T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ KULLANILARAK EKSTRAKTE EDİLEN DENİZ ÇAYIRI ATIKLARINDAN BİYOJENİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ VE KOMPOZİT MEMBRAN UYGULAMALARI

Doktora Tezi

Ayşegül İNAM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir

2025

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ KULLANILARAK EKSTRAKTE EDİLEN DENİZ ÇAYIRI ATIKLARINDAN BİYOJENİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ VE KOMPOZİT MEMBRAN UYGULAMALARI

Ayşegül İNAM

Danışmanlar: Prof. Dr. Murat ELİBOL
Prof. Dr. Yılmaz YÜREKLİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir
2025

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum "**DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ KULLANILARAK EKSTRAKTE EDİLEN DENİZ ÇAYIRI ATIKLARINDAN BİYOJENİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ VE KOMPOZİT MEMBRAN UYGULAMALARI**" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14 / 02 / 2025

Ayşegül İNAM

ÖZET

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ KULLANILARAK EKSTRAKTE EDİLEN DENİZ ÇAYIRI ATIKLARINDAN BİYOJENİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ VE KOMPOZİT MEMBRAN UYGULAMALARI

İNAM, Ayşegül

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Şubat 2025, 176 sayfa

Günümüzde nanoteknoloji farklı alanlardaki uygulamaları nedeniyle oldukça önem kazanmıştır. Nanoteknoloji ürünü olan metal nanopartiküller yüksek yüzey alanı-hacim oranları nedeniyle özgün biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir. Gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri bu avantajlı özelliklerinin yanında çeşitli aktivitelere sahip olduklarından en çok uygulama bulan nanopartiküllerden olmuştur. Metal nanopartiküllerinin üretiminde kullanılan yaklaşımlarda genellikle fiziksel ve kimyasal yöntemler bulunmaktadır. Ancak kullanılan ekipmanların ve solventlerin çevreye zararı olması, yüksek enerji giderleri gerektirmesi nedeniyle alternatif yöntem olarak yeşil sentez son zamanlarda popüler hale gelmiştir. İndirgeyici ajan olarak biyolojik materyallerin kullanıldığı bu yöntemde oda koşullarında başarılı şekilde metal nanopartiküller elde edilebilmektedir. Deniz çayırı yaprak ve rizomlarının özellikle turistik sahillerde birikim göstermesi, bu biyolojik kaynağı bertaraf edilecek bir atık olarak düşündürmüştür. Ancak sahip olduğu bileşikler, deniz çayırı atıklarının potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir. Diğer yandan geleneksel solvent sistemlerine alternatif ve çevre dostu olarak geliştirilen derin ötektik çözücüler (DES) düşük buhar basıncı, yanmazlık, yüksek çözünme, yüksek termal aktivite ve kimyasal kararlılık gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Ayrıca lignoselülozik bitki kaynaklarının ekstraksiyonunda DES sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemlerle elde edilen ekstraktların yeşil sentez yönteminde indirgeyici özelliği bulunmaktadır. Asetik asit bakterileri tarafından bitkisel selülozla aynı yapıda ve saf olarak üretilen bakteriyel selüloz (BS) modifikasyonlara açık bir biyolojik polimerdir. Gözenekli yapıya sahip olması BS'nin atık su arıtım membranı olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında ilk aşama olarak deniz

çayırı atıklarının yeşil sentez yönteminde indirgeyici ajan olarak kullanılması hedeflenmiştir. Öncelikle farklı DES sistemleri kullanılmış, toplam fenolik ve toplam şeker miktarları spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre çözücü DES sistemi olarak kolin klorür:üre (1:2) seçilmiştir. Ekstraksiyon çalışma koşullarında çözücü sisteminde su miktarı %52,5, ekstraksiyon süresi 60 dakika, ekstraksiyon sıcaklığı 82,5 °C ve çözücü/biyokütle oranı 35 mL/g olarak belirlenmiştir. Sentezlenen metal nanopartikülleri arasından yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda daha stabil yapıda olan gümüş nanopartikülü seçilmiştir. Gümüş nanopartikül boyutu 163 nm, polidispersite indeksi ise 0,117 olarak ölçülmüştür. Antibakteriyel, antibiyofilm ve fotokatalitik aktiviteleri saptanan gümüş nanopartikülünün son basamak uygulamasında ise BS ile atık su arıtımına yönelik kompozit membran yapı oluşturulmuştur. Karakterizasyon sonrasında BS membranlarının farklı filtrasyon testleri yapılmıştır. Başarılı şekilde *Escherichia coli* filtrasyonu yapılarak türbidite giderimi sağlanırken, optik yoğunluğa bağlı olarak kompozit BS ile zeytin karasuyu %54 oranında giderilmiştir. Kompozit membranın hidrolik geçirgenlik değeri 8,99 $L/m^2.h.bar$ olarak ölçülmüştür. Yapılan karakterizasyon ve filtrasyon testleriyle bu kompozit membranın gelecek çalışmalar için potansiyeli tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Metal nanopartiküller, yeşil sentez, atık deniz çayırı, derin ötektik çözücüler, bakteriyel selüloz.

ABSTRACT

BIOGENIC NANOPARTICLE SYNTHESIS FROM EXTRACTED SEAGRASS WASTE USING DEEP EUTECTIC SOLVENT AND COMPOSITE MEMBRANE APPLICATIONS

INAM, Aysegul

PhD in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELIBOL

February 2025, 176 pages

Today, nanotechnology has gained great importance due to its applications in different fields. Metal nanoparticles, which are nanotechnology products, have unique biological, chemical and physical properties due to their high surface area-to-volume ratios. Silver, titanium and zinc nanoparticles have been the most widely used nanoparticles since they have various activities besides these advantageous properties. The approaches used in the production of metal nanoparticles generally include physical and chemical methods. However, since the equipment and solvents used are harmful to the environment and require high energy costs, green synthesis has recently become popular as an alternative method. In this method, where biological materials are used as reducing agents, metal nanoparticles can be successfully obtained under room conditions. The accumulation of seagrass leaves and rhizomes, especially on touristic beaches, has led us to consider this biological resource as a waste to be disposed of. However, its contents show that seagrass wastes are a potential source. On the other hand, deep eutectic solvents (DES) developed as an environmentally friendly alternative to conventional solvent systems have unique properties such as low vapor pressure, non-flammability, high solubility, high thermal activity and chemical stability. In addition, DES systems are widely used in the extraction of lignocellulosic plant sources. The extracts obtained with these systems have reducing properties in green synthesis method. Bacterial cellulose (BS), produced by acetic acid bacteria in the same structure and purity as plant cellulose, is a biological polymer open to modifications. Its porous structure enables BS to be used as a wastewater treatment membrane. Within the scope of this thesis study, it was aimed to use seagrass wastes as reducing agent in green synthesis method as a first step. Firstly, different DES systems were used, and total phenolic and total sugar amounts were determined by spectrophotometric

methods. According to these results, choline chloride:urea (1:2) was selected as solvent DES system. As extraction operating conditions, the amount of water in the solvent system was determined as 52,5%, extraction time was 60 minutes, extraction temperature was 82,5 °C and solvent/biomass ratio was 35 mL/g. Among the synthesized metal nanoparticles, silver nanoparticle, which has a more stable structure, was selected as a result of the characterization studies. Silver nanoparticle size was 163 nm, and the polydispersity index was measured as 0,117. Antibacterial, antibiofilm and photocatalytic activities of silver nanoparticles were determined. In the last step application of silver nanoparticles, a composite membrane structure was formed for wastewater treatment with BS. After characterization, different filtration tests of BS membranes were performed. While turbidity removal was achieved by successfully filtration of *Escherichia coli*, olive mill wastewater was removed by 54% with the composite BS depending on the optical density. The hydraulic permeability value of the composite membrane was measured as 8.99 $L/m^2.h.bar$. With the characterization and filtration tests, the potential of this composite membrane was determined for future studies.

Keywords: Metal nanoparticles, green synthesis, seagrass waste, deep eutectic solvents, bacterial cellulose.

ÖNSÖZ

Sanayileşmeyle birlikte prosesler sonucu açığa çıkan ve gün geçtikçe miktarı artmakta olan atık sular, temiz su kaynaklarını ve toprağı kirleterek canlılar üzerinde farklı yönlerden tehdit oluşturmaktadır. Atık suların çeşitli teknikler kullanılarak arıtılması gerektiği aşikardır. Membran sistemler gibi yenilikçi yöntemler atık suların arıtılarak deşarj edilmesini sağlamaktadır. Özellikle bakteriyel selüloz gibi biyolojik bir membran sistemi geliştirmek hem filtrasyon öncesi üretim prosesinde hem de filtrasyon sonrası bertaraf işleminde çevre dostu yöntemlerin takip edilmesini sağlayacaktır. Diğer yandan metal nanopartiküllerin membran sistemlere entegre edilmesi bu sistemlerin kirlenme, verimliliklerinin azalması gibi durumlarının önüne geçilecektir. Metal nanopartiküllerin çevre dostu yeşil sentez yöntemiyle üretilmesi ve ardından çevre dostu membranlara entegre edilmesi bu tez çalışmasının temel hedefi olmuştur. Oda koşullarında kolaylıkla üretilen nanopartiküllerde, öncül metal çözeltilerinin nanopartikül hale gelmesinde rol oynayan önemli bileşenlerden biri bitkisel ekstraktlardır. Son zamanlarda Yeşil Kimya bileşeni olan derin ötektik çözücüler ekstraksiyon sistemlerinde başarılı sonuçlar göstermiştir. Deniz çayırı atıklarının sahillerde değerlendirilmeyi beklemesi, yeni nesil ekstraksiyon sistemlerinde optimize edilmesi ve yeşil sentezde potansiyel bir biyolojik kaynak olarak düşünülmesi tez çalışmasının ilk motivasyonu olmuştur. Bu tez çalışması T.C. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FGA-2021-23345 numaralı Genel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

İZMİR

14/02/2025

Ayşegül İNAM

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

ÖNSÖZ xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xix

TABLOLAR DİZİNİ xxvi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xxix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1 Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler 4

2.2 Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri 4

2.3 Yeşil Sentez Yöntemi 6

2.4 Deniz Çayırları 7

2.5 Yeşil Kimya Yöntemi Olarak Derin Ötektik Çözücüler 10

2.6 Gümüş, Titanyum ve Çinko Nanopartikülleri 15

2.7 Bakteriyel Selüloz 16

2.7.1 Bakteriyel selüloz suşları, gelişimi ve organizasyonu 16

2.7.2 Bakteriyel selüloz üretim metotları ve saflaştırılması 18

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7.3 Bakteriyel selülozun özellikleri ve kullanım alanları 19

2.7.4 Bakteriyel selülozun modifikasyonları 20

3. GEREÇ VE YÖNTEM 22

3.1 Deniz Çayırı Atıklarının Toplanması 22

3.2 DES Sistemlerinin Hazırlanması 23

3.3 Farklı DES Sistemleriyle Deniz Çayırı Atıklarının Ekstraksiyon Ön Çalışması 23

3.4 Ekstrakt Analizleri 28

3.4.1 Toplam fenolik madde miktarı analizi (Folin-Ciocalteu reaktifi) 28

3.4.2 Toplam şeker tayini (fenol sülfürik asit metodu (Dubois metodu)) 28

3.4.3 Belirlenen şartlarda elde edilen ekstraktlara antibakteriyel aktivite tayini .. 29

3.4.4 Belirlenen şartlarda elde edilen ekstraktlara antioksidan aktivite tayini 30

3.4.5 Seçilen ekstrakta LC-MS/MS analizi 30

3.5 Yeşil Sentez Yöntemiyle Nanopartikül Sentezi 31

3.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 36

3.6.1 UV-Görünür spektral analiz 36

3.6.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği 36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.6.3 Zeta potansiyeli ölçümü....37

3.6.4 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopi analizi....37

3.6.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi....38

3.6.6 Antibakteriyel aktivite tayini....38

3.6.7 Antifungal aktivite tayini....38

3.6.8 Antioksidan aktivite tayini....39

3.6.9 Antibiyofilm aktivite tayini....39

3.6.10 Fotokatalitik aktivite tayini....39

3.7 Gümüş Nanopartikül Katkılı Kompozit Bakteriyel Selüloz Membranı Üretimi ve Uygulamaları....40

3.7.1 Membran olarak bakteriyel selüloz üretimi....40

3.7.2 Gümüş nanopartikül katkılı kompozit bakteriyel selüloz üretimi....41

3.7.3 Kompozit bakteriyel selüloz membranının karakterizasyonu....42

3.7.4 Kompozit bakteriyel selüloz membranının filtrasyon testleri....43

4. BULGULAR....45

4.1 Ekstraksiyonlar ve Ekstrakt Analizleri....45

4.2 ChCl:Üre (1:2) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları....46

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.1 ChCl:Üre (1:2) sisteminin toplam fenolik madde analizi 47

4.2.2 ChCl:Üre (1:2) sisteminin toplam şeker analizi..... 51

4.3 Ekstraksiyon Sistemlerinin Çalışma Şartlarının Belirlenmesi 53

4.3.1 ChCl:Üre (1:1) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi 53

4.3.2 ChCl:Üre (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi 54

4.3.3 L-Mentol:Asetik Asit (1:1) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi 55

4.3.4 ChCl:Gliserol (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi 56

4.3.5 ChCl:Asetik Asit (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi 57

4.4 Ekstraktların Analizleri 58

4.4.1 Toplam şeker, toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktivite..... 58

4.4.2 Antibakteriyel aktivite..... 59

4.4.3 LC-MS/MS fenolik bileşen analizi 65

4.5 Yeşil Sentez Yöntemiyle Nanopartikül Sentezi..... 66

4.5.1 Design Expert programında Ag-NP üretim sonuçları..... 71

4.5.2 Design Expert programında Ti-NP üretim sonuçları 77

4.5.3 Design Expert programında Zn-NP üretim sonuçları 83

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 89

4.6.1 UV- Görünür spektrofotometre 90

4.6.2 DLS spektrometresi 91

4.6.3 Zeta potansiyeli ölçümü 96

4.6.4 FTIR spektrometresi 98

4.6.5 SEM-EDX analizi 100

4.6.6 Antibakteriyel aktivite 106

4.6.7 Antifungal aktivite 113

4.6.8 Antioksidan aktivite 114

4.6.9 Antibiyofilm aktivite 114

4.6.10 Fotokatalitik aktivite 115

4.7 Gümüş Nanopartikül Katkılı Kompozit Bakteriyel Selüloz Membranı Üretimi, Karakterizasyonu ve Filtrasyon Uygulamaları 116

4.7.1 Karakterizasyon 117

4.7.2 Filtrasyon uygulamaları 120

5. TARTIŞMA 125

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 132

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ 135

TEŞEKKÜR 147

ÖZGEÇMİŞ 149

EKLER .....

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

Şekil 2.1. Metal nanopartikül üretim yöntemleri. 5

Şekil 2.2. *Posidonia oceanica* bitkisi **A)** Yaprak, **B)** Rizom, **C)** Kök (Astudillo-Pascual et al., 2021). 7

Şekil 2.3. Deniz kıyısında atık deniz çayırları. 8

Şekil 2.4. DES tipleri. 13

Şekil 2.5. Bakteriyel selüloz üretim ve saflaştırma aşaması. 18

Şekil 3.1. Deniz çayırı atıkları **a)** Denizden ayrılmış yeşil formu, **b)** Deniz kıyısında atık deniz çayırı birikimi, **c)** Kurutma sonrası görünüm, **d)** Öğütme sonrası görünüm. 22

Şekil 3.2. ChCl:Üre (1:2) karıştırma öncesi ve sonrası. 23

Şekil 3.3. Ekstraksiyon için faktörler, yanıtlar ve deneme deseninin Design Expert programı çıktısı. 25

Şekil 3.4. Ekstraksiyon aşaması. 26

Şekil 3.5. Filtrasyon ve antisolvent ilavesi sonrası görünümler. 27

Şekil 3.6. Nanopartikül üretimi için faktörler, yanıtlar ve deneme deseninin Design Expert programı çıktısı. 32

Şekil 3.7. Ag, Ti ve Zn nanopartikül sentezi-örnek Run'lar. 33

Şekil 3.8. Büyük ölçekte DES ile atık deniz çayırı ekstraksiyonu. 33

Şekil 3.9. Prekürsör çözeltilere ekstrakt ilave edilmesi. 34

Şekil 3.10. Ag-NP süreç başlangıç ve bitimindeki görünümü. 34

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 3.11. **a)** Ti-NP ve **b)** Zn-NP çözeltilerinin üretim sonundaki görünümleri. 35

Şekil 3.12. Nanopartiküllerin santrifüj sonrası görünümü **a)** Ag-NP, **b)** Ti-NP, **c)** Zn-NP. 35

Şekil 3.13. Nanopartiküllerin liyofilizatör sonrası toz haldeki görünümleri **a)** Ag-NP, **b)** Ti-NP, **c)** Zn-NP. 36

Şekil 3.14. BS çalkalamalı ve statik üretim görüntüleri. 40

Şekil 3.15. BS membranı saflaştırma aşaması. 41

Şekil 3.16. BS modifikasyon basamakları. 42

Şekil 4.1. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit standart eğrisi. 45

Şekil 4.2. Dubois yöntemine göre glikoz standart eğrisi. 45

Şekil 4.3. Design Expert programında ChCl:Üre (1:2) sisteminin sonuç çıktısı.. 47

Şekil 4.4. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafiği çıktısı. 50

Şekil 4.5. DES'li ekstraktların *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **1)** CC:Üre (1:1), **2)** CC:Üre (1:2), **3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **4)** CC:Gliserol (1:2), **5)** CC:Asetik asit (1:2) ekstraktları. 60

Şekil 4.6. Su ekstraktlarının *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **6)** Su ekstraktı-60 dk, **7)** Su ekstraktı-100 dk. 60

Şekil 4.7. Kontrollerin *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **P)** Gentamisin, **D1)** CC:Üre (1:1), D2) CC:Üre (1:2), **D3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **D4)** CC:Gliserol (1:2), **D5)** CC:Asetik asit (1:2) ve Su 62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.8. DES'li ekstraktların *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **1)** CC:Üre (1:1), **2)** CC:Üre (1:2), **3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **4)** CC:Gliserol (1:2), **5)** CC:Asetik asit (1:2) ekstraktları.....62

Şekil 4.9. Su ekstraktlarının *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **6)** Su ekstraktı-60 dk, **7)** Su ekstraktı-100 dk. 63

Şekil 4.10. Kontrollerin *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **P)** Gentamisin, **D1)** CC:Üre (1:1), **D2)** CC:Üre (1:2), **D3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **D4)** CC:Gliserol (1:2), **D5)** CC:Asetik asit (1:2) ve Su. 64

Şekil 4.11. Ag-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu.....68

Şekil 4.12.Ti-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu 69

Şekil 4.13. Zn-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu. 69

Şekil 4.14. Ag-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu. 70

Şekil 4.15. Ti-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu. 71

Şekil 4.16. Zn-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu.....71

Şekil 4.17. Ag-NP sonuçlarının Design Expert programı çıktısı. 72

Şekil 4.18. Ag-NP boyut yanıtı faktörlerin etki grafikleri. 74

Şekil 4.19. Ag-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri. 76

Şekil 4.20. Ti-NP sonuçlarının Design Expert programı çıktısı.....78

Şekil 4.21. Ti-NP boyut yanıtı faktörleri etki grafik çıktısı. 80

Şekil 4.22. Ti-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri. 82

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.23. Zn-NP sonuçlarının Design Expert programında çıktısı. 84

Şekil 4.24. Zn-NP boyut yanıtı faktörlerin etki grafikleri çıktısı..... 86

Şekil 4.25. Zn-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri. 88

Şekil 4.26. Ag-NP UV-Vis spektrumu. 90

Şekil 4.27. Ti-NP UV-Vis spektrumu..... 91

Şekil 4.28. Zn-NP UV-Vis spektrumu..... 91

Şekil 4.29. DLS' de boyut ve PDI takibi..... 92

Şekil 4.30. a) Ag-NP, **b)** Ti-NP ve **c)** Zn-NP'lerin DLS sonuçları. 95

Şekil 4.31. Ag-NP Zeta potansiyeli ölçümü. 96

Şekil 4.32. Ti-NP Zeta potansiyeli ölçümü..... 97

Şekil 4.33. Zn-NP Zeta potansiyeli ölçümü..... 97

Şekil 4.34. Ag-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu. 98

Şekil 4.35. Ti-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu..... 99

Şekil 4.36. Zn-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu..... 99

Şekil 4.37. Ag-NP SEM görüntüsü- 50 K büyütme. 100

Şekil 4.38. Ag-NP SEM görüntüsü- 20 K büyütme. 101

Şekil 4.39. Ti-NP SEM görüntüsü-10 K büyütme..... 102

Şekil 4.40. Ti-NP SEM görüntüsü-5 K büyütme..... 102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.41. Zn-NP SEM görüntüsü-50 K büyütme. 103

Şekil 4.42. Zn-NP SEM görüntüsü-20 K büyütme. 103

Şekil 4.43. Ag-NP EDX analizi. 104

Şekil 4.44. Ti-NP EDX analizi. 105

Şekil 4.45. Zn-NP EDX analizi. 105

Şekil 4.46. Ag-NP katı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*. 107

Şekil 4.47. Ag-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*. 107

Şekil 4.48. Ag metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P.* aeruginosa. 108

Şekil 4.49. Ti-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus,* **b)** *E. coli,* **c)** *P. aeruginosa* 109

Şekil 4.50. Ti metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa.* 109

Şekil 4.51. Zn-NP katı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa* 110

Şekil 4.52. Zn-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginos*a. 111

Şekil 4.53. Zn metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa.* 111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.54. DES ekstrakt ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus,* **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*..... 113

Şekil 4.55. *C. albicans*' a karşı antifungal aktivite çalışması..... 114

Şekil 4.56. Fotokatalitik aktivite deney düzeneği..... 115

Şekil 4.57. Zamana göre nanopartiküllerin fotokatalitik aktiviteleri..... 116

Şekil 4.58. Modifiye edilmemiş saf selülozun SEM görüntüsü-10 K büyütme. 117

Şekil 4.59. Modifiye edilmemiş saf selülozun SEM görüntüsü-20 K büyütme. 117

Şekil 4.60. Kompozit BS SEM görüntüsü-1000 büyütme..... 118

Şekil 4.61. Kompozit BS SEM görüntüsü-20 K büyütme..... 118

Şekil 4.62. Modifiye BS üzerindeki Ag-NP'lerin görünümü ve boyutları..... 119

Şekil 4.63. BS membranlarının FTIR analizi. 119

Şekil 4.64. BS-*E. coli* filtrasyon testi **a)** Kompozit BS membranı, **b)** Filtrasyon modülü yandan görünüşü, **c)** Filtrasyon modülü üstten görünüşü, **d)** Filtrasyon öncesi ve sonrası *E. coli* ortamı. 120

Şekil 4.65. Zeytin kara suyu filtrasyonu **a)** Filtrasyon süreci, **b)** Filtrasyon sonrası membran, **c)** Filtre edilmemiş ve filtre edilmiş örnek..... 121

Şekil 4.66. BS-Dikey akışlı sistemde filtrasyon testi **a)** Saf BS, **b)** Kompozit BS, **c)** Filtrasyon modülü, **d)** Modülün sisteme dahil edilmesi, **e)** Filtrasyon işleminde tartım. 122

Şekil 4.67. Saf BS zamana göre farklı basınçlarda filtre edilen su miktarları.... 123

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.68. Saf BS zamana göre hidrolik geçirgenlik grafiği. 123

Şekil 4.69. Kompozit BS zamana göre farklı basınçlarda filtre edilen su miktarları. 124

Şekil 4.70. Kompozit BS zamana göre hidrolik geçirgenlik grafiği. 124

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo Sayfa

Tablo 3.1. Ekstraksiyon faktörleri ve değerlerinin Design Expert programında çıktısı. 24

Tablo 3.2. Nanopartikül sentez faktörleri ve değerlerinin Design Expert programı çıktısı. 31

Tablo 4.1. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri çıktısı. 48

Tablo 4.2. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 48

Tablo 4.3. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi çıktısı-revize. 49

Tablo 4.4. ChCl:Üre (1:2)-Toplam şeker miktarı yanıt model özellikleri çıktısı. 51

Tablo 4.5. ChCl:Üre (1:2)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 51

Tablo 4.6. ChCl:Üre (1:1) sisteminin çözüm çıktısı. 53

Tablo 4.7. ChCl:Üre (1:2) sisteminin çözüm çıktısı. 54

Tablo 4.8. L-Mentol:Asetik Asit (1:1) sisteminin çözüm çıktısı. 55

Tablo 4.9. ChCl:Gliserol (1:2) sisteminin çözüm çıktısı..... 56

Tablo 4.10. ChCl:Asetik asit (1:2) sisteminin çözüm çıktısı. 57

Tablo 4.11. Denemelerin analiz sonuçları. 59

Tablo 4.12. Ekstraktların antibakteriyel aktivite tayini sonuçları. 64

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Sayfa

Tablo 4.13. ChCl:Üre (1:2) DES sistemi ile elde edilen ekstraktın LC-MS/MS fenolik bileşen içeriği. 65

Tablo 4.14. Nanopartiküllerin DLS ve PDI sonuçları. 67

Tablo 4.15. Ag-NP boyut yanıt model özellikleri çıktısı. 72

Tablo 4.16. Ag-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 73

Tablo 4.17. Ag-NP PDI yanıtı model anlamlılığı. 75

Tablo 4.18. Ag-NP çözüm çıktısı. 77

Tablo 4.19. Ti-NP boyut yanıtı model özellikleri çıktısı. 78

Tablo 4.20. Ti-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 79

Tablo 4.21. Ti-NP PDI yanıtı model özellikleri çıktısı. 81

Tablo 4.22. Ti-NP PDI yanıtı model anlamlılığı. 81

Tablo 4.23. Ti-NP çözüm çıktısı. 83

Tablo 4.24. Zn-NP boyut yanıtı model özellikleri çıktısı. 84

Tablo 4.25. Zn-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 85

Tablo 4.26. Zn-NP PDI yanıtı model özellikleri çıktısı. 87

Tablo 4.27. Zn-NP PDI yanıtı model anlamlılığı çıktısı. 87

Tablo 4.28. Zn-NP çözüm çıktısı. 89

Tablo 4.29. Ag-NP antibakteriyel aktivite sonuçları. 108

Tablo 4.30. Ti-NP antibakteriyel aktivite sonuçları. 110

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Sayfa

Tablo 4.31. Zn-NP antibakteriyel aktivite sonuçları. 112

Tablo 4.32. Ekstrakt ve kontrollerin antibakteriyel sonuçları. 112

Tablo 4.33. Nanopartiküllerin antioksidan aktivite sonuçları. 114

Tablo 4.34. Nanopartiküllerin antibiyofilm aktivite sonuçları. 115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat
%	Yüzde
N	Normalite

Kısaltmalar

Ag-NP	Gümüş nanopartikül
BS	Bakteriyel selüloz
CCD	Merkezi tümleşik
ChCl	Kolin klorür
cm	Santimetre
CMC	Karboksimetil selüloz
DES	Derin ötektik çözücüler
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDX	Enerji dağılım spektroskopisi
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
GAE	Gallik asit eşdeğerliği
GRAS	Genel olarak güvenli olarak kabul edilen
HBA	Hidrojen bağı alıcısı
HBD	Hidrojen bağı donörü
HS	Hestrin-Shramm
IL	İyonik sıvılar
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
m	Metre
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
mV	Milivolt
NADES	Doğal derin ötektik çözücüler
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OD	Optik yoğunluk

OVAT	Tek seferde tek değişken yaklaşımı
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDA	Patates dekstroz agar
PDI	Polidispersite indeks
ppm	Milyonda bir birim
rpm	revolutions per minute
RSM	Yanıt yüzey yöntemi
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
TCA	Trikarboksilik asit
TEM	Geçirimli elektron mikroskopu
Ti-NP	Titanyum nanopartikül
TiO_2	Titanyum dioksit
UDP	Üridin difosfat
UV	Ultraviyole
UV-Vis	UV-görünür
XRD	X-ışını kırınımı
ZnO	Çinko oksit
Zn-NP	Çinko nanopartikül
2FI	İki faktörlü etkileşim

1. GİRİŞ

Nanobiyoteknoloji, nanoteknolojinin gelişen bir alanıdır ve biyoloji, fizik ve kimya ilkelerini birleştirerek spesifik özellikteki nanoyapıda materyalleri oluşturur. Nanobiyoteknoloji yeni materyallerin üretimi ve fonksiyonelleştirilmesinde biyolojik sistemlerin uygulanmasını sağlar. Bu sistemler kimyasal ürünlerin tasarım, gelişim ve uygulanmasında insan sağlığına ve çevreye karşı zararlı maddelerin kullanımını ve oluşumunu azaltmakta, hatta ortadan kaldırmaktadır. Nanobiyoteknolojinin rol oynadığı yeşil yöntemler atık oluşumunun ve sentetik proseslerin önlenmesini, tehlikeli ve toksik ürünlerin kimyasal sentezinin minimize edilmesini, yan ürünlerin ve kataliz kullanımının azaltılmasını, yenilenebilir hammaddelerin kullanımını ve çevre için temiz ve güvenli ürünlerin oluşumunu sağlamaktadır (Hernandez-Pinero et al., 2016). Nanobiyoteknolojinin ürünü olan metal nanopartiküller özgün özellikleri nedeniyle sağlık, gıda, çevre, kozmetik, optik gibi temel alanlarda çok geniş bir çerçevede uygulama bulmaktadır. Metal nanopartiküllerin sentezlendiği fiziksel ve kimyasal yöntemlerin çoğu toksik ve çevre dostu olmayan prosedürler içermektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin üretiminde bitki ekstraktları, bakteri, fungus, alg ve çeşitli enzimlerin kullanıldığı yeşil sentez günümüzde önem kazanmıştır. Nanopartiküllerin özellikle denizel alglerden ve denizel bitkilerden biyosentezi yeni gelişmekte olan bir araştırma alanıdır. Algler ve denizel bitkiler metal ve metal oksit nanopartiküllerin üretiminde içerdikleri çeşitli biyolojik yönden aktif bileşikler ve sekonder metabolitler sayesinde oldukça büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir (Fawcett et al., 2017).

Sahil kesimine yakın derinliklerde bulunan, iklim değişikliği ve yanlış aktiviteler sonucunda *Posidonia* ve *Zostera* gibi deniz çayırı yatakları gün geçtikçe azalmaktadır. Bitki, yapraklarını genellikle sonbahar mevsimi boyunca atmaktadır. Normal koşullarda yapraklar sürekli olarak yenilenmektedir. Çevresel faktörlerin de etkisiyle büyük miktarlarda ölü yapraklar kıyıda birikmektedir ve bu yaprakların bertarafları oldukça maliyetlidir. Kıyıda bekleyen biyokütlenin bozunması sinek ve böcek popülasyonlarının çoğalmasına, kokuya ve hidrojen sülfür üretimine neden olmaktadır. Bu deniz çayırlarının dağılımı İzmir ili Urla, Karaburun, Foça gibi ilçe sınırlarında bulunan deniz bölgelerinde tespit edilmiştir (Akçalı et al., 2019; Christopoulou et al., 2021). Lignoselüloz materyal kaynağı olan bu yaprak ve rizom atıkları farklı çalışmalara konu olmuştur. Literatürdeki çalışmaların çoğu bu deniz bitkilerinin biyokimyasal, morfolojik ve taksonomik olarak belirlenmesinin yanında küresel ısınma ve insan aktivitelerinden nasıl etkilendiği, yayılma bölgeleri ve alanlarının azalmaması için ne yapılması gerektiğiyle ilgilidir. Ayrıca deniz

kıyısında bulunan bitki kalıntıları çevre, gıda, tarım gibi alanlardaki çalışmalarda kullanım görmüştür. Bu tez çalışmasında potansiyel olarak şeker ve fenol içeriği yüksek olan bu kaynak gümüş, titanyum ve çinko nanopartiküllerinin sentezinde kullanılmıştır.

Ekstraksiyon tekniklerinde kullanılan organik çözücülerin, zararlı ve toksik etkilerinin azaltılabilmesi için Yeşil Kimya, yeni nesil yeşil çözücülerin geliştirilmesini sağlamaktadır. Bunun yanında daha kısa süreli ekstraksiyon zamanı, düşük maliyet ve yapılan işlerin basit olması diğer geliştirilmesi hedeflenen parametrelerdir. Güvenli, çevre dostu ve ucuz olması, sentez kolaylığının bulunması gibi üstün özellikleri nedeniyle derin ötektik çözücüler (deep eutectic solvents=DES), geleneksel çözücülere alternatif olarak bilim ve teknoloji dünyasında son zamanlarda popüler hale gelmiştir. DES'ler, iki bileşiğin (hidrojen bağı donörü (HBD) ve hidrojen bağı alıcısı (HBA) olarak adlandırılır) belirli bir molar oranda karıştırılmasıyla elde edilmektedir (Isci and Kaltschmitt, 2021). Bu iki bileşen ötektik bir karışım oluşturabilmelidir. DES'ler düşük maliyet, daha az toksisite, yüksek iletkenlik, yanmazlık, çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi çeşitli üstün özelliklerine sahiptir (Banjare et al., 2018).

Tez kapsamında, bir çevre sorununa karşı çözüm önerisi olarak *Posidonia* ve *Zostera* gibi deniz bitkisi atıkları İzmir ili Mordoğan sahilinde bulunan plajlardan toplanmıştır. Toplama işlemi doğal habitatlar yerine özellikle insanların denize girdiği ve bu biyokütlenin varlığının olumsuz durumlara yol açtığı düşünülen sahil kısımlarından yapılmıştır. Bu şekilde belirli zamanlarda sahillerde bol miktarda bulunabilen ve yenilenebilir bir biyolojik kaynak olan bu bitki atıkları kullanılarak atık değerlendirme hedefinin yanında düşük maliyetli yöntemlerle nanobiyoteknolojiye katkı sağlayacak bir sentez gerçekleştirilmiştir.

Atık biyokütlede kullanılacak ekstraksiyon yönteminde DES temelli çözücü sistemleri kullanılmıştır. Bunun için beş farklı DES karışımından yola çıkılarak en iyi ekstraksiyon yöntemi belirlenip, ekstraksiyon sonrası elde edilen biyoaktif bileşenlerin miktarı spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiştir. Biyoaktif bileşenlerce (fenolikler ve şekerler) zengin olduğu tespit edilen ekstrakt; birçok metal nanopartikül arasında en fazla kullanım alanı bulmuş olan gümüş ve bunun yanında çinko ve titanyum gibi çeşitli aktivitelere sahip nanopartiküllerinin biyojenik sentezinde kullanılmıştır. Nanopartiküllerin fiziksel karakterizasyonunda UV-görünür spektrofotometre, dinamik ışık saçılımı (DLS) spektrometresi, zeta potansiyeli ölçümü, Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve taramalı

elektron mikroskopu (SEM) yöntemleri kullanılmış, bunun yanında nanopartiküllerin antibakteriyel, antifungal, antibiyofilm ve fotokatalitik aktiviteleri tespit edilmiştir.

Deniz çayırları yeni ve değerli fitokimyasallar bakımından birçok fırsat barındırmasına rağmen mikroalglere göre daha az kullanım alanı bulmuştur. Ülkemizin sahip olduğu denizel bitki kaynaklarının zenginliği göz önünde bulundurulduğunda, denizel bitki kaynaklarının atıklarının belirli dönemlerde ülkemizin turizm açısından olumsuz etkiler oluşturması ve bu durumun atık değerlendirme gibi olumlu bir yöne çevrilme hedefi bu tez çalışmasının başlangıç şeklini belirlemiştir. Yapılan literatür taramasına göre deniz çayırı atıklarından DES sistemlerinin kullanıldığı yeşil yöntemle gümüş, çinko ve titanyum nanopartiküllerinin sentez çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada DES ve yeşil sentez kullanımlarını içeren çevre dostu ve düşük maliyetli yöntemler takip edilmiştir.

Son aşamada ise üretilen gümüş nanopartikülün uygulaması olarak biyolojik temelli bir membran sisteminde kullanılması amacıyla bakteriyel selüloz (BS) üretimi yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında saflaştırılan BS'nin atık su arıtım sistemlerinde membran olarak kullanılması amaçlanmıştır. Ardından karakterizasyonu tamamlanan nanopartiküllerden seçilen gümüş nanopartikülü BS membranına entegre edilerek biyolojik ve kompozit bir membran elde edilerek çeşitli filtrasyon testleri yapılmıştır. Yapılan filtrasyon testlerinde özellikle *Escherichia coli* gibi bakteriler bakımından mikrobiyolojik yükü yüksek olan atık suların arıtılmasına yönelik ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. BS, bu bakteri yükünü azaltarak elde edilen sıvının türbiditesini sıfıra yakın bir değere indirmiştir. Diğer yandan Türkiye gibi zeytin yetiştiriciliğinin önemli olduğu ülkelerde atık su olarak çevreye zarar veren zeytin karasuyunun filtre edilmesi için ön çalışma yapılmıştır. Başarılı şekilde *Escherichia coli* filtrasyonu yapılarak türbidite giderimi sağlanırken, optik yoğunluğa bağlı olarak kompozit BS ile zeytin karasuyu %54 oranında giderilmiştir. Kompozit membranın hidrolik geçirgenlik değeri 8,99 $L/m^2.h.bar$ olarak ölçülmüştür. Yapılan karakterizasyon ve filtrasyon testleriyle bu kompozit membranın gelecek çalışmalar için umut vadedici olduğu tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

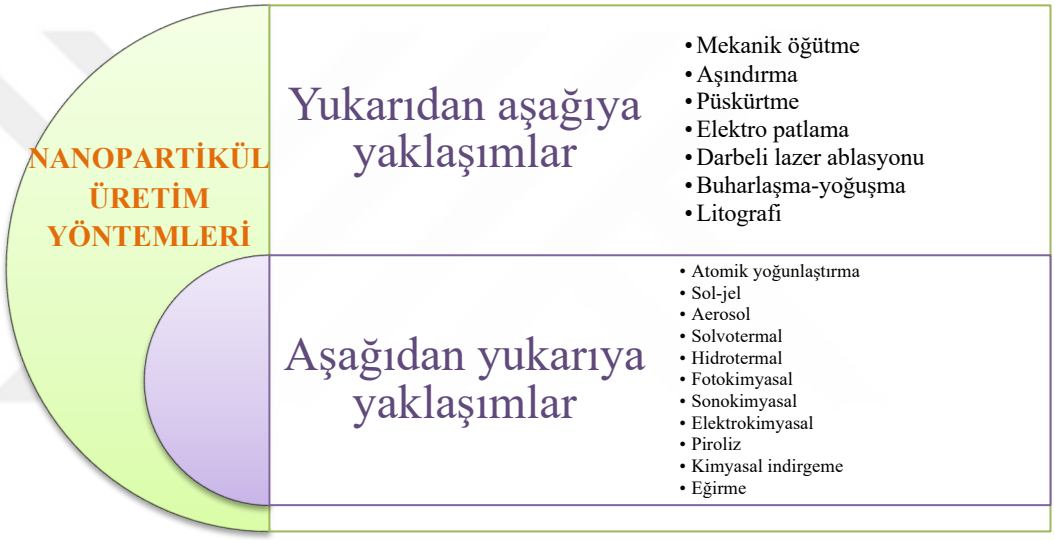
2.1 Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler

Son zamanlarda nano boyuttaki malzemelerin insan yaşamını kolaylaştırmasıyla birlikte nanoteknoloji uygulamalarına olan ilgi artmıştır (Hawar et al., 2022). Nanoteknoloji 1-100 nanometre boyutlarında parçacıkların sentezi, morfolojisi, işlevsel hale getirilmesi ile ilgilenen önemli modern araştırma alanlarından biridir. Nanoteknoloji ile gelişmekte olan nano boyuttaki malzemeler özellikle yüksek yüzey alanı-hacim oranından dolayı kazandıkları karakteristik özellikleri sayesinde çok geniş yelpazede kullanım alanı bulmuştur. Bunun yanı sıra nanometre ölçeğindeki materyaller normal boyutta olan formlarına göre özgün kimyasal, fiziksel, elektronik, optik, termal, mekanik ve biyolojik özellikler sergilemektedir. Bu nedenle sağlık, kozmetik, biyomedikal, gıda ve yem, çevre endüstrisi, kimya endüstrisi, uzay endüstrisi, enerji bilimi gibi çok sayıda alana yenilik kazandırmıştır (Agarwal et al., 2017; Ahmed et al., 2016; Fawcett et al., 2017). Organik nanomalzemeler karbon bazlı iken, inorganik nanomalzemeler soy metalleri (altın, platinyum ve gümüş), manyetik malzemeleri (demir oksit) ve yarı-iletken malzemeleri (titanyum dioksit ve çinko oksit) içermektedir (Fawcett et al., 2017). Son yıllarda, metalik nanomalzemeler bilimsel alanda en çekici ve hızla gelişen bir malzeme haline gelmiştir. Nanomateryal araştırma ve geliştirmeye, özellikle de nanopartiküllere olan önemli ilgi, küçük boyutları, mükemmel katalitik, optik ve elektriksel özellikler sunan dikkat çekici aktiviteleri gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, metalik nanopartiküller kapsamlı araştırmalarda, yöntemlerde ve ileri mikro ve nanoteknoloji uygulamalarında aktif rol almaktadır (Albukhaty et al., 2022). Metalik nanopartiküller arttırılmış katalitik reaktivite ve termal iletim, kristalinite, kontrol edilebilir morfoloji, lineer olmayan optik performans ve kimyasal istikrar gibi üstün özelliklere sahip olabilir (Jemilugba et al., 2019).

2.2 Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

Metalik nanopartiküllerin sentezinde aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemleri içermektedir. Yukarıdan aşağıya sentez yönteminde fiziksel veya kimyasal proseslerle materyalin boyutu önemli ölçüde azaltılarak nano boyutlara ulaşılır. Boyut küçültmek için farklı fiziksel ve kimyasal süreçler benimsenebilir. Etkili litografik tekniklerin kullanılmasıyla, uygun yığın

malzeme partiküllere parçalanacaktır ve ilgili uygulanabilir teknikler mekanik öğütme, aşındırma, püskürtme, patlama işlemi, darbeli lazer ablasyonu ve buharlaşma-yoğuşma reaksiyonu gibi tekniklerdir (Aslam et al., 2021). Aşağıdan yukarıya sentez yönteminde ise kimyasal ve biyolojik metotlarla atomların, moleküllerin ve küçük parçacıkların nano boyuttaki yeni çekirdeklere kendiliğinden toplanması sağlanır. Bu yöntemlere örnek olarak atomik yoğunlaştırma, sol-jel işlemi, aerosol işlemi, solvotermal, hidrotermal, fotokimyasal, sonokimyasal, elektrokimyasal, piroliz, kimyasal indirgeme, eğirme vb. verilebilir (Şekil 2.1.) (Aslam et al., 2021; Fawcett et al., 2017). Metal nanopartiküller genellikle bu metotları içeren yaklaşımlarla sentezlenmektedir (Hernandez-Pinero et al., 2016).



Şekil 2.1. Metal nanopartikül üretim yöntemleri.

Geleneksel yöntemlerle sentezde kullanılan fiziksel metotlar pahalı ekipman, yüksek sıcaklık ve basınç, makine kurumu için büyük alan gerektirmektedir. Kimyasal metotlarla sentezde ise kimyasallar indirgeme ajanı olarak kullanılmaktadır. Bu proseslerin birçoğu teknik olarak komplekstir, yüksek enerji girdisinden dolayı da maliyet yüksektir. Ayrıca pahalı, toksik ve tehlikeli kimyasallar çevreye zarar vererek özellikle biyolojik materyallerde kimyasal kontaminasyon riski oluşturur (Ahmed et al., 2016; Fawcett et al., 2017). Sonuç olarak nanopartikülleri fiziksel ve kimyasal olarak üretmek için birçok yöntem vardır ancak bunlar çevre için güvenli değildir. Ayrıca, bu yöntemlerde kaplama ve stabilizasyon ajanları kullanmak gerekmektedir. Bu olumsuz durumlara alternatif olarak çevre dostu proseslerin ortaya çıkarılması önem kazanmıştır (Hawar et al., 2022).

2.3 Yeşil Sentez Yöntemi

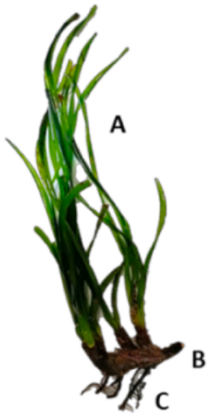
Son yıllarda gelişen nanobiyoteknoloji bazlı tekniklerin kullanımını içeren nanopartiküllerin alternatif biyojenik olarak üretiminde, çevreye ve insan sağlığına olan olumsuz durumları azaltan temiz metotlar bulunmaktadır. Bu yeşil sentez yöntemi maliyet etkili, hızlı, güvenli, biyouyumlu, çevre dostu ve kolaylıkla ölçek büyütülebilir özelliktedir. Ayrıca geleneksel yöntemlerdeki gibi yüksek sıcaklık, basınç, enerji ve toksik kimyasallara gerek yoktur (Ahmed et al., 2016; Fawcett et al., 2017; Yılmaz Öztürk et al., 2020). Çeşitli canlıların indirgeme ve koruma ajanı olarak kullanıldığı yeşil sentez yöntemi oldukça basittir. Gerçekleşen biyoredüksiyon tepkimesi metal iyonlarının veya metal oksitlerin sıfır değerlikli metal nanopartiküllere indirgenmesidir. Metal iyonlarının indirgenmesi ve stabilizasyonu protein, amino asit, enzim, polisakkarit, stereoid, flavonoid, alkaloid, tannin, fenolik, saponin, terpenoid ve vitamin gibi bileşikler sayesinde olmaktadır. Bu bileşiklerde bulunan ve indirgenme tepkimesinin oluşmasını sağlayan önemli fonksiyonel grupları ise alkenil, amit, amin, keton, aldehit ve karboksilik gibi gruplardır (Ahmed et al., 2016; Hawar et al., 2022).

