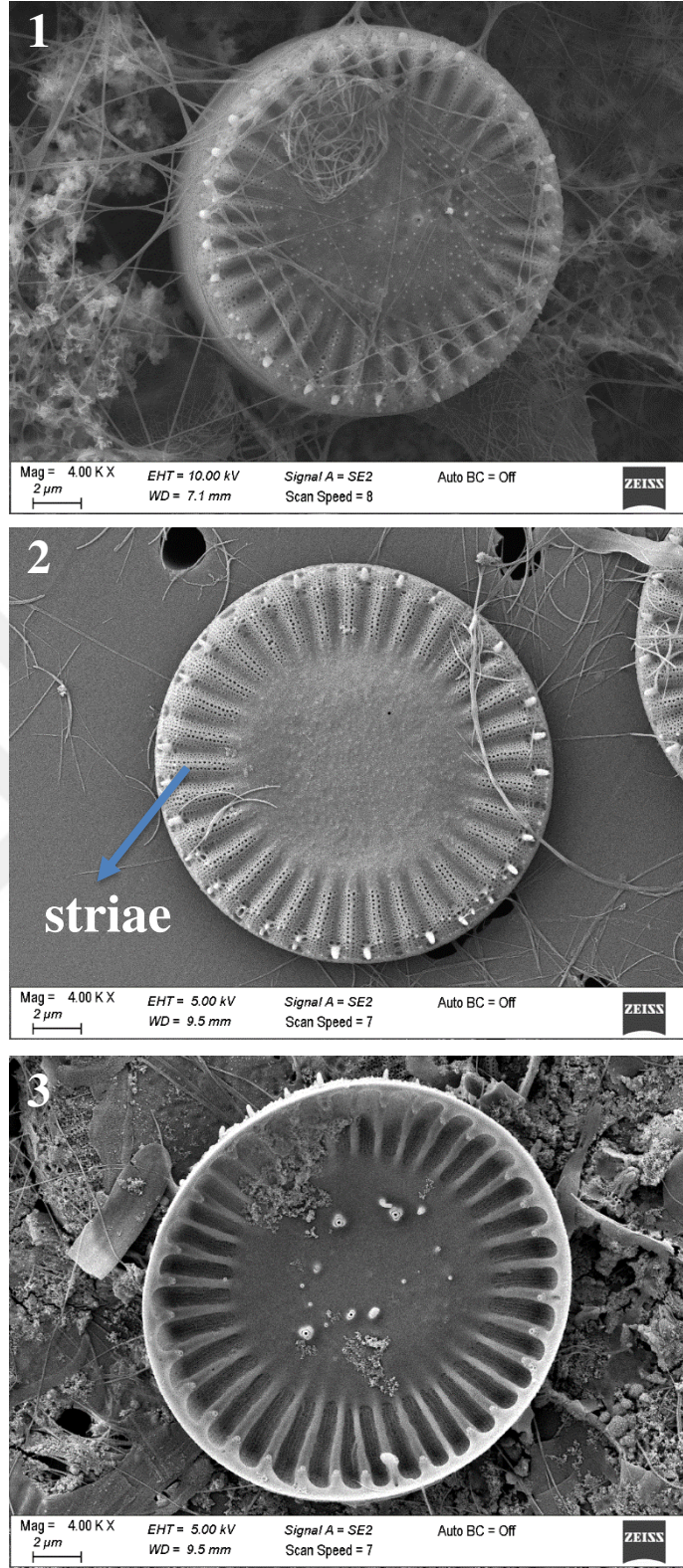
Şekil 3.7 : Diatom hücrelerinin ters faz kontrast mikroskobu görüntüleri 1) 40x, 2) 20x büyütme.

Faz kontrast mikroskobu ile diatom hücrelerinin sentrik/ silindirik bir diatom türü olduğu görülmüştür. Ksantofil pigmentinin etkisiyle hücrelerin altın renginde olduğu ve plakalarda kültür yoğunluğu arttıkça hücre yoğunluğundan kaynaklanan renk koyulaşması görüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).