Bakteri, aktinomiset, fungus, maya, alg, bitki gibi tek hücreli veya çok hücreli biyolojik formlar aracılığıyla biyosentez gerçekleşebilmektedir. Her bir biyolojik varlıkta indirgeyici ve stabilize edici aktif molekül ve bileşikler bulunmaktadır. Yeşil sentez hücre içinde veya hücre dışında gerçekleşebilir. Hücre içi sentezde üretilen nanopartiküllerin hücre dışına alınabilmesi için ek basamaklar gerekirken, hücre dışı sentez daha kolay ve ekonomiktir (Yılmaz Öztürk et al., 2020; Fawcett et al., 2017; Agarwal et al., 2017). Mikroorganizmalar enzimleri ve biyoaktif bileşenleri sayesinde metal nanopartikülleri hem hücre içi hem de hücre dışı olarak sentezleyebilirken, bitki ekstraktlarında bulunan farklı bileşikler sayesinde metal indirgenmesi gerçekleşmektedir. Bitkilerin kök, yaprak, gövde, tohum ve meyveleri de nanopartikül sentezinde kullanılabilmektedir (Agarwal et al., 2017). Bu alan için nanopartiküllerin hazırlanması biyolojik canlıların çeşitliliğinden dolayı oldukça avantajlıdır. Canlılar ve ekstraktları indirgeyici ajan ve kaplama veya stabilizasyon ajanlarını salgılama özelliğine sahiptir. Özellikle bitki ekstraktlarında hızlı, doğa dostu, ekonomik ve tek basamaklı teknik kullanılmaktadır. Bitki ekstraktlarının kullanımındaki avantaj kültür ortamı ve mikroorganizmaların izolasyon maliyetlerine gerek olmamasıdır (Ahmed et al., 2016). Bununla birlikte mikroorganizmalar çeşitli redüktaz enzimleri sayesinde ağır metalleri uzaklaştırma veya akümüle etme yeteneğine sahiptir. Bu sayede daha iyi bir dağılımla metal tuzlarının metal nanopartiküllere indirgenmesini sağlar (Hoseinpour and Ghaemi,

2018). Yapılan literatür çalışmalarına göre denizel alglerden ve denizel bitkilerden biyojenik olarak metal nanopartiküllerin sentezi henüz başlangıç aşamasındadır.

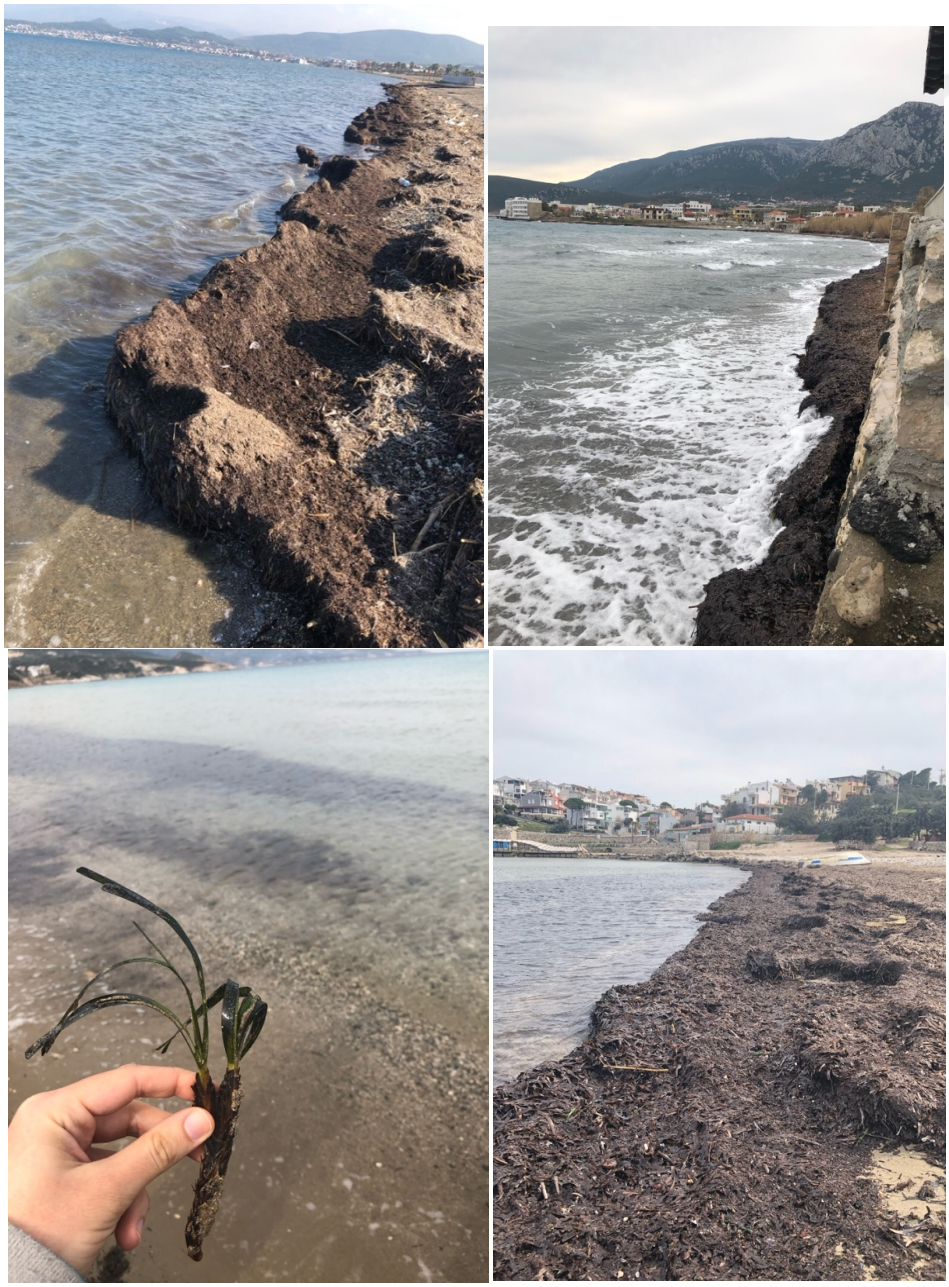
2.4 Deniz Çayırları

Posidonia oceanica ve *Zostera marina* Akdeniz'de ve Ege Denizi'nde bulunan önemli endemik çiçekli deniz bitkilerindendir (Akçora, 2011; Akçalı et al., 2019; Pilavtepe et al., 2012). Deniz çayırı olarak da isimlendirilen bu bitkiler 1-40 metre derinliklerde bulunan deniz bölgelerinde yayılarak topluluk oluşturmakta hem ekolojik hem de ekonomik yönden önemli roller oynamaktadır. Ekolojik olarak diğer canlılara ev sahipliği yapıp gıda sağlarken, ekonomik açıdan kıyı şeridinin erozyonunu engeller. Bunun yanında kıyı deniz ekosisteminin durumunun belirlenmesinde biyolojik bir belirteçtir (Achamlale et al., 2009; Akçora, 2011; Akçalı et al., 2019; Christopoulou et al., 2021). Bu bitkiler dünya çapında (Antarktika hariç) kıyı bölgelerinde geniş, kritik ve son derece üretken ekosistemler oluştururken, besin ve karbon döngüsüne, balıkçılığın veya su kalitesinin korunmasına önemli katkılarda bulunmaktadır (Tomas et al., 2024). Ayrıca tıpkı karada ormanların yaptığı etki gibi denizin oksijen bakımından zenginleşmesini sağlamaktadır. 11-29 °C sıcaklıklarda yaşayabilmekte, uzun kök, rizom bir gövde ve şeritsi yapraklara sahiptir (Şekil 2.2.). Yaprakları genellikle yeşil, 1 m uzunluğunda ve 1 cm genişliğindedir. Rizomları sayesinde toprağa bağlanıp, kökleriyle besinlerini alarak uzun yıllar yaşayabilmektedirler. Yapraklar 5-13 ay gibi bir sürede ömürlerini tamamlamaktadır. Yaşlı yapraklar mat denilen tabakaları oluşturmaktadır (Akçora, 2011; Christopoulou et al., 2021; Aktan and Aysel, 2013).



Şekil 2.2. *Posidonia oceanica* bitkisi **A)** Yaprak, **B)** Rizom, **C)** Kök (Astudillo-Pascual et al., 2021).

Bazı çalışmalar deniz çayırlarında ağır metaller gibi kirleticilerin varlığını ve biyoakümülasyonunu tespit etmiş ve bunların kirlilik biyoindikatörleri olarak değerlendirilmesine ışık tutmuştur. *P. oceanica*'nın kirlenme kaynaklı stresin yanı sıra doğal kaynaklı strese (rekabet, mikrobiyal yerleşim ve ötrofikasyon gibi) fenolik bileşiklerin miktarını değiştirerek yanıt verdiği de bildirilmiştir (Astudillo-Pascual et al., 2021). Ekolojik ve sosyo-ekonomik önemlerine rağmen, deniz çayırları ötrofikasyon ve habitat tahribatı gibi insan kaynaklı bozulmaların bir sonucu olarak dünya çapında azalmaktadır, ancak yönetim faaliyetlerinin (örneğin, su kalitesinin iyileştirilmesi, demirleme ve trol avcılığının düzenlenmesi) gerçekleştiği bazı alanlarda iyileşme gözlemlenebilmektedir (Tomas et al., 2024).



Şekil 2.3. Deniz kıyısında atık deniz çayırları.

Eylül-Ekim ayı itibariyle deniz çayırları olan *Posidonia* ve *Zostera* gibi türlerin fotosentez aktivitesini yitirmiş yaprakları ve ayrıca rizom parçaları bitkiden ayrılarak akıntılarla birlikte deniz kıyısına ulaşarak plajlarda birikmektedir (Şekil 2.3.). Bitkinin doğal döngüsünün yanında hızlı nüfus artışı ve endüstriyelleşmeye bağlı kirlilik, yanlış avlanma gibi sorunlar nedeniyle yaprakların aktivitelerini kaybetme durumları artış gösterebilmektedir. Doğal habitatta bu materyalin varlığı farklı avantajlar sağlasa da sahillerde büyük miktarlarda biriken ölü yapraklar çevresel ve ekonomik problemlere neden olduğu için atık materyal olarak görülmektedir. Kıyıda biriken bu ölü yapraklar güçlü fırtınalarda sahili korurken, birçok tür için önemli habitatlar olarak rol oynamaktadır. Ancak deniz kıyılarındaki birikim, plajların kalitesine zarar verdiği için turizm açısından olumsuz olarak görülür ve yerel makamlar tarafından toplanıp bertaraf edilmesi gereken bir maliyet olarak düşünülür. Yaz sezonunda özellikle turistik plajlarda bu ölü yaprakların varlığı, estetik ve sıhhi problemler olarak düşünüldüğü için toplanılıp yakılmaktadır. Bazı durumlarda kötü kokular yayması da ayrı bir olumsuz durumdur. Araştırmacılar bu ölü yaprakların değerlendirilmesinde alternatif çözümler üretmektedir çünkü ekstraktları biyoaktif bileşikler bakımından zengindir (Dural et al., 2011; Cocozza et al., 2011; De Sanctis et al., 2019; Aktan and Aysel, 2013; Benito-Gonzalez et al., 2018; Benito-Gonzalez et al., 2019; Pilavtepe et al., 2012). Lignoselüloz içeriği yüksek olan bu biyolojik materyal önceden paketleme ve dolgu materyali, çatı yalıtım malzemesi, toprak iyileştirici ve gübre, hayvancılıkta yem olarak kullanılmış hatta antifungal ve antibakteriyel aktivitesi tespit edilmiştir. Ne yazık ki bu geleneksel uygulamalar kademeli olarak terk edilmiştir ve günümüzde genellikle kalıntılar kıyıda değerlendirilmeyi beklemektedir (Cocozza et al., 2011; Dural et al., 2011).

Yapraklar yüksek miktarda selüloz, hemi-selüloz, lignin ve ayrıca karbonhidrat, protein, lipit, fenolik bileşikler, fenilmetan türevleri içerir. *Posidonia* kalıntılarının amin, hidroksil, karbonil, karboksilik asit ve sülfonil gibi önemli fonksiyonel grupları içerdiği tespit edildiği için birçok alanda kullanım potansiyeline sahiptir. (Benito-Gonzalez et al., 2019; Christopoulou et al., 2021; Pilavtepe et al., 2013). Ayrıca gallik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferrulik asit, rosmarinik asit, zosterik asit, humik asit gibi fenolik bileşikler *Zostera* kalıntı yapraklarında tespit edilmiştir (Pilavtepe et al., 2012; Achamlale et al., 2009). *Posidonia*'da araştırılan bileşiklerden ferulik asit, kafeik asit, şikorik asit, kaftarik asit ve sinnamik asit başlıca fenolik bileşikler olarak tanımlanmıştır (Astudillo-Pascual et al., 2021).

Yapılan çalışmalar genellikle substrat olarak biyoyakıt alanında, boya ve fenollerin adsorpsiyonunda, ambalaj olarak gıda alanında ve gübre olarak ziraat alanında kullanımlara yöneliktir (De Sanctis et al., 2019; Aktan and Aysel, 2013; Benito-Gonzalez et al., 2018; Christopoulou et al., 2021; Dural et al., 2011). Bir çalışmada atık deniz çayırlarının süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile içeriği belirlenip, ardından gerçekleştirilen hidroliz yöntemleri sayesinde biyorafineri konseptinde biyoetanol üretilmiştir (Pilavtepe, 2012). Bu literatür bilgileri ışığında atık biyokütlenin içeriğinin belirlenmesinde mevsim, konum, deniz suyu özellikleri gibi çevresel faktörler ile ekstraksiyon temelli uygulanacak yöntemlerin farklılığının önemli bir rol oynayacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

P. oceanica'dan antioksidan ve/veya antidiyabetik potansiyele sahip biyoaktif özütler rapor edilmiştir, ancak bunlar çevresel sorunlarla ilişkili olan ve gıda uygulamaları için arzu edilmeyen organik çözücüler kullanılarak elde edilmiştir ve atık yerine doğrudan doğal yaşam alanından toplanan bitki kullanılmıştır (Benito-Gonzalez et al., 2019).

2.5 Yeşil Kimya Yöntemi Olarak Derin Ötektik Çözücüler

Analizi yapılacak olan materyalin ekstraksiyonu ve ardından ileri analizinin yapılabilmesi için örneğin hazırlanması, analitik yöntemlerin ilk basamaklarını oluşturmaktadır. Geleneksel örnek hazırlama teknikleri çoklu basamak içeren sıvı-sıvı ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu gibi zaman alıcı ve yüksek hacimde organik çözücünün kullanıldığı yöntemleri içermektedir. En yaygın kullanılan çözücüler, başta petrol ve petrol türevleri olmak üzere yenilenemeyen kaynaklardan elde edilen uçucu organik bileşiklerdir. Yüksek hacimde organik çözücü (alkoller, aseton, hekzan, kloroform, etil asetat ve dietil eter) kullanımı ise hem maliyetlidir hem de çevre ve insan sağlığı açısından tehlikeli atık oluşturabilir. Bu klasik çözücüler genellikle düşük parlama noktaları, yüksek yanıcılık, ekipmanda kirlilik korozyonu gibi problemlere neden olabilecek yüksek buhar basınçları gibi dezavantajlara sahiptir (Isci and Kaltschmitt, 2021). Ayrıca organik çözücüler biyoaktif maddeleri yüksek verimle ekstrakte edebilmesine rağmen, bu çözücüler yüksek buharlaşma eğilimine ve bazıları ekstraktlarda aşırı kalıntı bırakan toksisite özelliklerine sahiptir (Mulia et al., 2015). Bu sıkıntıları aşmak için Yeşil Kimya ışığı altında son yıllarda birçok yöntem geliştirilmeye başlamıştır. Organik çözücüler oldukça toksik olduğundan, yeni nesil yeşil çözücüler geliştirilmiştir. Yeşil solventler güvenli, uygun maliyetli ve kullanımı kolaydır ve geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. 1990'larda Yeşil Kimya ismini alan ve çevre hassasiyetlerini ortaya koyan yaklaşım, proseslerin tüm

basamaklarında toksik çözücülerin minimize edilmesi gerektiğini benimsemiştir (Alam et al., 2021). Yeşil Kimya'nın 12 temel ilkesi bulunmaktadır: önleme, ekonomi, daha az tehlikeli kimyasal sentez, daha güvenli kimyasal tasarlama, daha güvenli çözücü ve diğer maddelerin kullanımı, enerjinin verimli kullanımı, yenilenebilir hammaddelerin kullanımı, türevlerin azaltılması, katalizörlerin ve biyokatalizörlerin kullanımı, kullanılmış ürünlerin bozunma olasılığının kullanılması, gerçek zamanlı teknolojik süreçlerin izlenmesi ve yeterli düzeyde kimyasal güvenliğinin sağlanmasıdır. Her yıl 10^7 tondan fazla organik çözücü üretilmektedir ve bunların çoğu Yeşil Kimya koşullarına uygun değildir. Bu nedenlerle Yeşil Kimya ışığı altında yeni nesil solventlerin kullanımı önem kazanmıştır (Özel and Elibol, 2021).

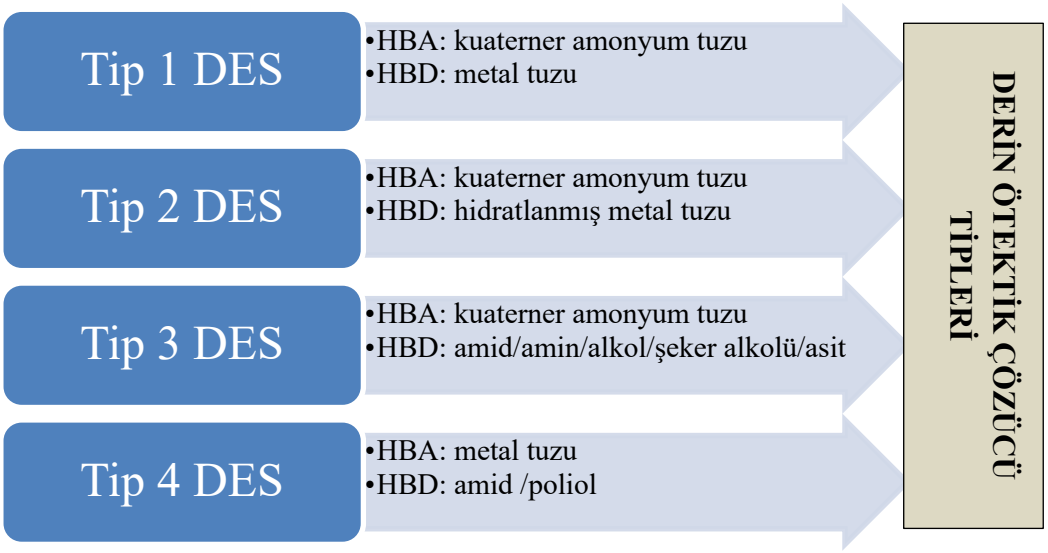
Süperkritik sıvılar (örneğin karbondioksit veya su), iyonik sıvılar ve DES sistemlerinin yanı sıra suyun kendisi de iyi bilinen yeşil çözücülerdir. Toksik olmaması, bol ve ucuz olmasına rağmen, su çoğu organik bileşik için zayıf bir çözücüdür, ancak kimyasal bir bozulmaya neden olmak için oldukça reaktiftir ve polarite sınırlamasına sahiptir, bu nedenle organik biyoaktif bileşiklerin çoğu çok iyi ekstrakte edilemez. Süperkritik akışkan olarak karbondioksit lipofilik bileşikler için daha uygundur, bu nedenle kullanımı gıdaları yağ almak veya kafeinsizleştirmekle sınırlıdır (Mišan et al., 2020).

Alternatif çözücü kullanımı konusunda yapılan ilk çalışmalar çoğunlukla iyonik sıvılar (IL) üzerine olmuştur. IL, erime noktası 100 °C' nin altında olan, oldukça büyük organik katyon ve inorganik veya organik anyondan (moleküler iyonik sıvılar) oluşan özel sıvı türleridir. IL'ler düşük buhar basıncı, yanmazlık, yüksek çözünme, yüksek termal aktivite, elektrokimyasal ve kimyasal kararlılık gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Bu özellikleri sayesinde IL, kimya, biyoteknoloji, tıp, nanoteknoloji, elektro-kimya ve enerji mühendisliği gibi birçok bilim ve endüstri dalında kullanılmaktadır (Zdanowicz et al., 2018). Mevcut IL'lerin yüksek sentez maliyetleri, gıdalarda kullanım sıkıntıları ve geri dönüşüm sorunları nedeniyle, IL'lerin özelliklerine sahip ancak daha ucuz ve kolay geri dönüştürülebilir DES olarak adlandırılan yeni bir ötektik karışım sınıfı sentezlenmiştir (Mamilla et al., 2019). IL'ler ve DES'lerin bulunduğu sınıf olan ötektik çözücüler, erime noktaları karışımdaki bileşenlerin ayrı ayrı erime noktalarından daha düşük olan homojen sıvılardır. Aslında bu isim Yunanca "ευ" (eu = iyi) ve "τηξις" (texis = erime) kelimelerinden gelmektedir (Socas-Rodríguez et al., 2021). DES, IL'nin avantajlarını sergilemesine rağmen (düşük buhar basıncı, kimyasal ve termal stabilite, yanmazlık, yüksek çözünme kabiliyeti, düşük erime

noktası) düşük derecede toksiktir veya toksik değildir ve genellikle biyolojik olarak parçalanabilir. Ayrıca DES, doğal ve/veya kolaylıkla elde edilebilen bileşiklerden ısıtma ve karıştırma yoluyla basit ve eşzamanlı bir şekilde hazırlanabilir (Zdanowicz et al., 2018). DES sistemleri IL'ler ile benzer fiziksel özelliklere sahip olsa da kimyasal olarak farklıdırlar (Mulia et al., 2015).

Bir çözücü tipi olarak DES, Yeşil Kimya'da en umut vadeden buluşlardan biridir. Çevre dostu DES'ler ilk kez 2003 yılında Abbott ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Bildik, 2021). 20. yüzyılın başlarında popülerlik kazanmaya başlayan DES'ler yeni ve yeşil çözücü sistemler olarak tanıtılmıştır. Geliştirilen yeni yöntemlerden biri bu çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyon sistemleridir. Bu çözücü, biri hidrojen bağı alıcısı (kuaterner tuzlar) diğeri hidrojen bağı vericisi (asit, alkol, amin ve karbonhidrat) olan iki bileşenden oluşmaktadır. Ortaya çıkan karışım ötektiktir, yani her bir bileşenin erime noktasından daha düşük bir erime noktasına sahiptir ve çok düşük sıcaklıklarda bile sıvıdır. DES bileşen molekülleri arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri, yüksek ekstrakte edilebilirliklerinden ve düşük erime noktalarından sorumludur (García et al., 2016).

DES'ler dört ana grupta sınıflandırılabilir (Şekil 2.4.). HBA olarak genellikle kuaterner amonyum tuzu (tip 1 ila 3) veya bir metal tuzu (tip 4) kullanılır. Hidratlanmamış ve hidratlanmış metal halojenürler sırasıyla tip 1 ve 2 DES'lerin sentezinde HBD olarak kullanılır. Tip 3 DES'lerde ise HBD olarak amidler, aminler, alkoller, şeker alkolleri ve asitler kullanılır. Bu tip DES'ler hızlı ve kolay sentez, su ile reaktivite göstermeme, biyolojik olarak parçalanabilir yapı ve maliyet etkinliği gibi benzersiz avantajlara sahiptir. DES'lerin özellikleri büyük ölçüde mevcut hidrojene bağlı olduğundan, bu DES sınıfı farklı uygulamalar için kolayca uyarlanabilir. Bir dizi geçiş metali, amid ve polioller ile ortam sıcaklığı ötektiklerine dahil edilebilir ve bunlar tip 4 DES'ler olarak adlandırılmaktadır (Isci and Kaltschmitt, 2021).



Şekil 2.4. DES tipleri.

DES iyonik sıvılara benzer solvent özelliklerine sahip olarak alternatif bir sistemdir. Ayrıca düşük buhar basıncı, yanmazlık, suya karşı reaktif olmama ve su ile karışabilme gibi özgün kimyasal özelliklere sahiptir. Hazırlanması kolaydır, biyobozunur ve biyouyumludur, düşük veya ihmal edilebilir seviyede toksisiteye sahiptir ve kolaylıkla geri dönüştürülebilirdir. DES'ler yüksek viskozite ile karakterizedir ve oda sıcaklığında katı halde bulunabilirler, doğal ürünlerden aktif bileşiklerin ekstraksiyon işleminde başarıyla kullanılabilir. Bu nedenler ekstraksiyon yöntemlerinde DES'i geleneksel çözücülere göre daha tercih edilebilir hale getirmektedir. Doğal derin ötektik çözücüler (NADES), DES'in bir alt grubudur ve hücre metabolizması tarafından üretilen doğal bileşenlerle (üre, amino asit, organik asit, şeker, kolin klorür (ChCl) ve su ile hazırlanabilmektedir (Grudniewska et al., 2018). NADES kavramı ilk kez 2011 yılında Choi tarafından sunulmuştur (Zdanowicz et al., 2018). Yoğun moleküller arası etkileşimler ile karakterize edilirler. Çevresel ve ekonomik açıdan bakıldığında, NADES biyolojik olarak parçalanabilirlik, sürdürülebilirlik, düşük maliyet, basit hazırlama ve "genel olarak güvenli olarak kabul edilen: GRAS" gibi birçok çarpıcı avantaj da sunmaktadır (Grudniewska et al., 2018). Ekstraksiyon yeteneklerinin yanı sıra, ekstraksiyon ve depolama sırasında doğal bileşiklerin stabilitesinin artması, NADES kullanımının geleneksel çözücülere göre bir başka avantajıdır. NADES'i oluşturabilecek bileşiklerin ve molekül düzenlemelerinin sayısının 10^6'ya kadar çıktığı tahmin edilmektedir, bu nedenle yüksek çok yönlülükleri ve neredeyse sınırsız sayıda kombinasyonları nedeniyle özel yapım çözücüler olarak da adlandırılmaktadırlar (Mišan et al., 2020). NADES bileşimi viskozite, yoğunluk, iletkenlik, polarite ve çözünürleştirme kabiliyeti gibi fizikokimyasal özellikler üzerinde önemli bir etkiye sahip olmasının yanı sıra hedef bileşiklerin ekstraksiyon

verimliliğini de etkileyebilir. Tüm bu özellikler onları ilaç, gıda ve kozmetik gibi sağlıkla ilgili alanlardaki uygulamalar için ilgi çekici kılmaktadır (Dai et al., 2015). ChCl, asetilkolin ve fosfolipidler için bir öncü olan ve aynı zamanda kararsız metil gruplarının önemli bir kaynağı olan kolinin doğal olarak oluşan tuzudur. Bu kuaterner amonyum tuzu düşük maliyeti ve biyobozunurluk özelliğinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. ChCl, genel olarak hayvan yemi takviyesi şeklinde kullanılmaktadır ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'ne göre "vitaminler, pro-vitaminler ve benzer etkiye sahip kimyasal olarak iyi tanımlanmış maddeler" fonksiyonel grubuna aittir (Grudniewska et al., 2018). DES'ler farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde direkt olarak kullanıma yönelik değerli bitki sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve ekstraksiyonunda kullanılabilmektedir (Bildik, 2021). Bunun yanında DES'ler çeşitli doğal hammaddelerden (lignoselülozik biyokütle, ağaç kabuğu, odun, algler) ve atıklardan (bitkisel yağlar içecek üretimi ve tüketiminden kaynaklananlar) katma değerli bileşenlerin elde edilmesinde uygulanabilmektedir (Jablonský et al., 2018). DES, kimya, biyoteknoloji, elektrokimya (metallerin elektrodepozisyonu, kaplama), biyokimya (katalizörler, dönüşümlerin yardımcı çözücü ortamı), analiz (tespit, kromatografide uygulama), nanoteknoloji (nanomalzeme üretimi) ve ayrıca farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda uygulanabilir. Biyopolimerlerin veya ilaçların çözünmesi, doğal pigmentlerin stabilizasyonu, ham petrol ve biyodizelin saflaştırılması, bitkilerden sekonder metabolitlerin ve proteinlerin ekstraksiyonu gibi birçok uygulamada DES'ler kullanılabilmektedir (Das et al., 2016; García et al., 2016; Zdanowicz et al., 2018). DES için en çok çalışılan uygulama ise bitkilerden flavonoid ve polifenol gibi fenolik bileşiklerin, alkaloidlerin, saponinlerin, uçucu yağların, terpenoidlerin, proteinlerin, karbonhidratların, çoklu doymamış yağ asitlerin ve fotosentetik pigmentlerin ekstraksiyonudur (Mišan et al., 2020).

DES'e ekstraksiyon amacıyla su eklenmesi iyi bir yöntemdir. Çözücülerin viskozitesini azaltmak ve doğal matrislerden biyoaktif moleküllerin kütle transferini iyileştirmek için belirlenmiş bir prosedürdür. Diğer yandan sıcaklık artışı daha düşük viskoziteye ve sonuç olarak daha yüksek ekstraksiyon verimine yol açmaktadır (Vieira et al., 2018). DES iki veya üç bileşenin belirli molar oranlarındaki karışımının su varlığında ısıtılmasıyla da elde edilir. Hidrojen bağ donör özelliği bulunan su viskoziteyi azaltırken moleküller arası etkileşimlere izin vermektedir. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi spektrumlarına göre su varlığının DES'lerin özelliklerini önemli ölçüde değiştirmediğini belirlenmiştir (Jablonský et al., 2018). Bu çözücülerin en önemli özelliklerinden

biri de bir veya iki bileşenin de kolayca değişebilir olmasıdır. DES iki veya daha fazla bileşenin karıştırılıp ısıtılması, öğütülmesi veya dondurularak kurutulması yollarıyla hazırlanmaktadır. Dikkat edilmesi gereken nokta ise hidrojen bağı alıcısının yüksek higroskopiklik özelliğinden dolayı vakum koşullarının kullanılması gerektiğidir (Cunha and Fernandes, 2018; Das et al., 2016; Płotka-Wasylka et al., 2017; Özel and Elibol, 2021). DES ile ekstraksiyon veriminin geliştirilmesinde ultrason veya mikrodalga enerjilerine başvurulmaktadır (Cunha and Fernandes, 2018). Birçok çalışmada DES'lerin geri dönüşümü için farklı geri kazanım yöntemleri olarak anti-solvent ilavesi, kristalizasyon, membran filtrasyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, kısa yol distilasyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, yoğunluk ve viskozite farklılıklarına bağlı ayırma gibi yöntemler uygulanmaktadır (Isci and Kaltschmitt, 2021).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda hidrofilik özelliklere sahip DES'ler kullanılmıştır, bu durum da hedeflenen bileşik aralığını daraltmaktadır. Polar olmayan bileşiklerin ekstraksiyonu için DES kullanımını genişletmek amacıyla yeni hidrofobik DES'lerin geliştirilmesi ve test edilmesi ihtiyacı doğmuştur. Genellikle iki farklı hidrofobik DES ailesi hazırlanmış ve üzerinde çalışılmıştır. Marrucho'nun grubu tarafından tanıtılan ilki mentol (HBA) ve doğal organik asitlerdir (HBD). İkincisinde kuaterner amonyum tuzları (HBA), organik asitler ve alkoller (HBD) kullanılmış ve Kroon'un grubu tarafından tanıtılmıştır (Křížek et al., 2018).

2.6 Gümüş, Titanyum ve Çinko Nanopartikülleri

Metal nanopartiküller arasında gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri sahip oldukları avantajlar ve farklı alanlarda uygulama bulabilmeleri nedeniyle en çok başvurulan nanopartiküllerdendir. Gümüş nanopartikülü kimyasal stabilite, iyi iletim ve katalitik özelliklerine sahiptir. Hücre membranını ve enzimatik aktiviteleri bozarak mikroorganizmalarda öldürücü rol oynar. Antibakteriyel özelliklerinden dolayı bu nanopartikül gıda depolamada, tekstil ürünlerinin kaplanmasında, biyosensörlerde, birçok biyomedikal ve çevresel uygulamada ve ayrıca antioksidan, antienflamatuvar gibi özelliklerinden dolayı sağlık endüstrisinde kullanılmaktadır (Singh et al., 2016). Bunun yanında boyaların uzaklaştırılmasında yüksek katalitik aktiviteler göstermektedir. Biyomedikal alanında yara örtüleri, topik krem ve spreylerde gümüşün antiseptik özelliği önemlidir (Ahmed et al., 2016; El-Rafie et al., 2013).

Titanyum dioksit (TiO_2) nanopartikülleri geniş bir yüzey bölgesine, üstün yüzey morfolojisine sahiptir, toksik değildir ve fotokatalitik antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir. Mikrobiyal kontaminasyona karşı mükemmel biyolojik etki uygular. Ayrıca titanyum nanopartikülleri geniş bant UV emilimi, güneş kremi uygulamaları bulundurmaktadır (Albukhaty et al., 2022). Bunun yanında UV-bloklama ve kendi kendine temizleme özelliklerine sahiptir (El-Rafie et al., 2013). Nano boyutlu TiO_2'ye dayalı fotokatalitik atık su arıtımı, atık sudaki inatçı organik ve inorganik kirleticilerin ayrıştırılması ve detoksifikasyonu için oldukça etkili bir prosestir (Aslam et al., 2021).

Çinko oksit (ZnO) yarı iletken metal oksittir. Çinko nanopartikülü antibakteriyel, antifungal, antidiyabetik, antikanser, antienflamatuvar, antioksidan, yara iyileştirme gibi üstün optik özelliklerine sahiptir; elektronik, optik ve biyomedikal sistemlerde uygulama bulmaktadır. Ultraviyole (UV) filtreleme özelliğinden dolayı güneş kremlerinde kullanılmaktadır. Zirai uygulamalara ve sülfür, arsenik gibi kirleticilerin sulardan temizlenmesi gibi atık su arıtım özelliklerine sahiptir. Yapılan çalışmalarda kimyasal yöntemle senteze göre daha yüksek antibakteriyel özellik göstermektedir (Agarwal et al., 2017; El-Rafie et al., 2013).

Nanopartiküller boyut, şekil, yüzey alanı ve dağılımlarına göre karakterize edilmektedir. Bu özelliklerin homojenliği önemlidir. Karakterizasyonda kullanılan yaygın teknikler: UV–görünür spektrofotometre, dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı elektron mikroskopu (SEM), geçirimli elektron mikroskopu (TEM), Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), toz X-ışını kırınımı (XRD) ve enerji dağılım spektroskopisi (EDX)'dir (Mittal et al., 2013).

2.7 Bakteriyel Selüloz

2.7.1 Bakteriyel selüloz suşları, gelişimi ve organizasyonu

Selüloz $(C_6H_{10}O_5)_n$ dünyada en çok bulunan ve tükenmeyecek olan yenilenebilir doğal bir polimerdir, çeşitli teknoloji alanında sayısız uygulamaya sahiptir. Farklı türde bitkiler, funguslar, denizel hayvanlar, yosunlar ve bakteriler tarafından sentezlenir. Bakterilerde ise *Gluconacetobacter* (*Acetobacter*), *Agrobacterium, Alcaligenes, Aerobacter, Achromobacter, Azotobacter, Rhizobium, Pseudomonas, Sarcina, Dickeya, Rhodobacter* ve *Salmonella* gibi özellikle Gram-negatif bakteriler gibi farklı türler nano boyutta selüloz matrisini hücre dışına sentezlemektedir. Bakteriyel selüloz (BS) A. J. Brown tarafından 1880'lerde

keşfedilmiştir (Brown, 1886). Bakteriden üretilen selüloz şekli nano boyutta genişlikte fiberlerden oluşmaktadır ve ipek böceğinden üretilen doğal ipek fibere benzemektedir. Bakterinin selüloz biyofilmini, organizmayı ultraviyole radyasyon ve diğer kimyasal veya mekanik travmalardan korumak amacıyla ve besin transportunu da desteklemek amacıyla ürettiği düşünülmektedir. 1886 yılında BS beyaz pelikül şeklinde asetik fermentasyon sırasında elde edilmiştir. Bu selülozu üreten bakterinin ilk adı *Bacterium xylimun* iken daha sonra *Acetobacter xylimun* (*A. xylinum*) ve *Komagataeibacter medellinensis* olarak da isimlendirilmiştir. İlk olarak BS uygulaması medikal alanda Brezilya şirketi tarafından 1986, 1989 ve 1990 yıllarında patentlerle belgelenmiştir. Buna paralel olarak Johnson & Johnson yara bakımı için de 1986 ve 1987 yıllarında patent alarak BS kullanımını araştırmıştır (De Lima Fontes et al, 2018; Stumpf et al, 2018; Choi and Shin, 2020; Ashrafi et al, 2019).

Bakteriyel selüloz moleküller arası hidrojen bağları tarafından bağlanan ß-1,4-D-glukopiranoz birimlerinden oluşan bir ekzopolisakkarittir. Tekrarlanan birim iki glikoz molekülünün birleşmesiyle oluşan sellobiyozdur. Bu selüloz zincirleri ardından temel alt-fiberleri oluşturmaktadır. Daha sonra hidrojen bağları tarafından bağlanarak mikrofibrilleri oluşturmaktadır. Son olarak mikrofibriller birlikte organize olarak şeritleri oluşturur. İyi organize olmuş üç boyutlu nanofiberlerden oluşan mikrofiberli ağ, yüksek yüzey alanı ve yüksek porozitede hidrojel membranının oluşmasını sağlamaktadır. Model organizma olan Gram-negatif *Acetobacter* bakteriyel selülozu yüksek verimlilikte üretmektedir. Bu suş aerobiktir ve oksidatif fermentasyon yoluyla selüloz hidrojelini sıvı kültür ortamı yüzeyi üzerinde oluşturur (Şekil 2.5.). Genellikle bu fiberli yapı hava/sıvı ara yüzeyinde yüzer. BS membranı hava/sıvı ara yüzeyinde asimetrik tabaka oluşturmaktadır; hava ile etkileşim gösteren yüzey daha yoğunken, sıvıya temas eden diğer taraf ise daha jelatinimsi bir yapıya sahiptir. *A. xylinum* doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve hatta sirke endüstrisinde kullanılmaktadır. Çürüyen meyve ve sebzelerden izole edilir. Birçok *A. xylinum* suşu glikoz, fruktoz, invert şeker, etanol ve gliserol gibi substratlar kullanarak selülozu farklı miktarlarda sentezleyebilme özelliğine sahiptir. pH 3'ten 7'ye, sıcaklık 25-30 °C'ye aktif metabolizma göstermektedir. Bu suş için ideal selüloz üretim pH'ı 4-5'tir (Zhang et al, 2019; Stumpf et al, 2018; Choi and Shin, 2020; Ashrafi et al, 2019; Jagannath et al, 2008).



Şekil 2.5. Bakteriyel selüloz üretim ve saflaştırma aşaması.

2.7.2 Bakteriyel selüloz üretim metotları ve saflaştırılması

Selüloz üretimi statik (durgun), karıştırmalı, hava kaldırmalı veya yatay reaktörlerde üretim metotlarına bağlı olarak farklı şekillerde ve yapılarda üretilebilmektedir. Oluşan BS'nin özellikleri bakteri kültür koşullarına göre değişebilmektedir. Durgun kültivasyon koşullarında kalın, jelatinimsi membran kültür ortamı yüzeyine birikirken, karıştırmalı kültür koşullarında selüloz fibröz süspansiyon, düzensiz pellet veya küre şeklinde oluşmaktadır. Statik üretim modunda kullanılan tepsi benzeri kültür kaplarına üretim ortamı konulup inokulasyon işlemi yapıldıktan sonra 1-14 gün arasında 28-30 °C'de pH 4-7 arasında selüloz tüm yüzeyi kaplayana kadar üretim gerçekleştirilir. Bu mod daha basittir ve düşük kayma kuvvetlerine sahiptir. Ancak düşük verimle zaman alıcı prosesten oluşan bu üretim modu özellikle ticari uygulamalarda engel olarak görülmektedir. Bunun önüne geçmek için kesikli beslemeli kültivasyon modu önerilmektedir. Karıştırmalı/çalkalamalı üretim modunda ise oksijenin ortam içerisinde sürekli olarak karıştırılmasıyla BS verimi arttırılabilir ve hıza bağlı olarak küre, pellet şeklinde elde edilmektedir. 100 rpm altı karıştırma hızında düzensiz şekiller oluşmaktadır, bu nedenle karıştırma hızı da önemli bir parametredir. Karıştırmalı tank biyoreaktörlerde ise yüksek enerji tüketimiyle birlikte genellikle karıştırmaya bağlı kayma geriliminden dolayı pelikül BS'ye göre düşük kristalinitede, düşük elastik modülünde ve düşük polimerizasyon derecesinde fiberli BS süspansiyonu elde edilmektedir. Hava kaldırmalı biyoreaktörde ise kültür ortamına sürekli olarak oksijen transferi mümkündür, karıştırmalı tank reaktöre göre daha az kayma gerilimi oluşur, daha enerji verimlidir. Yüksek oksijen

beslemesi ve yüksek hacimsel karıştırma gücü selüloz verimliliğini arttırsa da reaktörlerde sürekli karıştırma ve havalandırmanın olumsuz bir sonucu olarak kültür koşullarına da bağlı olarak selüloz üretmeyen mutant suşlar çoğalabilmektedir. Ayrıca selüloz üretimi şeker, azot kaynağı gibi farklı türde substrat ve pH gibi farklı parametrelerden etkilenmektedir (Jagannath et al, 2008; Stumpf et al, 2018; Krystynowicz et al, 2002; Choi and Shin, 2020).

Üretim için kullanılan model besiyeri Hestrin-Shramm ortamına göre glikoz karbon kaynağı iken, maya ekstraktı ve baktopepton azot kaynağıdır. Disodyum fosfat ve sitrik asit ise fosfat tamponu olarak kullanılmaktadır (Krystynowicz et al, 2002; Choi and Shin, 2020). Sentez sonrası BS bakteri hücrelerinden, organik asitlerden, tuzlardan, kalıntı şekerlerden ve diğer ortam bileşenlerinden arındırılmak için işlem görmektedir. Saflaştırma prosesi yıkama, sanrifügasyon, filtrasyon ve kimyasal ekstraksiyon gibi çeşitli metotları içermektedir. Bu metotlardan BS'nin sıcak ve dilüe sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanıp, distile su ile durulanıp son olarak otoklav yoluyla sterilizasyonu en yaygın olarak kullanılmaktadır (Stumpf et al., 2018).

2.7.3 Bakteriyel selülozun özellikleri ve kullanım alanları

Bitkilerden saf selüloz eldesinde farklı kompleks kimyasal muameleler gerekirken, BS hali hazırda saf formda üretilmekte, herhangi bir bileşik içermemektedir (Stumpf et al, 2018). Üç boyutlu nanoyapıdaki matris saf bir biyopolimerdir, 40-60 nm çapında şerit şeklindeki nanofiberlerden oluşur. Bu nanofiberler pamuk fiberlerine göre yüksek yüzey alanına sahiptir (Ashrafi et al, 2019). BS bitkisel türevli selüloza göre birçok avantaja sahiptir; yüksek kimyasal saflığa, mükemmel mekanik dayanıma, iyi biyouyumluluk ve biyobozunurluğa sahiptir (Zhang et al, 2019). Bitkisel selüloza göre BS lignin, hemiselüloz ve pektin içermediğinden yüksek saflık özelliği gösterir. BS membranının saflığının yanında, yüksek yüzey alanına, yüksek esnekliğe, elastik modülüne, termal stabiliteye, poroziteye, çeşitli por geometrisinde fiberli ağ yapısına, geniş kimyasal ve fiziksel modifikasyon potansiyeline, farklı yapılara kalıplanabilme yeteneğine sahiptir. Yüksek çekme kuvveti (200-300 MPa), yüksek termal ve kimyasal stabilite, yüksek su tutma ve yüksek absorpsiyon kapasitesi (suda kendi ağırlığının 100 katından fazlasını absorbe etmesi), bitkisel selüloza göre yüksek polimerizasyon derecesi ve kristalinite özellikleri gösterir (De Lima Fontes et al, 2018; Ashrafi et al, 2019; Stumpf et al, 2018, Choi and Shin, 2020).

BS genellikle ağsı yapısı, yüksek saflık ve yüksek biyouyumluluk özelliklerinden dolayı çevre, tekstil, sağlık, gıda, malzeme esnek elektronik ve optik, süper iletken, teşhis edici sensör ve kozmetik gibi farklı uygulama alanlarında üstün olmaktadır. Ayrıca bakteriyel selüloz mikroyapısı insan derisi ekstraselüloz matrisini taklit etmekte ve böylece yara örtüsü, doku mühendisliği gibi medikal uygulamalarda umut vadedici olmaktadır (Sun et al, 2020; Ashrafi et al, 2019). BS çeşitli gıda endüstrisinde uygulama bulurken, medikal alanda da doku mühendisliği iskeleleri, yara örtü malzemeleri, dental implantlar, yapay kan damarları, cerrahi yamalar, kemik dolguları, kalp kapakçığı, menisküs, yapay kıkırdak gibi ürünlere de dönüştürülebilmektedir (Choi and Shin, 2020). Ayrıca iyi organize olmuş üç boyutlu ağ yapısı geçici deri ve antimikrobiyal yapay kan damarı gelişimlerine katkıda bulunabilir. İlaç sektöründe ise ilaç salınım sistemleri, jelleştirme ajanı olarak kullanımı mümkündür (De Lima Fontes et al, 2018).

2.7.4 Bakteriyel selülozun modifikasyonları

BS geniş uygulama alanlarında değiştirilmeye ve geliştirilmeye oldukça açıktır. Genellikle bakteriyel selüloza yapılan modifikasyonlar kültür esnasında ek/destek maddelerin eklenmesiyle veya karbon kaynağının değiştirilmesiyle *in situ* olarak veya var olan mikrofiberlerin üretim sonrası *ex situ* olarak modifikasyonu şeklinde olmaktadır. *In situ* kimyasal modifikasyon iken, *ex situ* kimyasal veya fiziksel metotları içermektedir. Ayrıca absorpsiyon yoluyla fiziksel *ex situ* modifikasyonu *in situ*'ya göre daha kolay ve uygundur. BS fermentasyon prosesi sırasında herhangi bir şekilde üretilebilme özelliğine sahiptir, ancak genellikle yapısal modifikasyon için kalıp veya polimerik materyaller gerekmektedir. BS peliküllerinin şeffaflığı büyüme ortamı karbon komponentleriyle değiştirilebilir (Ashrafi et al, 2019; Sun et al, 2020; Stumpf et al, 2018). Boyalar, hemiselülozik polisakkaritler, karboksimetilselüloz (CMC) ve dönen manyetik alan gibi farklı ajanlar BS'nin kompozisyonu veya morfolojisini değiştirerek modifikasyon yapılmasını sağlar. Değişim ajanlarının eklenmesiyle polisakkarit zincirlerindeki etkileşimler ayarlanabilir, çözünebilir ve kristal bölgelerin kompozisyonları etkileyerek, kristalinite, porozite ve yapıyı değiştirebilir (Sun et al, 2020). BS'nin fibril boyutu, yüzey alanı, kristalinite gibi özellikleri kültür ortamına farklı katkı maddelerinin farklı konsantrasyonlarda eklenmesiyle *in situ* veya *ex situ* modifikasyonlarla düzenlenebilir. CMC suda çözünebilen selüloz türevidir, kültür ortamının viskozitesini arttırır, selüloz molekülünde bulunan hidroksil gruplarının eterifikasyonu sonucu oluşur. CMC, BS mikrofibrillerine bağlanarak ve kaplayarak daha yoğun bir yapı oluşmasını sağlamakta ancak mekanik dayanım ve kristaliniteyi azaltmaktadır. CMC'nin BS ile karışması yapısal engeldir,

mikrofibriller arasındaki hidrojen bağlarının oluşumunu değiştirir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada morfolojiye bakıldığında nanofiberlerin uzunluk ve kalınlığında çok büyük bir değişiklik yoktur, porozitede ise azalmaya yol açmıştır (De Lima Fontes et al, 2018). BS üretim verimlerini arttırmak için birçok genetik mühendisliği yaklaşımı da bulunmaktadır (Stumpf et al, 2018). Diğer bir çalışmada BS nanofiberleri kitosanla kombine edilerek yüksek düzeyde hizalanmış ve porlu yapıya sahip doku iskelesi üretilmiştir. Kitosan, BS'nin yoğun bir yapı ve üstün mekanik özellikleriyle birlikte biyomedikal alanda uygulama bulmasını sağlamıştır (Li et al, 2017).

BS üretim veriminin arttırılmasında da çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. BS üretimi bakteri türü, besin çeşitleri (karbon, azot kaynakları ve mikroelement), hız, inokulum miktarı, sıcaklık, oksijen dağılımı ve pH gibi farklı parametrelerden etkilenmektedir. Bir çalışmada ise karbon kaynaklarının etkisi için standart ortamdaki sükroz; glikoz, maltoz, galaktoz, fruktoz, mannitol ve gliserolle değiştirilmiştir. BS verimi standart karbon kaynağına göre fruktoz ve gliserolde daha fazla elde edilmiştir. Sükroz üretiminde verimin kısmen az olmasının nedeni ise sükrozun öncelikle glikoz ve fruktoza hidrolize edilerek periplazmaya transfer edilmesi gerektiğidir. Maltoz, galaktoz ve mannitolde ise BS üretimi azdır. Glikozda düşük verimin nedeni üretim esnasında glukonik asitin oluşarak ortam pH'ını düşürmesidir. Fruktoz ise selülozun üretiminde glukonik asit oluşmadan prekürsör olan üridin difosfat (UDP)-glikoza dönüşmektedir. Gliserol de glukonik asit oluşumu olmadan pentoz siklusunu trikarboksilik asit (TCA) siklusuna dönüştürmektedir (Khan et al., 2020).

Çok sayıda yüzey hidroksil grubu nedeniyle, BS kimyasal modifikasyona açıktır. Kimyasal yapıları nedeniyle kitosan ve selüloz, her iki bileşenin fonksiyonel grupları arasında hidrojen bağları yoluyla etkileşim gösterebilir. BS mikrofiberleri üzerinde bol miktarda hidroksil grubunun bulunması, metal nanopartiküllerinin adsorpsiyonunu kolaylaştırır. BS'nin metal nanopartiküllerle modifikasyonu sadece filtrasyon akışını iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda ona fotokatalitik ve antibakteriyel özellikler de kazandırır (Urbina et al., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deniz Çayırı Atıklarının Toplanması

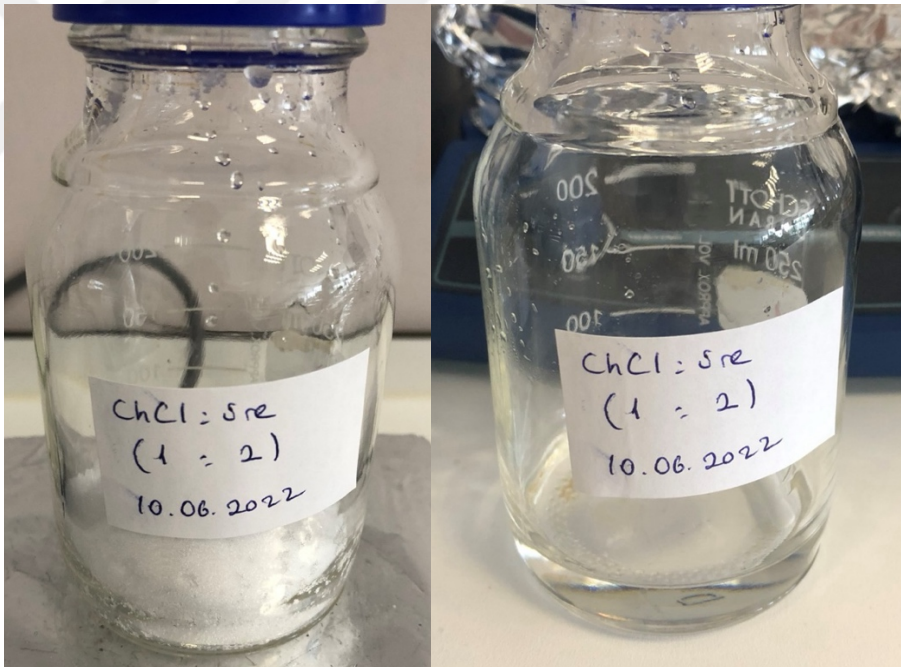
T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nden deniz çayırı atıklarının toplanabilmesi için gerekli yasal izin alınmıştır. Sonbahar itibariyle Urla ve Karaburun kıyılarında yapılan gözlemler sonucunda 20 Şubat 2022 tarihinde Mordoğan Ardıç Koyu Plajı'ndan ölü deniz çayırı yaprakları toplanmıştır. Temiz poşet ve kovalar yardımıyla laboratuvara getirilen deniz çayırı yaprakları öncelikle 2 kez musluk suyundan geçirilerek kaba kirlilikten arındırılmıştır. Ardından distile sudan geçirilerek, akabinde filtre kağıtlarına yayılarak suları giderilmiştir. Etüvde (NÜVE marka EN500 model) 50 °C sıcaklığında tutulduktan sonra laboratuvar koşullarında tamamen kurutma işleminin yapılabilmesi için laboratuvar tezgâhları üzerine yayılan filtre kağıtlarına aktarılmıştır. Takip eden günlerde yapraklar karıştırılarak kurutma işleminin hızlandırılması sağlanmıştır. Tamamen kuruduktan sonra da öğütme basamağına geçilmiştir. Parçalayıcı olarak hububat öğütücü cihazında yapılan öğütme işleminde kısa sürede homojen ve toz görünümlü bir yapı elde edilmiştir (Şekil 3.1.). Nem, sıcaklık ve ışıktan etkilenmemesi amacıyla kilitli poşetlere konularak oda sıcaklığındaki dolaba kaldırılmıştır.



Şekil 3.1. Deniz çayırı atıkları **a)** Denizden ayrılmış yeşil formu, **b)** Deniz kıyısında atık deniz çayırı birikimi, **c)** Kurutma sonrası görünüm, **d)** Öğütme sonrası görünüm.

3.2 DES Sistemlerinin Hazırlanması

Derin ötektik çözücü olarak ChCl:Glikoz:Su (5:2:5), ChCl:Üre (1:1), ChCl:Üre (1:2), ChCl:Gliserol (1:2) ChCl:Asetik asit (1:2) ve L-mentol:Asetik asit (1:1) sistemleri çalışılmıştır. DES hazırlığında ChCl (Sigma-Aldrich) ve L-mentol (Tekkim) hidrojen bağı alıcısı; üre (Sigma-Aldrich), glikoz (AFG Sci), gliserol (Sigma-Aldrich) ve asetik asit (Tekkim) ise hidrojen bağı vericisi olarak seçilmiştir. Ancak ChCl:Glikoz sisteminde viskozitenin artışı önemli bir sorun olarak düşünüldüğü için bu sistemle çalışmaya devam edilmemiştir. Buna göre başlangıç mol değerine göre hesaplama yapılarak uygun miktarda hidrojen bağı alıcısı ile hidrojen bağı vericisi kapaklı Schott şişeye eklenerek 150-250 rpm ve 80 °C çalışma koşullarındaki ısıtmalı karıştırıcıya (Wisd marka) konularak, yaklaşık 1-1,5 saat boyunca berrak hale gelene kadar gözlemlenmiş ve bu süre sonunda çözücü elde edilmiştir (Abo-Hamad et al., 2015). Şekil 3.2.'de ChCl:Üre (1:2) sisteminin karıştırma öncesi ve sonrası görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2. ChCl:Üre (1:2) karıştırma öncesi ve sonrası.

3.3 Farklı DES Sistemleriyle Deniz Çayırı Atıklarının Ekstraksiyon Ön Çalışması

DES sistemleriyle atık deniz çayırı yapraklarının ekstraksiyon çalışmaları aşamasına geçilmiştir. Öncelikle belirlenen parametrelere göre Design Expert programında (Software 13.0.5.0) dört adet numerik faktör ve iki adet yanıt ile otuz

deneylik deneme deseni oluşturulmuştur (Tablo 3.1.). Parametreler ve değer aralıkları aşağıdaki gibi verilmiştir:

- Su varlığı: 0-%70
- Süre: 40-120 dakika
- Sıcaklık: 30-100 °C
- Sıvı/Katı Oranı: 30-50 mL/g (Abo-Hamad et al., 2015; Saravana et al., 2018).

Tablo 3.1. Ekstraksiyon faktörleri ve değerlerinin Design Expert programında çıktısı.

Versiyon	13.0.5.0			
Çalışma Türü	Response Surface		**Alt türü**	Rastgele
Tasarım Türü	Merkezi Tümleşik		**Run sayısı**	30,00
Tasarım Modeli	Quadratic		**Blok Durumu**	Yok
Faktör	**İsim**	**Birimler**	**Minimum**	**Maksimum**
A	Su	%	0,00	70,00
B	Süre	dk	40,00	120,00
C	Sıcaklık	°C	30,00	100,00
D	Sıvı/Katı	mL/g	30,00	50,00

Design Expert 13.0.5.0 versiyonunda deneme deseninin oluşturulmasında Design Expert programı yanıt yüzey yöntemi (RSM) merkezi tümleşik (CCD) deneme deseninden yararlanılmıştır. Parametreler; su varlığı, süre, sıcaklık ve sıvı/katı oranı iken, toplam fenolik madde miktarı ve toplam şeker miktarı yanıtları oluşturmaktadır. Bu parametrelerin toplam fenolik madde miktarı ve toplam şeker miktarı üzerine etkisini araştırmak hedeflenmiştir. Parametrelere ve değer aralıklarına göre Design Expert programında oluşturulan deneme deseni Şekil 3.3.'te verilmiştir. Buna göre 30 adet deneme çıkarılmıştır. Yukarıda verilmiş olan DES sistemlerinin her birine ayrı ayrı bu deneme deseni uygulanmıştır. Ekstraksiyonlar cam tüplerde toplamda 10 mL solvent hacimleriyle gerçekleştirilmiştir. Çözücüler ile birlikte cam tüplerde bir araya getirilen hammaddenin homojen dağılabilmesi için öncelikle 1 dakika boyunca vorteksleme işlemi yapılmıştır.

	Name	Units	Low	High	-alpha	+alpha
A [Numeric]	Su	%	17,5	52,5	0	70
B [Numeric]	Süre	dk	60	100	40	120
C [Numeric]	Sıcaklık	C	47,5	82,5	30	100
D [Numeric]	Sıvı/Katı	mL/g	35	45	30	50

Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg	Response 2 Toplam şeker mg
13	1	17,5	60	82,5	45		
21	2	35	80	30	40		
17	3	0	80	65	40		
9	4	17,5	60	47,5	45		
14	5	52,5	60	82,5	45		
4	6	52,5	100	47,5	35		
2	7	52,5	60	47,5	35		
15	8	17,5	100	82,5	45		
11	9	17,5	100	47,5	45		
5	10	17,5	60	82,5	35		
16	11	52,5	100	82,5	45		
10	12	52,5	60	47,5	45		
7	13	17,5	100	82,5	35		
28	14	35	80	65	40		
27	15	35	80	65	40		
25	16	35	80	65	40		
18	17	70	80	65	40		
6	18	52,5	60	82,5	35		
19	19	35	40	65	40		
1	20	17,5	60	47,5	35		
23	21	35	80	65	30		
24	22	35	80	65	50		
3	23	17,5	100	47,5	35		
29	24	35	80	65	40		
26	25	35	80	65	40		
22	26	35	80	100	40		
8	27	52,5	100	82,5	35		
30	28	35	80	65	40		
20	29	35	120	65	40		
12	30	52,5	100	47,5	45		

Şekil 3.3. Ekstraksiyon için faktörler, yanıtlar ve deneme deseninin Design Expert programı çıktısı.

Ekstraksiyon deneyleri 150 rpm çalkamalı su banyosunda gerçekleşeceği için deney planlamasında sıcaklığa göre sınıflandırma yapılmıştır (Şekil 3.4.). Ayrıca değişen su varlığına göre eklenmesi gereken DES ve su hacimleri ile 10 ml ekstraksiyon hacminde sıvı/katı oranına göre eklenmesi gereken toplam biyokütle miktarları aşağıda belirtilmiştir:

Sıcaklıklar: 30 ve 100 °C

47,5 °C

82,5 °C

65 °C

% Su varlığı: %0 → 10 mL DES

%17,50 → 8,25 mL DES+ 1,75 mL distile su

%35 → 6,5 mL DES+3,5 mL distile su

%52,50 → 4,75 mL DES+5,25 mL distile su

%70 → 3 mL DES+7 mL distile su

Zaman: 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika

Sıvı/Katı Oranı: 30 mL/g → 0,33 gram

35 mL/g → 0,286 gram

40 mL/g → 0,25 gram

45 mL/g → 0,22 gram

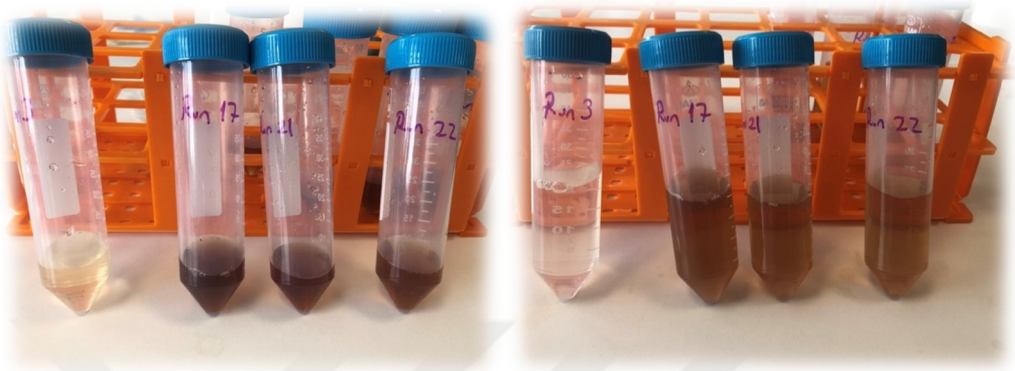
50 mL/g → 0,20 gram



Şekil 3.4. Ekstraksiyon aşaması.

Bu koşullarda gerçekleşen ekstraksiyon tüpleri süre sonunda alınarak öncelikle kaba filtre kâğıdı ile vakum altında filtre edilmiş ve katı faz ayrılmıştır. Alt kısımda kalan ve içerisinde metabolitlerin olduğu düşünülen sıvı faz 50 mL'lik falkonlara alınarak (yaklaşık 7,5 ile 10 mL hacimlerinde) 2 kat oranında antisolvent uygulaması yapılmıştır. Antisolvent uygulamasındaki amaç iki bileşen arasında oluşan hidrojen bağının kırılmasıyla DES sisteminin etkisinin ortadan

kaldırılmasıdır. Bunun için ekstrakt hacminin 2 katı kadar distile su falkona ilave edilmiştir. Aynı şekilde mentol ve asetik asitin faz oluşturabilmesi için bu sisteme de distile su ilavesi yapılmıştır. Ardından maksimum üç gün içerisinde toplam fenolik madde ve toplam şeker tayini yapılmak üzere +4 °C'deki buzdolabına kaldırılmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Filtrasyon ve antisolvent ilavesi sonrası görünümler.

Buraya kadar yapılan deneme ve analizlerle atık deniz çayırının birçok avantaja sahip yenilikçi DES sistemleriyle tarama ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu taramalarla her bir DES için programın önermiş olduğu en iyi koşullarda fenolik bileşik ve şeker açısından en fazla ekstrakt içeriğinin elde edilmesi amacıyla en iyi sistem araştırılmıştır. DES sistemlerindeki valide edilmiş değerlerle yapılan en iyi çalışma koşulları şunlardır:

ChCl:Üre (1:1)'de % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Üre (1:2)'de % su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

L-mentol:Asetik asit (1:1)'de % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Gliserol (1:2)'de % su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Asetik asit (1:2)'de % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni deneyler planlanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlarla en iyi DES sistemi belirlenmiştir.

3.4 Ekstrakt Analizleri

Ekstraksiyon sonucunda en iyi DES sisteminin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde ve toplam şeker tayini yapılması amaçlanmıştır. Bu nedenle sıvı ve katı fazı birbirinden ayırabilmek için filtrasyon işlemi uygulanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı analizinde Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılırken; toplam şeker tayininde fenol sülfürik asit metodu (Dubois metodu) uygulanmıştır.

3.4.1 Toplam fenolik madde miktarı analizi (Folin-Ciocalteu reaktifi)

Standart Eğrinin oluşturulması

- Standart olarak gallik asit (Sigma-Aldrich) kullanılmış ve sonuçlar gallik asit eşdeğerliği (GAE) olarak hesaplanmıştır. Gallik asit farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak absorbansları okunmuştur. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilmiştir.

Örneklerde toplam fenolik madde tayini

- Hazırlanan sıvı ekstraktlardan erlenlere 1000 µL alınıp üzerine 22 mL ultra saf su ilave edilmiştir. Erlenlere 0,5 mL 0,5 N Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) reaktifi ve 3 dk beklemenin ardından da %3'lük sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck) çözeltisinden 1,5 mL eklenmiştir. Karışım 2 saat boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında çalkalanarak bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin absorbansı UV-görünür spektrofotometrede (Mecasys, OPTIZEN POP) 720 nm'de saf suya karşı ölçülmüştür. Oluşan tepkimelerin DES sistemlerini nasıl etkilediğini belirlemek için çözücüler de tıpkı ekstraktlar gibi düşünülerek absorbans değerleri ayrı şekilde elde edilmiştir ve bu değerler asıl değerlerden çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır (Karakavuk, 2020).

3.4.2 Toplam şeker tayini (fenol sülfürik asit metodu (Dubois metodu))

Standart Eğrinin oluşturulması

- Ekstraktların toplam şeker miktarı fenol-sülfürik asit (Dubois metodu) yöntemi ile belirlenmiştir (Dubois et al., 1951). Şeker tayininde standart

çözelti glikoz (AFG Sci) çözeltisidir. Bu nedenle stok olarak 1000 ppm'lik glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. 0-100 µg/mL konsantrasyon aralığında standart tüpleri oluşturulmuştur. Hazırlanan tüplere 0,5 mL standart, %5'lik fenol (Merck) çözeltisinden 0,5 mL, derişik sülfürik asitten (Merck) 2,5 mL eklenerek tüplerin ağzı kapatılarak vortekslenmiş (IKA marka), ardından soğuması için 15 dakika su ile dolu bir beherde bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar vortekslenerek standartlar küvetlere aktarılmıştır. Küvetlerdeki standartlar 490 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede okunup standart eğri oluşturulmuştur.

Örneklerde toplam şeker tayini

- 0,5 mL örnek üzerine 0,5 mL %5 fenol çözeltisi ve 2,5 mL sülfürik asit ilave edilmiştir. Tüplerin ağzı kapatılarak vortekslenmiş, ardından soğuması için su ile dolu bir beherde bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değeri okunmuştur. Oluşan tepkimelerin DES sistemlerini nasıl etkilediğini belirlemek için çözücüler de tıpkı ekstraktlar gibi düşünülerek absorbans değerleri ayrı şekilde elde edilmiştir ve bu değerler asıl değerlerden çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır. Daha önce hazırlanan standart eğrideki denklemde, okunan absorbans değeri yerine koyularak örnekteki toplam şeker miktarı tayin edilmiştir (Mutaf Kılıç, 2020).

3.4.3 Belirlenen şartlarda elde edilen ekstraktlara antibakteriyel aktivite tayini

Design Expert programıyla yapılan çalışmalar sonrasında belirlenen koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlardaki DES'lerden elde edilen ekstraktlara toplam fenolik madde, toplam şeker tayinlerinin yanında antibakteriyel ve antioksidan testleri de üçer tekrarlı olarak uygulanmıştır. Ayrıca klasik yöntem olarak distile su ile aynı solvent çalışma hacminde 60 ve 100'er dakika olarak ekstraksiyon yapılmış, toplam fenolik madde, toplam şeker tayinleri ile antibakteriyel ve antioksidan aktivite testleri bu ekstraktlara da uygulanmıştır. Antibakteriyel aktivite testinde kullanılan yöntem Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemidir. Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ve Gram negatif bakteri olarak ise *Escherichia coli* test edilmiştir. Bunun için bakteriler Nutrient Broth (Merck) ile kültüre alınmıştır. Aktivite belirlenmesi için Mueller-Hinton agarlı (Condalab) besiyeri hazırlanarak petri kaplarına dökülmüştür. Bakterilerin

türbiditesi Mc Farland (GBL) No.1'e denk gelecek şekilde seyreltilmiş, ardından yapılan hesaplamalarla 1×10^8 CFU/mL olacak şekilde agar üzerine yayma plaka yöntemiyle inokule edilmiştir. Bakteri ekim işleminden sonra örnekler 6 mm çapındaki steril disklere (Bioanalyse) 30 µL hacimde emdirilerek agar üzerine yerleştirilmiştir. Sonrasında petriler 24 saat boyunca 37°C'deki inkübatörde (Zhicheng marka ZHWY-103B model) inkübe edilmiş ve disklerin etrafında oluşan zon çapları belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite testleri sırasında pozitif kontrol olarak konsantrasyonu 10 mg/mL olan Gentamisin (Sigma-Aldrich) antibiyotiği, negatif kontrol olarak ise her örneğin çözücüsü kullanılmıştır. Her bir örnek için üç paralelli denemeler gerçekleştirilmiştir (Maltaş et al., 2010).

3.4.4 Belirlenen şartlarda elde edilen ekstraktlara antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan aktivite tayini için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi uygulanmıştır. Öncelikle metanol (Merck) ile 0,3 mmol/L konsantrasyonunda DPPH (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.) çözeltisi hazırlanmıştır. 300 µL sıvı ekstrakt üzerine 900 µL metanol ve ardından 300 µL DPPH çözeltisi eklenmiştir. Vortekslemenin ardından çözeltiler 10 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Renk değişimi gözlemlenerek 517 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Örnekler suya karşı okunmuştur. Pozitif kontrol 300 µL ekstrakt içermeyen ekstraksiyon ortamı, 900 µL metanol ve 300 µL DPPH çözeltisi içermektedir. Aynı işlemler standart Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA) (Sigma-Aldrich) çözeltisi için de uygulanmıştır. Yönteme göre antioksidan aktivitesi yüzde olarak hesaplanmaktadır ve % inhibisyon şeklinde ifade edilmektedir (Deniz, 2021). Yüzde hesabında kullanılan denklem ve absorbans değerleri ile % inhibisyon değerleri aşağıda verilmiştir:

$$(\%)\ \boldsymbol{inhibisyon} = \frac{\boldsymbol{Absorbans}_{\boldsymbol{pozitif\ kontrol}} - \boldsymbol{Absorbans}_{\boldsymbol{örnek}}}{\boldsymbol{Absorbans}_{\boldsymbol{pozitif\ kontrol}}} \times \mathbf{100}$$

3.4.5 Seçilen ekstrakta LC-MS/MS analizi

Elde edilen sonuçlara göre ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere ChCl:Üre (1:2) DES sistemiyle yapılan ekstrakt seçilmiştir. Bu ekstraktın fenolik bileşenlerini seçilen standartlara göre tespit etmek amacıyla Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (liquid chromatography–

mass spectrometry/mass spectrometry:LC-MS/MS) (Agilent) analizi yapılmıştır. Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, protokateşuik asit ve rosmarinik asit standartları kullanılmıştır. C18 ters faz ODS kolonu (25 × 4,6 mm × 5 μm) fenolik bileşiklerin kromatografik ayrımı için kullanılmıştır. Standartlar ve numuneler için enjeksiyon hacmi 2 μL'dir. Mobil faz 0,4 mL/dk akış hızına sahip olup, eluent A olarak %0,1 formik asit içeren su ve eluent B metanolden oluşmaktadır. Gradyan koşulları 3 dakika için %2 B, 6 dakika için %25 B, 10 dakika için %50 B, 14 dakika için %95 B, 17,5 dakika için %2 B şeklindedir. Fenolik bileşikleri tanımlamak için pozitif ve negatif modlar kullanılmıştır.

3.5 Yeşil Sentez Yöntemiyle Nanopartikül Sentezi

Ekstraksiyon çalışmaları sonrasında seçilen zengin içerikli ChCl:Üre (1:2) ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri sentezlenmiştir. Öncül olarak gümüş nitrat ($AgNO_3$) (Merck) bileşiği, titanyum (IV) bis (ammonyum laktato) dihidroksit çözeltisi (Sigma-Aldrich) ve çinko sülfat hepta hidrat ($ZnSO_4.7H_2O$) (AFG Sci) bileşiği kullanılmıştır. Metal konsantrasyonu yani öncül metal çözeltisi konsantrasyonu ve süre olmak üzere iki parametrenin nanopartikül sentezine olan etkisini incelemek amaçlanmıştır. Deneme deseninin oluşturulmasında Design Expert (13.0.5.0) programı yanıt yüzey yöntemi (RSM), merkezi tümleşik (CCD) deneme deseninden yararlanılmıştır (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. Nanopartikül sentez faktörleri ve değerlerinin Design Expert programı çıktısı.

Versiyon	13.0.5.0			
Çalışma Türü	Response Surface		**Alt türü**	Rastgele
Tasarım Türü	Merkezi Tümleşik (CCD)		**Run sayısı**	13,00
Tasarım Modeli	Quadratic		**Blok Durumu**	Yok
Faktör	**İsim**	**Birimler**	**Minimum**	**Maksimum**
A	Metal Konsantrasyonu	mM	0,50	10,00
B	Süre	saat	1,00	8,00

Bu amaçla öncelikle Design Expert programında metal çözeltisi molaritesi ve süre parametreleri kullanılarak 13 denemelik desen oluşturulmuştur. Metal molaritesi aralığı 0,5-10 mM, süre aralığı ise 1-8 saat olarak belirlenmiştir. Programdan elde edilen deneme deseni Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. Her bir metal öncülü için bu deneme deseni ayrı olarak uygulanmıştır. Boyut ve polidispersite

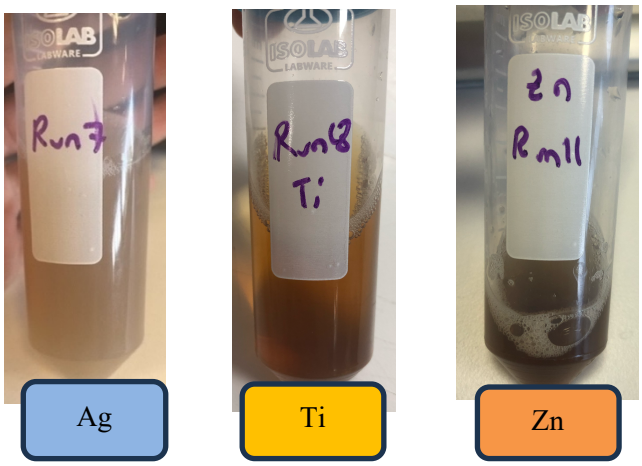
indeksi (PDI) ise programda iki ayrı yanıt olarak kullanılmıştır. Bu yanıtlar için dinamik ışık saçılımı spektrofotometre yöntemiyle ölçülerek elde edilen değerler programa girilmiştir.

	Name	Units	Low	High	-alpha	+alpha
A [Numeric]	ME Konsantra		1,89124	8,60876	0,5	10
B [Numeric]	Süre		2,02513	6,97487	1	8

Std	Run	Factor 1 A:ME Konsantra...	Factor 2 B:Süre	Response 1 Boyut nm	Response 2 PDI Mw/Mn
13	1	5,25	4,5		
9	2	5,25	4,5		
7	3	5,25	1		
6	4	10	4,5		
12	5	5,25	4,5		
10	6	5,25	4,5		
1	7	1,89124	2,02513		
11	8	5,25	4,5		
5	9	0,5	4,5		
4	10	8,60876	6,97487		
2	11	8,60876	2,02513		
8	12	5,25	8		
3	13	1,89124	6,97487		

Şekil 3.6. Nanopartikül üretimi için faktörler, yanıtlar ve deneme deseninin Design Expert programı çıktısı.

En iyi koşulların belirlenmesi için nanopartikül üretimleri falkon tüplerde oda sıcaklığında, karanlık ortamda 150 rpm çalkalama hızına sahip çalkalamalı karıştırıcı cihazında (Zhicheng marka) belirlenen sürelerde ve molaritede gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7.). Literatürden elde edilen verilere göre ekstrakt/öncül metal hacim oranı ise gümüşte 1/9 olarak (Arya et al., 2019), titanyumda 1/5 olarak (Caliskan et al., 2022), çinkoda ise 1/3 olarak (Mohammadi and Ghasemi, 2018) sabitlenmiştir. Bu hacimsel oranlar daha sonraki aşamada büyük üretimlerde de aynı şekilde kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Ag, Ti ve Zn nanopartikül sentezi-örnek Run'lar.

En iyi molarite değerleri gümüş çözeltisi için 1,891 mM, titanyum çözeltisi için 5,528 mM ve çinko çözeltisi için 8,609 mM olarak belirlenmiştir. Sentez üretim süreleri ise gümüş ve çinko nanopartikülleri için 2,025 saat, titanyum nanopartikülü içinse 4,689 saat olarak sürdürülmüştür. Elde edilen sonuçlardan sonra hedeflenen asıl üretimler daha büyük ölçekte optimize edilen molarite ve süre değerlerinde oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bunun için büyük ölçekte ChCl:Üre (1:2) DES sistemi ile ekstraksiyon yapılmıştır (Şekil 3.8.).



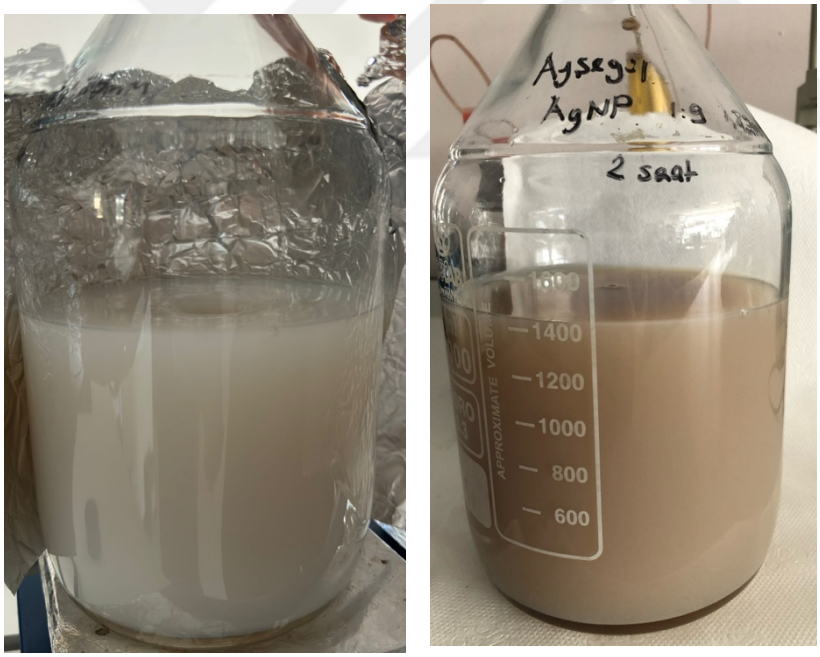
Şekil 3.8. Büyük ölçekte DES ile atık deniz çayırı ekstraksiyonu.

Santrifüj ve filtrasyon sonrası elde edilen DES deniz çayırı ekstraktı Şekil 3.9.'da görüldüğü üzere prekürsör (öncül metal çözeltisi) olarak oluşturulan gümüş, titanyum ve çinko çözeltilerine aglomerasyonu engellemek amacıyla saniyede 1-2 damla olacak şekilde ilave edilmiştir, eş zamanlı olarak manyetik karıştırıcıda karıştırma işlemi uygulanmıştır.



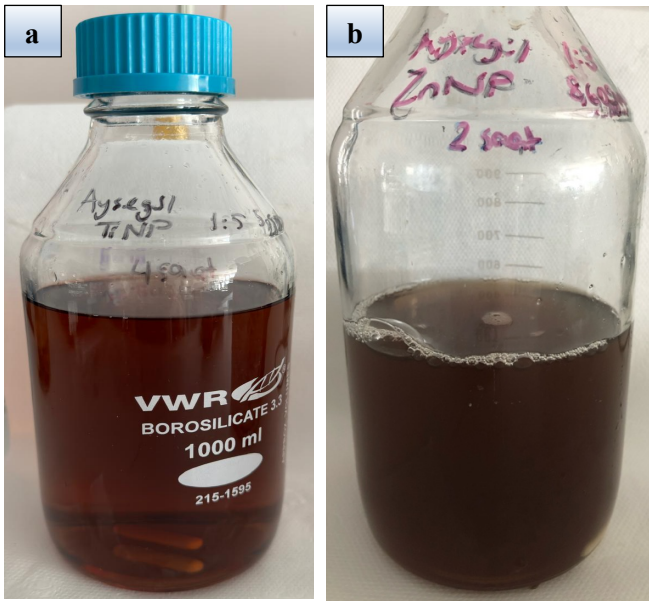
Şekil 3.9. Prekürsör çözeltilere ekstrakt ilave edilmesi.

Şekil 3.10.'da görüldüğü üzere gümüş nanopartikül (Ag-NP) çözeltisinin rengi yaklaşık 2 saatlik inkübasyon sonucunda kahverengine dönmüştür.



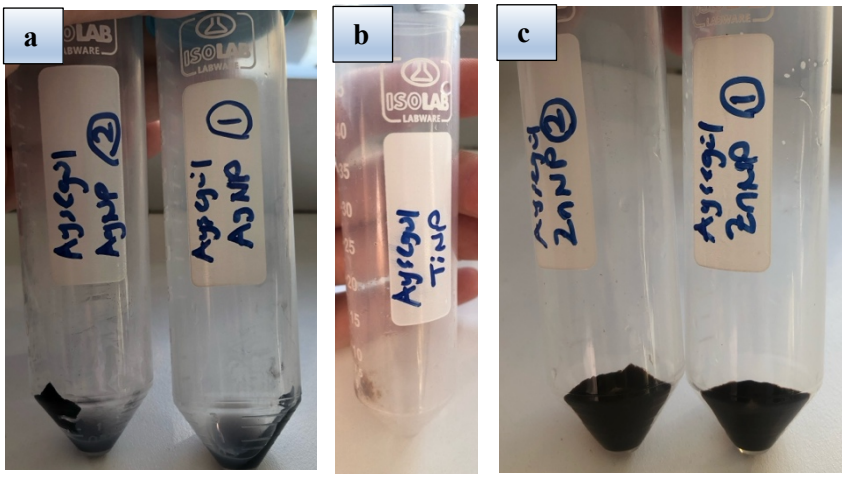
Şekil 3.10. Ag-NP süreç başlangıç ve bitimindeki görünümü.

Şekil 3.11.'de ise titanyum ve çinko nanopartiküllerinin inkübasyon sonundaki görünümleri bulunmaktadır. Titanyum nanopartikülleri (Ti-NP) çinko nanopartiküllerine (Zn-NP) göre daha berrak görünümündedir. Renk dönüşümleri ise gümüşte olduğu gibi net bir şekilde yakalanmamıştır.



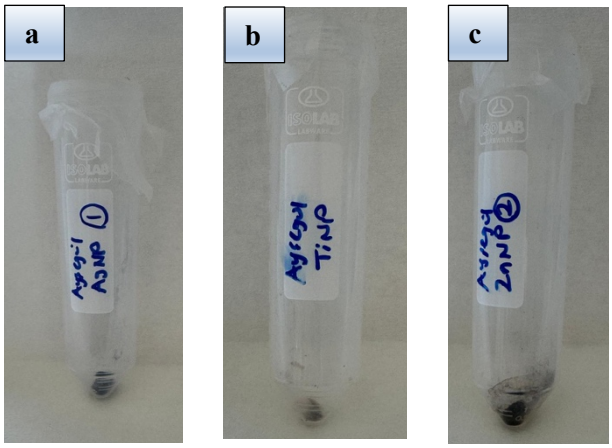
Şekil 3.11. **a)** Ti-NP ve **b)** Zn-NP çözeltilerinin üretim sonundaki görünümleri.

Nanopartiküllerin bazı karakterizasyon yöntemleri direkt olarak üretim ortamından örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. Bazı yöntemlerde ise kuru halleri gerekmektedir. Bunun için üretim sonundaki nanopartiküller 9000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifügasyona (Hettich marka Universal 320 R model) tabi tutularak saflaştırılmış ve Şekil 3.12.'deki gösterildiği gibi falkonlarda elde edilmiştir.



Şekil 3.12. Nanopartiküllerin santrifüj sonrası görünümü **a)** Ag-NP, **b)** Ti-NP, **c)** Zn-NP.

Bazı karakterizasyon yöntemlerinde kuru faz numune gerektiğinden nanopartiküller liyofilizatör ile kurutularak toz hale getirilmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Nanopartiküllerin liyofilizatör sonrası toz haldeki görünümleri **a)** Ag-NP, **b)** Ti-NP, **c)** Zn-NP.

3.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında sentezlenen nanopartiküllerin fiziksel karakterizasyonu için UV-Görünür spektral analiz, dinamik ışık saçılımı (DLS), zeta potansiyeli, Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ölçüm yöntemleri; biyolojik karakterizasyon için de antibakteriyel aktivite, antifungal aktivite, antioksidan aktivite, antibiyofilm aktivite ve ayrıca fotokatalitik aktivite tespiti yapılmıştır.

3.6.1 UV-Görünür spektral analiz

İndirgenme tepkimesinde oluşan renk değişimi görsel olarak gözlemlendikten sonra metal iyonlarının nanopartiküllere indirgenmesi reaksiyon zamanının fonksiyonuna göre spektrum olarak görüntülenmiştir. Metal nanopartiküller genellikle 190-900 nm dalga boyları arasında pik vermektedir. Sentezlenen nanopartiküllerin görünür bölgedeki özelliklerinin incelenmesi Mettler Toledo marka Easy VIS model Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopi (UV-Vis) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler üretim ortamından örnek alınarak yapılmıştır (Yılmaz Öztürk et al., 2020).

3.6.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği

Kolloidal çözeltiden geçirilen bir lazerden saçılan ışık, DLS yöntemiyle ölçülmektedir. Çözeltideki parçacığın büyüklüğü, saçılmış ışık yoğunluğunun modülasyonunu zamanın bir fonksiyonu olarak analiz eder. DLS analizindeki

temel, küçük parçacıklardan daha fazla ışık saçılması, daha büyük parçacıkların daha yavaş hareket etmesi ve çözelti içindeki parçacıkların difüzif hareketine dayanır (Sapsford et al., 2011). Sentezlenen nanopartiküllerde kolloidal süspansiyon içerisine parçacıkların boyut dağılımlarını ve ortalama parçacık çapını karakterize etmek için Malvern, Zeta Sizer Nano-ZS model cihazı kullanılmıştır. Bu analiz için gerekli numune miktarı minimum 1 mL'dir. Üretim ortamından alınan örnekler analiz öncesi 10 dakika boyunca sonik banyoda homojenize hale getirilip, daha sonra 10 kat seyreltilmiştir. Her bir nanopartikül için ölçümler üç parallelli yapılmıştır.

3.6.3 Zeta potansiyeli ölçümü

Zeta potansiyel ölçümü, sulu çözeltilerdeki elektrostatik dağılmayı ve yüzey yükünü kontrol etmek için kritik bir role sahiptir. Zeta potansiyelinde örnekler iki tarafı altın elektrot içeren bir hücreye eklenir. Voltaj uygulanarak, parçacıkların zıt yüklü elektrota doğru hareket etmesi sağlanır. Zeta potansiyel ölçümleri için şırınga ile örneklerden 1 mL numune alınarak, temiz elektrotlu zeta potansiyel küvetine konularak analizatör cihazında analizler yapılmıştır. Deneysel belirsizliklerin standart hatalarını en aza indirmek amacıyla, ölçümler en az iki kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyeli, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda Nano Plus Analizörü, Micro Meritics, ABD cihazı ile ölçülmüştür (Clogston and Patri, 2011).

3.6.4 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopi analizi

FTIR spektroskopisi yüzey kimyasını ve fonksiyonel gruplar arasındaki bağları karakterize etmektedir. Karbonil, hidroksil gibi organik fonksiyonel gruplar nanopartikül yüzeyine bağlanır ve diğer yüzey kimyasal kalıntıları tespit edilir. Kullanılan DES sistemi, ekstrakt ve sentezlenen nanopartiküller bu yöntemle karakterize edilmiştir. Üretim ortamından alınan sıvı haldeki örneklerden FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomalzemeler Laboratuvarında bulunan FTIR spektrometresi (Thermo Scientific marka) kullanılmıştır. Spektrumlar 32 tarama sayısı 1 cm^{-1} çözünürlükte 4000-500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir (Suresh et al., 2016).

3.6.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Elde edilen nanopartiküllerin boyutlarının, şekillerinin ve morfolojik yapılarının nano ölçekte belirlenmesinde SEM analizi oldukça önemlidir. Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDX) spektrumu ise temel olarak biyojenik sentezlenmiş nanopartiküllerin elementel bileşimini ve saflığını tanımlamak için kullanılmaktadır (Khane et al., 2022). Elde edilen nanopartiküllerin SEM/EDX karakterizasyonunda Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan ZEISS marka FESEM-EDX model cihazı ile görüntüleme işlemi yapılmıştır. Uygulama öncesinde kuru toz haldeki nanopartikül örnekleri altın ile kaplanmıştır.

3.6.6 Antibakteriyel aktivite tayini

Elde edilen nanopartiküllere antibakteriyel aktivite testleri üçer tekrarlı olarak uygulanmıştır. Nanopartiküllerin hem üretim sonrası örnek alınan sıvı hallerine hem de liyofilizasyon sonrası toz haline getirilmiş hallerine bu test uygulanmıştır. Toz nanopartiküller 2 mg/mL olacak şekilde suda çözünmüştür. Suda çözme işleminde ultrasonikasyon uygulanmıştır. Antibakteriyel aktivite testinde kullanılan yöntem Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemidir. Burada Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* kullanılırken, Gram negatif bakteri olarak ise *Escherichia coli* bakterisinin yanında laboratuvara sonradan dahil olan *Pseudomonas aeruginosa* suşu da test edilmiştir (Maltaş et al., 2010).

3.6.7 Antifungal aktivite tayini

Nanopartiküllerin *Candida albicans*'a karşı etkinliği agar kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir (EUCAST, 2020). Nanopartiküllerin hem üretim sonrası örnek alınan sıvı hallerine hem de liyofilizasyon sonrası toz haline getirilmiş hallerine bu test uygulanmıştır. Bu kapsamda, besiyerinde son konsantrasyonu 10^5 olarak ayarlanmış *C. albicans* içeren patates dekstroz agar (PDA) (Merck) ortamı petri kaplarına dökülmüş ve kuyucuklar 5 mm çapında içi boş steril bir cam çubuk ile açılmıştır. Kuyucuklara 100 µL örnek eklenmiş ve petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (EUCAST, 2020). Örneklerin *C. albicans*'a karşı inhibisyon zonları, inkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. Antifungal ajan olarak flukonazol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6.8 Antioksidan aktivite tayini

Nanopartiküllere toplam antioksidan aktivite tayini için Bölüm 3.4.4 'te anlatıldığı gibi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi uygulanmıştır.

3.6.9 Antibiyofilm aktivite tayini

Sentezlenen nanopartiküllerin biyofilm inhibisyonunu belirlemek amacıyla kristal viyole boyama prosedürüyle 620 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Bu analiz kapsamında öncelikle *S. aureus* bakterisi 24 saat inkübe edilerek büyütülmüştür. Ardından Mueller Hinton Besi ortamıyla 1/100 oranında seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak yapılan bu analizde kontrol olarak 0,2 mL Mueller Hinton Besi ortamı ve 0,2 mL seyrelmiş bakteri kullanılmıştır. Devamında diğer kuyuculara 10 µL bakteri, 10 µL test edilecek nanopartikül ve 180 µL besi ortamı eklenerek 24 saatlik inkübasyon başlatılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra küvetler 0,2 mL fosfat tamponlu salin (PBS) (Oxoid) (pH:7,2) ile 4 kez yıkanmıştır. Küvetlerde kalan biyofilmler %2'lik sodyum asetat (Carlo Erba) ile karıştırılmış ve %0,1'lik kristal viyole (Sigma) ile boyanmıştır. Ardından fazla boya distile su ile yıkanmış ve kuyucuklar kurumaya bırakılmıştır. Kurumadan sonra 0,2 mL %95'lik etanol (Merck) eklenmiştir ve absorbans ölçümleri yapılmıştır (Erci and Torlak, 2019). Yüzde olarak biyofilm inhibisyonu aşağıda bulunan denklem ile hesaplanmıştır:

$$\%\ \boldsymbol{Biyofilm\ inhibisyonu} = \mathbf{1} - \frac{\boldsymbol{OD620\ (ornek)}}{\boldsymbol{OD620\ (negatif\ kontrol)}} \times \mathbf{100}$$

3.6.10 Fotokatalitik aktivite tayini

Liyofilizasyon sonrası toz haline getirilip 2 mg/mL oranında su ile homojenize hale getirilen nanopartiküllere bu test uygulanmıştır. Nanopartiküllerin UV ilişkili katalitik aktivitelerinin belirlenmesi için sentezlenen nanopartiküller sabit karıştırmada 5 ppm konsantrasyonundaki 100 mL'lik metilen mavisi (Sigma-Aldrich) çözeltisine ilave edilmiştir. Adsorpsiyon-desorpsiyon dengesine ulaşana kadar karanlık koşullar altında 20 dakikalık zaman diliminde boya çözeltisi katalizörle karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra metilen mavisinin UV ilişkili bozunma hızını kontrol etmek için 20 dakikada bir örnek alınarak 663 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Kontrol olarak ise katalizör içermeyen boya

çözeltisi kullanılmıştır. Yüzde olarak boya bozunması aşağıda bulunan denklem ile hesaplanmıştır:

$$\%\ \boldsymbol{Boya\ bozunma} = \frac{(\boldsymbol{A_0} - \boldsymbol{A_t})}{\boldsymbol{A_t}} \times \mathbf{100}$$

A_0 ve A_t sırasıyla metilen mavisi boyasının ilk ve son absorbans değerleridir (Shabaani et al., 2020).