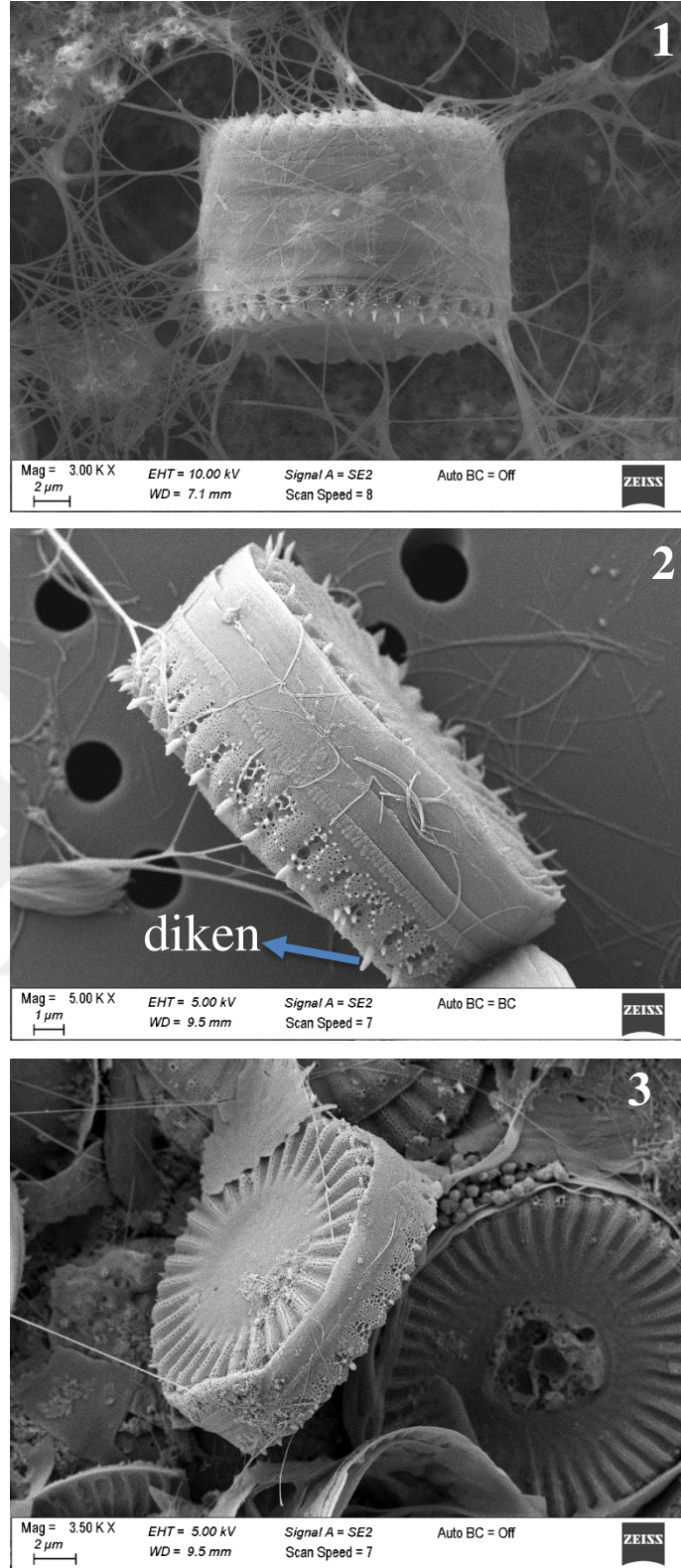
Daha temiz bir görüntü elde etmek amacıyla üç farklı metot kullanılarak hazırlanan diatom hücreleri SEM ile analiz edilmiştir (Şekil 3.8-3.10). Yapılan muameleler sonrasında elde edilen görüntülere göre hücreler en temiz HCl muamelesi ile hazırlanan örneklerde gözlenmiştir (Şekil 3.8-3.10'da 2. resimler). Bu metotta hücreler temiz ve ortam safsızlıklardan arınmış olsa da hücrelerden uzanan kitin iplikleri ve bu ipliklerin oluşturduğu ağsı yapı sadece filtreden geçirilen örneklerde daha belirgin ve yoğun bir şekilde görülmüştür (Şekil 3.8-3.10'da 1. resimler).

Diken yapıları üç muamele sonrasında da elde edilen örneklerde görülebilmektedir (Şekil 3.9'de 2. resim). H_2O_2 ile muamele edilmiş hücrelerin parçalandığı ve iç yapılarının görüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3.8-3.10'da 3. resimler). Şekil 3.8 ve 3.10'da 3. resimlerde hücre duvarının ortasında fultoportula adı verilen özel açıklıklar görülmüştür. Hücrelerin üstten görünüşlerine bakıldığında, hücre duvarı yapısında kenarlardan ortaya doğru uzanan striae olarak adlandırılan çizgiler/şeritler gözlemlenmiştir (Şekil 3.8'de 2. resim).