3.7 Gümüş Nanopartikül Katkılı Kompozit Bakteriyel Selüloz Membranı Üretimi ve Uygulamaları

3.7.1 Membran olarak bakteriyel selüloz üretimi

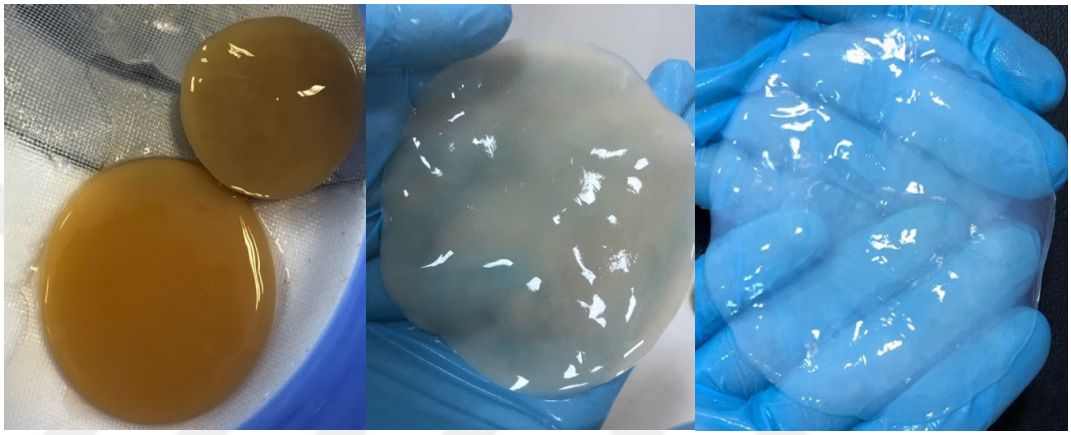
Bakteriyel selüloz üretiminde öncelikle, pH 5,5-6'da 20 g/L glikoz (AFG Sci), 5 g/L pepton (Oxoid), 5 g/L maya özütü (Merck), 1,15 g/L sitrik asit (Merck) ve 2,7 g/L disodyum fosfat (Na_2HPO_4) (Merck) içeren steril Hestrin-Schramm (HS) ortamında *Gluconoacetobacter xylinum* suşu büyütülmüştür. HS agar kültürde büyütülen hücreler HS sıvı ortamına aktarılmıştır. Hücrelerin aktifleşmesi için öncelikle çalkalamalı etüvde 27°C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Hassan et al., 2017).



Şekil 3.14. BS çalkalamalı ve statik üretim görüntüleri.

Aktifleşen hücrelerden BS membranı elde etmek için statik üretim koşullarına geçilmiştir (Şekil 3.14.). Statik üretim koşullarında modifikasyon yapabilmek amacıyla besi ortamına %0,5'lik karboksimetil selüloz (CMC) (Tito) ilavesi yapılmıştır (De Lima Fontes et al, 2018). 25-27°C'de statik koşullarda 20 gün

boyunca inkübasyon işlemi gerçekleşmiştir. BS membranı kültür ortamının hava/sıvı ara yüzeyinde oluşmaktadır. İnkübasyon sonrasında oluşan bu selüloz pelikülleri fermentasyon sıvısının yüzeyinden hasat edilip, su ile yıkandıktan sonra 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH) (Carlo Erba) içerisinde 1 saat boyunca kaynatılarak saflaştırılmıştır. Ardından pH'ın nötrleşmesi için asetik asitle muamele sonrası distile su içerisinde 1 saat boyunca kaynatma işlemi yapılmıştır. Steril olarak saklanabilmesi için 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır (Hirayama marka). Böylece BS saf bir şekilde elde edilmiştir (Hassan et al., 2017) (Şekil 3.15.).

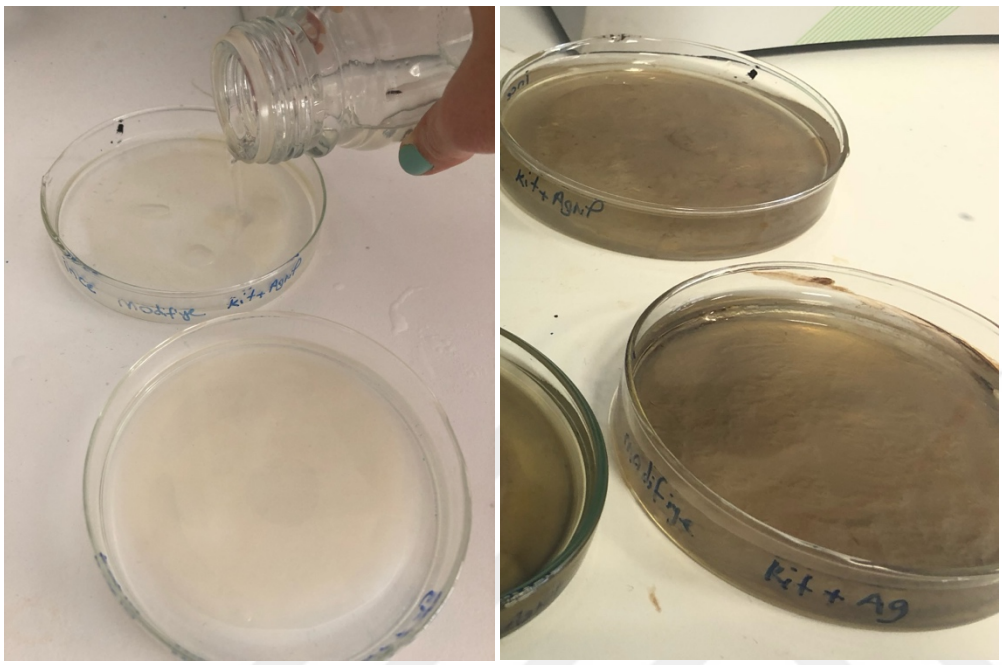


Şekil 3.15. BS membranı saflaştırma aşaması.

3.7.2 Gümüş nanopartikül katkılı kompozit bakteriyel selüloz üretimi

Karboksimetil selüloz içeren ortamda üretilip saflaştırılan BS membranı kompozit hale getirilebilmek amacıyla öncelikle çapraz bağlayıcı olan %5'lik glutaraldehit (Sigma-Aldrich) çözeltisinde 1 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından %1'lik asetik asit çözeltisinde çözünmüş %1'lik kitosan (Sigma-Aldrich, medium molecular weight) çözeltisine daldırılmıştır. Geleneksel olarak, glutaraldehit, adsorpsiyon kapasitesini en üst düzeye çıkarmanın ve yüzey alanı oranını değiştirmenin yanı sıra membranların kimyasal ve mekanik direncini artırmak amacıyla kitosanın çapraz bağlayıcısı olarak kullanılmıştır (Urbina et al., 2018; Li et al., 2017). 24 saatlik inkübasyon sonrasında kitosan çözeltisinden alınan selüloz membranı yıkanarak fazla kitosan uzaklaştırılmıştır. Bir önceki basamakta yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerden yapılan karakterizasyonlar sonucunda boyut olarak daha kararlı olan ve biyolojik aktivitesi daha yüksek olan Ag-NP seçilmiştir. Ag-NP, kompozit BS membranı ile bir araya getirilerek yapılan filtrasyon çalışmalarında bu nanopartikülün membran kirlenmesini engellemesi ve antibakteriyel aktivite oluşturarak membranın daha kararlı yapıda olmasını

sağlamak hedeflenmiştir. Bu amaçla kitosanla daha katı yapıya sahip olan BS membranı son aşama olarak Ag-NP çözeltisinde 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.16.). Ardından fazla Ag-NP çözeltisi yıkanarak yapıdan uzaklaştırılmış; karakterizasyon ve filtrasyon denemelerine geçilmiştir.



Şekil 3.16. BS modifikasyon basamakları.

3.7.3 Kompozit bakteriyel selüloz membranının karakterizasyonu

3.7.3.1 SEM analizi

Elde edilen kompozit BS membranı ve kontrol olarak modifiye edilmemiş BS membranı morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan ZEISS marka FESEM model cihazı ile görüntüleme işlemi yapılmıştır. Bu aşamada membranlar iyi görüntüleme alınması amacıyla liyofilizatör cihazı ile kurutulmuştur.

3.7.3.2 FTIR analizi

Fonksiyonel grupların belirlenebilmesi amacıyla oda sıcaklığında kurutulmuş kompozit BS membranı ve kontrol BS membranının FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomalzemeler Laboratuvarında bulunan FTIR (Thermo Scientific marka)

spektrometresi kullanılmıştır. Spektrumlar 32 tarama sayısı 1 cm^{-1} çözünürlükte 4000-500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.

3.7.3.3 Su tutma kapasitesinin ve porozitenin ölçümü

BS membranlarının su tutma/şişme kapasitesi çalışması için kuru haldeki membranlar öncelikle 24 saatlik zaman diliminde deiyonize suya daldırılmıştır. Farklı zaman aralıklarında numuneler sudan çıkarılmış, serbest suyun uzaklaştırılması için filtre kağıdı ile silinmiş ve ardından tartılmıştır. Su tutma kapasitesi aşağıda bulunan denklem ile hesaplanmıştır (Urbina et al., 2018):

$$Su\ tutma\ kapasitesi\ (\%) = \frac{Wıslak - Wkuru}{Wkuru} \times 100$$

BS membranlarının gözenekliliğinin hesaplanması, $W_{ıslak}$ ve W_{kuru} sırasıyla ıslak ve kuru membranların ağırlığı, d suyun yoğunluğu (1 g/cm^3), D kalınlık (cm) ve A membranın alanı (cm^2) olmak üzere aşağıdaki denklem uyarınca gerçekleştirilmiştir (Galdino et al., 2020).

$$Porozite = \frac{Wıslak - Wkuru}{d \times A \times D} \times 100\%$$

3.7.4 Kompozit bakteriyel selüloz membranının filtrasyon testleri

3.7.4.1 *Escherichia coli* filtrasyon testi

Öncelikle *Escherichia coli* bakterisi Nutrient Broth besi ortamında 37 °C sıcaklıkta 24 saat 120 rpm'de çalkalamalı şekilde inkübe edilerek büyütülmüştür. Ardından spektrofotometre 660 nm dalga boyunda 0.6 optik yoğunluk (OD) değerine denk gelecek şekilde seyreltmeler yapılarak bakteri miktarı 10^8 cfu/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. Bu konsantrasyonda *E. coli* içeren 20 mL'lik çözelti vakum altındaki filtrasyon modülünde filtrasyon membranı olarak kullanılan kompozit membrandan geçirilmiştir. Ardından filtrat sıvısının OD değeri ölçülerek başlangıç OD değeriyle kıyaslanmıştır. Aynı işlemler modifiye edilmemiş BS için de yapılmıştır (Alves et al., 2020).

3.7.4.2 Zeytin karasuyu filtrasyon testi

Zeytin karasuyunun görünür UV absorbansı, polifenol bileşiklerine özgü pik olarak 280 nm dalga boyunda varlığını göstermektedir (Elayadi et al., 2019). Bu nedenle filtrasyon modülünde besleme olarak kullanılan ve seyreltilen zeytin karasuyu örneğinin 280 nm'deki absorbans değeri ölçülmüştür. Hem saf selüloz hem de kompozit bakteriyel selüloz ile vakum altındaki filtrasyon modülünde 20 mL'lik zeytin karasuyu çözeltisinin filtrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından filtrat sıvısının bu dalga boyundaki OD değeri ölçülmüştür. Her iki membranda da OD bazlı zeytin karasuyu filtrasyon giderimi yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.7.4.3 Dikey akışlı filtrasyon testi

Membranların hidrolik su geçirgenlik değerlerinin tespit edilmesi için filtrasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Membranlar karıştırmalı dikey akış filtrasyon modüllerine yerleştirilmiştir. Düşük basınçtan yüksek basınca doğru sabit basınçta su geçiş deneyleri yapılmış ve filtrat ağırlık değişimleri zamana göre bilgisayara bağlı teraziler yardımıyla ölçülmüştür. Akı değerlerinin zamana karşı grafikleri çizilmiştir. Filtrasyon verileri akı (Jv, L/m^2.saat) değerini hesaplamak için kullanılmıştır. Her bir basınç değerinde elde edilen doğruların eğimlerinin (Vp, mL/sn) membran yüzey alanına (A, 3.46 cm^2) oranlanarak aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$Jv = \frac{Vp}{A}$$

Hidrolik geçirgenlik değeri (Lp, L/m^2.saat.bar) hesaplanan akı değerlerinin transmembran basınca karşı çizdirilmesiyle oluşan doğrunun eğimi ile aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilmiştir.

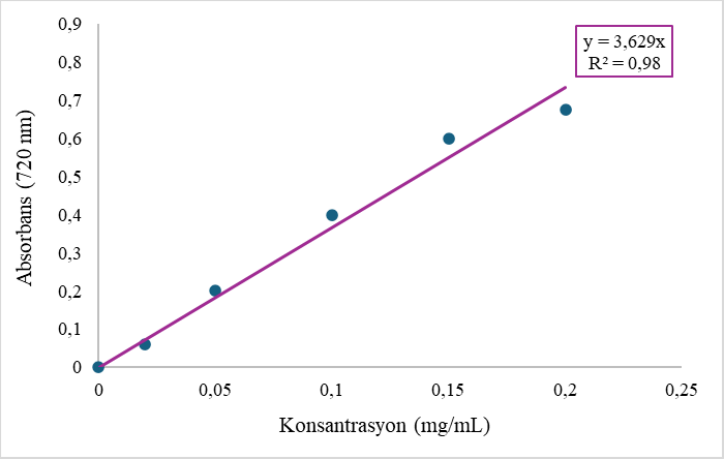
$$Lp = \frac{Jv}{\Delta P}$$

Grafikteki eğim değerleri doğrudan membranlar için hidrolik geçirgenlik değerlerine karşılık gelmektedir (Wang et al., 2023; Wanichapichart et al., 2002; Ashrafi et al, 2019; Isik et al., 2018).

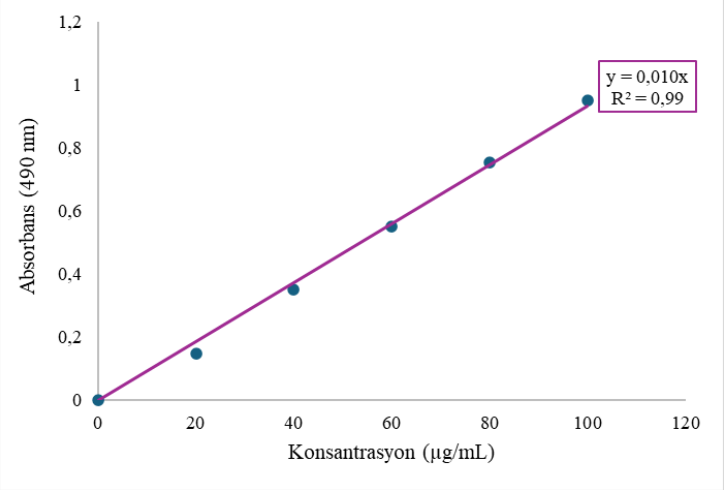
4. BULGULAR

4.1 Ekstraksiyonlar ve Ekstrakt Analizleri

Deniz çayırı atıklarının beş farklı DES sistemi ile ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstraktlara spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde analizi, Dubois yöntemiyle de toplam şeker tayini uygulanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı analizinde standart olarak gallik asit kullanılmış ve sonuçlar gallik asit eşdeğerliği (GAE) olarak hesaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltilerinin okunan absorbans değerleriyle gallik asit standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.1.). Toplam şeker tayininde ise standart çözelti olarak glikoz çözeltisi kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glikoz çözeltilerinin absorbans değerleriyle glikoz standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit standart eğrisi.



Şekil 4.2. Dubois yöntemine göre glikoz standart eğrisi.

Deniz çayırı atıklarıyla yapılan ekstraksiyonlarda kullanılan DES sistemleri aşağıda belirtilmiştir:

- ChCl:Üre (1:1)
- ChCl:Üre (1:2)
- L-mentol:Asetik asit (1:1)
- ChCl:Gliserol (1:2)
- ChCl:Asetik asit (1:2)

Deneme deseninin oluşturulmasında Design Expert programı yanıt yüzey yöntemi (RSM) merkezi tümleşik (CCD) deneme deseninden yararlanılmıştır. Ekstraksiyonda su varlığı, süre, sıcaklık ve sıvı/katı oranı olarak dört adet numerik faktör; toplam fenol ve toplam şeker miktarı olarak ise iki adet yanıt bulunmaktadır. Üçer tekrarlı yapılan analiz sonuçlarının ortalama değerleri programa girilerek modelin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı, ANOVA-varyans analizi testi, en iyi koşulların belirlenmesi gibi aşamalar test edilerek parametrelerin etkisi belirlenmiştir. Design Expert programından elde edilen çıktılar aşağıda basamak basamak verilmiştir. Her sistem için programda iki yanıt da ayrı ayrı analiz edilerek deneme modelleri oluşturulmuştur. En iyi şartların belirlenmesi için elde edilen sonuçlara göre ChCl:Üre (1:2) sistemi ile ekstraksiyon işleminin devam edilmesine karar verilmiştir. Bu nedenle sadece bu DES sistemine ait Design Expert program çıktıları sunulmuş olup, diğer DES sistemlerinin çıktıları EKLER bölümünde verilmiştir.

4.2 ChCl:Üre (1:2) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları

ChCl:Üre (1:2) DES sisteminin kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında Run'lara göre toplam fenolik (mg GAE/mL) ve toplam şeker miktarı (µg/mL) sonuçlarının ortalama değerleri Şekil 4.3.'te verilmiştir. Burada en dikkat çeken ayrıntı su miktarının %0 olduğu koşulda fenolik maddenin elde edilemediği durumudur. Bu sonuçlara göre yapılan parametre değerlendirmeleri ve ANOVA testi ilerleyen aşamalarda program çıktılarıyla belirtilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg/mL	Response 2 Toplam şeker ug/mL
13	1	17,5	60	82,5	45	0,150173	64,5611
21	2	35	80	30	40	0,0668961	44,6271
17	3	0	80	65	40	0	19,9406
9	4	17,5	60	47,5	45	0,0880216	36,1452
14	5	52,5	60	82,5	45	0,0519464	73,1089
4	6	52,5	100	47,5	35	0,073023	61,2937
2	7	52,5	60	47,5	35	0,0610632	55,0231
15	8	17,5	100	82,5	45	0,0834142	50,8977
11	9	17,5	100	47,5	45	0,0964523	45,0231
5	10	17,5	60	82,5	35	0,106647	62,5809
16	11	52,5	100	82,5	45	0,076258	76,9043
10	12	52,5	60	47,5	45	0,0495937	49,7426
7	13	17,5	100	82,5	35	0,0741993	65,3201
28	14	35	80	65	40	0,0779735	59,2475
27	15	35	80	65	40	0,0657197	50,8317
25	16	35	80	65	40	0,0639551	48,2904
18	17	70	80	65	40	0,025037	53,2079
6	18	52,5	60	82,5	35	0,0652786	82,0528
19	19	35	40	65	40	0,076405	52,1848
1	20	17,5	60	47,5	35	0,101746	121,162
23	21	35	80	65	30	0,0526816	60,8317
24	22	35	80	65	50	0,050623	37,5314
3	23	17,5	100	47,5	35	0,0775324	49,5446
29	24	35	80	65	40	0,0534659	49,1485
26	25	35	80	65	40	0,0330755	45,2871
22	26	35	80	100	40	0,0683665	87,1353
8	27	52,5	100	82,5	35	0,0727289	98,2574
30	28	35	80	65	40	0,0640532	61,7558
20	29	35	120	65	40	0,0797381	57,5644
12	30	52,5	100	47,5	45	0,0522405	52,2508

Şekil 4.3. Design Expert programında ChCl:Üre (1:2) sisteminin sonuç çıktısı.

Programda toplam fenolik madde miktarı ve toplam şeker miktarı olarak iki yanıt da ayrı ayrı analiz edilerek deneme modelleri oluşturulmuştur.

4.2.1 ChCl:Üre (1:2) sisteminin toplam fenolik madde analizi

ChCl:Üre (1:2) DES sistemindeki ekstraktta toplam fenolik madde miktarı için yapılan tasarımda model “Quadratic” veya “2FI” (two factor interactions=iki faktörlü etkileşim) olarak önerilmiştir. p-value değeri burada 0,1261’dir. (Tablo 4.1.). “Quadratic” model; etkisi incelenen faktörler ve yanıtlar arasında ikinci dereceden bir ilişki olduğunu ifade etmektedir. Faktörlerin ana etkilerinin yanında kendilerinin ikinci dereceden etkileri ve tüm faktörlerin birbirleriyle etkileşimleri de bu modelde önemlidir. “2FI” model ise faktörlerin kendilerinin yanında diğer faktör etkileşimlerini de içermektedir. Model daha kapsamlı “Quadratic” olarak devam edilmiştir.

Tablo 4.1. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	0,1412	1	0,1412			
Linear vs Mean	0,0026	4	0,0006	0,8901	0,4843	
2FI vs Linear	0,0029	6	0,0005	0,5920	0,7328	
Quadratic vs 2FI	0,0056	4	0,0014	2,14	0,1261	Önerilen
Cubic vs Quadratic	0,0040	8	0,0005	0,6090	0,7493	
Residual	0,0057	7	0,0008			
Total	0,1620	30	0,0054			

Programda belirlenen modelde uygulanan ANOVA testine göre parametrelerden % su miktarı (p-value: 0,0904) ve sıcaklığın (p-value: 0,5118) etkisinin diğer faktörlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak buna göre model değeri de "lack of fit" değeri (uyum eksikliği değeri) de "not significant" (anlamlı değil) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2.).

Bu nedenle model prosesinde değişiklikler yapılmış ve bunun sonucunda model daha basit olan "Mean" olarak ortalama model kabul edilmiştir. Parametrelerdeki değişikliğin sonucu etkilemediğine, bu faktör etkilerinin anlamlı olmadığına karar verilmiştir.

Tablo 4.2. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0110	14	0,0008	1,21	0,3583	not significant
A-Su	0,0021	1	0,0021	3,28	0,0904	
B-Süre	0,0002	1	0,0002	0,2462	0,6270	
C-Sıcaklık	0,0003	1	0,0003	0,4516	0,5118	
D-Sıvı/Katı	5,766E-06	1	5,766E-06	0,0089	0,9262	
AB	0,0016	1	0,0016	2,50	0,1343	
AC	0,0000	1	0,0000	0,0400	0,8442	

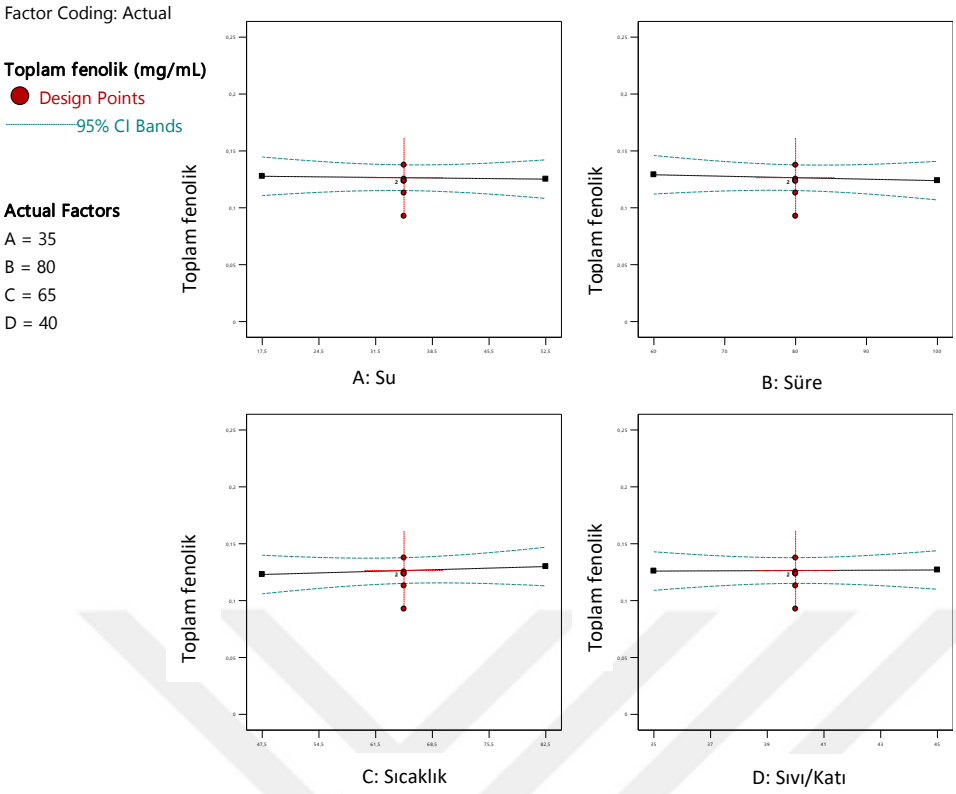
Tablo 4.2 (devam)

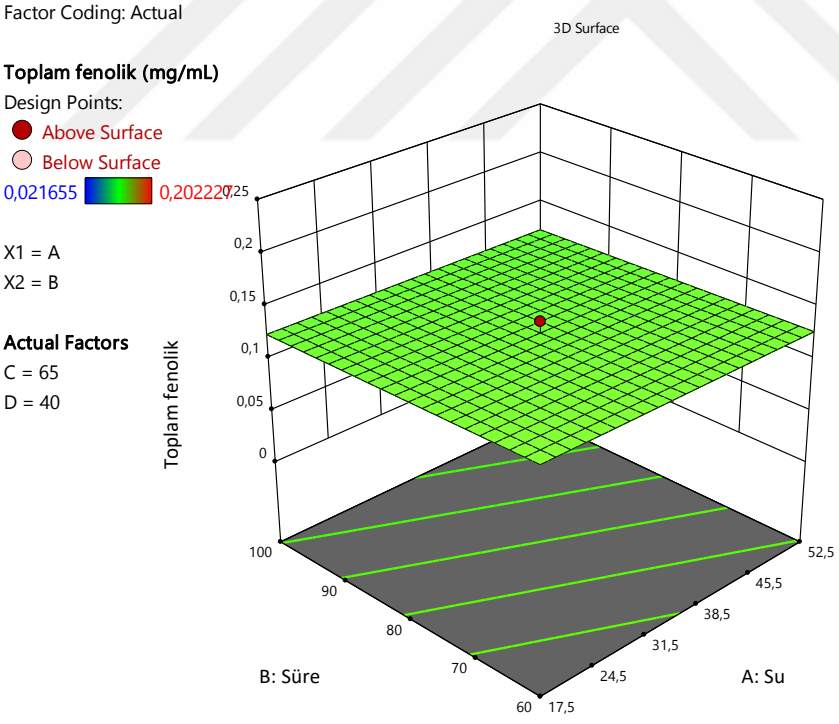
AD	0,0006	1	0,0006	0,9619	0,3423	
BC	0,0003	1	0,0003	0,4225	0,5255	
BD	2,162E-06	1	2,162E-06	0,0033	0,9548	
CD	0,0003	1	0,0003	0,4713	0,5028	
A^2	0,0014	1	0,0014	2,19	0,1594	
B^2	0,0023	1	0,0023	3,56	0,0787	
C^2	0,0012	1	0,0012	1,82	0,1968	
D^2	0,0002	1	0,0002	0,2807	0,6040	
Residual	0,0097	15	0,0006			
Lack of Fit	0,0086	10	0,0009	3,72	0,0800	not significant
Pure Error	0,0012	5	0,0002			
Cor Total	0,0208	29				

"Mean" olarak gerçekleştirilen prosese göre uyum eksikliği değeri "anlamlı değil" olarak, p-value değeri 0,0821 olarak verilmiştir (Tablo 4.3.). Buna göre %su ve süre parametrelerinin yanıt üzerine etkisi grafikten de anlaşılacağı üzere artan veya azalan bir trendde değildir (Şekil 4.4.).

Tablo 4.3. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi çıktısı-revize.

Source	**Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F-value**	**p-value**	
Model	0,0000	0				
Residual	0,0208	29	0,0007			
Lack of Fit	0,0196	24	0,0008	3,53	0,0821	not significant
Pure Error	0,0012	5	0,0002			
Cor Total	0,0208	29				





Şekil 4.4. ChCl:Üre (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafiği çıktısı.

4.2.2 ChCl:Üre (1:2) sisteminin toplam şeker analizi

ChCl:Üre (1:2) sistemiyle yapılan ekstraksiyon sonrası üçer tekrarlı olan toplam şeker miktarı ortalama sonuçları programa girildiğinde toplam şeker miktarı için yapılan tasarımda önerilen modellerden biri "Lineer"dir (p-value: 0,0334) (Tablo 4.4.). Bu modelde faktörlerin ana etkileri doğrusal olarak ön plandadır.

Tablo 4.4. ChCl:Üre (1:2)-Toplam şeker miktarı yanıt model özellikleri çıktısı.

Source	Sum of	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	1,046E+05	1	1,046E+05			
Linear vs Mean	3683,89	4	920,97	3,10	0,0334	Öneri len
2FI vs Linear	2394,84	6	399,14	1,51	0,2290	
Quadratic vs 2FI	1221,43	4	305,36	1,20	0,3503	
Cubic vs Quadratic	2118,96	8	264,87	1,10	0,4579	
Residual	1690,16	7	241,45			
Total	1,157E+05	30	3857,02			

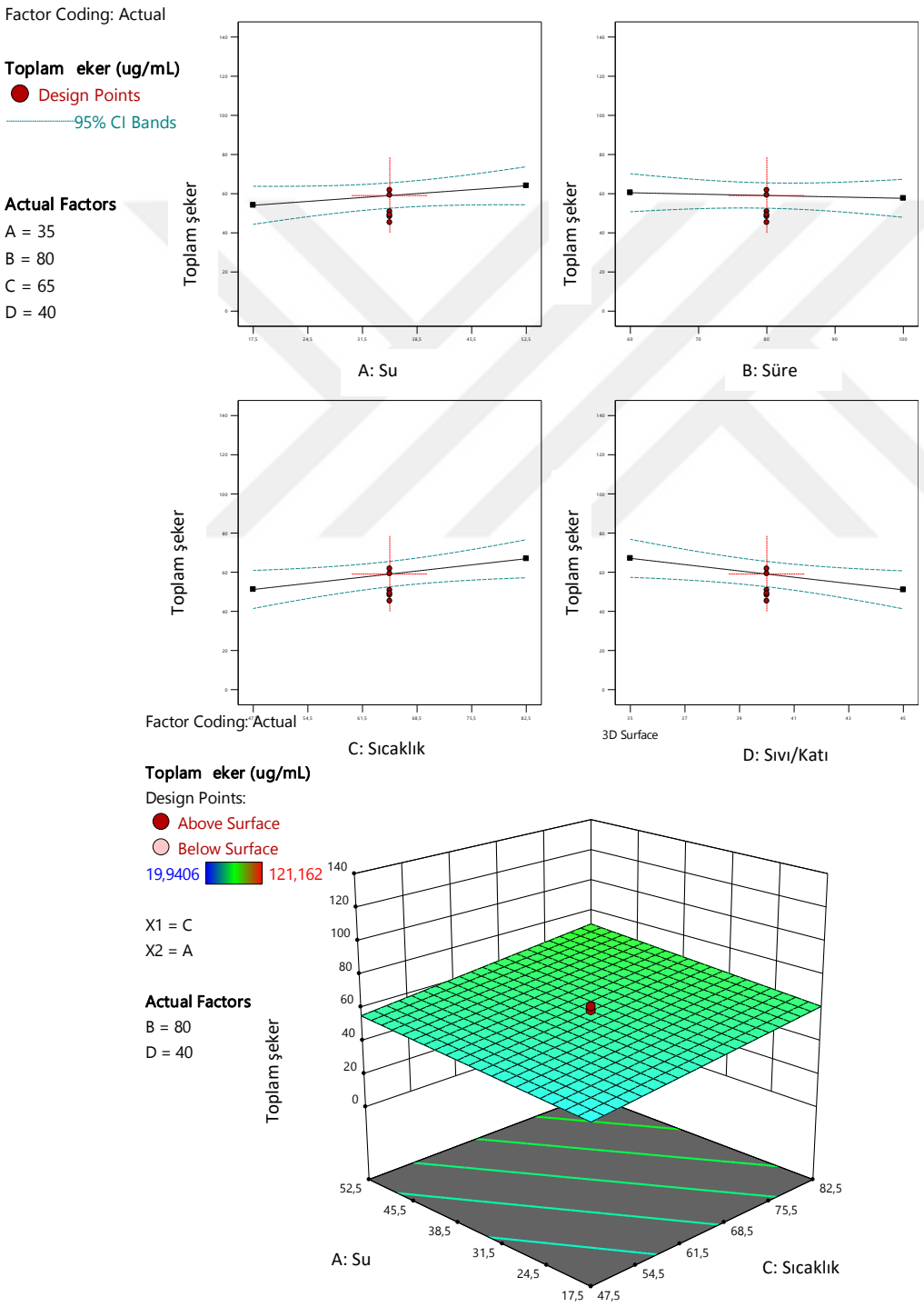
Tasarımda "Lineer" olarak önerilen model seçilmiştir. Buna göre varyans analizinde model değeri de uyum eksikliği değeri de "anlamlı" olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5.). En etkili faktörlerin p-value değerleri sıvı/katı oranı için 0,0308, sıcaklık için 0,0348, su için ise 0,1678'dir. Süre parametresinin etkisinin en az olduğu ve diğer tüm faktörlerin yanıtı lineer olarak etkilediği Şekil 4.5.'teki grafiklerinden de anlaşılmaktadır.

Tablo 4.5. ChCl:Üre (1:2)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3683,89	4	920,97	3,10	0,0334	significant
A-Su	599,34	1	599,34	2,02	0,1678	
B-Süre	48,52	1	48,52	0,1634	0,6895	
C-Sıcaklık	1480,74	1	1480,74	4,99	0,0348	
D-Sıvı/Katı	1555,28	1	1555,28	5,24	0,0308	

Tablo 4.5 (devam)

Residual	**7425,39**	**25**	**297,02**			
Lack of Fit	7210,46	20	360,52	8,39	0,0134	significant
Pure Error	214,93	5	42,99			
Cor Total	11109,27	29				



Şekil 4.5. ChCl:Üre (1:2)-Toplam şeker yanıtı faktörlerin etki grafikleri çıktısı.

4.3 Ekstraksiyon Sistemlerinin Çalışma Şartlarının Belirlenmesi

İlerleyen aşamalarda çalışmayı tek bir DES sistemine indirgeyebilmek için Design Expert programında her bir DES sisteminin sonucuna göre çalışma şartları belirlenmiştir. Buna göre sınırlandırılmış değerlerle belirlenen hedeflere yönelik validasyon amacıyla yeni deneyler planlanmıştır.

4.3.1 ChCl:Üre (1:1) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Tablo 4.6. ChCl:Üre (1:1) sisteminin çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek sınır	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A-Su	in range	17,5	52,5	1	1	3
B-Süre	in range	60	100	1	1	3
C-Sıcaklık	in range	47,5	82,5	1	1	3
D-Sıvı/Katı	in range	35	45	1	1	3
Toplam fenolik	in range	0	0,200071	1	1	3
Toplam Şeker	maksimum	9,67657	115,799	1	1	3

Su	Süre	Sıcaklık	Sıvı/Katı	Toplam fenolik	Toplam Şeker	Desirability
52,500	100,000	82,500	35,000	0,080	108,722	0,933
52,498	99,835	82,492	35,000	0,080	108,626	0,932
52,500	99,262	82,500	35,000	0,080	108,348	0,930
52,500	99,005	82,500	35,000	0,080	108,218	0,929
52,500	100,000	82,378	35,064	0,080	108,216	0,929

Bu DES sistemindeki çalışma şartlarının belirlenmesi işleminde tüm parametreler “in range”de, şeker yanıtı ise “maksimum”da bırakıldığında toplam 100 çözüm bulunmuştur. Tablo 4.6.’da ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. “Desirability” değeri ise yanıtların hedef değerlere ne kadar yakın olduğunu belirtmektedir, bu değerin 1’e oldukça yakın olması istenmektedir. Buna göre yukarıdaki gibi % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı

oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen toplam fenolik miktarı 0,080 mg GAE/mL iken, toplam şeker miktarı 108,722 µg/mL olarak program tarafından belirlenmiştir.

4.3.2 ChCl:Üre (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Tablo 4.7. ChCl:Üre (1:2) sisteminin çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük sınır	En yüksek sınır	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A-Su	in range	17,5	52,5	1	1	3
B-Süre	in range	60	100	1	1	3
C-Sıcaklık	in range	47,5	82,5	1	1	3
D-Sıvı/Katı	in range	35	45	1	1	3
Toplam fenolik	in range	0	0,150173	1	1	3
Toplam Şeker	in range	19,9406	121,162	1	1	3

Su	Süre	Sıcaklık	Sıvı/Katı	Toplam fenolik	Toplam Şeker	Desirability
52,500	60,000	82,500	35,000	0,069	81,372	1,000
25,268	95,762	77,262	38,386	0,069	63,251	1,000
17,500	60,000	82,500	35,000	0,069	71,378	1,000
35,000	80,000	65,000	40,000	0,069	59,048	1,000
17,500	100,000	47,500	35,000	0,069	52,825	1,000

Bu DES sistemindeki çalışma şartlarının belirlenmesi işleminde tüm parametreler ve yanıtlar “in range”de, bırakıldığında toplam 100 çözüm bulunmuştur. Tablo 4.7.’de ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Buna göre yukarıdaki gibi en yüksek şeker miktarı için % su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen toplam fenolik miktarı 0,069 mg GAE/mL iken, toplam şeker miktarı 81,372 µg/mL olarak program tarafından belirlenmiştir. Buradaki “Desirability” değeri 1 olarak verilmiştir.

4.3.3 L-Mentol:Asetik Asit (1:1) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Tablo 4.8. L-Mentol:Asetik Asit (1:1) sisteminin çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A-Su	in range	17,5	52,5	1	1	3
B-Süre	in range	60	100	1	1	3
C-Sıcaklık	in range	47,5	82,5	1	1	3
D-Sıvı/Katı	in range	35	45	1	1	3
Toplam fenolik	none	0	0,118068	1	1	3
Toplam Şeker	maximize	1,42574	167,564	1	1	3

Su	Süre	Sıcaklık	Sıvı/Katı	Toplam fenolik	Toplam Şeker	Desirability
52,500	100,000	82,500	35,000	0,036	333,153	1,000
35,000	80,000	65,000	40,000	0,030	207,180	1,000
52,500	100,000	47,500	45,000	0,014	174,033	1,000
23,309	72,030	77,192	42,682	0,025	214,463	1,000
17,500	60,000	82,500	45,000	0,017	206,176	1,000

Bu DES sistemindeki çalışma şartlarının belirlenmesi işleminde tüm parametreler “in range”de, fenolik “none” olarak şeker yanıtı ise “maksimum”da bırakıldığında toplam 100 çözüm bulunmuştur. Tablo 4.8.’de ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Bu kısıtlamalar belirlenirken, “Desirability” değerinin 1 olması hedeflenmiştir. Buna göre en yüksek şeker miktarı için yukarıdaki gibi % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen toplam fenolik miktarı 0,036 mg GAE/mL iken, toplam şeker miktarı 333,153 µg/mL olarak program tarafından belirlenmiştir.

4.3.4 ChCl:Gliserol (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Tablo 4.9. ChCl:Gliserol (1:2) sisteminin çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A-Su	in range	17,5	52,5	1	1	3
B-Süre	in range	60	100	1	1	3
C-Sıcaklık	in range	47,5	82,5	1	1	3
D-Sıvı/Katı	in range	35	45	1	1	3
Toplam fenolik	in range	0	0,118068	1	1	3
Toplam Şeker	in range	1,42574	167,564	1	1	3

Su	Süre	Sıcaklık	Sıvı/Katı	Toplam fenolik	Toplam Şeker	Desirability
52,500	60,000	82,500	35,000	0,079	115,873	1,000
52,500	100,000	82,500	45,000	0,061	91,484	1,000
35,000	80,000	65,000	40,000	0,070	72,430	1,000
17,500	60,000	47,500	35,000	0,034	53,376	1,000
17,500	60,000	82,500	35,000	0,074	89,309	1,000

Bu DES sistemindeki çalışma şartlarının belirlenmesi işleminde tüm parametreler ve yanıtlar “in range”de, bırakıldığında toplam 100 çözüm bulunmuştur. Tablo 4.9.’da ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Buna göre yukarıdaki gibi en yüksek şeker miktarı için % su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen toplam fenolik miktarı 0,079 mg GAE/mL iken, toplam şeker miktarı 115,873 µg/mL olarak program tarafından belirlenmiştir. Buradaki “Desirability” değeri 1 olarak verilmiştir.

4.3.5 ChCl:Asetik Asit (1:2) DES sisteminin çalışma şartlarının belirlenmesi

Tablo 4.10. ChCl:Asetik asit (1:2) sisteminin çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A-Su	in range	17,5	52,5	1	1	3
B-Süre	in range	60	100	1	1	3
C-Sıcaklık	in range	47,5	82,5	1	1	3
D-Sıvı/Katı	in range	35	45	1	1	3
Toplam fenolik	none	0	0,217324	1	1	3
Toplam Şeker	maximize	85,9802	295,98	1	1	3

Su	Süre	Sıcaklık	Sıvı/Katı	Toplam fenolik	Toplam Şeker	Desirability
52,500	100,000	82,500	35,000	0,030	247,568	0,769
51,411	100,000	82,500	35,053	0,029	247,363	0,768
51,091	99,739	82,500	35,000	0,028	247,326	0,768
52,500	98,775	82,500	35,009	0,029	247,191	0,768
49,742	100,000	82,450	35,000	0,027	247,072	0,767

Bu DES sistemindeki çalışma şartlarının belirlenmesi işleminde tüm parametreler “in range”de, fenolik “none” olarak şeker yanıtı ise “maksimum”da bırakıldığında toplam 100 çözüm bulunmuştur. Bu şekilde “Desirability” değeri 0,769’a çıkarılmıştır. Tablo 4.10.’da ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Buna göre en yüksek şeker miktarı için yukarıdaki gibi % su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen toplam fenolik miktarı 0,030 mg GAE/mL iken, toplam şeker miktarı 247,568 µg/mL olarak program tarafından belirlenmiştir.

Buraya kadar yapılan deneme ve analizlerle atık deniz çayırının birçok avantaja sahip yenilikçi DES sistemleriyle tarama ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu

taramalarla uygulanabilir koşullarda, en fazla ekstrakt içeriğinin elde edilmesi amacıyla çalışılabilecek en iyi sistem araştırılmıştır.

Özetle DES sistemlerinin seçimi çalışmalarında:

ChCl:Üre (1:1)'de %su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Üre (1:2)'de %su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

L-mentol:Asetik asit (1:1)'de %su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Gliserol (1:2)'de %su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g;

ChCl:Asetik asit (1:2)'de %su miktarı:52,5, süre:100 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olacak şekilde yeni deneyler yapılmıştır.

Ekstraksiyon koşulları olarak beş DES sistemindeki tek farklı değere sahip faktör süre olmuştur. Deniz bitkisinin hücre duvarı düşünüldüğünde ekstraksiyon sıcaklığının yüksek olması olağandır. DES sistemine su eklenerek ekstraksiyon işleminin yapılması ise viskozitesinin azalarak daha etkili bir kütle transferi beklenmektedir. Sonuç olarak bu DES'lerden elde edilen ekstraktlara toplam fenolik madde, toplam şeker tayinleri ile antibakteriyel ve antioksidan aktivite testleri üçer tekrarlı olarak uygulanmıştır. Ayrıca klasik yöntem olarak distile su ile aynı solvent çalışma hacminde 60 ve 100'er dakika olarak ekstraksiyon yapılmış, toplam fenolik madde, toplam şeker tayinleri ile antibakteriyel ve antioksidan aktivite testleri bu ekstraktlara da uygulanmıştır.

4.4 Ekstraktların Analizleri

4.4.1 Toplam şeker, toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktivite

Program tarafından verilen parametre değerlerine göre yeni deneyler yapılarak validasyonu tamamlanan ekstraktlara uygulanan toplam şeker, toplam fenolik madde miktarı ve %inhibisyon cinsinden antioksidan aktiviteleri Tablo 4.11.'de verilmiştir. Sonuçlara detaylıca bakıldığında ilk gözlemlenen durum şu şekildedir: ChCl:Asetik asit (1:2) sisteminde toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite tespit edilememiştir. Ancak toplam şeker miktarı ise 278,752 µg/mL olarak bu sistemde en fazladır. Su ekstraktlarından sonra en yüksek toplam fenolik madde

miktarı her iki ChCl:Üre sistemlerinde elde edilmiştir. Bu sistemlerdeki antioksidan aktiviteler ise 100 dk ekstraksiyon süresi ile elde edilmiş su ekstraktındakine benzer miktarlardadır. Bunun dışında L-mentol-asetik asit (1:1) sisteminde yapılan ekstraksiyonda su fazında yüksek miktarda şeker ve antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Ancak mentolün olumsuz çalışma şartları da göz önünde bulundurulmalıdır. ChCl:Gliserol (1:2) sisteminde toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite ChCl:Üre ve mentol-asetik asit ekstraktlarına göre daha düşük değerde kalmıştır.

Tablo 4.11. Denemelerin analiz sonuçları.

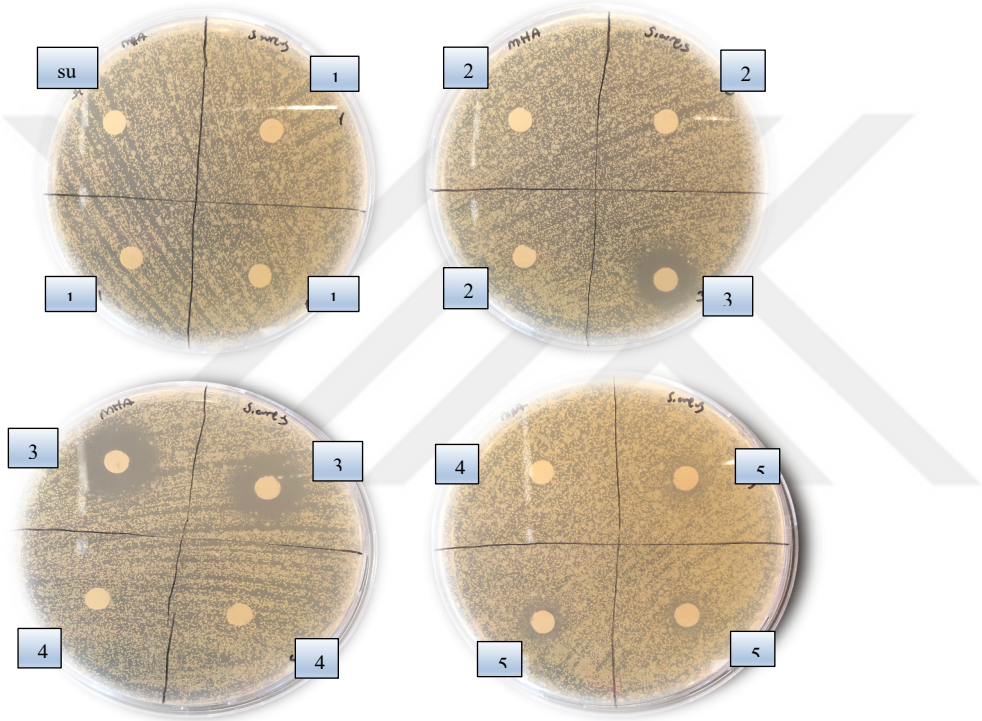
Ekstraksiyonda kullanılan DES sistemine göre ekstraktlar	Toplam Şeker (µg/mL)	Toplam Fenolik (mg GAE/mL)	Antioksidan (%inhibisyon)
ChCl:Üre (1:1) ekstraktı	64,611	57,926	53,275
ChCl:Üre (1:2) ekstraktı	75,584	50,280	55,162
L-Mentol:Asetik Asit (1:1) ekstraktı	109,908	35,281	64,900
ChCl:Gliserol (1:2) ekstraktı	92,416	27,145	47,100
ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktı	278,752	0	0
Su ekstraktı-60 dk	201,261	79,787	7,641
Su ekstraktı-100 dk	222,878	94,492	51,827

4.4.2 Antibakteriyel aktivite

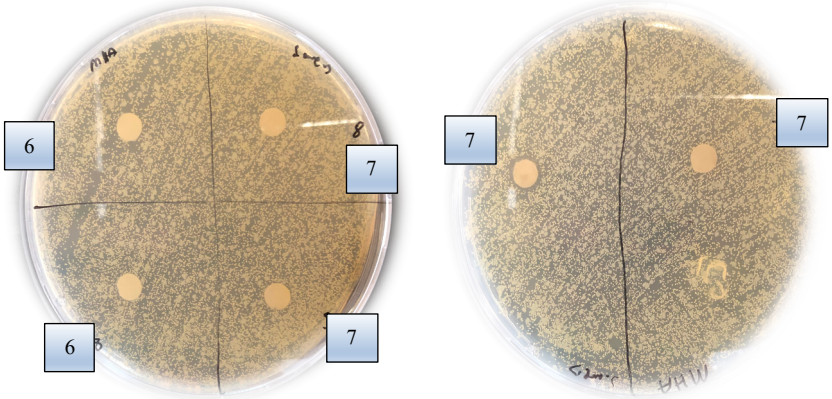
Elde edilen antibakteriyel sonuç görselleri olarak Şekil 4.5., 4.6. ve 4.7. *S. aureus* bakterisindeki; Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10. ise *E. coli* bakterisindeki aktiviteleri göstermektedir. Sonuçlar üç tekrarlıdır. Tablo 4.12.'de ise Image-J programıyla ölçülüp ortalaması alınan inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden yer almaktadır. DES ve su ile elde edilen ekstraktlar dışında kontrol olarak DES sistemlerinin kendilerine, suya ve pozitif kontrol olarak Gentamisin antibiyotiğine de antibakteriyel analiz uygulanmıştır. Bu sonuçlardaki belirgin zon çapları kontrollerle birlikte değerlendirilmiştir. Ancak kontrol DES'lerde de zon çapları elde edilen örneklerde ekstrakttan kaynaklanan anlamlı bir antibakteriyel aktivite sonucu tespit edilememiştir.

S. aureus bakterisindeki aktivitelere bakıldığında Şekil 4.5.'te 1 no'lu örnekler ChCl:Üre (1:1) ekstraktını gösterirken, 2 no'lu örnekler ChCl:Üre (1:2) ekstraktını göstermektedir. Bu iki ekstraktta zon elde edilememiştir. 3 no'lu örnek

L-mentol:asetik asit (1:1) ekstraktının aktivitesini göstermektedir. Ortalama zon çapı 16,383 mm'dir. 4 no'lu örnekler ChCl:Gliserol (1:2) ekstraktının aktivitesini gösterirken, 5 no'lu örnekler ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktınınkini belirtmektedir. 4 no'lu örnekte herhangi bir zon ölçülmemişken, 5 no'lu örnekte ortalama olarak 10,064 mm zon çapı ölçülmüştür. Bu şekilde su olarak belirtilen örnek ise su kontrolünün bir paralelidir ve inhibisyon çapı gözlemlenmemiştir. Şekil 4.6.'da yer alan 6 ve 7 numaralı örnekler su ekstraktlarını göstermektedir. Bu örneklerde de *S. aureus* bakterisine karşı bir antibakteriyel aktivite saptanmamıştır. Özetle aktivite sadece L-mentol:asetik asit (1:1) ve ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktlarında elde edilmiştir.



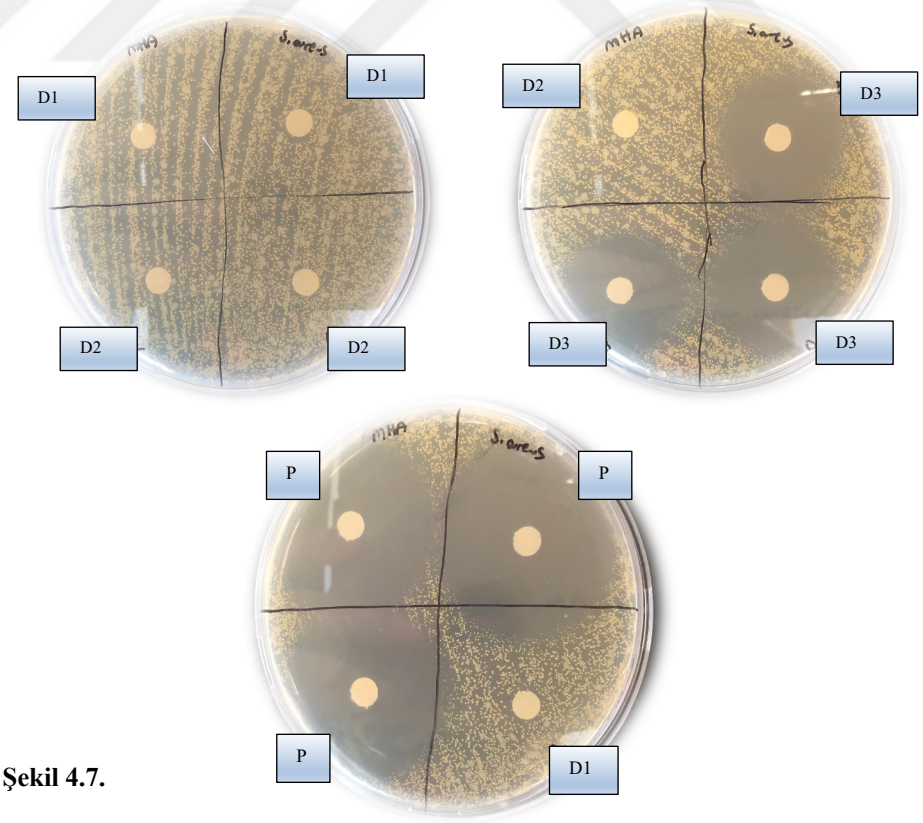
Şekil 4.5. DES'li ekstraktların *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **1)** CC:Üre (1:1), **2)** CC:Üre (1:2), **3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **4)** CC:Gliserol (1:2), **5)** CC:Asetik asit (1:2) ekstraktları.



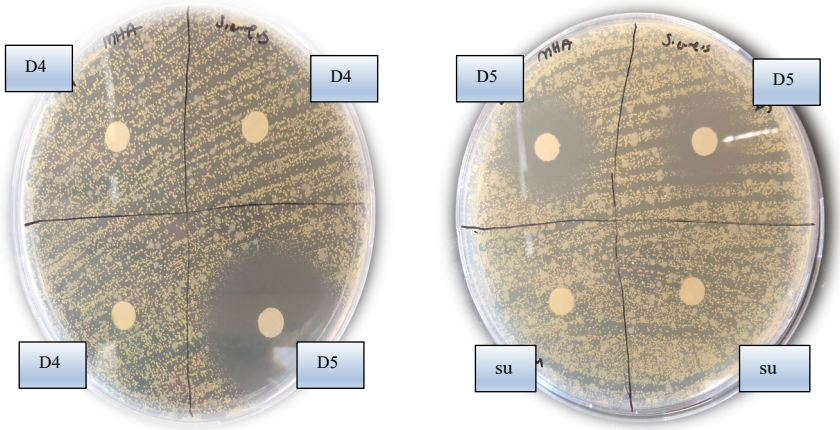
Şekil 4.6. Su ekstraktlarının *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **6)** Su ekstraktı-60 dk, **7)** Su ekstraktı-100 dk.

Şekil 4.7. DES sistemlerinin kendileri ve su ile pozitif kontrolün *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel aktivitelerini göstermektedir. P, D1, D2, D3, D4 ve D5 sırasıyla pozitif kontrol, ChCl:Üre (1:1), ChCl:Üre (1:2), L-mentol:Asetik asit (1:1), ChCl:Gliserol (1:2) ve ChCl:Asetik asit (1:2) DES sistemlerini simgelemektedir. Suyun kendisinde herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Pozitif kontrol olan Gentamisin ortalama olarak 35 mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur. L-mentol:Asetik asit (1:1) DES sisteminin kendisi ortalama 28,240 mm çapında zon göstermiştir. Diğer yandan ChCl:Asetik asit (1:2) sisteminin kendisi de 22,051 mm çapında inhibisyon çapına sahiptir. Buradan çıkan sonuca göre bu DES sistemlerinin kendileri antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunda ekstraktları da diğer sistemlere göre antibakteriyel aktivite sergilemiştir.

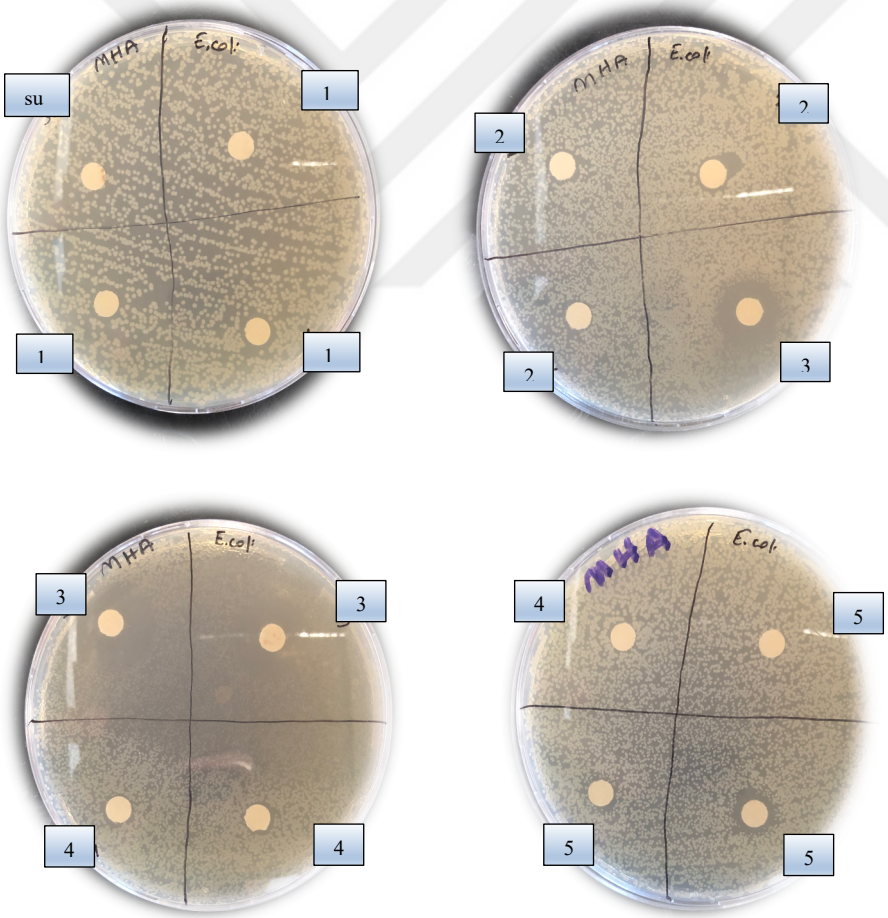
E. coli bakterisindeki aktivitelere bakıldığında Şekil 4.8.'de 1, 2, 3, 4 ve 5 no'lu örnekler sırasıyla ChCl:Üre (1:1), ChCl:Üre (1:2), L-mentol:Asetik asit (1:1), ChCl:Gliserol (1:2) ve ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktlarını göstermektedir. Şekil 4.9. ise 6 ve 7 no'lu örneklerin yani farklı sürelerde yapılan su ekstraksiyonu ekstraktlarının sonucunu belirtmektedir. Şekil 4.14. ise DES sistemlerinin kendileri ve su ile pozitif kontrolün *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel aktivitelerini göstermektedir.



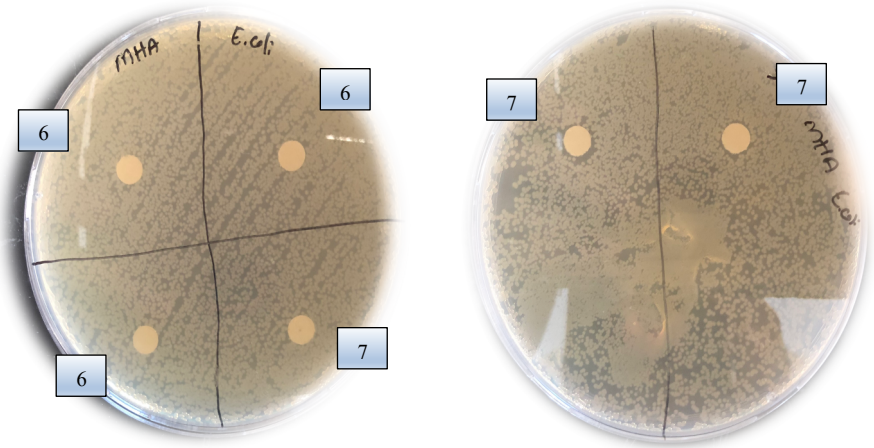
Şekil 4.7.



Şekil 4.7. Kontrollerin *S. aureus* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **P)** Gentamisin, **D1)** CC:Üre (1:1), D2) CC:Üre (1:2), **D3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **D4)** CC:Gliserol (1:2), **D5)** CC:Asetik asit (1:2) ve Su

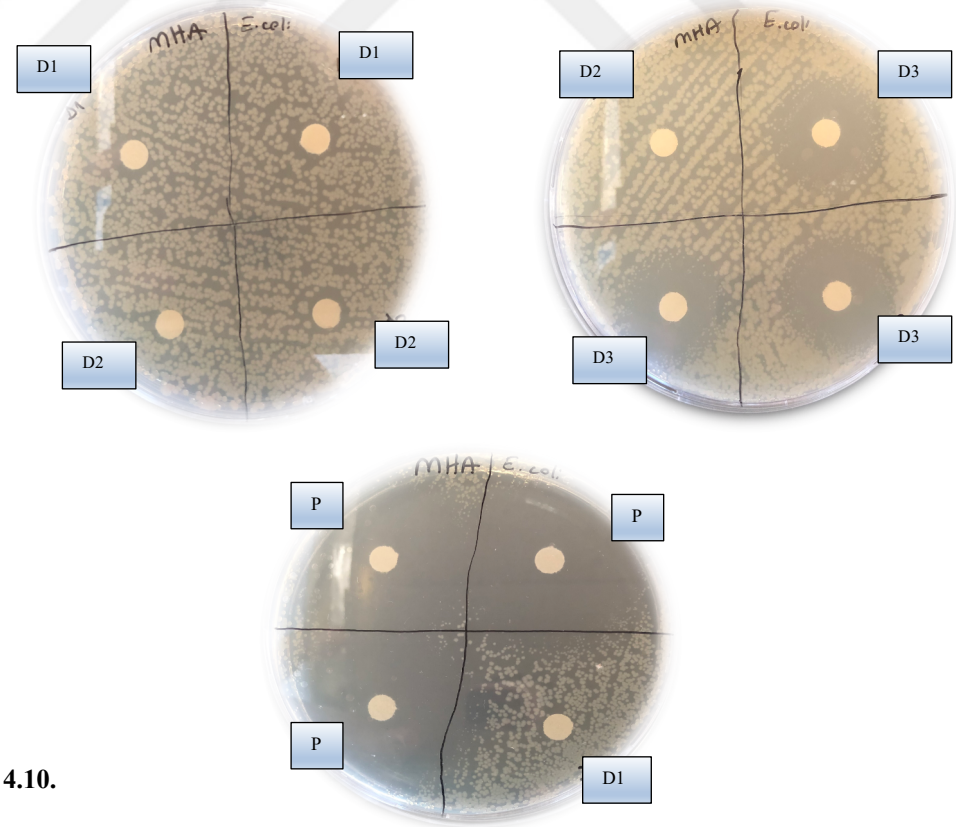


Şekil 4.8. DES'li ekstraktların *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **1)** CC:Üre (1:1), **2)** CC:Üre (1:2), **3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **4)** CC:Gliserol (1:2), **5)** CC:Asetik asit (1:2) ekstraktları

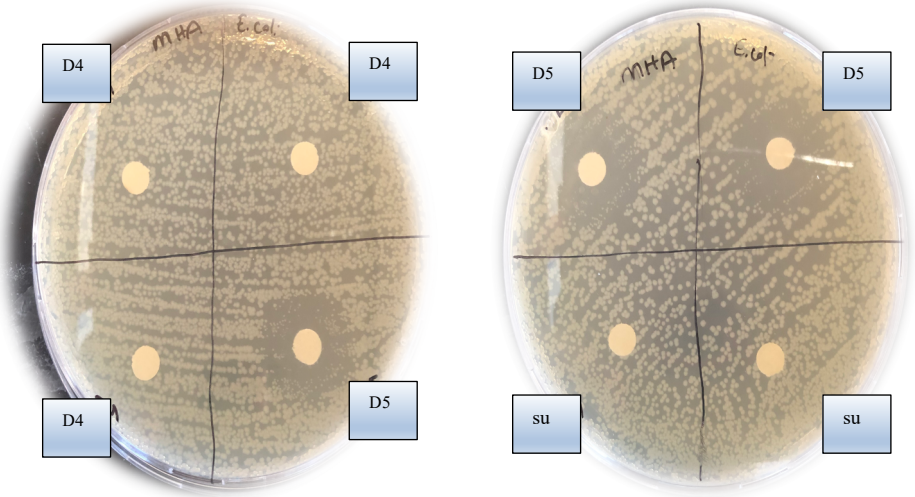


Şekil 4.9. Su ekstraktlarının *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **6)** Su ekstraktı-60 dk, **7)** Su ekstraktı-100 dk.

E. coli bakterisinde ekstraktlarda elde edilen zon çapları sırasıyla ChCl:Üre (1:1), ChCl:Üre (1:2), L-mentol:Asetik asit (1:1), ChCl:Gliserol (1:2) ve ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktları için 7,402, 7,229, 16,892, 7,681, 8,776 mm'dir. Bu DES sistemlerinin kontrolleri ise sırasıyla 9,422, 8,871, 23,593, 0 ve 20,063 mm'dir. DES kontrolleri ekstraktlara göre daha fazla zon çapı göstermiştir. Su ekstraktlarında ve kontrolünde herhangi bir zon elde edilmemiştir. Pozitif kontrol olan Gentamisinin *E.coli* için inhibisyon çapı 34,897 mm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.10.



Şekil 4.10. Kontrollerin *E. coli* bakterisinde antibakteriyel aktiviteleri **P)** Gentamisin, **D1)** CC:Üre (1:1), **D2)** CC:Üre (1:2), **D3)** L-Mentol:Asetik asit (1:1), **D4)** CC:Gliserol (1:2), **D5)** CC:Asetik asit (1:2) ve Su.

Tüm antibakteriyel sonuçlarından hareketle asetik asit kullanılan DES sistemlerinin antibakteriyel aktivitesinin ekstraktlarında da korunduğu söylenebilir. Ayrıca Gram negatif *E. coli* bakterisinde daha fazla sayıda inhibisyon çapı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.12. Ekstraktların antibakteriyel aktivite tayini sonuçları.

Örnekler	**İnhibisyon zon çapı (mm)** ***Staphylococcus aureus***	**İnhibisyon zon çapı (mm)** ***Escherichia coli***
ChCl:Üre (1:1) ekstraktı	0	7,402
ChCl:Üre (1:1) DES kontrolü	0	9,422
ChCl:Üre (1:2) ekstraktı	0	7,229
ChCl:Üre (1:2) DES kontrolü	0	8,871
L-Mentol:Asetik Asit (1:1) ekstraktı	16,383	16,892
L-Mentol:Asetik Asit (1:1) DES kontrolü	28,240	23,593
ChCl:Gliserol (1:2) ekstraktı	0	7,681
ChCl:Gliserol (1:2) DES kontrolü	0	0
ChCl:Asetik asit (1:2) ekstraktı	10,064	8,776
ChCl:Asetik asit (1:2) DES kontrolü	22,051	20,063
Su ekstraktı-60 dk	0	0
Su ekstraktı-100 dk	0	0
Negatif kontrol (Su)	0	0
Pozitif kontrol (Gentamisin)	35	34,897

BHA ile yapılan antioksidan aktivitesi %97 çıkarken, bu değere en yakın olarak L-mentol-asetik asit (1:1) sistemindeki ekstraktın aktivitesi elde edilmiştir. Tüm sonuçlara bakıldığında asetik asidin fenolik bileşik ve antioksidan sonuçları açısından olumsuz etki gösterdiği görülmektedir. Mentollü DES sisteminde ise mentol fazı ile çalışma zorluğu bulunmaktadır. ChCl:Üre (1:1) sisteminde viskozitenin yüksek olması yine problem oluşturmaktadır. Bu sonuçlardan hareketle çalışma kolaylığı da düşünülerek ChCl:Üre (1:2) DES sistemiyle yapılan ekstrakt ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.4.3 LC-MS/MS fenolik bileşen analizi

ChCl:Üre (1:2) sistemiyle ekstraksiyonu yapılan ekstraktın fenolik bileşenlerini tespit etmek amacıyla Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde LC-MS/MS analizi yapılmıştır. Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, protokateşuik asit ve rosmarinik asit standartları kullanılarak yapılan bu analiz sonuçları Tablo 4.13.'te verilmiştir.

Bu sonuçlara göre ChCl:Üre (1:2) DES sistemi, deniz çayırı atık yapraklarından en yüksek miktar olarak protokateşuik asiti 1088,14 µg/L miktarında elde etmiştir. Ardından 206,88 µg/L olarak kafeik asit, 153,97 µg/L olarak p-kumarik asit, 104,57 µg/L olarak ferulik asit ve 69,33 µg/L olarak rosmarinik asit saptanmıştır.

Tablo 4.13. ChCl:Üre (1:2) DES sistemi ile elde edilen ekstraktın LC-MS/MS fenolik bileşen içeriği.

Bileşen Adı	Konsantrasyon (µg/L)
Kafeik asit	206,88
Ferulik asit	104,57
p-Kumarik asit	153,97
Protokateşuik asit	1088,14
Rosmarinik asit	69,33

Farklı çevresel koşullara göre içerikleri değişebileceği düşünülen deniz çayırı atıklarında bulunabilen fenolik bileşiklerin ve şeker içeriklerinin en iyi çalışma ekstraksiyonu ChCl:Üre (1:2) DES sisteminde elde edilmiştir. Bu bileşen grupları metal nanopartiküllerin sentezinde kullanılan işlevsel gruplardandır. Yüksek oranda lignin, fenolik bileşik ve polisakkarit gibi içeriklerin bulunduğu tespit edilmiş *Posidonia oceanica* ve *Zostera marina* gibi deniz çayırı yaprak

kalıntılarının metal nanopartikül sentezinde değerlendirilme, bu kalıntıların farklı DES sistemleriyle entegre edilerek ekstrakte edilme ve elde edilen ekstrakt içeriklerinin tespitinden sonra biyoredüksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirerek, potansiyel uygulamalarda kullanılmak üzere gümüş, çinko ve titanyum nanopartiküllerin stabil olarak elde edilmesi bu tez çalışmasının hedefini oluşturmuştur.

4.5 Yeşil Sentez Yöntemiyle Nanopartikül Sentezi

Ekstraksiyon çalışmaları sonrasında zengin içerikli ChCl:Üre (1:2) ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri sentezlenmiştir. Design Expert programında metal tuzu çözeltisinin molaritesi ve süre parametreleri kullanılarak 13 denemelik desen oluşturulmuştur. Metal çözeltisi molaritesi aralığı 0,5-10 mM, süre aralığı ise 1-8 saat olarak belirlenmiştir. Her bir metal öncülü için bu deneme deseni ayrı olarak uygulanmıştır.

Nanopartikül üretimi oda sıcaklığında, karanlık ortamda 150 rpm çalkalama hızında belirlenen sürelerde ve molaritede gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin biyojenik olarak sentezi metal tuzu çözeltisi ile biyoaktif madde (fenolikler ve şekerler) içeren ekstraktın sulu çözeltisinin karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Nanopartiküllerin saflaştırma öncesinde pik spektrumunun tespiti için UV-Görünür spektrofotometrede ve boyut bilgisi için dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) spektrometresinde analiz edilmesi hedeflenmiştir. Öncelikle DLS cihazı ile nm cinsinden boyut ve polidispersite indeksi (PDI) analizi yapılmıştır. Ardından UV-Vis spektrofotometrede tarama yapılmış ve burada uygun molaritede elde edilen prekürsör çözeltileri kör olarak kullanılmıştır. Üç nanopartikül için ortalama DLS ve PDI değerleri aşağıdaki Tablo 4.14.'te verilmiştir.

Tablo 4.14. Nanopartiküllerin DLS ve PDI sonuçları.

Ag Run	Boyut 1	Boyut 2	Boyut 3	PDI 1	PDI 2	PDI 3
1	375	369,2	364	0,356	0,376	0,365
2	313,4	317,1	336,2	0,322	0,335	0,33
3	418,4	397,3	416,7	0,425	0,43	0,378
4	1099	858,8	1071	0,609	0,367	0,662
5	305	313,4	309,5	0,323	0,299	0,317
6	430,1	456,8	417,8	0,394	0,448	0,477
7	183	174,2	174,5	0,295	0,313	0,266
8	511,6	530,5	505,7	0,282	0,363	0,264
9	523,8	350,9	485,6	0,534	0,449	0,499
10	487,1	485,8	494,9	0,247	0,264	0,249
11	420,8	445,8	443	0,289	0,294	0,234
12	441,3	404,9	392,8	0,412	0,321	0,378
13	175,5	177,6	179,7	0,284	0,328	0,319
Ti Run						
1	624,7	666,6	667,7	0,725	0,68	0,536
2	142,1	103	180,1	0,331	0,461	0,436
3	297,8	241,8	303,9	0,433	0,428	0,606
4	143,4	109,2	142,3	0,261	0,417	0,355
5	158,4	104,6	120,9	0,288	0,454	0,379
6	196,8	44,58	147,9	0,24	1	0,437
7	277,2	130	152	0,393	0,328	0,362
8	121	107,9	69,13	0,286	0,476	0,405
9	281,6	292,3	279,7	0,381	0,624	0,538
10	41,84	47,11	207,3	1	1	0,477
11	205,2	101,5	64,5	0,313	0,391	0,461
12	240,9	220,8	117,5	0,445	0,347	0,612
13	3235	489,7	326,4	1	0,623	0,546
Zn Run						
1	1227	479,6	589,4	0,859	0,679	0,627
2	1012	557,9	462,4	0,821	0,567	0,502
3	894,2	482,7	466,7	0,563	0,56	0,72
4	500,8	499,7	502,2	0,315	0,417	0,413
5	861,8	1090	922,5	0,707	0,727	0,547
6	945,1	659,6	503,6	0,668	0,633	0,622
7		703,3	732,5		0,735	0,723
8	1046	920,6	1065	0,701	0,744	0,703
9	681,1	571,3	497,5	0,677	0,667	0,666
10	548,8	625,4	544,5	0,586	0,596	0,488
11	434	317,1	323	0,467	0,479	0,433
12	699,3	745,4	799,4	0,195	0,58	0,657
13	1254	1359	1736	0,774	0,835	0,989

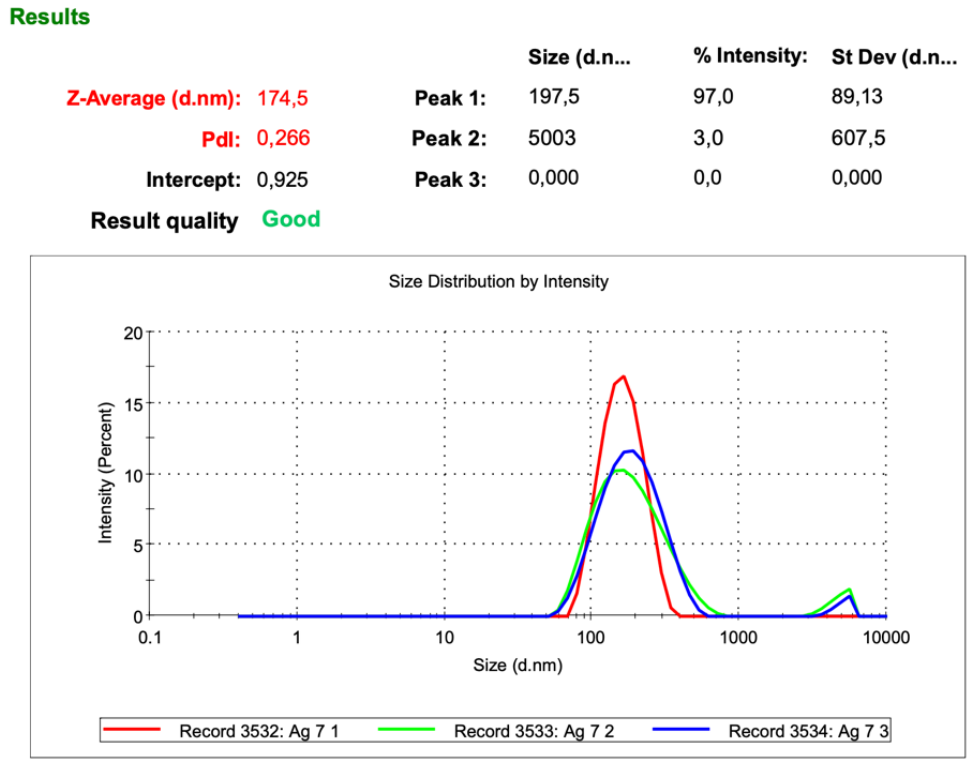
Yapılan taramalarda nanopartikül sentezinin başarısı test edilmiştir. Bu sonuçlardan hareketle değerlendirilmeye alınmak üzere hem boyut hem de PDI değerleri dikkate alındığında gümüş nanopartikülü için Run 7, titanyum nanopartikülü için Run 8, çinko nanopartikülü için Run 11 temsili olarak seçilmiştir. Bu Run'ların sonuçları gösterilmiş ancak şartların belirlenmesi için programa tüm Run'ların boyut ve PDI değerleri girilmiştir.

Run 7'nin koşulları metal tuzu konsantrasyonu: 1,891 mM süre: 2,025 saat

Run 8'in koşulları metal tuzu konsantrasyonu: 5,528 mM süre: 4,689 saat

Run 11'in koşulları: metal tuzu konsantrasyonu: 8,609 mM, süre: 2,025 saat

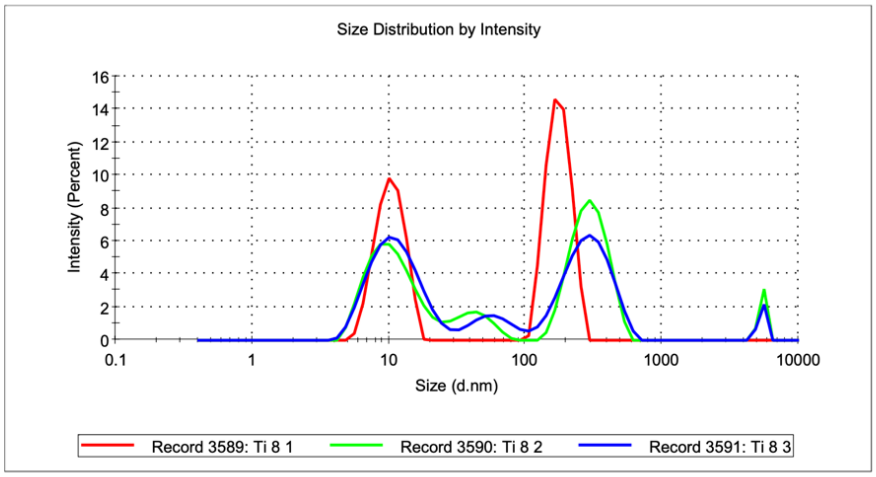
Bu temsili Run'ların ortalama DLS sonuçları Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'te sırasıyla Ag-NP, Ti-NP ve Zn-NP için verilmiştir. DLS yöntemi ile partiküllerin ortalama boyutunun yanı sıra süspansiyon içerisindeki partiküllerin boyut olarak homojen dağılımlı olup olmadığı da PDI değeri olarak hesaplanmaktadır. Grafiklerde üç ölçümün birbiriyle uyumlu olduğu en stabil nanopartikül Ag-NP olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Ag-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu.

Results

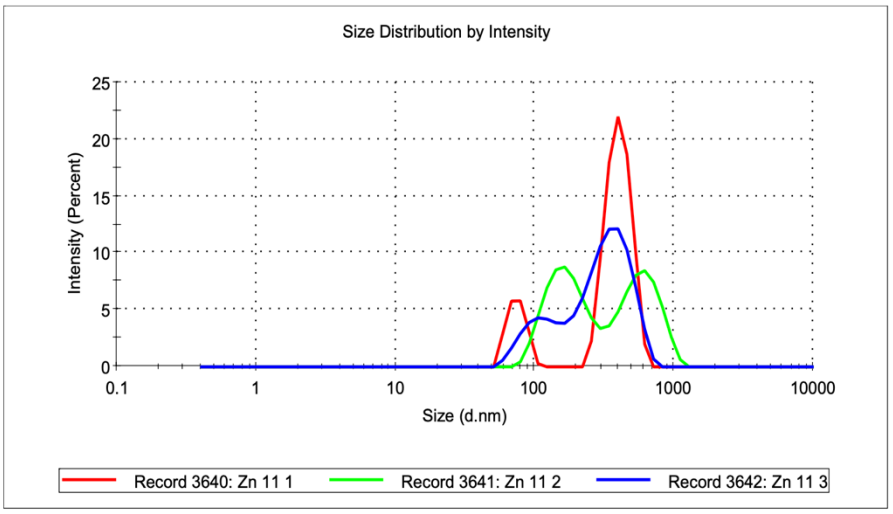
			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	69,13	Peak 1:	12,07	45,3	5,416
PdI:	0,405	Peak 2:	296,8	42,8	108,8
Intercept:	0,844	Peak 3:	60,31	9,1	19,76
Result quality	Refer to quality report				



Şekil 4.12.Ti-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu

Results

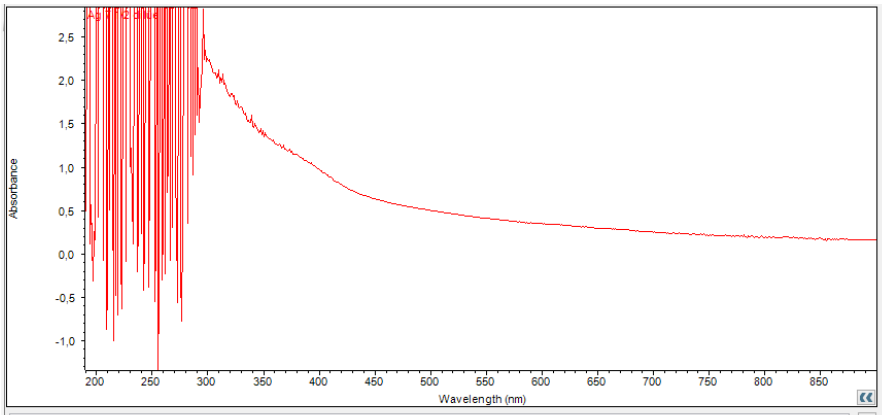
			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	323,0	Peak 1:	354,9	75,7	121,1
PdI:	0,433	Peak 2:	114,0	24,3	30,90
Intercept:	0,921	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality	Refer to quality report				



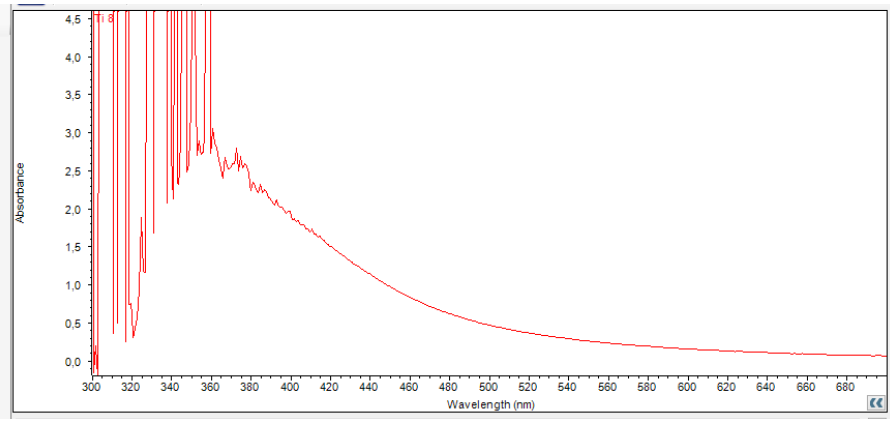
Şekil 4.13. Zn-NP'nin DLS'de boyut ve PDI sonucu.

DLS sonuçlarına göre nanopartiküllerde gümüş ortalama boyutu 174,5 nm, titanyum 69,13 nm, çinko ise 323 nm olarak bulunmuştur. DLS metoduyla elde edilen grafik, nanopartiküllerin süspansiyon içerisindeki titreşimlerine dayalı hidrodinamik çap dağılımını vermektedir ve grafiğin normal dağılım göstermesi yani tek bir çan eğrisine sahip olması önemlidir. Gümüş nanopartikülü dışında diğer nanopartiküllerde tekrarlı okumalar arasında çok büyük dalgalanmalar bulunmaktadır. Grafik üzerinde birden fazla eğrinin olması ise farklı boyutlarda partiküllerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte PDI değerleri 0,5'in altında olduğu durum süspansiyon içerisindeki partiküllerin boyut dağılımlarının homojen olduğunu göstermektedir. PDI sonuçları ise gümüşte 0,266, titanyumda 0,405, çinkoda ise 0,433 olarak ölçülmüştür.

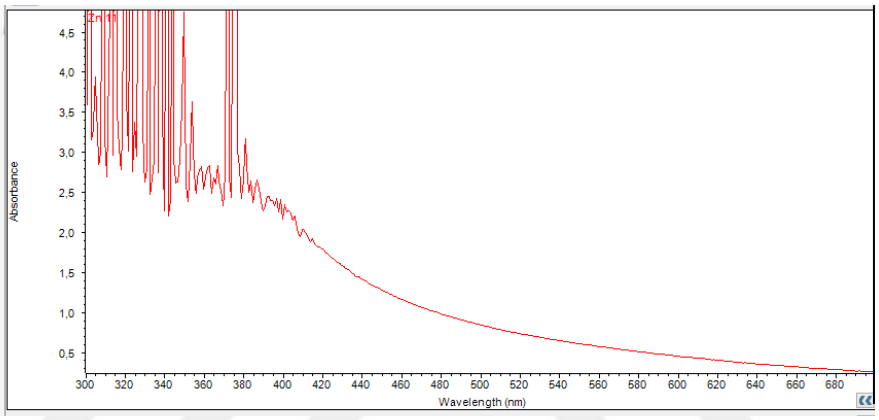
Farklı metallere özgü nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansları birbirinden farklıdır. Bu nedenle her bir metal nanopartikülün maksimum absorbans verdiği dalga boyu da birbirinden farklıdır. Seçilen Run numaralarına göre üç nanopartikülün UV-Görünür Spektrofotometre sonuçları Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da verilmiştir. Yapılan ön taramada seçilen Run'lar için Ag-NP'de 300-350 nm dalga boyu arasında, Ti-NP'de 340-400 nm arasında, Zn-NP'de ise 300-400 nm dalga boyu arasında spektrum bantları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.14. Ag-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu.



Şekil 4.15. Ti-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu.



Şekil 4.16. Zn-NP UV-Vis spektrofotometre sonucu.

UV taramanın da ardından boyut ve polidispersite indeks değeri sonuçları Design Expert programına girilerek koşulların belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Nanopartikül üretiminde boyutun 100 nm altında olması, PDI değerinin ise 0,5'ten küçük olması hedeflenmektedir.

4.5.1 Design Expert programında Ag-NP üretim sonuçları

Prekürsör molaritesi ya da diğer bir deyişle metal konsantrasyon aralığı 0,5-10 mM, süre aralığı ise 1-8 saat olarak belirlendiğinde Design Expert programında elde edilen deneme deseni ve deney sonuçları Şekil 4.17.'de verilmiştir. nm biriminden boyut, Mw/Mn cinsinden PDI ise sistem yanıtlarını oluşturmaktadır. Deney tasarımıyla ilgili tüm sonuçlar program çıktılarıyla basamak basamak aşağıda verilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:ME Konsantra...	Factor 2 B:Süre	Response 1 Boyut nm	Response 2 PDI Mw/Mn
9	1	5,25	4,5	369,4	0,366
11	2	5,25	4,5	322,2	0,329
7	3	5,25	1	410,8	0,411
6	4	10	4,5	1009,6	0,546
13	5	5,25	4,5	309,3	0,313
10	6	5,25	4,5	434,9	0,44
1	7	1,89124	2,02513	177,2	0,291
12	8	5,25	4,5	515,9	0,303
5	9	0,5	4,5	453,4	0,494
4	10	8,60876	6,97487	489,3	0,253
2	11	8,60876	2,02513	436,5	0,272
8	12	5,25	8	413	0,37
3	13	1,89124	6,97487	177,6	0,31

Şekil 4.17. Ag-NP sonuçlarının Design Expert programı çıktısı.

4.5.1.1 Gümüş nanopartikülün boyut analizi

Gümüş nanopartikülünde Design Expert programında boyut analizi yapıldığında sunulan modellerden "Lineer" seçilmiştir, bu modelde p-value değeri ise 0,0473'tür (Tablo 4.15.). Lineer model sadece faktörlerin kendilerinin yanıtlar üzerinde doğrusal etkisi olduğu, faktörler arasında etkileşimlerin veya faktörlerin ikinci dereceden etkileşimlerinin olmadığı modeldir.

Tablo 4.15. Ag-NP boyut yanıt model özellikleri çıktısı.

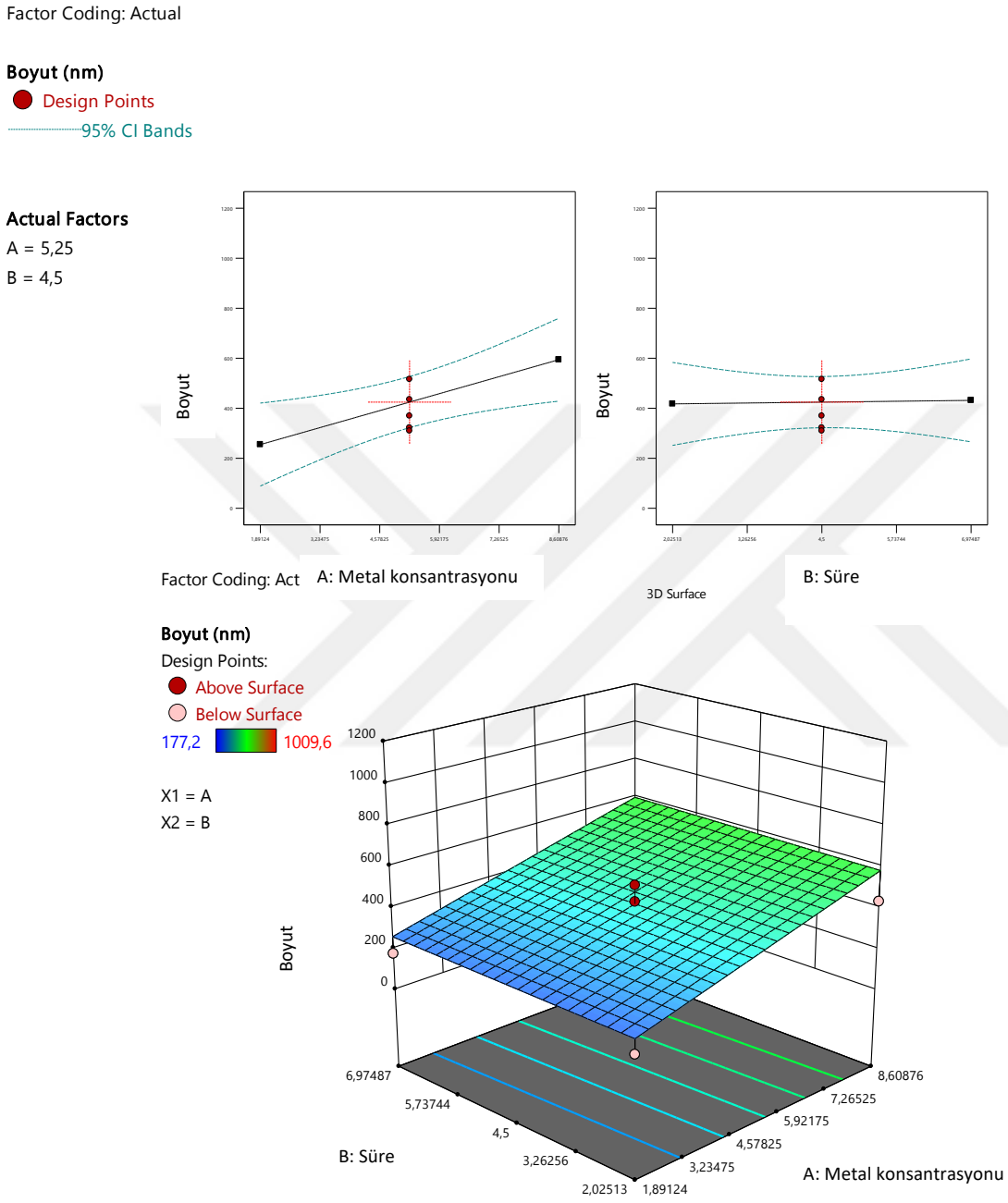
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	2,343E+06	1	2,343E+06			
Linear vs Mean	2,308E+05	2	1,154E+05	4,20	0,0473	Önerilen
2FI vs Linear	686,44	1	686,44	0,0226	0,8839	
Quadratic vs 2FI	1,117E+05	2	55825,45	2,41	0,1597	
Cubic vs Quadratic	6123,25	2	3061,63	0,0982	0,9082	
Residual	1,560E+05	5	31190,95			
Total	2,848E+06	13	2,191E+05			

Programda yapılan ANOVA-varyans analizi testine göre gümüş nanopartikülünün boyut yanıtında sunulan “Lineer” model “anlamlı” olarak (p-value:0,0473), “uyum eksikliği” değeri ise “anlamsız” olarak belirtilmektedir (Tablo 4.16.). Faktörlerden biri olarak sürenin etkisi (p-value: 0,9067), metal konsantrasyonuna (p-value: 0,0159) göre daha azdır.

Tablo 4.16. Ag-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2,308E+05	2	1,154E+05	4,20	0,0473	significant
A-ME Konsantrasyonu	2,304E+05	1	2,304E+05	8,40	0,0159	
B-Süre	396,37	1	396,37	0,0144	0,9067	
Residual	2,744E+05	10	27441,53			
Lack of Fit	2,450E+05	6	40835,90	5,56	0,0594	not significant
Pure Error	29399,93	4	7349,98			
Cor Total	5,052E+05	12				

Metal konsantrasyonu arttığında boyutun da arttığı söylenebilir. Bu faktörün boyut üzerindeki etkisi doğrusaldır. İki faktörün ayrı olarak ve birlikte boyutu etkilediği üç boyutlu grafikler Şekil 4.18.'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Ag-NP boyut yanıtı faktörlerin etki grafikleri.