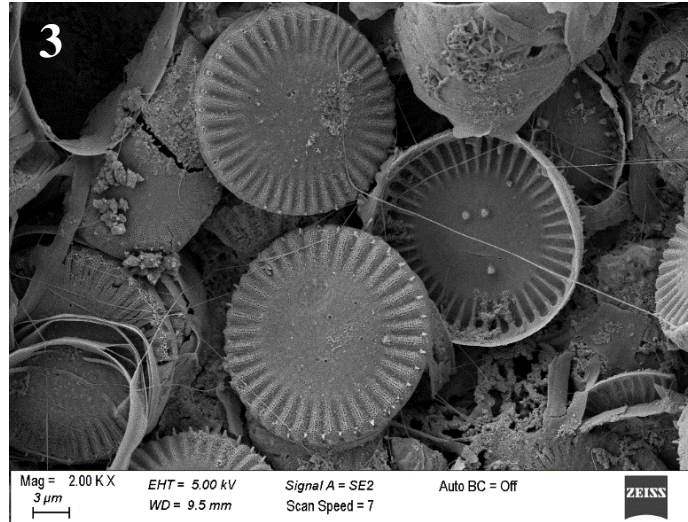
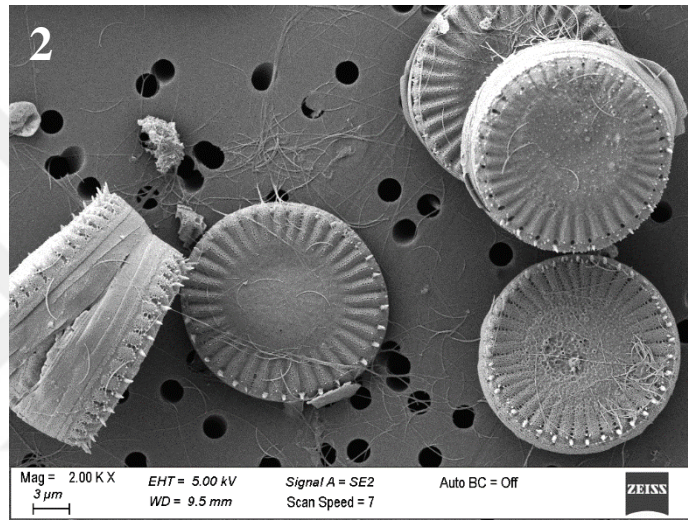
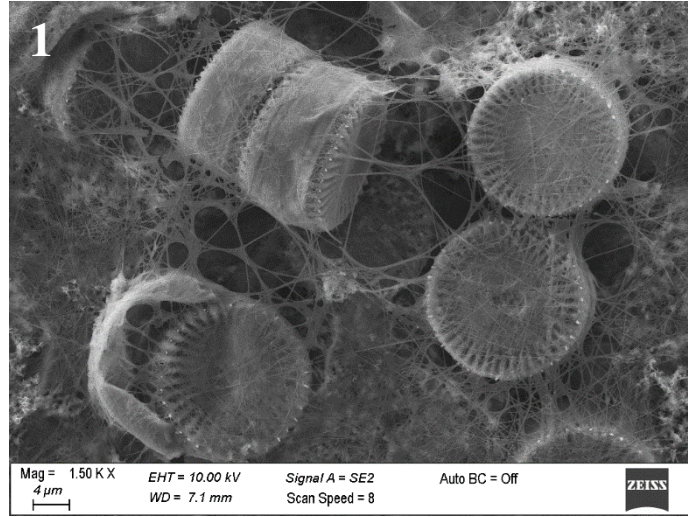
Tez çalışmasında kullanılan diatom hücrelerinin SEM analizi görüntüleri, filogenetik analiz sonucunda genetik benzerliği yüksek olan *Conticribra weissflogii* türünün SEM analizi görüntüleri ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışmasındaki diatom hücreleri; sentrik olması ve hücre duvarı ortasında bulunan fultoportula açıklıkları ile *Conticribra weissflogii* suşuna benzerlik göstermiş olsa da, tez çalışmasındaki diatom hücrelerinde belirgin bir şekilde görülen hücre duvarı kenarlarından merkeze doğru uzanan çizgiler *Conticribra weissflogii* suşunda net bir şekilde görülmemektedir. Ayrıca *Conticribra weissflogii* suşunda diken yapılarının da görünmemesi (fazla miktarda kenarlardan uzanan futoportula açıklığı içermekte), tez çalışmasında kullanılan türün bu suştan yapısal olarak farklılık gösterdiği sonucunu öne sürmektedir (Cavalcante ve diğ, 2013; Hevia-Orube ve diğ, 2016).



Şekil 3.8 : Diatom hücresinin üstten SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (4000x), 2) HCl ile muamele edilen (4000x), 3) H₂O₂ ile muamele edilen (4000x).



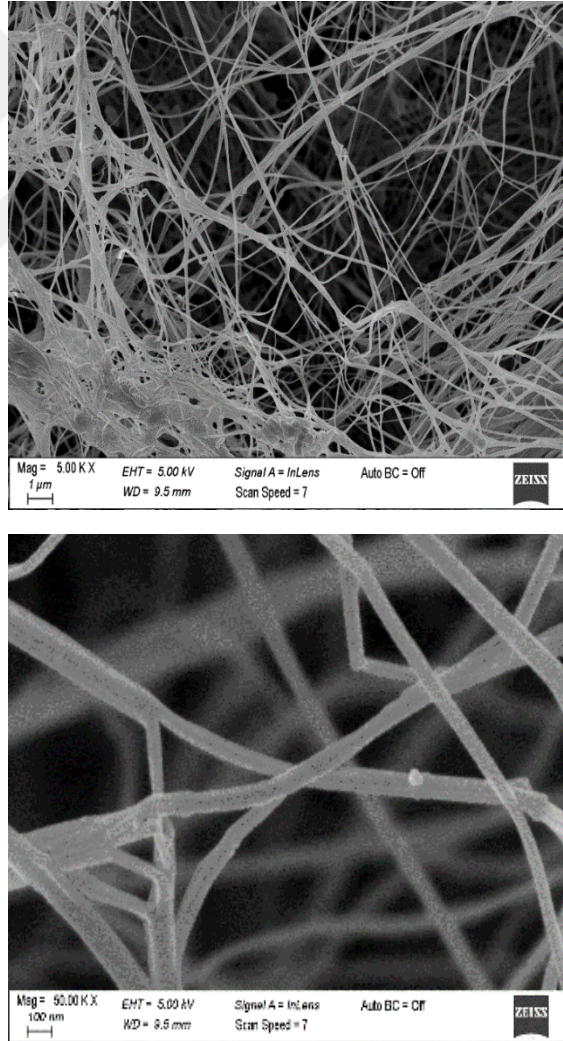
Şekil 3.9 : Diatom hücresinin yandan SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (3000x), 2) HCl ile muamele edilen (5000x), 3) H₂O₂ ile muamele edilen (3500x).



Şekil 3.10 : Diatom hücrelerinin SEM görüntüsü 1) sadece filtrelenen (1500x), 2) HCl ile muamele edilen (2000x), 3) H₂O₂ ile muamele edilen (1500x).