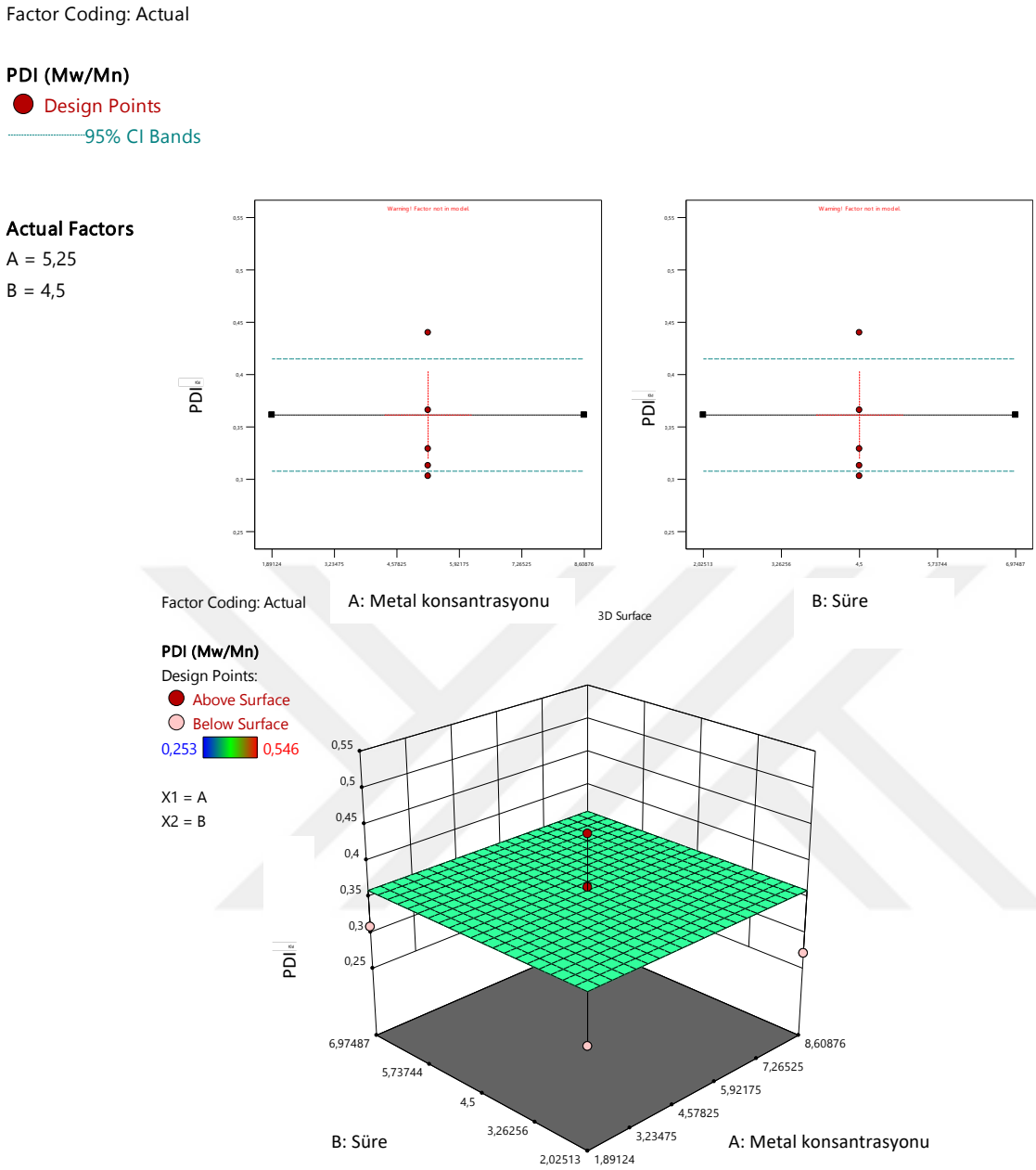
4.5.1.2 Gümüş nanopartikülün PDI analizi

Gümüş nanopartikülün ikinci yanıt olarak PDI analizine bakıldığında model "Mean (ortalama)" olarak sunulmuştur. Yani yanıtlar elde edilen değerlerin ortalaması olarak modelde işlenmektedir.

Tablo 4.17. Ag-NP PDI yanıtı model anlamlılığı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0000	0				
Residual	0,0945	12	0,0079			
Lack of Fit	0,0822	8	0,0103	3,32	0,1307	not significant
Pure Error	0,0124	4	0,0031			
Cor Total	0,0945	12				

Gümüş nanopartikülün PDI yanıtında uygulanan ANOVA-varyans analizi testinde model "ortalama" olarak önerildiği için Tablo 4.17.'den de görüldüğü üzere uyum eksikliği değeri "not significant" yani "anlamlı değil" olarak verilmiştir. Burada p-value değeri 0,1307'dir. İki faktörün PDI üzerinde artış veya azalış gösterecek bir etkisi bulunmamaktadır (Şekil 4.19.). Bunun yerine ortalama bir PDI değeri bulunmaktadır.



Şekil 4.19. Ag-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri.

Gümüş nanopartikülü üretiminde yapılan çalışma şartlarının belirlenmesi sonrası elde edilen validasyon çözümleri Tablo 4.18.'de sunulmuştur. Burada ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Parametre değerleri aralıkta bırakılıp, boyut minimize edilmiş ve PDI önemsiz bırakılmıştır. Bu şekilde "Desirability" değeri 0,915'e çıkarılmıştır. Bu değer yanıtların hedef değerlere ne kadar yakın olduğunu belirtmektedir, bu değerin 1'e oldukça yakın olması istenmektedir. Buradan gelen çözüm önerilerine göre metal konsantrasyonu 1,891 mM, süre ise 2,025 saat olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen boyut değeri 247,809 nm iken, PDI değeri 0,361 olarak program tarafından belirlenmiştir.

Tablo 4.18. Ag-NP çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük sınır	En yüksek sınır	En düşük ağırlık	En yüksek ağırlık	Önem
A:ME Konsantrasyonu	is in range	1,89124	8,60876	1	1	3
B:Süre	is in range	2,02513	6,97487	1	1	3
Boyut	minimize	177,2	1009,6	1	1	3
PDI	none	0,253	0,546	1	1	3

	ME Konsantrasyonu	Süre	Boyut	PDI	Desirability
	1,891	2,025	247,809	0,361	0,915
	1,891	2,056	247,897	0,361	0,915
	1,891	2,221	248,366	0,361	0,915
	1,891	2,239	248,417	0,361	0,914
	1,891	2,025	247,809	0,361	0,915

4.5.2 Design Expert programında Ti-NP üretim sonuçları

Titanyum nanopartikülü üretiminde metal konsantrasyon aralığı 0,5-10 mM, süre aralığı ise 1-8 saat olarak belirlendiğinde Design Expert programında elde edilen deneme deseni ve deney sonuçları Şekil 4.20.'de verilmiştir. nm biriminden boyut, Mw/Mn cinsinden PDI ise sistem yanıtlarını oluşturmaktadır. Deney tasarımıyla ilgili tüm sonuçlar program çıktılarıyla basamak basamak aşağıda verilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:ME Konsantra...	Factor 2 B:Süre	Response 1 Boyut nm	Response 2 PDI Mw/Mn
13	1	5,25	4,5	653	0,647
9	2	5,25	4,5	141,7	0,409
7	3	5,25	1	281,2	0,489
6	4	10	4,5	131,6	0,344
12	5	5,25	4,5	128	0,374
10	6	5,25	4,5	129,8	0,559
1	7	1,89124	2,02513	186,4	0,361
11	8	5,25	4,5	99,3	0,389
5	9	0,5	4,5	284,5	0,514
4	10	8,60876	6,97487	98,75	0,826
2	11	8,60876	2,02513	123,7	0,388
8	12	5,25	8	193,1	0,468
3	13	1,89124	6,97487	1350,4	0,723

Şekil 4.20. Ti-NP sonuçlarının Design Expert programı çıktısı.

4.5.2.1 Titanyum nanopartikülün boyut analizi

Titanyum nanopartikülü için Design Expert programında boyut analizi yapıldığında önerilen model p-value olarak 0,0620 değerine sahip "2FI- two-factor interaction" veya "Lineer" olarak sunulmuştur (Tablo 4.19.).

Tablo 4.19. Ti-NP boyut yanıtı model özellikleri çıktısı.

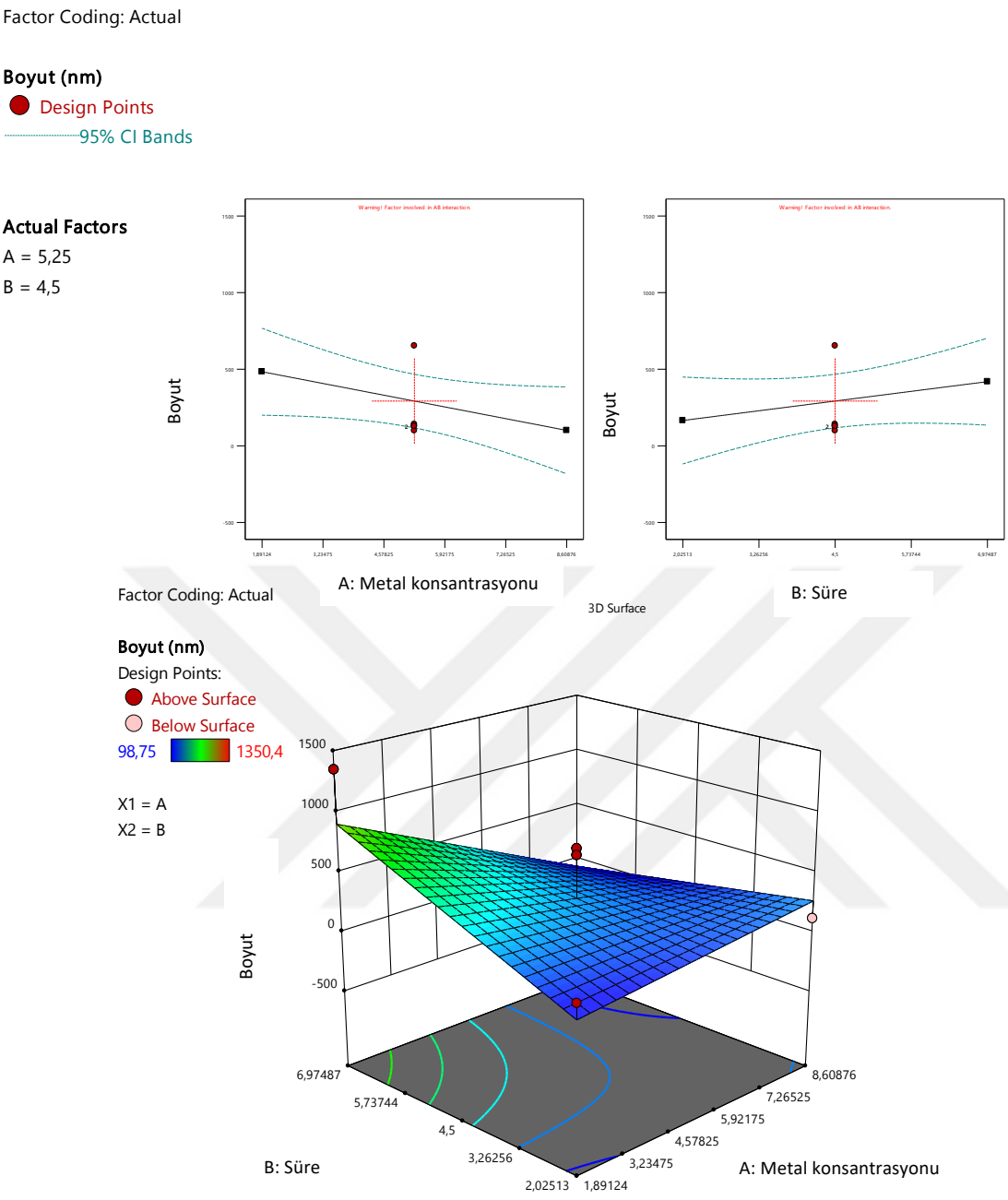
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	1,112E+06	1	1,112E+06			
Linear vs Mean	4,215E+05	2	2,107E+05	2,00	0,1861	
2FI vs Linear	3,534E+05	1	3,534E+05	4,54	0,0620	Önerilen
Quadratic vs 2FI	32139,01	2	16069,51	0,1682	0,8485	
Cubic vs Quadratic	3,503E+05	2	1,752E+05	2,75	0,1566	
Residual	3,186E+05	5	63722,86			
Total	2,588E+06	13	1,990E+05			

Bu modeldeki faktörlerin yani metal konsantrasyonu ve sürenin modeldeki etkisi "2FI" olarak seçilmiştir. Lineer model sadece ana faktörlerin etkileşimini içerirken, 2FI model ana faktörlerin yanında iki faktörlü etkileşimleri de içermektedir.

Tablo 4.20. Ti-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	7,749E+05	3	2,583E+05	3,32	0,0709	not significant
A-ME Konsantrasyonu	2,928E+05	1	2,928E+05	3,76	0,0845	
B-Süre	1,286E+05	1	1,286E+05	1,65	0,2309	
AB	3,534E+05	1	3,534E+05	4,54	0,0620	
Residual	7,011E+05	9	77898,31			
Lack of Fit	4,768E+05	5	95366,61	1,70	0,3134	not significant
Pure Error	2,243E+05	4	56062,94			
Cor Total	1,476E+06	12				

Modelin "2FI" olarak belirtilmesiyle yapılan ANOVA testinde elde edilen model anlamlı değildir (Tablo 4.20.). Faktörlerden biri olarak metal konsantrasyonun (p-value: 0,0845) azalan etkisi, sürenin (p-value: 0,2309) ise artan bir etkisi bulunmaktadır. İki faktörün etkileşiminin p-value değeri ise 0,0620 olarak tespit edilmiştir. Uyum eksikliği değeri ise "anlamlı değil" olarak elde edilmiştir. İki faktörün ayrı olarak ve birlikte boyutu etkilediği üç boyutlu grafikler Şekil 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Ti-NP boyut yanıtı faktörleri etki grafik çıktısı.

4.5.2.2 Titanyum nanopartikülün PDI analizi

Titanyum nanopartikülünün PDI analizine bakıldığında model "Linear" veya "Mean" olarak önerilmiştir. Burada p-value değeri 0,2001 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.21.). "Ortalama" olan modelde yanıtlar sadece gözlemlenen ortalama değerler olduğu için yanıtların faktör etkileşimlerini içeren "Lineer" model seçilmiştir.

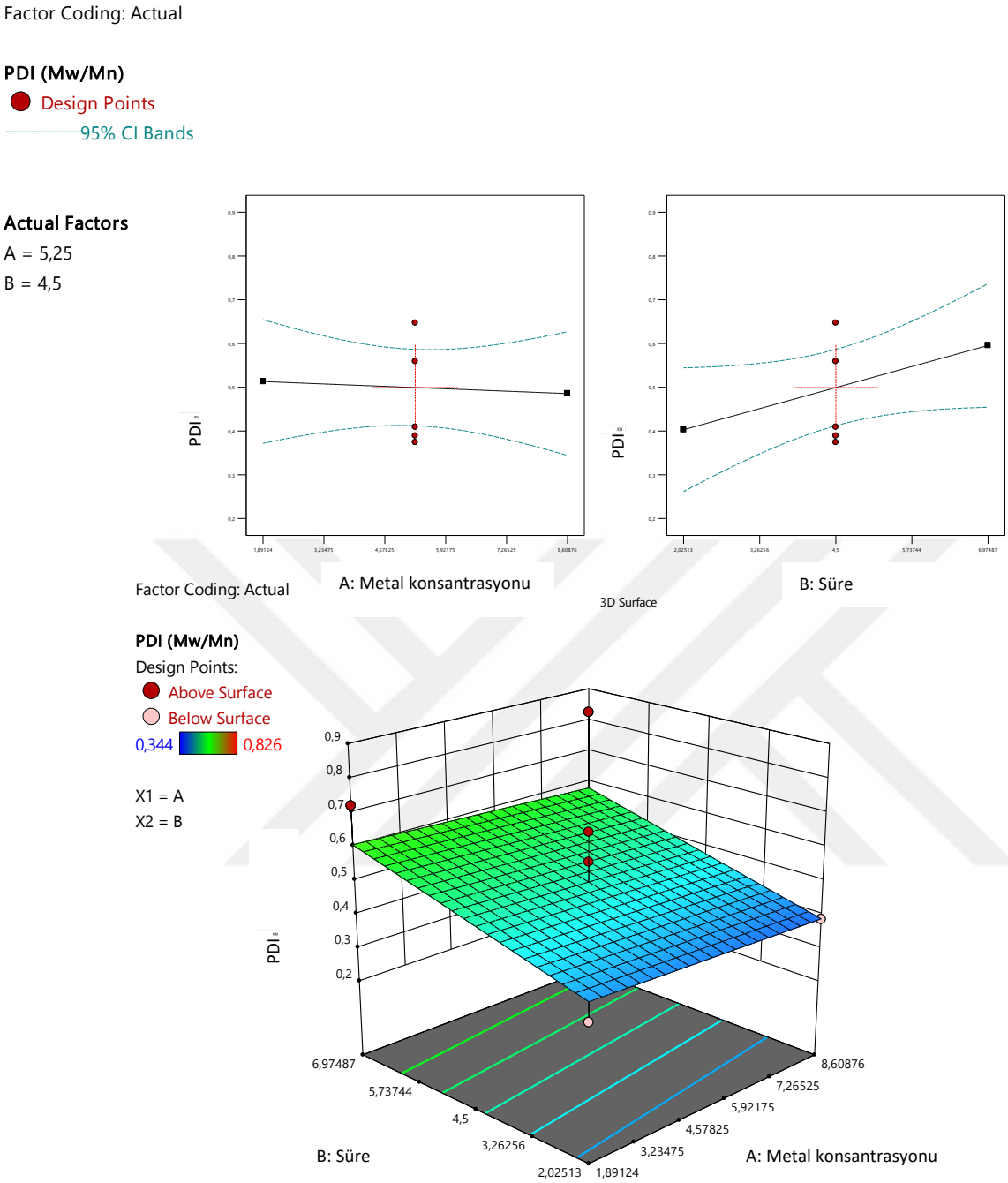
Tablo 4.21. Ti-NP PDI yanıtı model özellikleri çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	3,24	1	3,24			
Linear vs Mean	0,0757	2	0,0378	1,90	0,2001	Önerilen
2FI vs Linear	0,0014	1	0,0014	0,0656	0,8035	
Quadratic vs 2FI	0,0070	2	0,0035	0,1286	0,8813	
Cubic vs Quadratic	0,1032	2	0,0516	2,94	0,1432	
Residual	0,0878	5	0,0176			
Total	3,52	13	0,2705			

Tablo 4.22. Ti-NP PDI yanıtı model anlamlılığı.

Source	Sum of	df	Mean	F-value	p-value	
Model	0,0757	2	0,0378	1,90	0,2001	not significant
A-ME Konsantrasyonu	0,0015	1	0,0015	0,0764	0,7878	
B-Süre	0,0742	1	0,0742	3,72	0,0826	
Residual	0,1994	10	0,0199			
Lack of Fit	0,1408	6	0,0235	1,60	0,3374	not significant
Pure Error	0,0586	4	0,0146			
Cor Total	0,2751	12				

ANOVA testine göre “Linear” olarak önerilen model anlamlı değilken, uyum eksikliği değeri de anlamlı değil olarak elde edilmiştir (Tablo 4.22.). Şekil 4.22.’de faktörlerin PDI’yı etkilediği grafiklerden görüldüğü üzere diğer faktöre göre sürenin etkisi daha fazladır. Artan süreye bağlı PDI değerinde artış izlenebilir. Metal konsantrasyonunun etkisi ise daha azdır.



Şekil 4.22. Ti-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri.

Titanyum nanopartikülü üretiminde yapılan çalışma sonrası elde edilen validasyon çözümleri Tablo 4.23.'te sunulmuştur. Burada ilk 5 çözüm önerisi verilmiştir. Parametre değerleri aralıkta bırakılıp, boyut ve PDI önemsiz bırakıldığında çözüm önerilerinde "Desirability" değeri 1'e çıkarılmıştır. Bu değer yanıtların hedef değerlere ne kadar yakın olduğunu belirtmektedir ve değerin 1'e oldukça yakın olması istenmektedir. Buradan gelen çözüm önerilerine göre titanyum metal konsantrasyonu 5,528 mM, süre ise 4,689 saat olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen boyut değeri 284,376 nm iken, PDI değeri 0,506 olarak program tarafından belirlenmiştir.

Tablo 4.23. Ti-NP çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük sınır	En yüksek sınır	En düşük ağırlık	En yüksek ağırlık	Önem
A:ME Konsantrasyonu	is in range	1,89124	8,60876	1	1	3
B:Süre	is in range	2,02513	6,97487	1	1	3
Boyut	none	98,75	1350,4	1	1	3
PDI	none	0,344	0,826	1	1	3

	ME Konsantrasyonu	Süre	Boyut	PDI	Desirability
	5,528	4,689	284,376	0,506	1,000
	5,250	4,500	292,419	0,499	1,000
	8,609	2,025	271,527	0,389	1,000
	1,891	6,975	907,787	0,609	1,000
	8,609	6,975	-69,334	0,582	1,000

4.5.3 Design Expert programında Zn-NP üretim sonuçları

Çinko nanopartikülü üretiminde metal konsantrasyon aralığı 0,5-10 mM, süre aralığı ise 1-8 saat olarak belirlendiğinde Design Expert programında elde edilen deneme deseni ve deney sonuçları Şekil 4.23.'te verilmiştir. nm biriminden boyut, Mw/Mn cinsinden PDI ise sistem yanıtlarını oluşturmaktadır. Deney tasarımıyla ilgili tüm sonuçlar program çıktılarıyla basamak basamak aşağıda verilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:ME Konsantra...	Factor 2 B:Süre	Response 1 Boyut nm	Response 2 PDI Mw/Mn
10	1	5,25	4,5	765,3	0,722
12	2	5,25	4,5	677,4	0,63
7	3	5,25	1	614,5	0,614
6	4	10	4,5	500,9	0,382
11	5	5,25	4,5	958,1	0,66
9	6	5,25	4,5	702,8	0,641
1	7	1,89124	2,02513	717,9	0,729
13	8	5,25	4,5	1010,5	0,716
5	9	0,5	4,5	583,3	0,67
4	10	8,60876	6,97487	572,9	0,557
2	11	8,60876	2,02513	358	0,46
8	12	5,25	8	748	0,477
3	13	1,89124	6,97487	1449,7	0,866

Şekil 4.23. Zn-NP sonuçlarının Design Expert programında çıktısı.

4.5.3.1 Çinko nanopartikülün boyut analizi

Çinko nanopartikülünde Design Expert programında boyut analizi yapıldığında model "Linear" veya "Mean" olarak önerilmiştir (Tablo 4.24.). Bu önerilen modellerde p-value değeri 0,0589'dur.

Tablo 4.24. Zn-NP boyut yanıtı model özellikleri çıktısı.

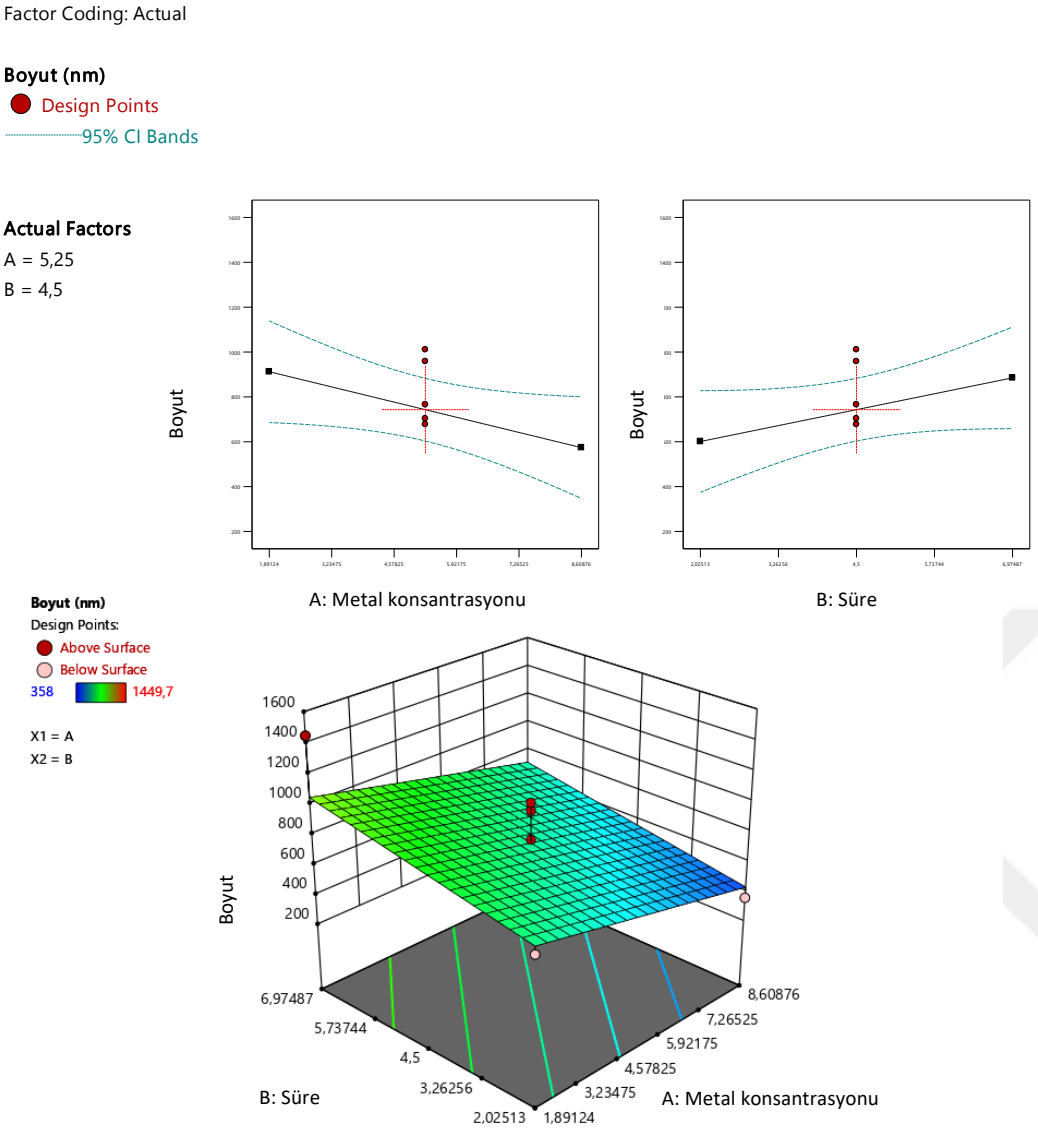
Source	Sum of	df	Mean	F-value	p-value	
Mean vs Total	7,177E+06	1	7,177E+06			
Linear vs Mean	3,901E+05	2	1,950E+05	3,81	0,0589	Önerilen
2FI vs Linear	66796,40	1	66796,40	1,35	0,2751	
Quadratic vs 2FI	71099,06	2	35549,53	0,6651	0,5439	
Cubic vs Quadratic	2,286E+05	2	1,143E+05	3,93	0,0943	
Residual	1,455E+05	5	29098,04			
Total	8,079E+06	13	6,215E+05			

Parametreler ve yanıtlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu "Lineer" model seçilmiştir. Yapılan ANOVA-varyans testinde lineer olarak seçilen modelde elde edilen sonuç "anlamlı değil"dir, uyum eksikliği değeri de "anlamlı değil" olarak

elde edilmiştir (Tablo 4.25.). Faktörlerden biri olarak metal konsantrasyonun (p-value: 0,0606) azalan etkisi, sürenin (p-value: 0,1064) ise artan bir etkisi bulunmaktadır. İki faktörün ayrı olarak ve birlikte boyutu etkilediği üç boyutlu grafikler Şekil 4.24.'te verilmiştir.

Tablo 4.25. Zn-NP boyut yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3,901E+05	2	1,950E+05	3,81	0,0589	not significant
A-ME Konsantrasyonu	2,289E+05	1	2,289E+05	4,47	0,0606	
B-Süre	1,612E+05	1	1,612E+05	3,15	0,1064	
Residual	5,120E+05	10	51203,49			
Lack of Fit	4,197E+05	6	69941,69	3,03	0,1515	not significant
Pure Error	92384,79	4	23096,20			
Cor Total	9,021E+05	12				



Şekil 4.24. Zn-NP boyut yanıtı faktörlerin etki grafikleri çıktısı.

4.5.3.2 Çinko nanopartikülün PDI analizi

Çinko nanopartikülünün PDI analizine bakıldığında model "Linear" veya "Mean" olarak önerilmiştir (Tablo 4.26.). Bu önerilen modellerde p-value değeri 0,0104'tür.

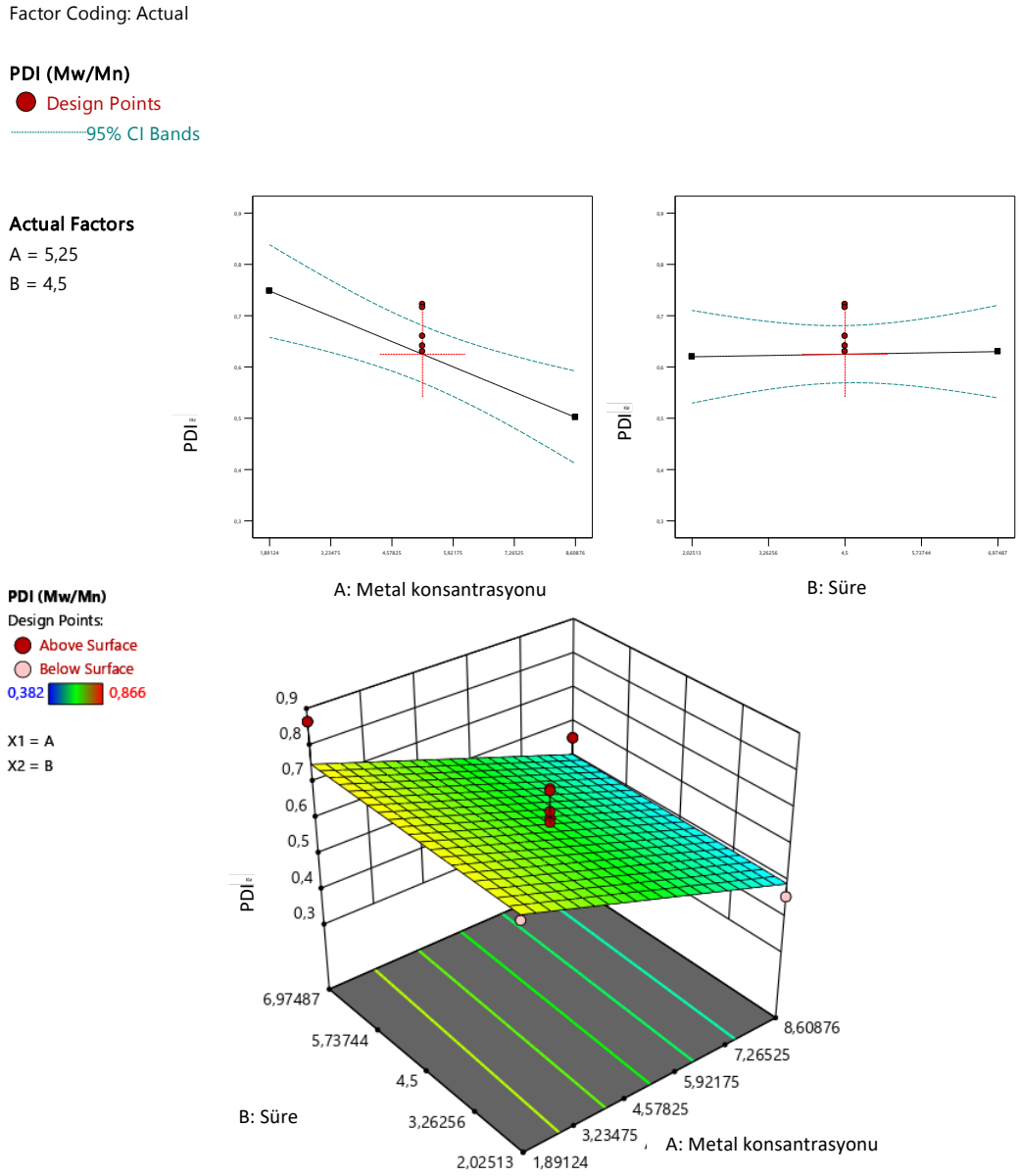
Tablo 4.26. Zn-NP PDI yanıtı model özellikleri çıktısı.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	5,08	1	5,08			
Linear vs Mean	0,1216	2	0,0608	7,46	0,0104	Önerilen
2FI vs Linear	0,0004	1	0,0004	0,0444	0,8378	
Quadratic vs 2FI	0,0198	2	0,0099	1,13	0,3756	
Cubic vs Quadratic	0,0265	2	0,0133	1,91	0,2426	
Residual	0,0348	5	0,0070			
Total	5,28	13	0,4061			

Tablo 4.27. Zn-NP PDI yanıtı model anlamlılığı çıktısı.

Source	Sum of	df	Mean	F-value	p-value	
Model	0,1216	2	0,0608	7,46	0,0104	significant
A-ME Konsantrasyonu	0,1214	1	0,1214	14,89	0,0032	
B-Süre	0,0002	1	0,0002	0,0249	0,8779	
Residual	0,0815	10	0,0081			
Lack of Fit	0,0742	6	0,0124	6,79	0,0425	significant
Pure Error	0,0073	4	0,0018			
Cor Total	0,2030	12				

Parametreler ve yanıtlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu “Lineer” model seçilmiştir. Yapılan ANOVA testinde “Linear” olarak önerilen model anlamlı iken, uyum eksikliği değeri de anlamlı olarak elde edilmiştir (Tablo 4.27.). Metal konsantrasyonu parametresi için p-value değeri 0,0032 iken, süre için 0,8779’tur. Bu nedenle metal konsantrasyonunun etkisi daha fazladır. Sürenin etkisi ise daha azdır. Şekil 4.25.’teki grafiklerden görüldüğü üzere artan metal konsantrasyona bağlı PDI değerinde azalış izlenebilir.



Şekil 4.25. Zn-NP PDI yanıtı faktörlerin etki grafikleri.

Çinko nanopartikülü üretiminde yapılan çalışma sonrası elde edilen validasyon çözümleri Tablo 4.28.'de sunulmuştur. Çözüm önerileri toplamda 6 adettir. Parametre değerleri aralıkta bırakılıp, boyut minimumda ve PDI önemsizde bırakıldığında çözüm önerilerinde "Desirability" değeri 1'e yaklaşmıştır. Buradan gelen değerlere göre metal konsantrasyonu 8,609 mM, süre ise 2,025 saat olacak şekilde yeni bir deney planlanmıştır. Bu parametrelere göre beklenen boyut değeri 431,932 nm iken, PDI değeri 0,497 olarak program tarafından belirlenmiştir.

Tablo 4.28. Zn-NP çözüm çıktısı.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek ağırlık	Önem
A:ME Konsantrasyonu	is in range	1,89124	8,60876	1	1	3
B:Süre	is in range	2,02513	6,97487	1	1	3
Boyut	minimize	358	1449,7	1	1	3
PDI	none	0,382	0,866	1	1	3

	ME Konsantrasyonu	Süre	Boyut	PDI	Desirability
	8,609	2,025	431,932	0,497	0,932
	8,609	2,049	433,317	0,497	0,931
	8,423	2,025	441,271	0,504	0,924
	8,609	2,240	444,251	0,497	0,921
	8,319	2,025	446,527	0,507	0,919

Design Expert programının sonuçlarından hareketle her bir nanopartikül, çalışma şartlarına göre belirlenen molarite ve sürelerde deniz çayırı ekstraktından daha büyük ölçek olarak yaklaşık 1000 ml hacminde sentezlenmiştir. Üretim sonrası pH değerleri nötr seviyede gümüşte 7,5, titanyumda 6,60, çinkoda 6,97 olarak kaydedilmiştir.

4.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nihayetinde tez çalışmasında tamamlanan nanopartikül karakterizasyon ve biyolojik aktivite çalışmaları aşağıda sıralanmıştır:

Fiziksel karakterizasyon:

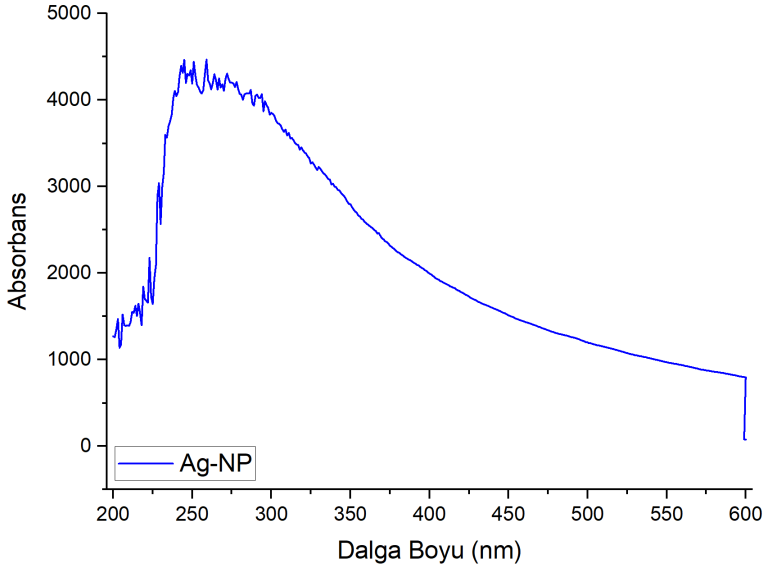
- UV-görünür spektrofotometre
- Dinamik ışık saçılımı (DLS) spektrometresi
- Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi
- Zeta potansiyel
- Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Biyolojik aktivite:

- Antibakteriyel
- Antifungal
- Antioksidan
- Antibiyofilm ve
- Fotokatalitik aktiviteler

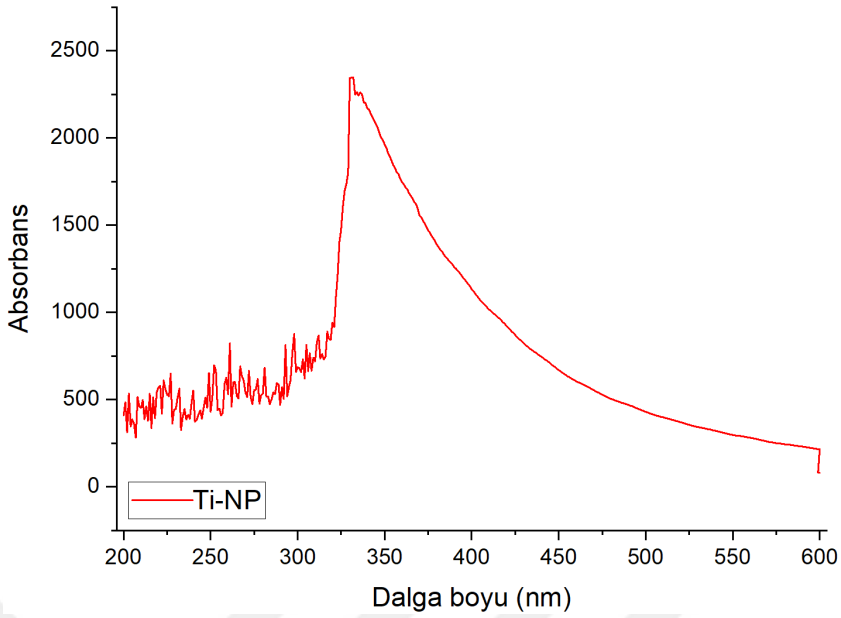
4.6.1 UV- Görünür spektrofotometre

Ön çalışmalar sonucunda nihai olarak üretimi yapılmış gümüş, titanyum ve çinko nanopartiküllerinin üretim ortamlarından örnek alınarak UV-Vis spektrumlarını tespit edebilmek için spektrofotometrede 200-600 nm dalga boyu aralığında taramalar yapılmıştır. Farklı metallere özgü nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansları birbirinden farklıdır. Bu nedenle her bir metal nanopartikülün maksimum absorbans verdiği dalga boyu da birbirinden farklıdır. Elde edilen datalarla Origin-Pro programında absorbansa karşı çizim yapılmıştır.

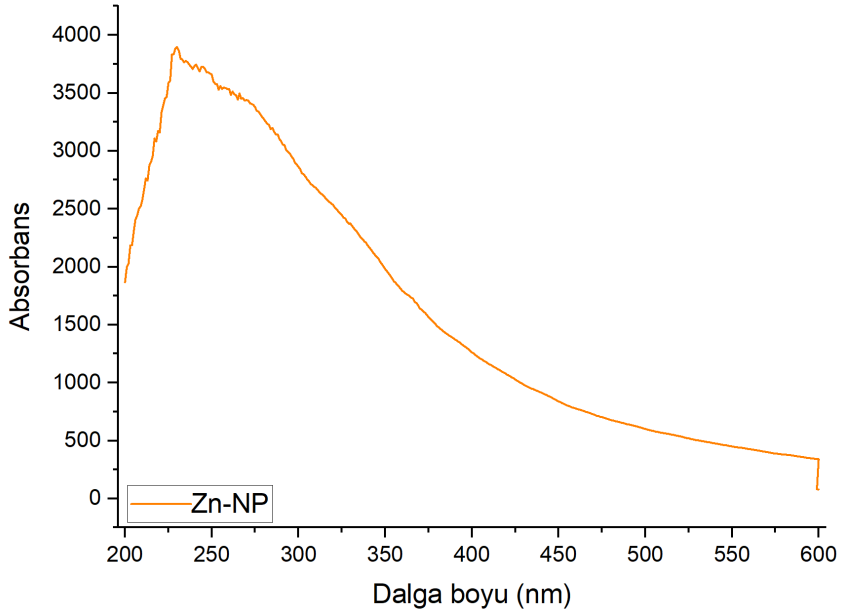


Şekil 4.26. Ag-NP UV-Vis spektrumu.

Şekil 4.26.'da Ag-NP UV-Vis spektrumu bulunmaktadır. 250-350 nm aralığında geniş bir bant elde edilmiştir. Maksimum pik noktası 300 nm civarındandır. Şekil 4.27.'de ise Ti-NP için 325-425 nm aralığında bant, 350 nm dalga boyunda ise pik noktası elde edilmiştir. Şekil 4.28.'de bulunan Zn-NP spektrumunda 225-325 nm aralığında bant, 250 nm dalga boyunda ise pik noktası tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. Ti-NP UV-Vis spektrumu.

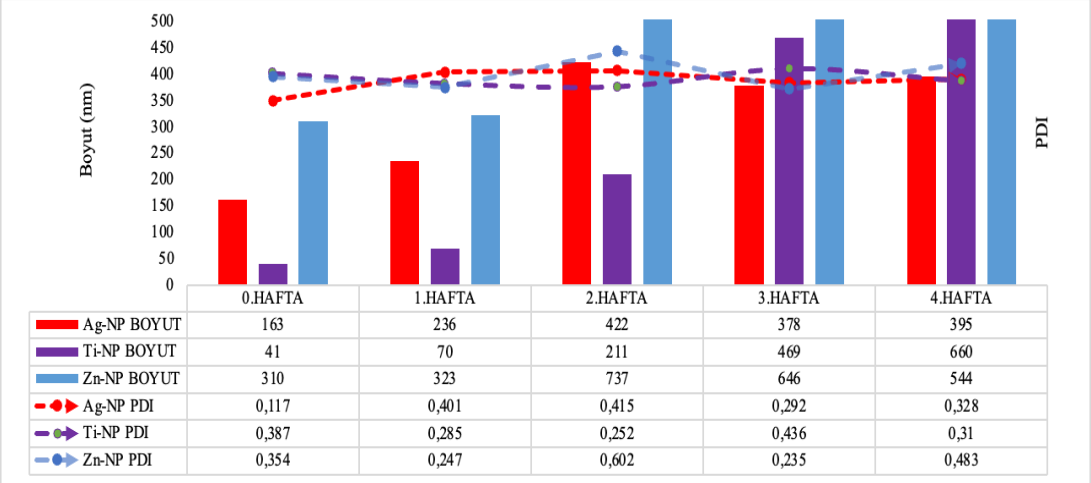


Şekil 4.28. Zn-NP UV-Vis spektrumu.

4.6.2 DLS spektrometresi

Sentezlenen nanopartiküllerde kolloidal süspansiyon içerisine parçacıkların boyut dağılımlarını karakterize etmek için Malvern, Zeta Sizer Nano Range cihazı kullanılmıştır. Her bir üretim için ölçümler üç parallelli yapılmış ve ortalama parçacık çapı ile boyut dağılımının homojenliği belirlenmiştir. Başlangıç ve bitiş dahil olmak üzere 5 hafta boyunca aynı örnekler DLS ölçümüne tabi tutularak boyut

ve PDI değerlerindeki değişimler takip edilmiştir (Şekil 4.29.). Ag-NP üretim sonrası boyut 163 nm iken, 4. hafta sonunda en düşük boyut olarak Ag-NP'de 395 nm ölçülmüştür. Ti-NP boyutu başlangıçta 41 nm ile en düşükken, süreç sonunda 660 nm değeriyle en yüksek hale gelmiştir. Zn-NP başlangıç boyut değeri 310 nm iken 4. hafta sonunda 544 nm olmuştur. PDI değerlerinin 0,5'in altında olması süspansiyon içerisindeki partiküllerin boyut dağılımlarının homojen olduğunu göstermektedir. Başlangıçta en düşük PDI değeri 0,117 olarak Ag-NP'de iken zaman içerisinde artış göstermiş, daha sonra bu değer tekrar düşmüş ve 0,328 olmuştur. Ti-NP başlangıç PDI değeri 0,387 iken, 4. hafta sonunda 0,310 olmuştur. Zn-NP üretimin hemen sonrasında 0,354 PDI değerine sahipken, süreç sonunda 0,483 olmuştur.



	0.HAFTA	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Ag-NP BOYUT	163	236	422	378	395
Ti-NP BOYUT	41	70	211	469	660
Zn-NP BOYUT	310	323	737	646	544
Ag-NP PDI	0,117	0,401	0,415	0,292	0,328
Ti-NP PDI	0,387	0,285	0,252	0,436	0,31
Zn-NP PDI	0,354	0,247	0,602	0,235	0,483

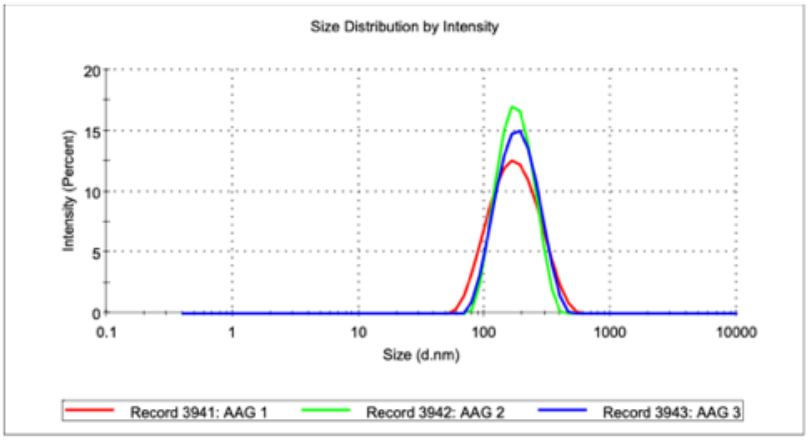
Şekil 4.29. DLS' de boyut ve PDI takibi.

Şekil 4.30. ise nanopartiküllerin boyut dağılım grafiklerinin üretimden hemen sonra ve 4. hafta sonundaki durumlarını göstermektedir. Üç paralelli yapılan okumalarda elde edilen grafiklerde başlangıç durumunda sadece Ag-NP pikleri birbirleriyle uyumludur. 4. hafta sonunda da piklerin boyut aralığı Ag-NP'de benzer aralıktadır, diğer nanopartiküllerde ise üç okumada da birbirleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. DLS metoduyla elde edilen grafikler, nanoparçacıkların süspansiyon içerisindeki titreşimlerine dayalı hidrodinamik çap dağılımını vermektedir ve grafiğin normal dağılım göstermesi yani tek bir çan eğrisine sahip olması önemlidir. Ag-NP dışında diğer nanopartiküllerde tekrarlı okumalar arasında çok büyük dalgalanmalar bulunmaktadır. Grafik üzerinde birden fazla eğrinin olması ise farklı boyutlarda partiküllerin varlığından kaynaklanmaktadır.

Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 168,2	Peak 1:	192,0	100,0	68,62
PdI: 0,115	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,941	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality Good



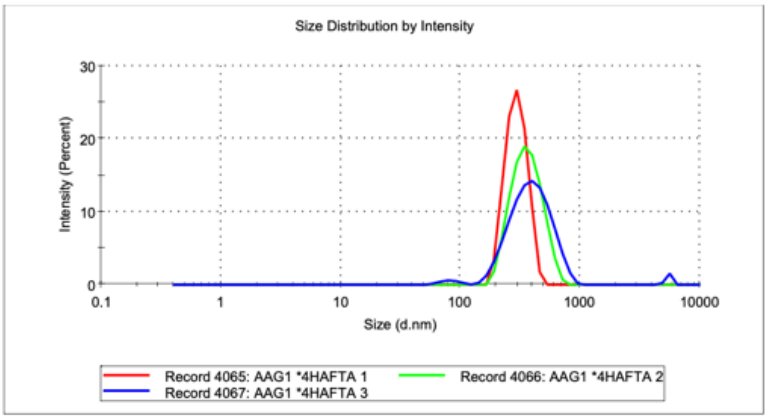
4. hafta sonunda

a Ag-NP

Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 414,0	Peak 1:	405,6	96,4	147,4
PdI: 0,320	Peak 2:	82,23	1,9	13,78
Intercept: 0,890	Peak 3:	5470	1,7	244,4

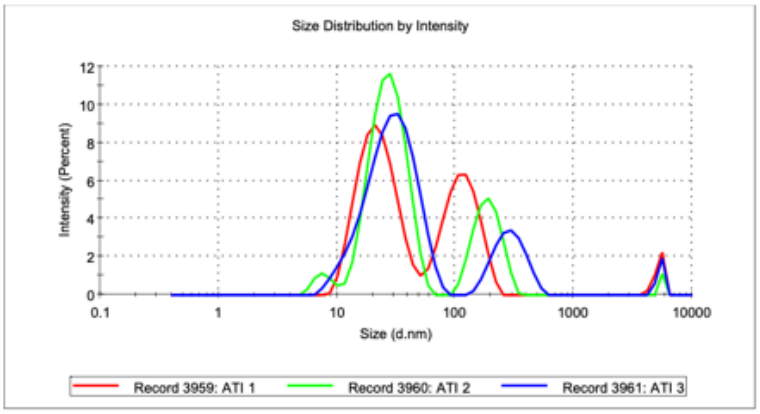
Result quality Refer to quality report



Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 41,05	Peak 1:	30,84	78,9	13,88
PdI: 0,372	Peak 2:	294,6	18,6	85,72
Intercept: 0,924	Peak 3:	5379	2,5	322,9

Result quality Refer to quality report



4. hafta sonunda

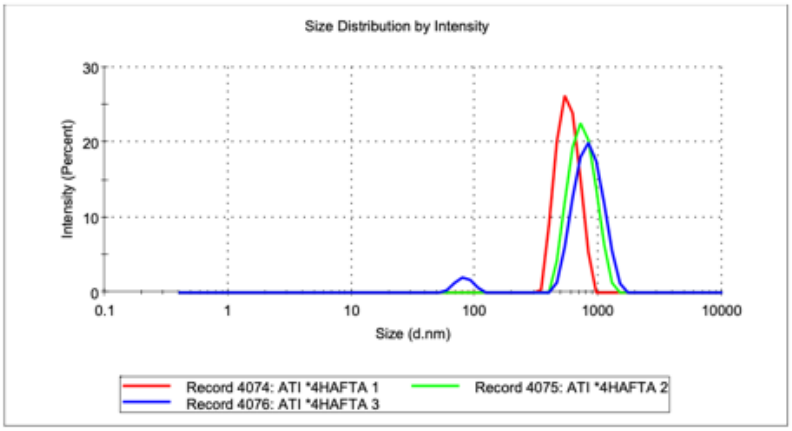
b

Ti-NP

Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 747,5	Peak 1:	846,3	94,1	215,4
PdI: 0,345	Peak 2:	82,03	5,9	12,57
Intercept: 0,942	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

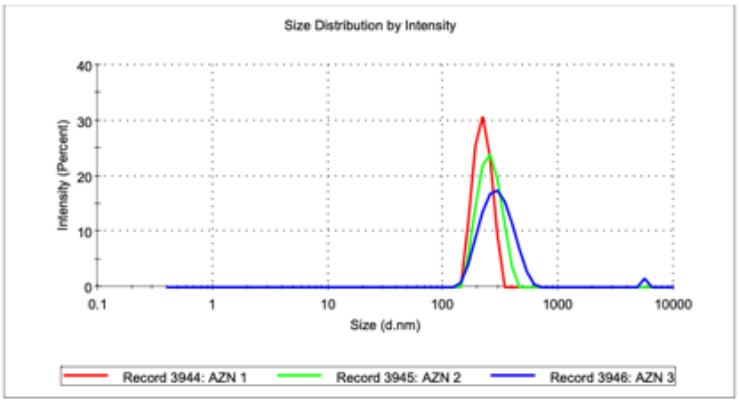
Result quality Refer to quality report



Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 346,2	Peak 1:	300,7	98,4	91,72
PdI: 0,408	Peak 2:	5560	1,6	0,000
Intercept: 0,932	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report



4. hafta sonunda

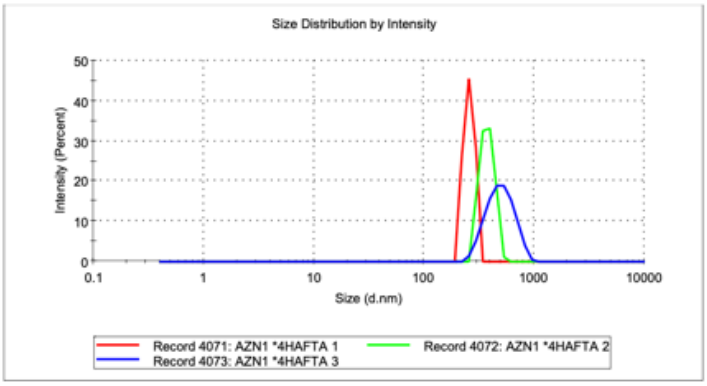
c

Zn-NP

Results

		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 573,0	Peak 1:	504,6	100,0	139,5
PdI: 0,479	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,914	Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

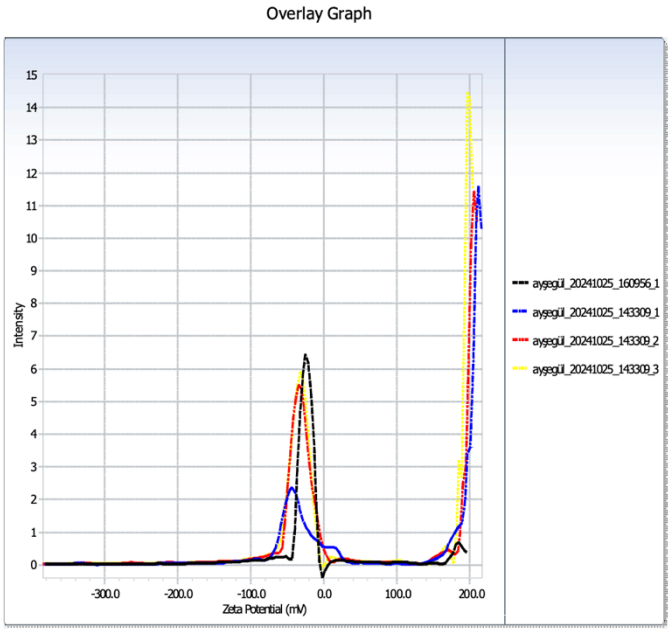


Şekil 4.30. a) Ag-NP, **b)** Ti-NP ve **c)** Zn-NP'lerin DLS sonuçları.

4.6.3 Zeta potansiyeli ölçümü

Gerçekleştirilen nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinden biri de zeta potansiyeli ölçümüdür. Zeta potansiyel ölçümü, dağılma mekanizmalarını anlamak ve elektrostatik dağılmayı kontrol etmek için kritik öneme sahiptir. Üç nanopartikülde de zeta potansiyelinin 5-20 mV aralığında olması bu parçacıkların minimal düzeyde kararlı olduğunu göstermektedir.

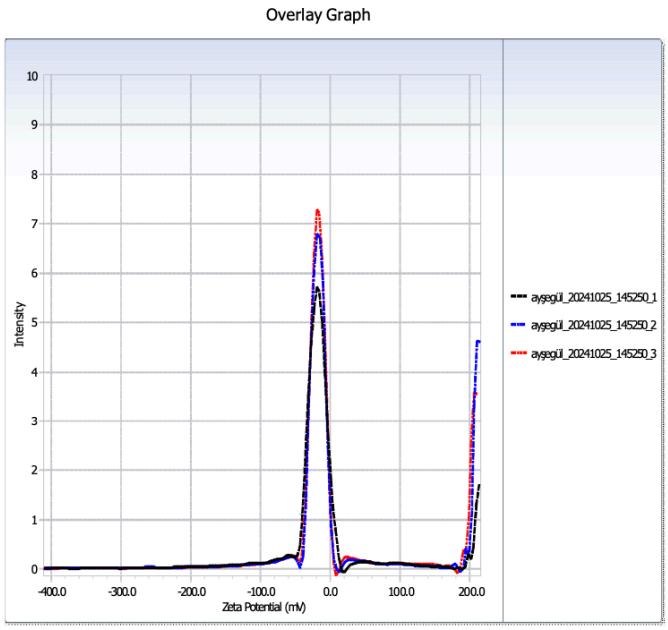
Üretim ortamından alınan sıvı nanopartikül örnekleriyle ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan çoklu okumalar sonucunda Ag-NP'de zeta potansiyeli ortalama ölçüm değeri -17,25 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.31.).



No	File Name	Repet. No	MeasTime	pH	Zeta Potential (mV)	Surface Zeta Potential(mV)	Mobility (cm²/Vs)	E. Field (V/cm)
1	ayşegül_20241025_160956	1	16:09:56	NA	-24.33	NA	-1.901e-004	-17.25
2	ayşegül_20241025_143309	1	14:33:09	NA	-41.16	NA	-3.204e-004	-17.27
3	ayşegül_20241025_143309	2	14:33:09	NA	-33.08	NA	-2.580e-004	-17.25
4	ayşegül_20241025_143309	3	14:33:09	NA	-32.63	NA	-2.545e-004	-17.24
Average					-32.80		-2.557e-004	-17.25

Şekil 4.31. Ag-NP Zeta potansiyeli ölçümü.

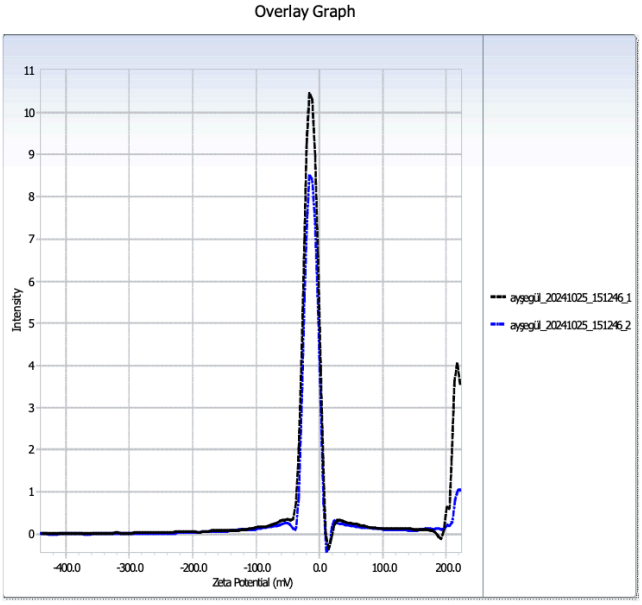
Ti-NP'de zeta potansiyeli ortalama ölçüm değeri -16,07 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.32.).



No	File Name	Repet. No	MeasTime	pH	Zeta Potential (mV)	Surface Zeta Potential(mV)	Mobility (cm²/Vs)	E. Field (V/cm)
1	ayşegül_20241025_145250	1	14:52:50	NA	-18.44	NA	-1.438e-004	-16.10
2	ayşegül_20241025_145250	2	14:52:50	NA	-17.54	NA	-1.368e-004	-16.06
3	ayşegül_20241025_145250	3	14:52:50	NA	-17.65	NA	-1.377e-004	-16.05
Average					-17.88		-1.394e-004	-16.07

Şekil 4.32. Ti-NP Zeta potansiyeli ölçümü.

Zn-NP'de zeta potansiyeli ortalama ölçüm değeri -14,98 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.33.).



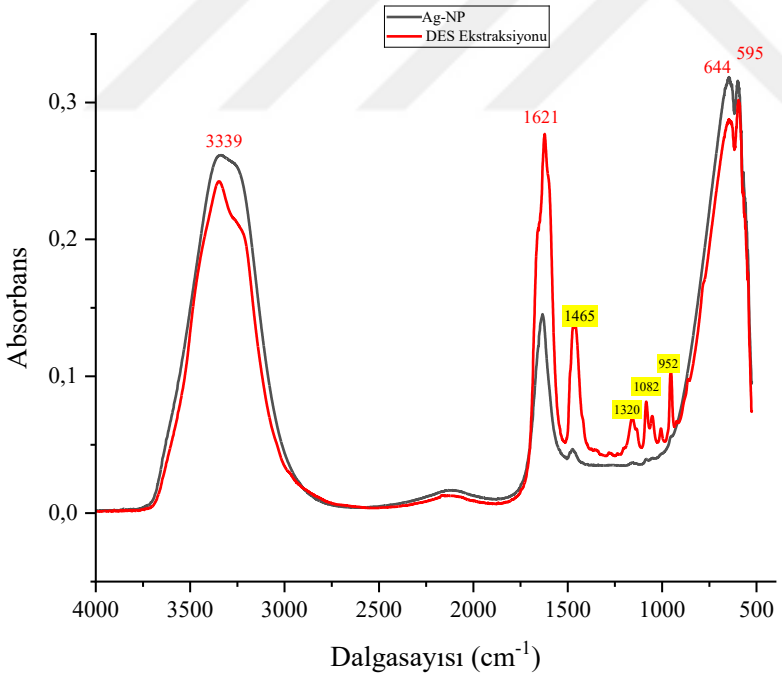
No	File Name	Repet. No	MeasTime	pH	Zeta Potential (mV)	Surface Zeta Potential(mV)	Mobility (cm²/Vs)	E. Field (V/cm)
1	ayşegül_20241025_151246	1	15:12:46	NA	-13.81	NA	-1.077e-004	-15.00
2	ayşegül_20241025_151246	2	15:12:46	NA	-13.40	NA	-1.045e-004	-14.95
Average					-13.60		-1.061e-004	-14.98

Şekil 4.33. Zn-NP Zeta potansiyeli ölçümü.

4.6.4 FTIR spektrometresi

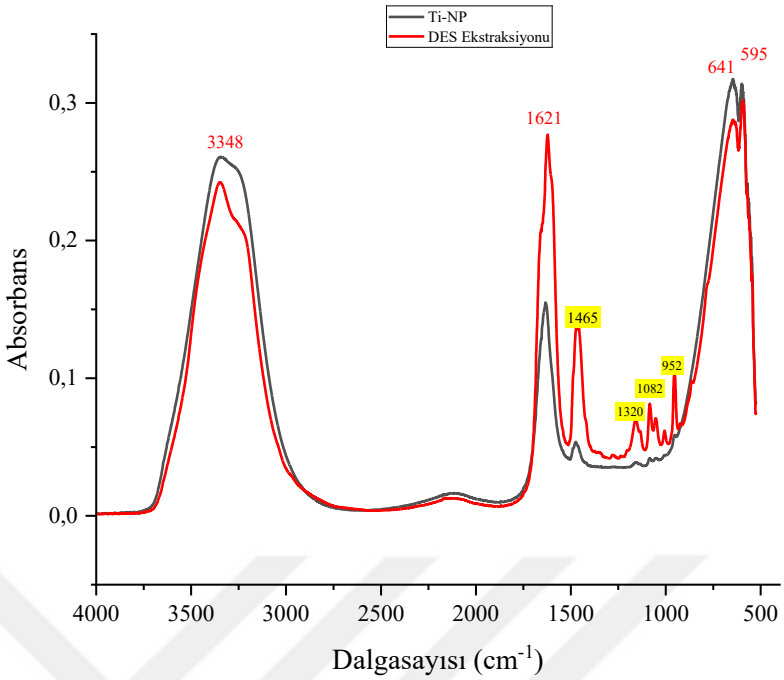
DES ile ekstrakte edilmiş atık deniz çayırlarından yeşil sentez yöntemiyle üretilmiş olan nanopartiküllerin sıvı hallerine FTIR analizi uygulanmıştır. Farklı hacimlerde de olsa bu nanopartikül üretim ortamlarının içinde belirli oranlarda DES ve ekstrakt bulunmaktadır. Bu nedenle nanopartiküller dışında ChCl:Üre (1:2) DES sistemiyle elde edilen ekstraktta da FTIR analizi uygulanarak nanopartiküllerle kıyaslama yapılmıştır. 4000-500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edilen absorbans değerleriyle Origin-Pro programında çizimler gerçekleştirilmiştir. Bu sayede fonksiyonel gruplar karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.34.'te bulunan DES ekstraktının 3339, 1621, 1465, 1320, 1082, 952, 644 ve 595 cm^{-1}'deki piklere karşılık gelen fonksiyonel grupları sırasıyla C-H veya N-H, C=C, C-N, C-O, C-H ve COO- bağını göstermektedir. Ag-NP'de bulunan 3339, 1621, 644 ve 595 cm^{-1}'deki pikler, ekstrakt ile ortaktır. Bu fonksiyonel gruplar nanopartikül eldesinde ve stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu grupların nanopartiküllerde bulunduğu ve kararlı halde durmasının sağlandığı FTIR analizi ile de doğrulanmıştır.



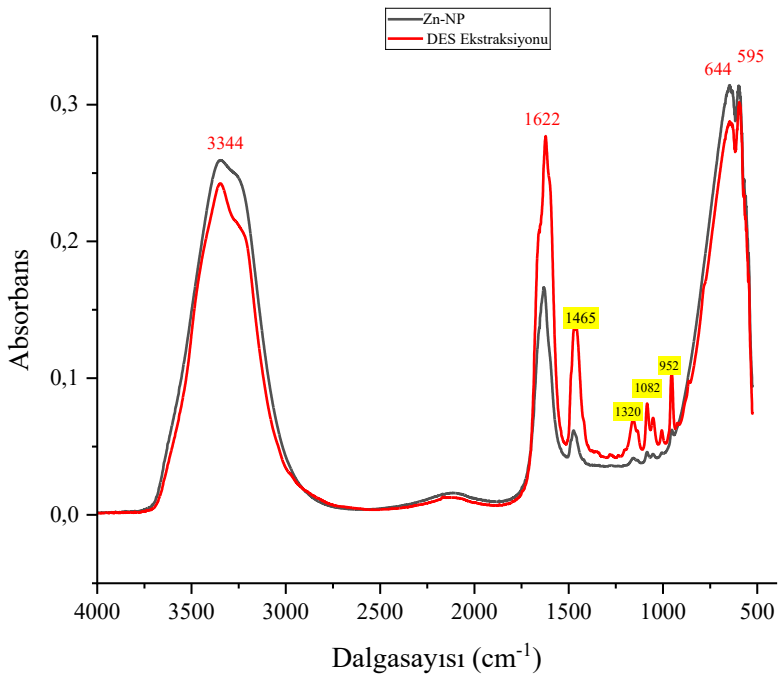
Şekil 4.34. Ag-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu.

Şekil 4.35.'te bulunan Ti-NP ve DES ekstraktları FTIR spektrumunda tıpkı Ag-NP'de olduğu gibi bazı dalga sayılarında ortak pikler (3348, 1621, 641 ve 595 cm^{-1}) bulunmaktadır. Bu pikler de yine deniz çayırı ekstraktına ait indirgeyici role sahip olan fonksiyonel gruplardır.



Şekil 4.35. Ti-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu.

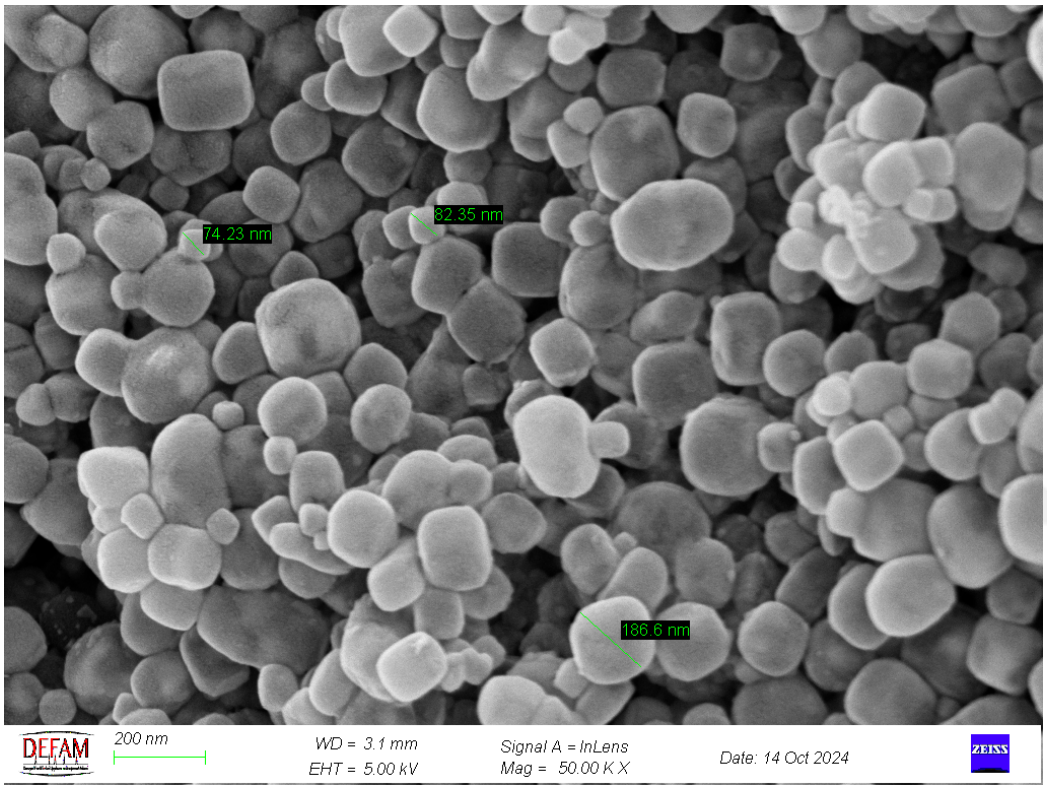
Şekil 4.36.'da bulunan Zn-NP ve DES ekstraktları FTIR spektrumunda tıpkı Ag-NP ve Ti-NP'de olduğu gibi bazı dalga sayılarında ortak pikler (3344, 1622, 644 ve 595 cm^{-1}) bulunmaktadır. Zn-NP'de de bulunan ortak pikler indirgeyici ve kaplama ajanı olarak stabilizasyon sağlayan deniz çayırı metabolitlerinden kaynaklanan fonksiyonel grup pikleridir.



Şekil 4.36. Zn-NP ve DES ekstraktı FTIR spektrumu.

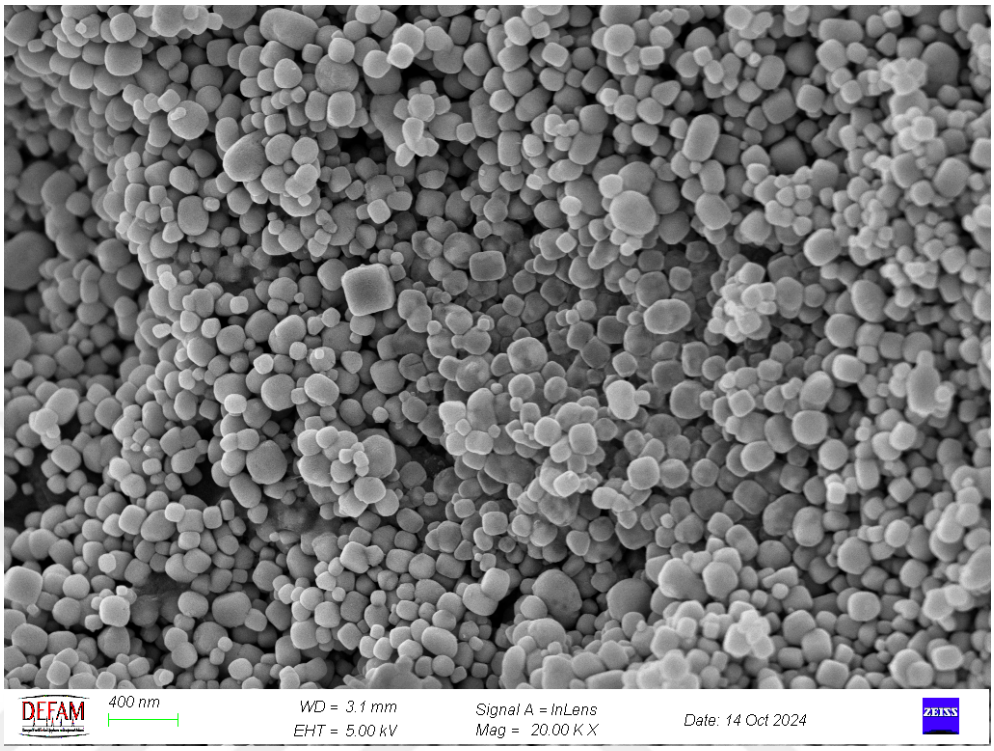
4.6.5 SEM-EDX analizi

Saflaştırılıp dondurularak kurutulan nanopartiküllerin yüzey morfolojileri, boyutları SEM analizi ile elementel içerikleri ise EDX ile tespit edilmiştir. SEM görüntüleme işlemleri nanopartikül şekillerinin ayırt edilebilme özelliklerine göre farklı büyütmelerde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.37.'de 50 bin büyütmede gerçekleştirilen analizde Ag-NP'lerin genellikle küresel veya kübik olan yapıları gösterilmiştir. Farklı boyutlara sahip olan nanopartiküllerde farklı noktalarda 74,23, 82,35 ve 186,6 nm olarak boyut ölçümleri yapılmıştır.



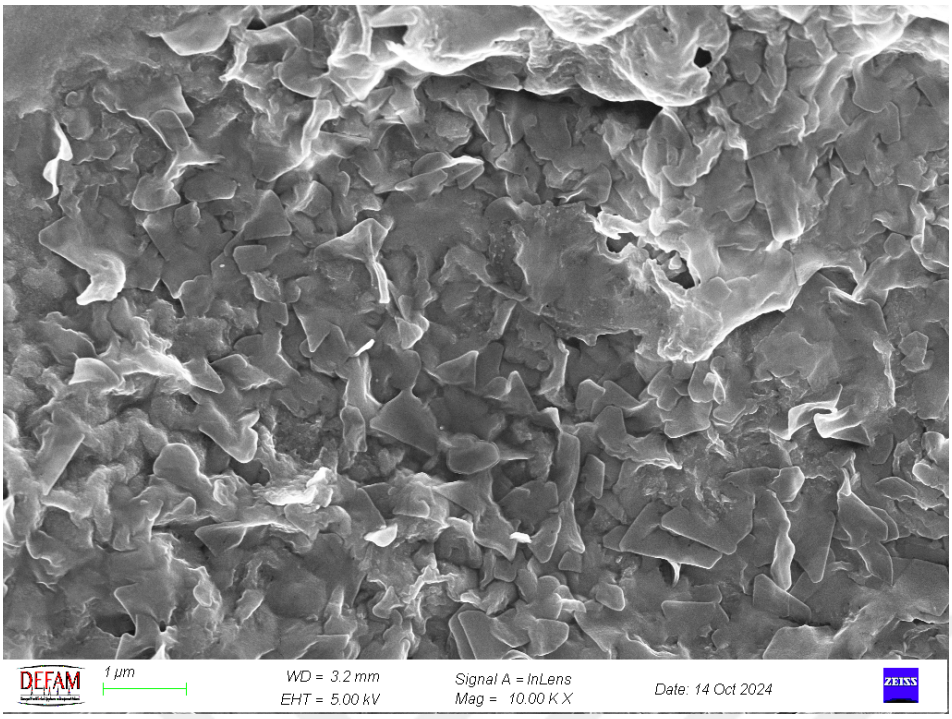
Şekil 4.37. Ag-NP SEM görüntüsü- 50 K büyütme.

Şekil 4.38.'de ise Ag-NP'lerin 20 bin büyütmedeki görünümleri bulunmaktadır. Bu büyütmede de nanopartiküllerin şekilleri genellikle küresel veya kübik olarak tespit edilmiştir. Nanopartiküller tek tek olarak ayırt edilebilir şekil ve büyüklüktedir.



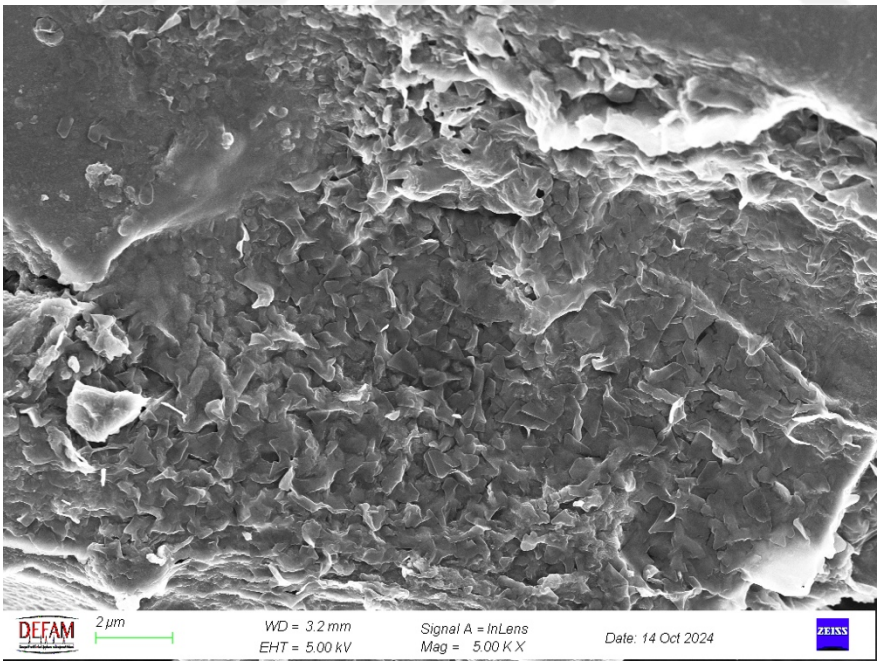
Şekil 4.38. Ag-NP SEM görüntüsü- 20 K büyütme.

Şekil 4.39.'da ise Ti-NP'lerin 10 bin kat büyütmedeki görünümleri bulunmaktadır. Burada nanopartiküllerin net bir şekle sahip olmamakla birlikte üçgensel özellikte ve birleşmiş yapıda oldukları gözlemlenmektedir.



Şekil 4.39. Ti-NP SEM görüntüsü-10 K büyütme.

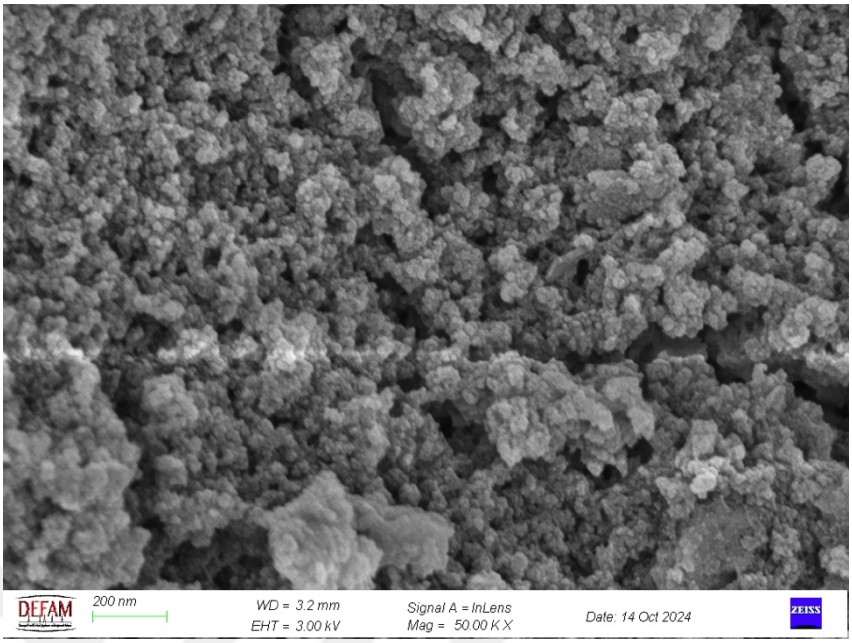
Şekil 4.40.'da ise Ti-NP'lerin 5 bin katlık büyütmedeki görünümleri bulunmaktadır. Bu nanopartiküllerin aglomere olarak bir arada bulundukları, düzensiz yapıda oldukları gözlemlenmektedir.



Şekil 4.40. Ti-NP SEM görüntüsü-5 K büyütme.

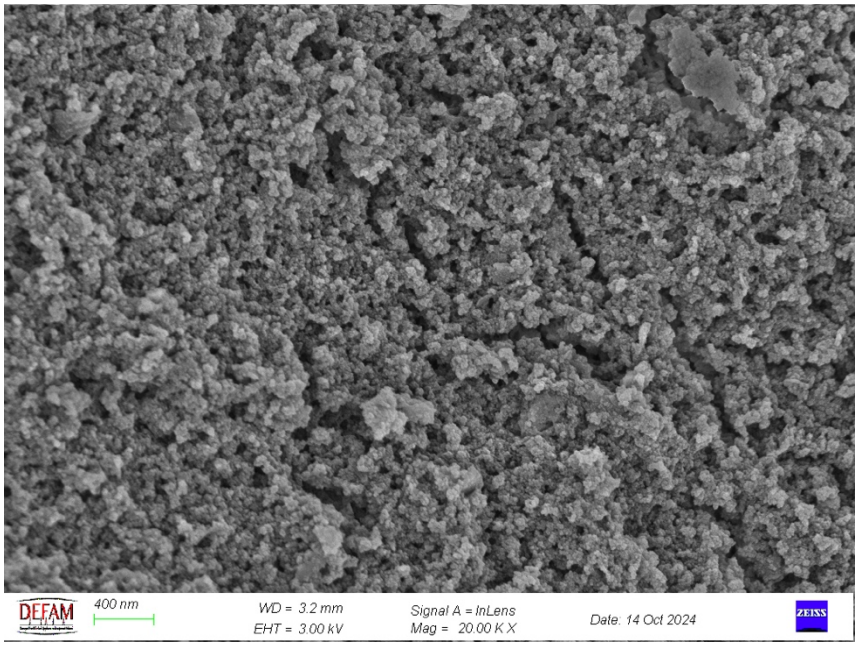
Şekil 4.41.'de Zn-NP'lerin 50 bin katlık büyütmedeki görünümleri bulunmaktadır. Bu nanopartiküller ayırt edilebilir bir şekle sahip olmadıkları için

boyut ölçümleri bu analiz üzerinden yapılamamıştır. Küresel ve düzensiz bir dağılıma sahiptirler.



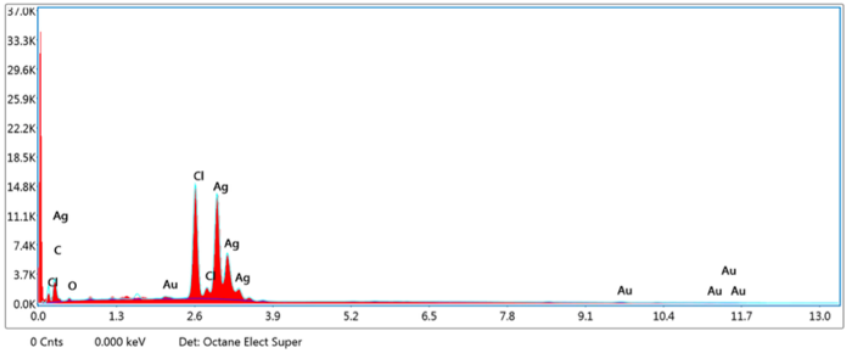
Şekil 4.41. Zn-NP SEM görüntüsü-50 K büyütme.

Şekil 4.42.'de Zn-NP'lerin 20 bin katlık büyütmedeki görünümleri bulunmaktadır. Düzensiz yapıda gözlemlenseler de bu nanopartiküller boyut olarak oldukça küçük, birbirleriyle birleşme eğilimindedirler.



Şekil 4.42. Zn-NP SEM görüntüsü-20 K büyütme.

SEM analiziyle nanopartiküllerin morfoloji, boyut ve dağılımları ile ilgili bilgiler edinilmiştir. Bunun yanında EDX ile seçilen bölgelerde nanopartiküllerin elementel içerik tayinleri de yapılmıştır. Sonuçlar yüzde ağırlığa göre verilmiştir. Şekil 4.43.'te Ag-NP'ye ait EDX analizi bulunmaktadır. Burada en yüksek elementel içerik %52,35 ile gümüş elemente aittir. Daha sonra yüzdelik değerleri büyükten küçüğe olarak klor, karbon, altın ve oksijen bulunmaktadır. Altın, yüzey kaplamadan kaynaklanırken, diğer elementler yıkamadan veya yıkama ile arınmayan ekstraktlardan kaynaklanmaktadır.

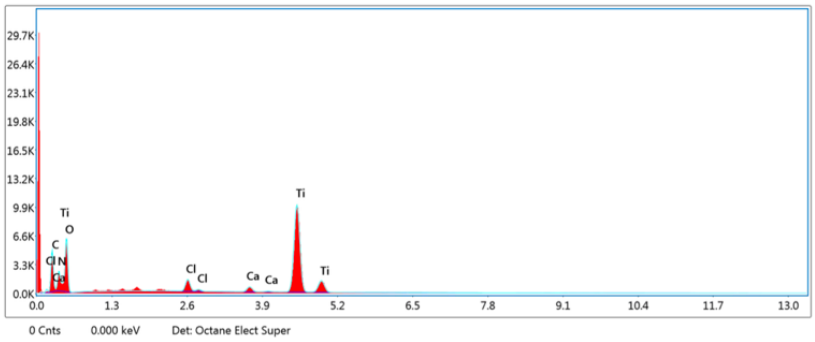


Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	19.83	56.78	577.57	10.62	0.0436	1.2860	0.1711	1.0000
O K	2.20	4.73	85.48	16.48	0.0026	1.2378	0.0953	1.0000
ClK	21.78	21.13	6791.66	2.97	0.2041	1.0674	0.8532	1.0292
AgL	52.35	16.69	6831.95	2.06	0.4215	0.8610	0.9357	0.9993
AuL	3.84	0.67	73.47	33.66	0.0268	0.6742	1.0256	1.0097

Şekil 4.43. Ag-NP EDX analizi.

Şekil 4.44.'te ise Ti-NP'nin EDX elementel analizi sonuçları bulunmaktadır. Buradaki titanyum elementi yüzdesi 31,59'dur. En yüksek oran ise %39,16 ile oksijen olmuştur. Geriye kalan elementler yüzdesel olarak büyükten küçüğe karbon, azot, klor ve kalsiyum olarak sıralanmaktadır. Yıkamadan kalan elementler ile titanyum için kullanılan prekürsör çözeltisi bu elementlerin nanopartikül yüzeyinde bulunmasına yol açmıştır.

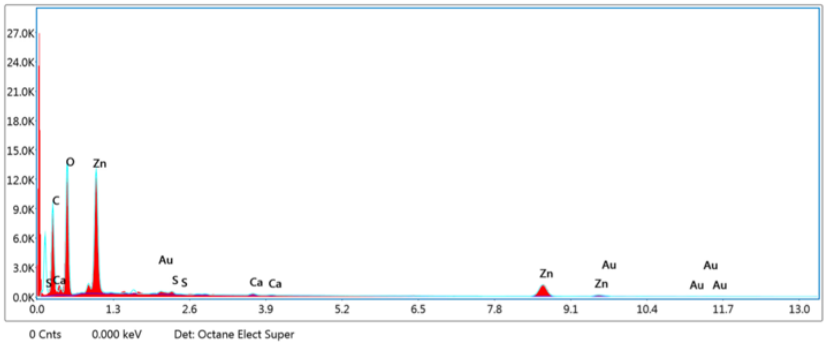


Smart Quant Results

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	18.41	29.15	1081.90	8.09	0.0774	1.1063	0.3803	1.0000
N K	7.33	9.95	356.28	11.41	0.0169	1.0819	0.2137	1.0000
O K	39.16	46.56	1682.71	10.45	0.0484	1.0604	0.1166	1.0000
ClK	2.14	1.15	653.76	3.72	0.0186	0.9014	0.9436	1.0219
CaK	1.36	0.65	321.27	5.05	0.0133	0.9141	1.0012	1.0637
TiK	31.59	12.55	6094.12	1.66	0.2665	0.8289	1.0113	1.0067

Şekil 4.44. Ti-NP EDX analizi.

Zn-NP EDX sonuçları Şekil 4.45.'te verilmiştir. En yüksek elementel %43,67 ile oksijen olmuştur. Onu %39,48 ile karbon takip etmektedir. Çinko yüzdesi 13,55 olarak tespit edilmiştir. Geriye kalan elementler ise altın, sülfür ve kalsiyumdur. Zn-NP sentezinde kullanılan öncül metal $ZnSO_4$ olduğu için sülfür prekürsörden kaynaklanabilir. Diğer elementler ise yıkamadan geriye kalan ve nanopartikül yüzeyinde biriken elementlerdir.



Smart Quant Results

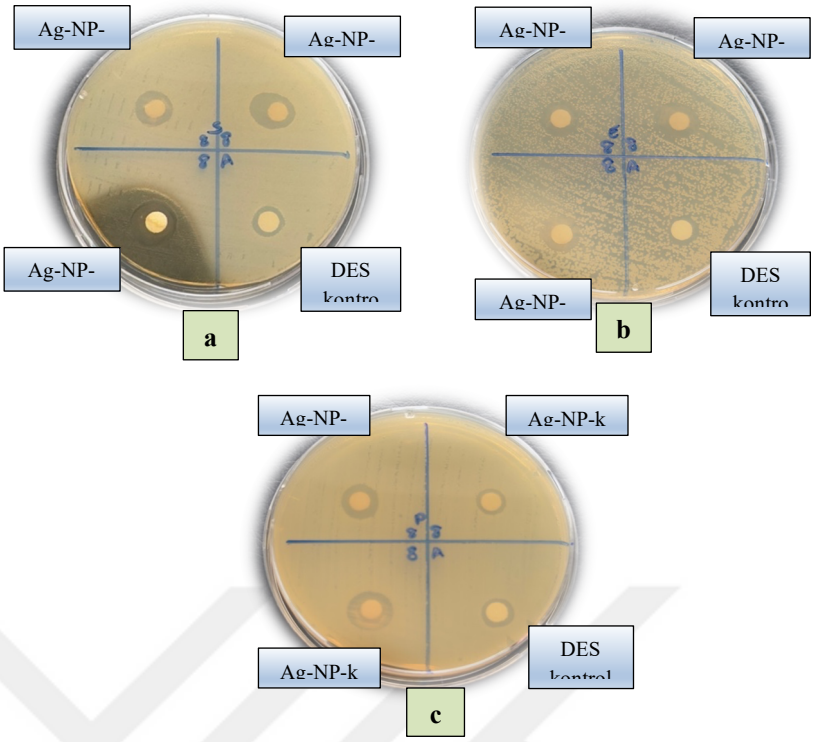
Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	A	F
C K	39.48	52.51	2452.48	8.04	0.1510	1.0657	0.3588	1.0000
O K	43.67	43.61	3913.75	9.33	0.0968	1.0208	0.2172	1.0000
S K	0.42	0.21	143.71	13.00	0.0032	0.9110	0.8529	1.0067
CaK	0.40	0.16	100.18	12.08	0.0036	0.8788	0.9861	1.0304
ZnK	13.55	3.31	1013.17	3.44	0.1108	0.7486	1.0139	1.0772
AuL	2.48	0.20	45.43	33.20	0.0135	0.5243	1.0420	0.9953

Şekil 4.45. Zn-NP EDX analizi.