Bunun yanında, tez çalışmasında kullanılan türün hücre çapının yaklaşık 8-10 μm olduğu görülmüştür. Hücre duvarındaki şeritler ve diken yapıları, hücre boyutu ve hücrenin ters faz kontrast mikroskobu görüntüleri incelendiğinde *Cyclotella meneghiniana* suşuna yapısal benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle kültürlenmiş diatom suşunun bu türün bir varyasyonu olabileceği düşünülmektedir (Lowe ve Kheiri, 2015; Walsh ve diğ., 2017). Ancak cins ve tür tanımlaması açısından ilave genetik analizlerin yapılması faydalı görülmektedir.

Diyaliz yapılarak daha temiz görüntü elde edilen kitin ipliklerinin çapı ImageJ programı ile ölçülmüş ve ortalama 42 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.11). Literatürde yaklaşık olarak 50 nm çapa sahip olduğu görülen kitin iplikleri ile tez çalışmasında elde edilen kitin ipliklerinin çapının yakın değerlere sahip olduğu görülmüştür (Chiriboga ve Rorrer, 2018; Ozkan ve Rorrer, 2017a).



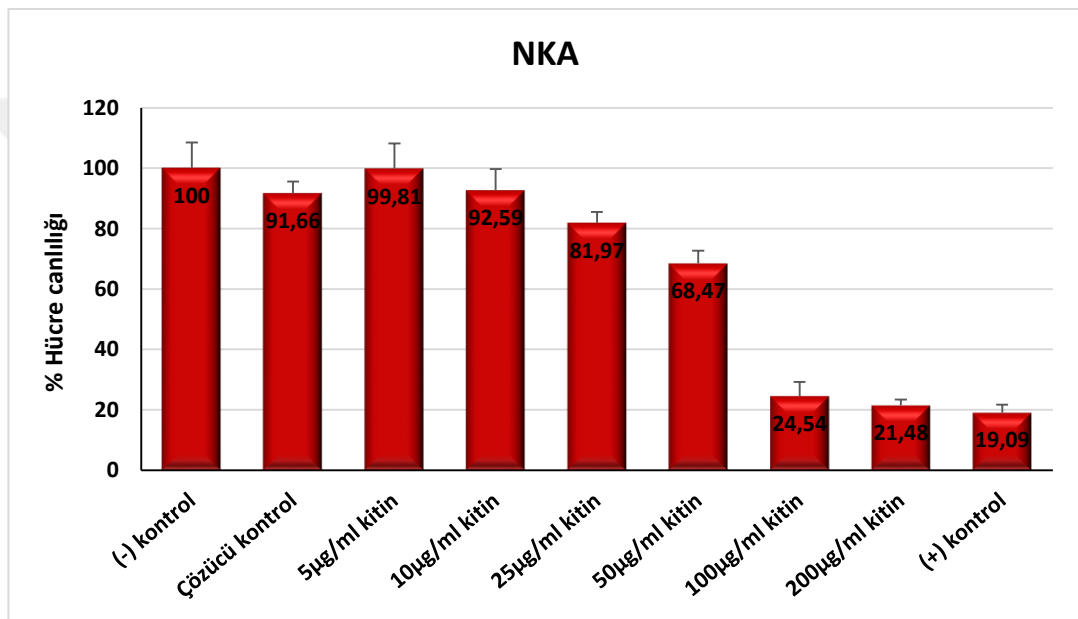
Şekil 3.11 : Diatom hücrelerinden elde edilen kitinin SEM görüntüleri (üst) 5000x, 2) 50000x büyütme.

3.4.1 Sitotoksosite testleri

Elde edilen kitinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri, nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksosite testleriyle incelenmiş ve iki testte de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.

3.4.1.1 NKA (Nötral Kırmızısı Alım) testi

Lizozomal aktiviteyi incelemek amacıyla yapılan NKA testi sonuç grafiği Şekil 3.12'deki gibi elde edilmiştir.



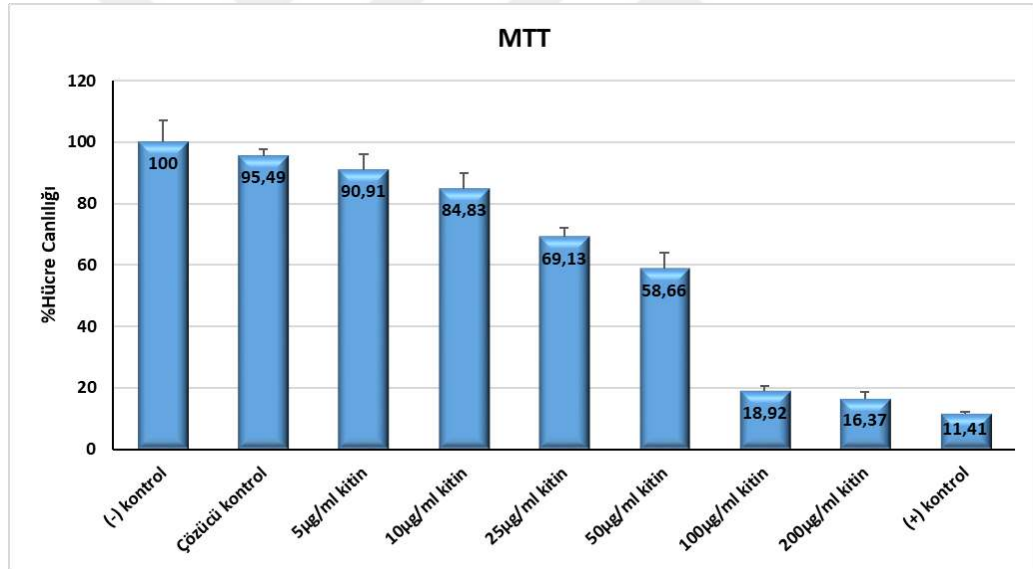
Şekil 3.12 : NKA yöntemine göre kitinin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *Sonuçlar her çalışmada 8 tekrarlı ve ayrı zamanlarda 2 paralel olarak yapılan çalışmaların ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

NKA testi sonuçlarına göre kitinin 5-50 $\mu\text{g/ml}$ düşük konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmadığı; ancak 100 $\mu\text{g/ml}$ ve 200 $\mu\text{g/ml}$ yüksek konsantrasyonlarında hücre canlılığının % 50 altına düştüğü ve sitotoksik etki oluşturduğu görülmektedir. Lizozomal aktiviteye dayalı olarak hücre canlılığını belirleyen NKA testine göre kitinin inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) değeri 71,02 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

3.4.1.2 MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi

Mitokondriyel aktiviteyi incelemek amacıyla yapılan MTT testi sonuç grafiği Şekil 3.13'teki gibi elde edilmiştir.

MTT testi sonucuna göre kitinin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla azalmalara neden olduğu görülmüştür. 5-25 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığı % 70'in altına ve 50 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı % 50'nin altına düşmediği için kitinin düşük konsantrasyonlarının sitotoksik olmadığı değerlendirilmiştir. Ancak, hücre canlılığı 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonda ise % 50'nin altına düştüğü için bu konsantrasyonlar sitotoksik olarak değerlendirilmiştir. Mitokondriyel aktiviteye dayalı olarak hücre canlılığını belirleyen MTT testine göre kitinin inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değeri 60,90 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.13 : MTT yöntemine göre kitinin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *Sonuçlar her çalışmada 8 tekrarlı ve ayrı zamanlarda 2 paralel olarak yapılan çalışmaların ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

En yüksek kitin konsantrasyonu (200 µg/ml) ile aynı konsantrasyonda hazırlanan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - MeOH çözücü kontrol grubu sonuçları karşılaştırıldığında; çözücü kontrolün toksik olmadığı görülmektedir. Böylece literatüre göre Ca çözücü sisteminin toksik olmaması bu çalışmada kanıtlanmaktadır (Pillai ve diğ, 2009).

Kitin kaynağı ve kitinin saflığı, bu malzemenin biyolojik aktivitelerini de etkilemektedir. Ticari olarak alınan kitin ve türevleri ile yapılan çalışmada 5-50 µg/ml

arasında toksik etki göstermeyen türevi olduğu ancak daha yüksek derişimlerde kitinin toksik etki gösterdiği görölmektedir (Mori ve diğ, 1997). Bu tez çalışmasında tekrarlı olarak yapılan her iki test sonucunda elde edilen verilere göre 50 µg/ml ve altında konsantrasyonlarda diatom suşundan elde edilen kitinin toksik etki oluşturmadığı görölmüştür.



4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Müsilajdan tek hücre izolasyonu ile elde edilen diatom hücresi, 96 kuyucuklu plakalarda f/2+Si ve L1+Si ortamlarına alınmış ve büyümeleri, şekilleri, yoğunluğu ters faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiştir.

Plakalarda yoğunlaşan diatom hücre kültürleri hacimleri yavaş yavaş artırılmak üzere falkonlara ve daha sonra erlenlere aktarılmıştır. Denemeler ve gözlemler sonucunda, f/2+Si ortamında daha sağlıklı büyümesi sebebiyle bundan sonraki hacim arttırmalarda bu ortam tercih edilmiştir.

Bu tez çalışmasında diatom suşunun kültürleme koşulları literatüre benzer şekilde 20-25 °C sıcaklıkta, 12 sa. gece/ 12 sa. gündüz ışık döngüsünde yapılmıştır. Ancak, 10 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ile literatüre kıyasla oldukça düşüktür. Burada dikkat edilen en önemli aşama hücre yoğunluğunu sağlıklı bir şekilde arttırarak genetik analizleri tamamlamak ve kitin üretip üretmediğini kanıtlamak olarak görülmüştür. Tek hücre aşamasında ve büyük hacimde düşük ışık şiddetinde kültür sağlıklı ve yoğun olduğu için bu ışık şiddetinde devam edilmiştir.

Gelecek çalışmalarda optimum büyüme koşullarını bulmak amacıyla ışık şiddeti, çalkalama, hava verme/ biyoreaktör sisteminde kültürleme faktörleri değiştirilecek ve en uygun olanları ile devam edilecektir.

Genetik karakterizasyonu amacıyla, DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak yapılmıştır. ITS gen bölgesi için tasarlanmış olan AB28, TW81 primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve jelde yürütülmüştür. Jelden ekstrakte edilen DNA fragmentlerinin filogenetik analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda maksimum olasılık ağasına göre diatom türünün Thalassiosirales takımına ait olduğu sonucuna varılmıştır.

Yoğun hale gelmiş olan diatom kültüründen, kitin izole edilmiştir. Diatomlardan kitin ipliklerini ayırma aşamasında 5, 9 ve 13 dk. vorteksleme süresi denenmiş ve

saflaştırma ve kurutma sonrası elde edilen kitin miktarlarında çok değişiklik olmadığı bu nedenle 5 dk. vortekslemenin yeterli olacağı düşünülmüştür. Gelecek çalışmalarda vorteksleme süresi ile ilgili daha fazla deneme yapılması planlanmaktadır. Hava vermeden kültürlenmiş diatomdan elde edilen kitin miktarı 25 mg/L'dir. Bu miktarı arttırmak için ortam koşullarında değişiklikler yapılarak hücre yoğunluğuyla doğru orantılı olarak kitin miktarının da artırılması hedeflenmektedir.

Kitin saflaştırma optimizasyonu amacıyla protein analizi yapılmıştır. Elde edilen kitine, saflaştırma aşamasında 5 ve 30 dk. SDS (sodyum dodesil sülfat) ile muamele edilmiş ve muamele süresi arttıkça protein içeriğinin azaldığı görülmüştür. Protein kalıntılarından uzaklaştırılan kitinin daha saf olmasından dolayı biyoteknolojik kullanım için de bu biyomalzemeyi daha elverişli hale getirmektedir.

Kitin iplikleri, FTIR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiş ve kitinin spesifik bantları olan; C-O-C bandı 1152 cm^{-1} değerinde ve C-O bandı 1025 cm^{-1} değerinde pik vermiştir. Ayrıca önemli fonksiyonel grupları olan NH_2 (amit I) bandının 1630 cm^{-1} 'de ve NH (amit II) bandının 1552 cm^{-1} 'de pik verdiği gözlemlenmiştir. 1435 cm^{-1} 'de görünen pik ise elde edilen kitinin β -kitin formunda olduğunu göstermektedir.

Diatom hücrelerinin ve elde edilen kitinin görüntüleri SEM ve ters faz kontrast mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir. Alınan görüntülerde kitin ipliklerinin hücreye bağlı yapısı ve hücre dışında kitin ipliklerinden oluşan ağsı tabaka net bir şekilde gözlemlenmiştir. ImageJ programı ile ölçülen kitin ipliklerinin çap genişliği 42 nm olarak hesaplanmıştır.

Sitotoksikite test sonuçları iki testte benzer çıkmıştır. Çözücü kontrol grubunun toksik etki göstermediği görülmüştür. NKA ve MTT test sonuçlarına göre $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ve altındaki konsantrasyonlardaki kitin çözeltisinin toksik etki oluşturmadığı ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında mikroalglerin kitin kaynağı olarak kullanımı araştırılmış ve kitin üreten bir diatom türü büyük hacimde üretilerek kitin ürettiği kanıtlanmıştır. Elde edilen kitinin karakterizasyonu ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Tez çalışmasının devamı olarak yapılacak olan çalışmalarda; farklı karakterizasyon yöntemleri (UV-VIS, XRD, DSC, TGA) ile ayrıntılı analizler yapılması ve elde edilen kitinin biyoteknolojik bir ürüne dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Diatomlardan kitin eldesi üzerine dünya genelinde çok az insan çalışmakta olup ülkemizde bu konuda çalışan

birkaç araştırmacı bulunmaktadır. Gelecek çalışmalarda yenilikçi malzeme veya katkısı olarak kullanılması için umut vadeden bir biyomalzeme olarak grlmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, R. M., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M. G., Soliman, A. Y., Mohamed, F. K., Mohsin, K., & Pinto, T. D.** (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>
- Andersen, R. A.** (2005). Algal Culturing Techniques. Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. & Watanabe, M.M. (Prep.). *Appendix A – Recipes for Freshwater and Seawater Media*, 429-539.
- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P. T. S., Deepthi, S., Chennazhi, K. P., Ehrlich, H., Tsurkan, M., & Jayakumar, R.** (2014). Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39(9), 1644–1667. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>
- Asimakis, E., Shehata, A. A., Eisenreich, W., Acheuk, F., Lasram, S., Basiouni, S., Emekci, M., Ntougias, S., Taner, G., May-Simera, H., Yilmaz, M. & Tsiamis, G.** (2022). Algae and Their Metabolites as Potential Bio-Pesticides. *Microorganisms*. 10(2):307. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020307>
- Balitaan, J. N. I, Martin, G. A. V & Santiago, K. S** (2020). Revamping squid gladii to biodegradable composites: In situ grafting of polyaniline to β -chitin and their antibacterial activity. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1-16. doi: 10.1177/0883911520973239
- Barbarino, E., Lourenço, S.O.** (2005) An Evaluation of Methods for Extraction and Quantification of Protein from Marine Macro and Microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17: 447–460
- Blackwell, J., Parker, K. D. & Rudall, K. M.** (1967). Chitin Fibres of the Diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. *J. Mol. Biol.* (28), 383–385.
- Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M., Machill, S., Paasch, S., Bazhenov, V. V., Kurek, D. V., Arnold, T., Brockmann, S., Ruhnnow, M., & Born, R.** (2009b). Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *Journal of Structural Biology*, 168(3), 539–547. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2009.06.018>
- Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S., & Van Pée, K. H.** (2009a). Chitin-based organic networks: An integral part of cell wall biosilica in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(51), 9724–9727. <https://doi.org/10.1002/anie.200905028>
- B. Rufato, K., P. Galdino, J., S. Ody, K., G.B. Pereira, A., Corradini, E., F. Martins, A., T. Paulino, A., R. Fajardo, A., A. Aouada, F., A. La Porta, F.,**

- F. Rubira, A., & C. Muniz, E.** (2019). Hydrogels Based on Chitosan and Chitosan Derivatives for Biomedical Applications. *Hydrogels - Smart Materials for Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81811>
- Cavalcante, K. P., Tremarin, P. I., & Ludwig, T. A. V.** (2013). Taxonomic studies of centric diatoms (diatomeae): Unusual nanoplanktonic forms and new records for Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27(2), 237–251. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000200001>
- Chiriboga, O., & Rorrer, G. L.** (2018). Effects of nitrogen delivery on chitin nanofiber production during batch cultivation of the diatom *Cyclotella* sp. in a bubble column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1575–1581. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1368-z>
- Dahmane, E. M., Taourirte, M., Eladlani, N., & Rhazi, M.** (2014). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *Parapenaeus longirostris* from Moroccan Local Sources. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 19(4), 342–351. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2014.902577>
- Demir, A., Seventekin, N., Emel, E. Ü., Meslek, A., Okulu, Y., Tekstil, E. Ü., Bölümü, M., & İzmir, B.** (2009). Chitin, Chitosan and General application Areas. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3(2), 92–103. www.teknolojikarastirmalar.com
- Ding, F., Shi, X., Li, X., Cai, J., Duan, B., & Du, Y.** (2012). Homogeneous synthesis and characterization of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.069>
- Durkin, C. A., Mock, T., & Armbrust, E. V.** (2009). Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryotic Cell*, 8(7), 1038–1050. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-09>
- Francesko, A., Díaz González, M., Lozano, G. R., & Tzanov, T.** (2010). Developments in the processing of chitin, chitosan and bacterial cellulose for textile and other applications. *Advances in Textile Biotechnology*, 2005, 288–311. <https://doi.org/10.1533/9780857090232.2.288>
- Franke, W. W., & Herth, W.** (1973). Cell and lorica fine structure of the chrysomonad alga, *Dinobryon sertularia* Ehr. (Chrysophyceae). *Archiv Für Mikrobiologie*, 91(4), 323–344. <https://doi.org/10.1007/BF00425052>
- Gerardi, M. H., & Lytle, B.** (2015). Green Algae and Diatoms. *The Biology and Troubleshooting of Facultative Lagoons*, 85–96. <https://doi.org/10.1002/9781118981771.ch11>
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H.** (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229- 239
- Guillard, R.R.L.** (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26- 60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** (2021). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>

- Harkin, C., Mehlmer, N., Woortman, D. V., Brück, T. B., & Brück, W. M.** (2019). *Nutritional and Additive Uses of Chitin and Chitosan in the Food Industry*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_1
- Heckel, T., Konieczna, D. D., & Wilhelm, R.** (2013). An ionic liquid solution of chitosan as organocatalyst. *Catalysts*, 3(4), 914–921. <https://doi.org/10.3390/catal3040914>
- Herth, W., & Barthlott, W.** (1979). The Site of fi-Chitin Fibril Formation in Centric Diatoms I. Pores and Fibril Formation. *Journal of Ultrastructure Research*, 68, 6–15.
- Herth, W., & Zugenmaier, P.** (1979). The lorica of Dinobryon. *Journal of Ultrastructure Research*, 69(2), 262–272. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(79\)90115-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(79)90115-1)
- Herth, W., Kuppel, A., & Schnepf, E.** (1977). Chitinous fibrils in the lorica of the flagellate chrysophyte *Poteriochromonas stipitata* (Syn. *Ochromonas malhamensis*). *Journal of Cell Biology*, 73(2), 311–321. <https://doi.org/10.1083/jcb.73.2.311>
- Hevia-Orube, J., Orive, E., David, H., Díez, A., Laza-Martínez, A., Miguel, I., & Seoane, S.** (2016). Molecular and morphological analyses of solitary forms of brackish Thalassiosiroid diatoms (Coscinodiscophyceae), with emphasis on their phenotypic plasticity. *European Journal of Phycology*, 51(1), 11–30. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1077394>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamura, H.** (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
- Je, J. Y., & Kim, S. K.** (2006). Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.012>
- Katarzyna Stachura-Suchoples & David M. Williams** (2009). Description of *Conticribratricircularis*, a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin, *European Journal of Phycology*, 44(4), 477–486, doi: 10.1080/09670260903225431
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I., & Labidi, J.** (2017). On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, 176, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>
- Khattak, S., Wahid, F., Liu, L. P., Jia, S. R., Chu, L. Q., Xie, Y. Y., Li, Z. X., & Zhong, C.** (2019). Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 1989–2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09602-0>
- Kostag, M., & El Seoud, O. A.** (2021). Sustainable biomaterials based on cellulose, chitin and chitosan composites - A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2(December 2020), 100079.

- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P.** (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
- Kurt, Ş., & Zorba, Ö.** (2005). Kitin (Chitin), Kitosan (Chitosan) veTürevlerinin Gıdalarda Kullanım Olanakları. In *Gıda* (Vol. 30, Issue 6, pp. 371–378).
- LeDuff, P., & Rorrer, G. L.** (2019). Formation of extracellular β -chitin nanofibers during batch cultivation of marine diatom *Cyclotella* sp. at silicon limitation. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3479–3490. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01879-6>
- Lowe, R. & Kheiri, S.** (2015). *Cyclotella meneghiniana*. In *Diatoms of North America*. https://diatoms.org/species/cyclotella_meneghiniana
- Matica, A., Menghiu, G., & Ostafe, V.** (2017). Antibacterial Properties of Chitin and Chitosans. *Former: Ann. West Univ. Timisoara-Series Chem*, 26(1), 39–54.
- Minke, R. & Blackwell, J.** (1978). The structure of α -chitin. *Journal of Molecular Biology*, (120), 167–81.
- Morganti, P., Del Ciotto, P., Carezzi, F., Nunziata, M. L., & Morganti, G.** (2016). A chitin nanofibril-based non-woven tissue as medical dressing: the role of bionanotechnology. *Nanomaterials and Regenerative Medicine, February*, 123–142. <https://doi.org/10.5599/obp.9.25>
- Morganti, P., & Li, Y.-H.** (2011). From Waste Materials Skin-Friendly Nanostructured Products to Save Humans and the Environment. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 01(03), 99–105. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2011.13015>
- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Minami, S., & Fujinaga, T.** (1997). Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18(13), 947–951. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00017-3)
- Moura, C. M. de, Moura, J. M. de, Soares, N. M., & Pinto, L. A. de A.** (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(4), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.03.003>
- Ogawa, Y., Kimura, S. & Wada, M.** (2011). Electron diffraction and high-resolution imaging on highly-crystalline β -chitin microfibril. *J. Struct. Biol.*, 176 (1), 83–90. doi: 10.1016/j.jsb.2011.07.001.
- Ozkan, A., & Rorrer, G. L.** (2017a). Effects of CO₂ delivery on fatty acid and chitin nanofiber production during photobioreactor cultivation of the marine diatom *Cyclotella* sp. *Algal Research*, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.003>
- Ozkan, A., & Rorrer, G. L.** (2017b). Effects of light intensity on the selectivity of lipid and chitin nanofiber production during photobioreactor cultivation of the marine diatom *Cyclotella* sp. *Algal Research*, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.032>

- Perona, A., Hoyos, P., Farrán, Á., & Hernáiz, M. J.** (2020). Current challenges and future perspectives in sustainable mechanochemical transformations of carbohydrates. *Green Chemistry*, 22(17), 5559–5583. <https://doi.org/10.1039/d0gc00901f>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P.** (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Rudall, K.** (1962). Silk and other cocoon proteins. *Comparative biochemistry*, 4, 397–433.
- Rudall, K.** (1963). The chitin/protein complexes of insect cuticles. *Advances in insect physiology*, 1, 257–313.
- Saad, E. M., Pickering, R. A., Shoji, K., Hossain, M. I., Glover, T. G., Krause, J. W., & Tang, Y.** (2020). Effect of cleaning methods on the dissolution of diatom frustules. *Marine Chemistry*, 224(June 2019), 103826. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103826>
- Schmitz, C., Auza, L. G., Koberidze, D., Rasche, S., Fischer, R., & Bortesi, L.** (2019). Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects. *Marine Drugs*, 17(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/md17080452>
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., & Petropoulos, S. A.** (2021). Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. *Biomolecules*, 11(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom11060819>
- Shamshina, J. L., Berton, P., & Rogers, R. D.** (2019). Advances in Functional Chitin Materials: A Review [Review-article]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(7), 6444–6457. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06372>
- Shamshina, J. L., Kelly, A., Oldham, T., & Rogers, R. D.** (2020). Agricultural uses of chitin polymers. *Environmental Chemistry Letters*, 18(1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00934-5>
- Shigemasa, Y., & Minami, S.** (1996). Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 383–420. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647935>
- Spinde, K., Kammer, M., Freyer, K., Ehrlich, H., Vournakis, J. N., & Brunner, E.** (2011). Biomimetic silicification of fibrous chitin from diatoms. *Chemistry of Materials*, 23(11), 2973–2978. <https://doi.org/10.1021/cm200677d>
- Synowiecki, J., Al-khateeb, N. A., & Synowiecki, J.** (2010). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3)(September 2011), 145–171.
- Tamura, H., Nagahama, H., & Tokura, S.** (2006). Preparation of chitin hydrogel under mild conditions. *Cellulose*, 13(4), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s10570-006-9058-z>
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S.** (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–

- Tesson, B., Masse, S., Laurent, G., Maquet, J., Livage, J., Martin-Jézéquel, V., & Coradin, T.** (2008). Contribution of multi-nuclear solid state NMR to the characterization of the *Thalassiosira pseudonana* diatom cell wall. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(7), 1889–1898. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1908-0>
- Vallejo-Domínguez, D., Rubio-Rosas, E., Aguila-Almanza, E., Hernández-Cocoletzi, H., Ramos-Cassellis, M. E., Luna-Guevara, M. L., Rambabu, K., Manickam, S., Siti Halimatul Munawaroh, H., & Loke Show, P.** (2021). Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105417>
- Viji, S., Anbazhagi, M., Ponpandian, N., Mangalaraj, D., Jeyanthi, S., Santhanam, P., Shenbaga Devi, A. & Viswanathan, C.** (2014). Diatom-Based Label-Free Optical Biosensor for Biomolecules. *Appl. Biochem. Biotechnol.* doi: 10.1007/s12010-014-1040-x
- Walsh, P. J., Clarke, S. A., Julius, M. & Messersmith, P. B.** (2017). Exploratory Testing of Diatom Silica to Map the Role of Material Attributes on Cell Fate. *Scientific Reports*, (7). doi:10.1038/s41598-017-13285-4
- Wustmann, M., Poulsen, N., Kröger, N., & van Pée, K.-H.** (2020). Chitin synthase localization in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *BMC Materials*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s42833-020-00016-9>

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Kübra TUNALIER

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** :
- **Yüksek Lisans** :