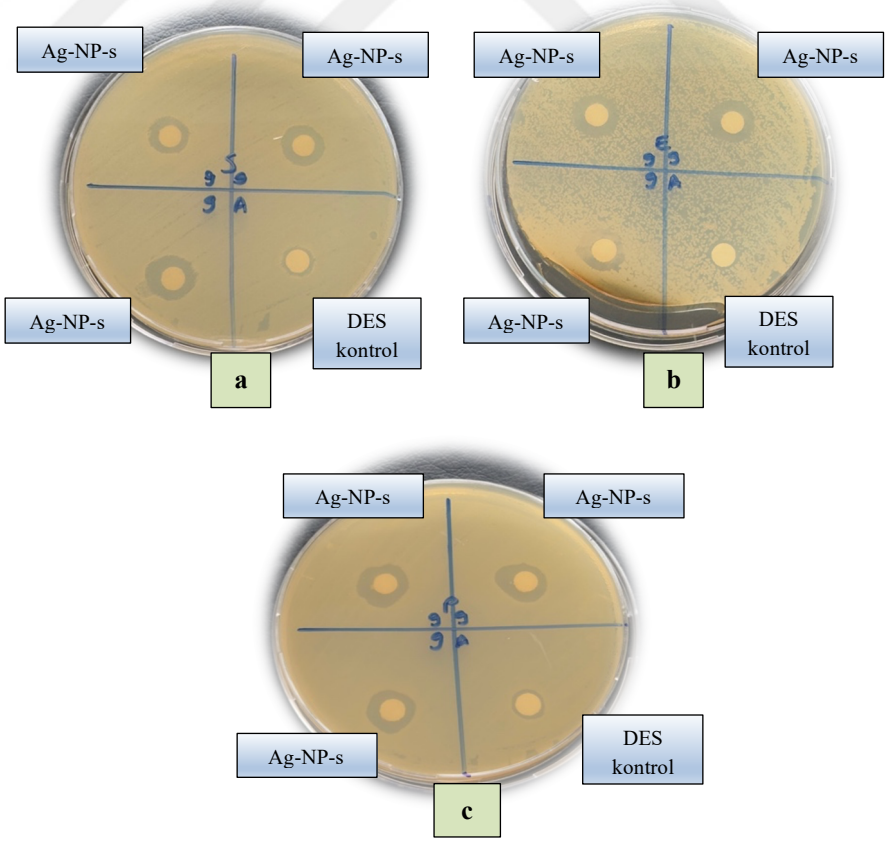
4.6.6 Antibakteriyel aktivite

En iyi çalışma koşullarının belirlenmesi sonrasında elde edilen nanopartiküllere antibakteriyel aktivite testleri üçer tekrarlı olarak uygulanmıştır. Nanopartiküllerin hem üretim sonrası sıvı hallerine hem de liyofilizasyon sonrası toz haline getirilmiş hallerine bu test uygulanmıştır. Toz nanopartiküller 2 mg/mL olacak şekilde suda çözünmüştür. Titanyum nanopartikülünde yeterince toz örnek elde edilemediği için sadece sıvı formdaki haline bu test uygulanmıştır. Antibakteriyel aktivite testinde kullanılan yöntem Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemidir. Burada Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* kullanılırken, Gram negatif bakteri olarak ise *Escherichia coli* bakterisinin yanında laboratuvara sonradan dahil olan *Pseudomonas aeruginosa* suşu da test edilmiştir. Ayrıca sentezde kullanılan molaritelerde prekürsör olan metal çözeltilerinde de antibakteriyel aktivite testi uygulanmıştır. Negatif kontroller olarak ChCl:Üre (1:2) DES sistemi ve distile, pozitif kontrol olarak Gentamisin antibiyotiği kullanılmıştır. Üç tekrarlı yapılan testin ortalama sonuçları alınmıştır.

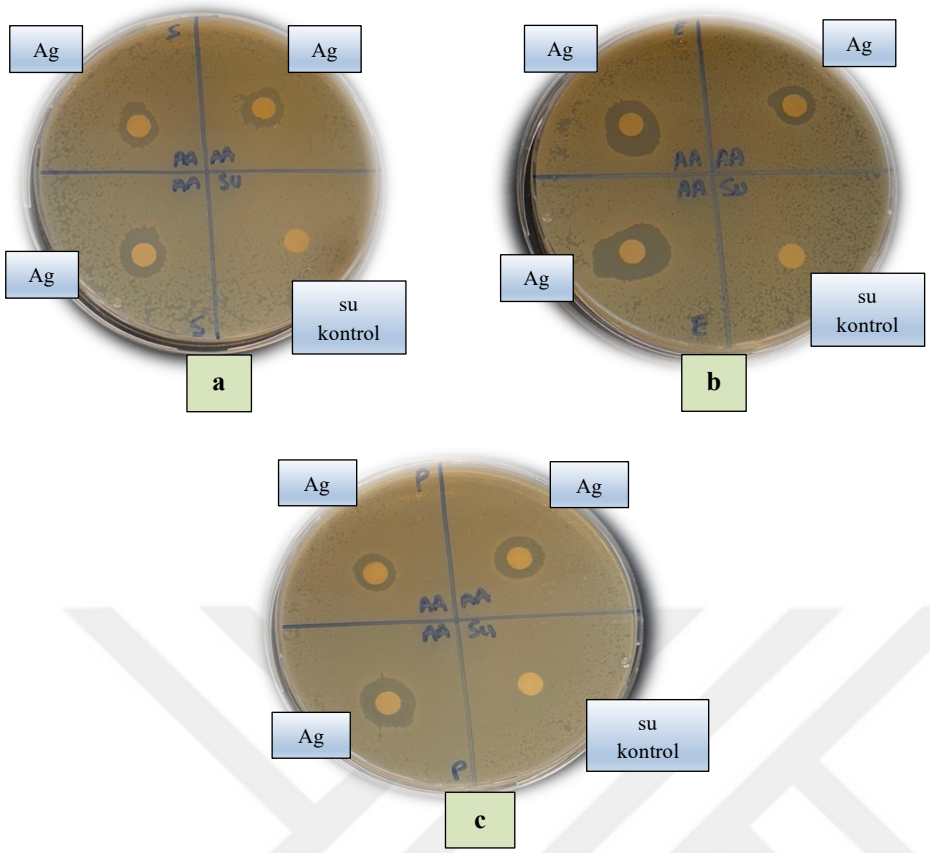
Şekil 4.46., 4.47. ve 4.48.'de sırasıyla Ag-NP katı toz haldeki nanopartiküllerin su ile homojenize hale getirilmiş formlarının, Ag-NP üretim ortamından alınmış sıvı formlarının ve 1,891 mM konsantrasyondaki $AgNO_3$ metal çözeltisinin a) *S. aureus* b) *E. coli* ve c) *P. aeruginosa* bakterilerindeki antibakteriyel analiz sonuçlarının görselleri verilmiştir. Çözünmüş nanopartikülün en yüksek inhibisyon zonu *S. aureus* bakterisinde 11,485 mm olarak ölçülmüştür. Gram negatif bakterilerdeki zon çapları ise 10,866 ve 10,108 mm'dir. Sıvı haldeki inhibisyon zon çapları ise 11,212 mm, 11,131 mm ve 10,740 mm olarak sırasıyla *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'de ölçülmüştür. $AgNO_3$ metal çözeltisi ise en yüksek antibakteriyel aktivitesini 13,908 mm zon çapıyla *E. coli* bakterisinde göstermiştir. 11,421 mm ve 10,821 mm ile *P. aeruginosa* ve *S. aureus* onu takip etmiştir. Gümüş metalinin kendisi de antibakteriyel özelliğe sahiptir. Bu özelliği nanopartikül formlarında da bulunmaktadır (Tablo 4.29.).



Şekil 4.46. Ag-NP katı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa.*



Şekil 4.47. Ag-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*.

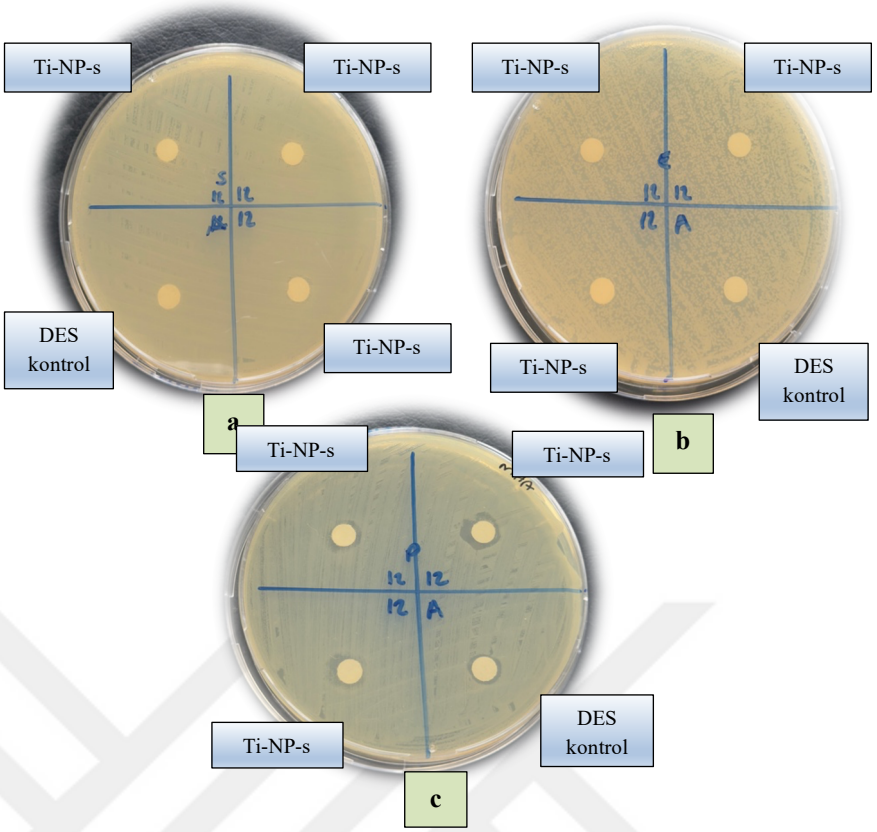


Şekil 4.48. Ag metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*.

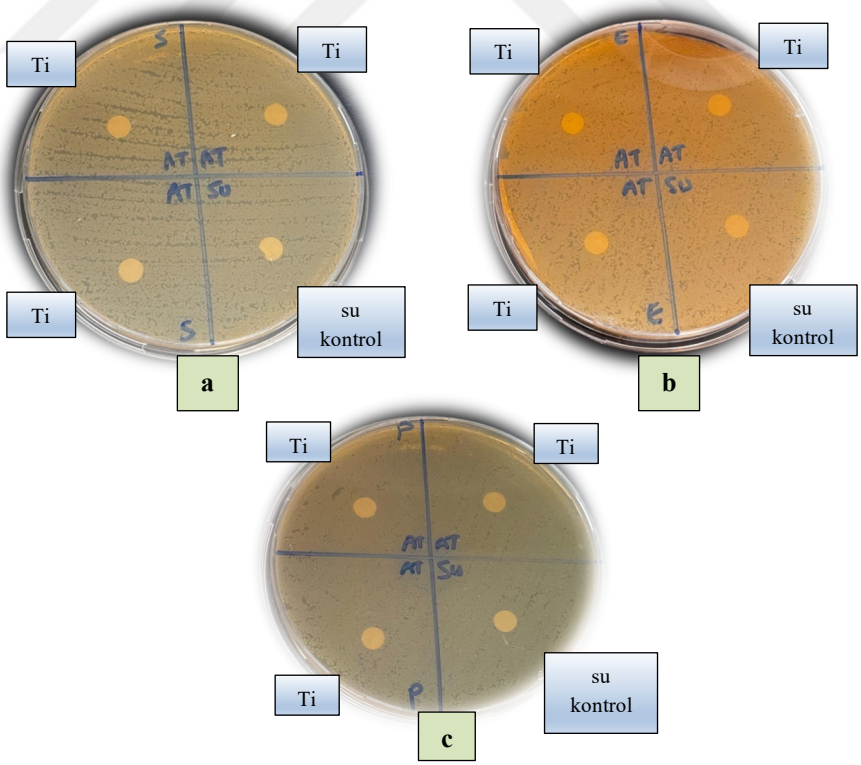
Tablo 4.29. Ag-NP antibakteriyel aktivite sonuçları.

Örnekler/İnhibisyon çapları (mm)	***S. aureus***	***E. coli***	***P. aeruginosa***
Ag-NP Katı form	11,485	10,866	10,108
Ag-NP Sıvı form	11,212	10,740	11,131
Ag-kontrol	10,821	13,908	11,421

Şekil 4.49. ve 4.50. ise sırasıyla Ti-NP üretim ortamından alınmış sıvı formlarının ve 5,528 mM konsantrasyondaki titanyum metal çözeltisinin a) *S. aureus* b) *E. coli* ve c) *P. aeruginosa* bakterilerindeki antibakteriyel analiz sonuçlarının görselleri verilmiştir. Burada sadece Ti-NP sıvı formunun *P. aeruginosa* bakterisinde 9,465 mm'lik bir zon çapı gösterdiği söylenebilir (Tablo 4.30.). Titanyum kontrol çözeltisi ise hiçbir bakteride aktivite göstermemiştir.



Şekil 4.49. Ti-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** S. aureus, **b)** E. coli, **c)** P. aeruginosa

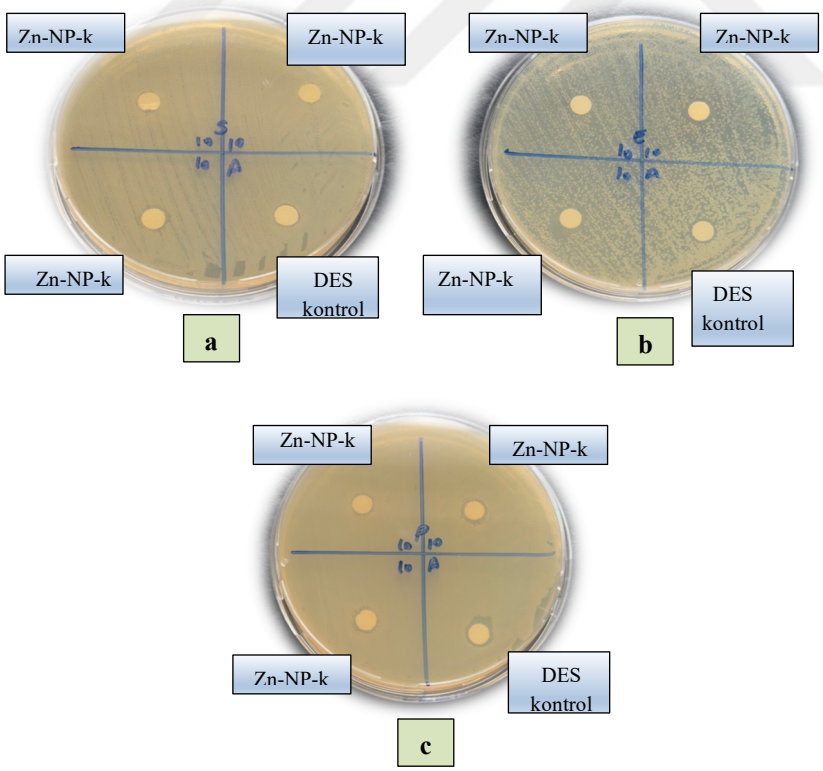


Şekil 4.50. Ti metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*.

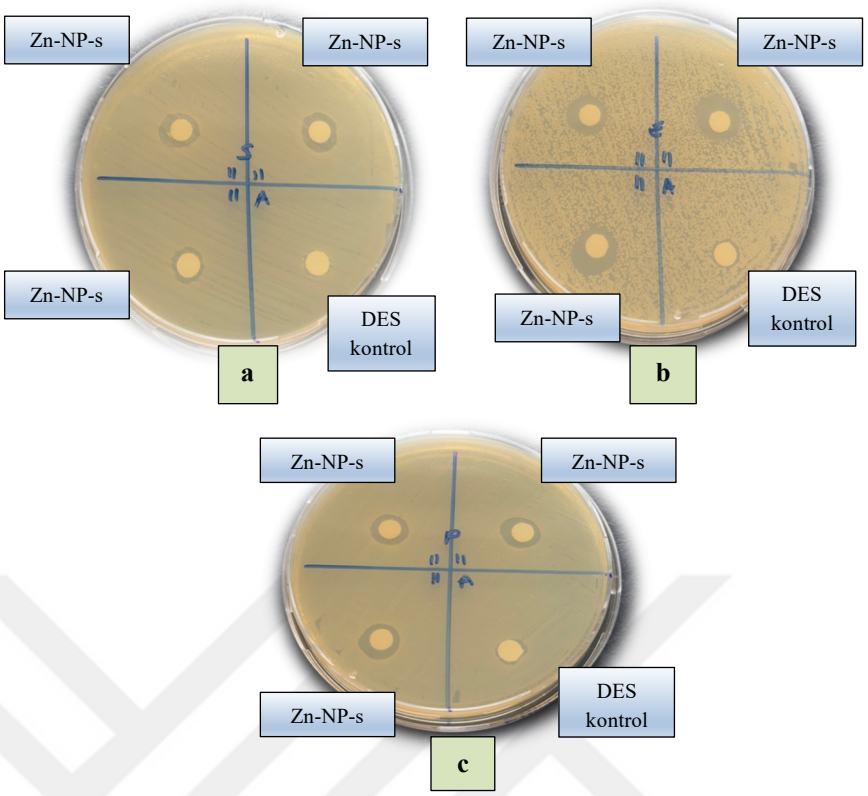
Tablo 4.30. Ti-NP antibakteriyel aktivite sonuçları.

Örnekler/İnhibisyon çapları (mm)	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
Ti-NP Sıvı form	0	0	9,465
Ti-kontrol	0	0	0

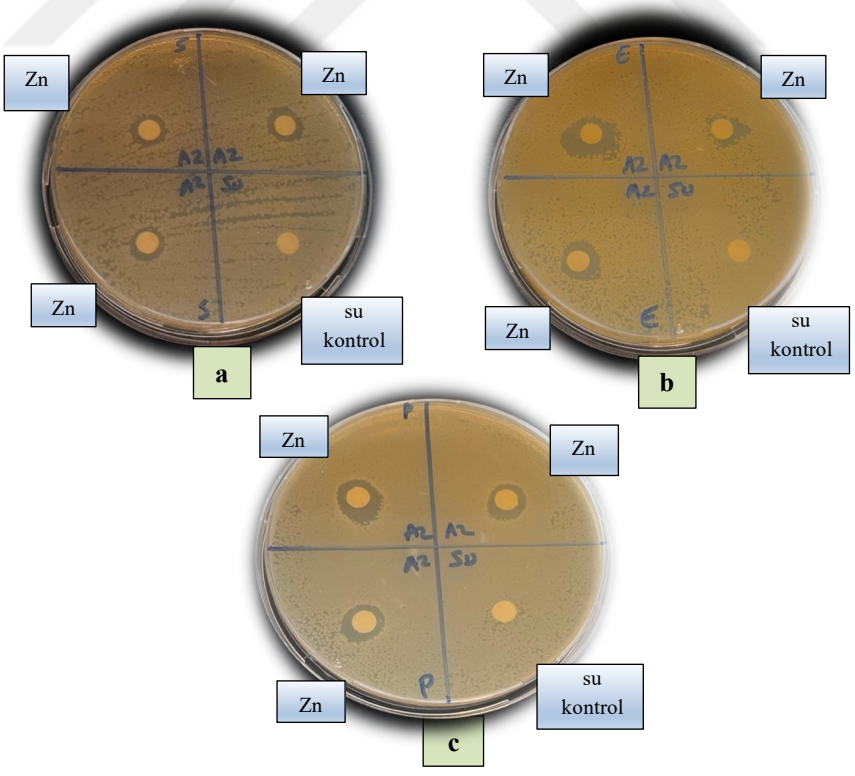
Şekil 4.51., 4.52. ve 4.53.'te sırasıyla Zn-NP katı toz haldeki nanopartiküllerin su ile homojenize hale getirilmiş formlarının, Zn-NP üretim ortamından alınmış sıvı formlarının ve 8,609 mM konsantrasyondaki $ZnSO_4$ metal çözeltisinin a) *S. aureus* b) *E. coli* ve c) *P. aeruginosa* bakterilerindeki antibakteriyel analiz sonuçlarının görselleri verilmiştir. Çözünmüş nanopartikülün en yüksek zon çapı *S. aureus* bakterisinde 7,940 mm olarak ölçülmüş, 7,275 mm ve 6,889 mm zon çaplarıyla *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterileri onu takip etmiştir. Sıvı formdaki Zn-NP ise 11,620 mm ile en yüksek zon çapını *E. coli* bakterisinde göstermiştir. Diğer bakteriler de ise zon çapları 8,673 mm olarak ölçülmüştür. Sıvı formdaki nanopartikül daha güçlü yanıtlar vermiştir. Çinko metalinin kendisinde de antibakteriyel aktivite bulunmaktadır. *E. coli*'de 11,642 mm, *P. aeruginosa*'da 11,172 mm ve *S. aureus*'ta 8,725 mm olarak zon çapları ölçülmüştür (Tablo 4.31.).



Şekil 4.51. Zn-NP katı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*



Şekil 4.52. Zn-NP sıvı form ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** S. aureus, **b)** E. coli, **c)** P. aeruginosa.



Şekil 4.53. Zn metal çözeltisi ve su kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*.

Tablo 4.31. Zn-NP antibakteriyel aktivite sonuçları.

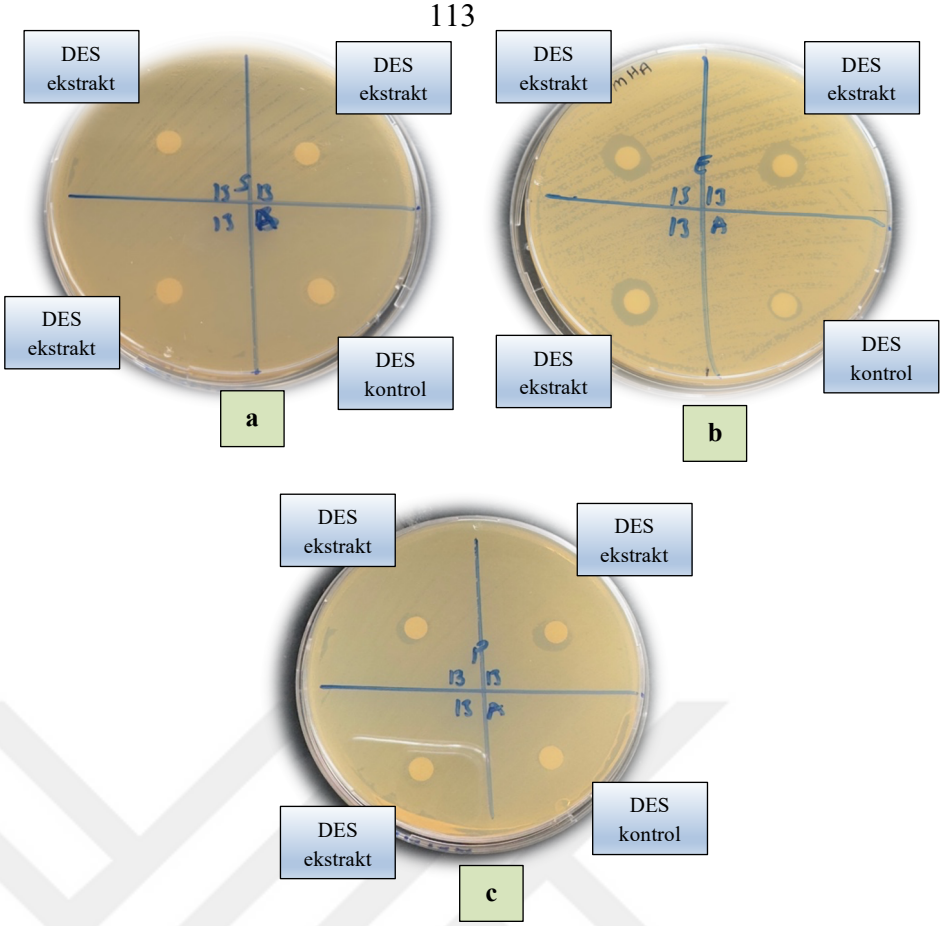
Örnekler/İnhibisyon çapları (mm)	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
Zn-NP Katı form	7,940	7,275	6,889
Zn-NP Sıvı form	8,673	11,620	8,673
Zn-kontrol	8,725	11,642	11,172

Şekil 4.54.'te ise ChCl:Üre (1:2) DES ile ekstrakt edilmiş deniz çayırı ekstraktının ve bu DES sisteminin kendisinin a) *S. aureus* b) *E. coli* ve c) *P. aeruginosa* bakterilerindeki antibakteriyel analiz sonuçlarının görselleri verilmiştir. Bu sonuçlara göre DES ekstraktı *S. aureus*'a göre aktivite sergilememiş, *E. coli*'de 11,218 mm'lik, *P. aeruginosa*'da 7,553 mm'lik zon çapı oluşturmuştur. DES sisteminin kendisi *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinde sırasıyla 8,450 mm, 7,790 mm ve 7,780 mm'lik zon çapı göstermiştir. Tablo 4.32.'deki sonuçlara göre suyun kendisinin antibakteriyel aktivitesinin olmaması doğrulanmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olan Gentamisin *E. coli*'de 35, 372 mm, *P. aeruginosa*'da 32,366 mm ve *S. aureus*'ta 29,320 mm'lik zon çapı oluşturmuştur (Tablo 4.32.).

Sonuç olarak gümüş ve çinko nanopartiküllerinde titanyum nanopartikülüne göre daha güçlü antibakteriyel aktivite saptanmıştır. Gümüş nanopartikülün hem katı hem sıvı formunda zon oluşurken, çinko nanopartikülünde sıvı formdaki zon katı formundan daha büyüktür. Ekstraktın kendisi *E.coli* bakterisinde daha fazla zon oluşturmuş, negatif kontrol suda herhangi bir zon elde edilmemiştir. Gümüş ve çinko çözeltilerinin kendilerinde de zon oluşumu gözlemlenmiştir. Genel olarak üretim sıvısında DES ve ekstraktın etkileriyle birlikte nanopartiküller antibakteriyel aktivite göstermişler. Saflaştırma ve kurutma sonrasında suda çözünen toz formları da bu halde bile antibakteriyel özelliklerini korumuştur.

Tablo 4.32. Ekstrakt ve kontrollerin antibakteriyel sonuçları.

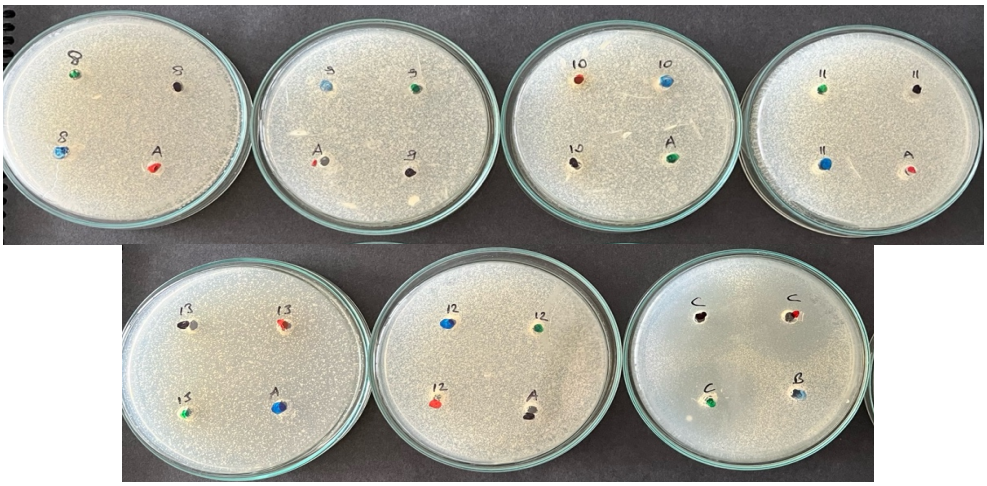
Örnekler/İnhibisyon çapları (mm)	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
DES ekstraktı	0	11,218	7,553
Su kontrol	0	0	0
Pozitif kontrol	29,320	35,372	32,366
DES kontrol	8,450	7,790	7,780



Şekil 4.54. DES ekstrakt ve DES kontrol antibakteriyel sonuçları **a)** *S. aureus*, **b)** *E. coli*, **c)** *P. aeruginosa*.

4.6.7 Antifungal aktivite

Nanopartiküllerin hem çözünmüş hallerine hem de üretim ortamından direkt olarak alınmış sıvı hallerinin *C. albicans*'a karşı antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Bu nanopartiküllerin yanı sıra DES'in kendisi, DES ekstraktı ve pozitif kontrol olarak Flukanozol de bu testte kullanılmıştır (Şekil 4.55.). Ancak pozitif kontrol dışında bir zon elde edilememiştir. Flukanozol ortalama zon çapı 31 mm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.55. *C. albicans*' a karşı antifungal aktivite çalışması.

4.6.8 Antioksidan aktivite

Nanopartiküllerin hem çözünmüş hallerine hem de üretim ortamından direkt olarak alınmış sıvı hallerine üç tekrarlı olarak DPPH metoduna göre antioksidan aktivite testi uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak ise metanol çözeltisi kullanılmıştır. Tablo 4.33.'ten elde edilen verilere göre nanopartiküllerde antioksidan aktivite tayin edilememiştir. Nanopartiküllerin yapısı gereği bulanıklılıktan dolayı absorbans okumalarında sapmalar meydana gelmiştir.

Tablo 4.33. Nanopartiküllerin antioksidan aktivite sonuçları.

	1	**2**	**3**	**Ortalama Absorbans**	**%inhibisyon**
Ag-NP Katı	2,569	2,604	2,660	2,611	-181,358
Ag-NP Sıvı	0,948	0,957	1,023	0,976	-5,172
Ti-NP Katı	0,997	0,940	0,905	0,947	-2,083
Ti-NP Sıvı	0,865	0,896	1,015	0,925	0,287
Zn-NP Katı	1,002	1,043	1,081	1,042	-12,284
Zn-NP Sıvı	0,987	1,006	0,994	0,996	-7,292
Metanol	0,913	0,925	0,946	0,928	(pozitif kontrol)

4.6.9 Antibiyofilm aktivite

Nanopartiküllerin sıvı halleriyle birlikte DES ekstraktı ve DES'in kendisine antibiyofilm aktivite testi uygulanmıştır. Yüzde biyofilm inhibisyonu formülüne absorbans değerleri yazılıp gerekli hesaplamalar yapıldığında sadece Ag-NP'de %13,66 oranında bir inhibisyon tespit edilmiştir (Tablo 4.34.).

Tablo 4.34. Nanopartiküllerin antibiyofilm aktivite sonuçları.

	1	2	3	Ortalama Absorbans	Antibiyofilm Aktivite
Kontrol	0,112	0,188	0,132	0,144	
Ag-NP	0,117	0,124	0,132	0,124	%13,66
Ti-NP	0,156	0,234	0,169	0,186	%-29,40
Zn-NP	0,194	0,175	1,171	0,513	%-256,48
DES	0,182	0,163	0,2	0,182	%-26,16
DES Ekstraktı	0,164	0,189	0,191	0,181	%-25,93

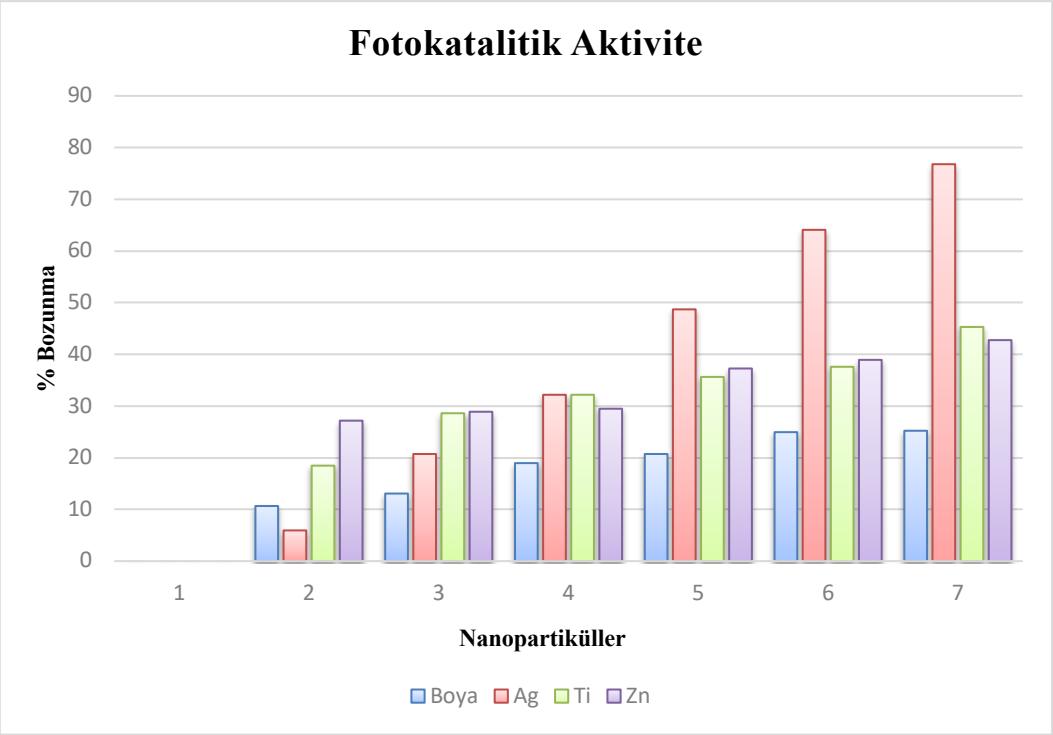
4.6.10 Fotokatalitik aktivite

Üretilen nanopartiküllerin UV lamba ve metilen mavisi ile fotokatalitik aktivitesi Şekil 4.56.'daki görselde verilmiştir. Nanopartiküllerin hem sıvı hem de katı formlarına bu test uygulanmıştır. Katı formlar 2 mg/mL olacak şekilde suda homojenize edilmiştir. Bu nanopartikül formu daha başarılı sonuçlar vermiştir (Şekil 4.57.). Ag, Ti ve Zn nanopartiküllerinin yanında metilen mavisinin kendisi de kontrol olarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.56. Fotokatalitik aktivite deney düzeneği.

0. dakikadan 120. dakikaya kadar 7 farklı zamanda örnek alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Şekil 4.57.'den elde edilen verilere göre gümüş nanopartikülü 120. dakika sonunda %76,78 değeriyle en yüksek fotokatalitik aktivite göstermiştir. Bu süre sonunda Ti-NP, Zn-NP ve boyanın kendisi sırasıyla %45,29, %42,75 ve %25,22 oranlarından fotokatalitik aktivite sergilemişlerdir.



Şekil 4.57. Zamana göre nanopartiküllerin fotokatalitik aktiviteleri.

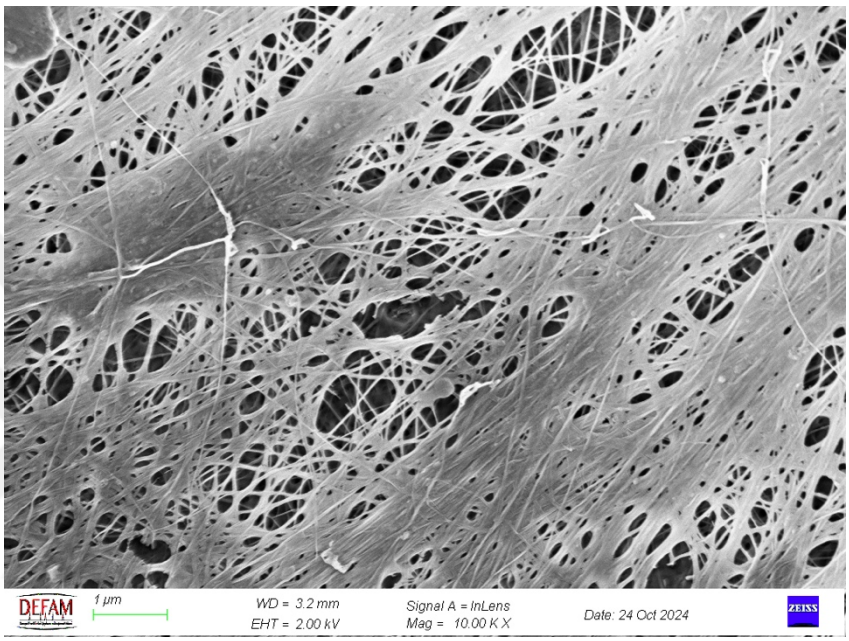
4.7 Gümüş Nanopartikül Katkılı Kompozit Bakteriyel Selüloz Membranı Üretimi, Karakterizasyonu ve Filtrasyon Uygulamaları

ChCl:Üre (1:2) DES sistemi seçilerek ekstraksiyonu gerçekleştirilen deniz çayırı ekstraktı başlangıç materyali olarak kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri üretilmiştir. Yapılan karakterizasyon ve biyolojik aktivasyon çalışmalarından hareketle aktivitesi ve kararlı yapısı göz önünde bulundurularak gümüş nanopartikülü seçilmiş ve membran sistemlerindeki potansiyel uygulamalar araştırılmıştır. Bu amaçla atık su arıtımında kullanılmak üzere membran sistemi olarak BS üretilerek kompozit hale getirilmesi ve gümüş nanopartikülün bu kompozit membranda uygulama bulması hedeflenmiştir. Kompozit membran oluşturmak için öncelikle glutaraldehitle kitosanın çapraz bağlama reaksiyonuyla BS yapısına dahil edilmesi sağlanmıştır. Glutaraldehit, yüksek etkinliği nedeniyle çapraz bağlama reaksiyonunda şimdiye kadar en yaygın kullanılan kimyasallardan biridir. Bu nedenle BS ve kitosan arasında çapraz bağlanma reaksiyonunu başlatmak için kullanılmıştır. Glutaraldehit, sırasıyla selüloz ve kitosanda bulunan hidroksil ve amin gruplarında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır (Chen et al., 2014). Ardından üretilmiş olan Ag-NP ile bu biyolojik materyalin kaplanması sağlanmıştır. Elde edilen kompozit BS membranı ve kontrol

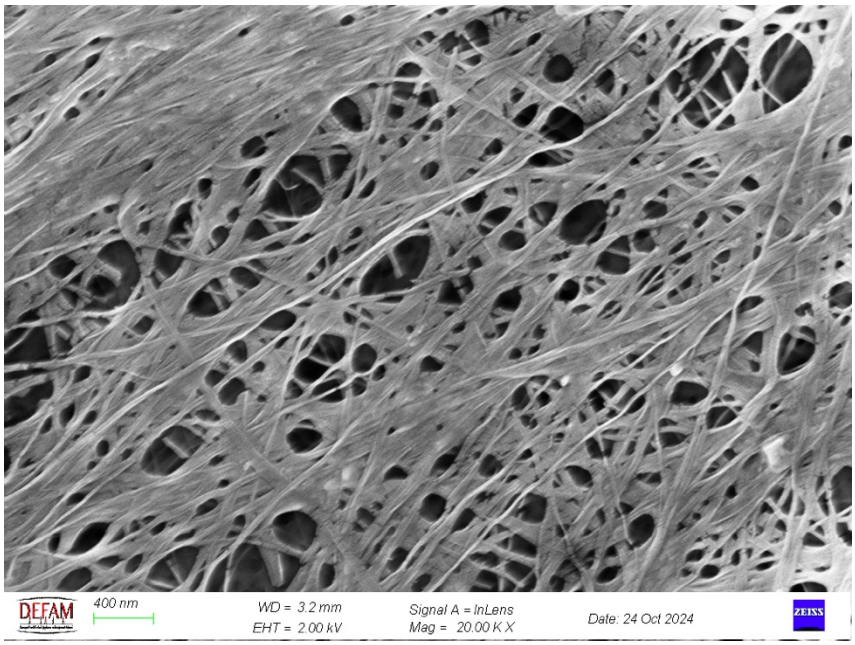
olarak modifiye edilmemiş BS membranı morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla öncelikle SEM analizi yapılmıştır.

4.7.1 Karakterizasyon

Şekil 4.58. ve Şekil 4.59.'da modifiye edilmemiş saf bakteriyel selülozun 10 bin ve 20 bin büyütmedeki SEM görüntüler bulunmaktadır. Burada BS'nin ağsı fibril yapısı gözlemlenebilmektedir. BS ekstraselüler bir polimerdir ve saflaştırma işleminden sonra bakteriler selüloz fibrillerinden uzaklaştırılır.

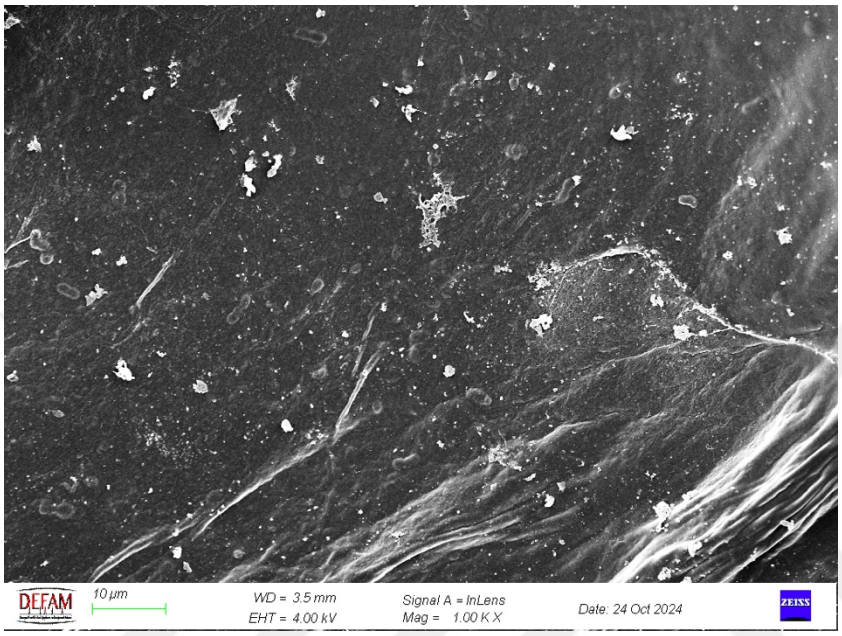


Şekil 4.58. Modifiye edilmemiş saf selülozun SEM görüntüsü-10 K büyütme.

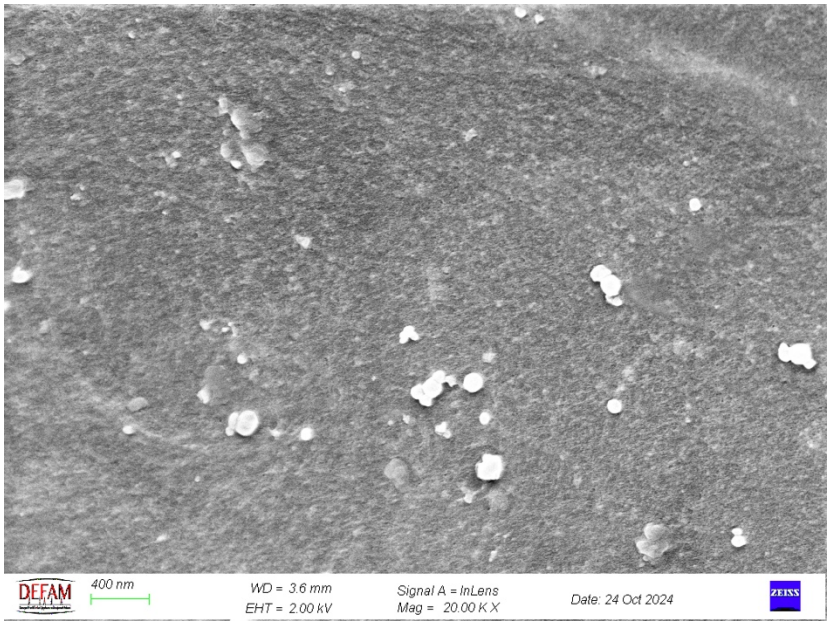


Şekil 4.59. Modifiye edilmemiş saf selülozun SEM görüntüsü-20 K büyütme.

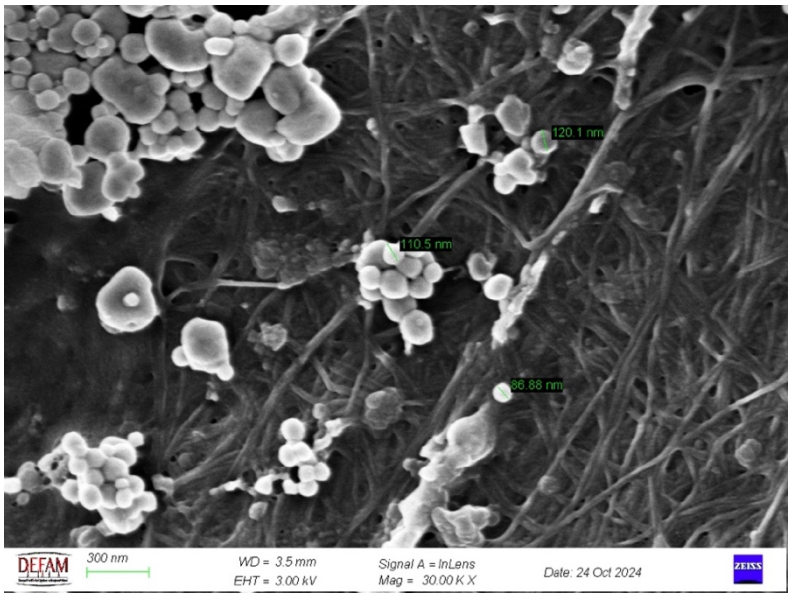
Şekil 4.60. ve 4.61.'de ise kompozit BS'nin bin ve 20 bin kat büyütmedeki görüntüleri bulunmaktadır. Glutaraldehit ve kitosan daldırma işleminden sonra, BS membranın mikro gözenekleri neredeyse tamamen kaybolmuş ve daha kompakt bir yapı ortaya çıkmıştır. Yüzeydeki Ag-NP yapıları SEM görüntülerine de yansımıştır. Ayrıca Şekil 4.62.'de bulunan SEM görüntüsünde 30 bin kat büyütmede selüloz fibrillerine tutunmuş Ag-NP boyutları yaklaşık 100 nm boyutlarında ölçülmüştür.



Şekil 4.60. Kompozit BS SEM görüntüsü-1000 büyütme.

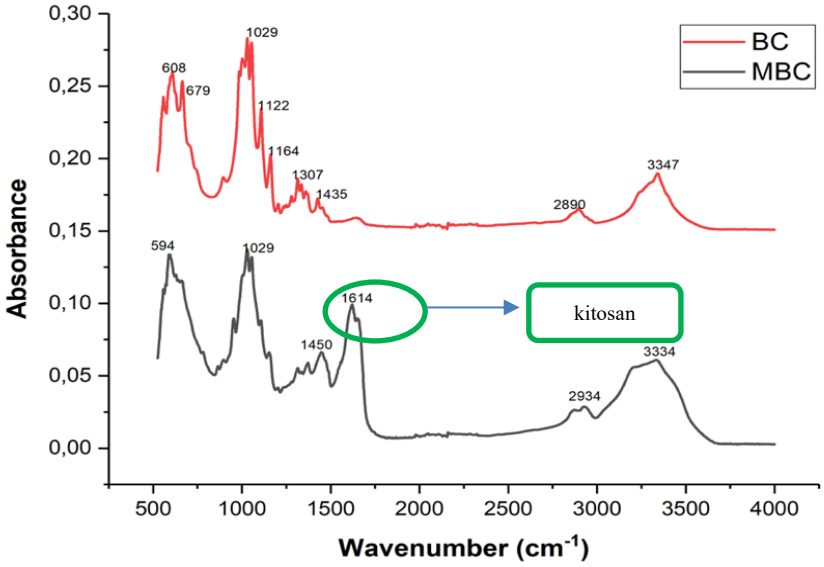


Şekil 4.61. Kompozit BS SEM görüntüsü-20 K büyütme.



Şekil 4.62. Modifiye BS üzerindeki Ag-NP'lerin görünümü ve boyutları.

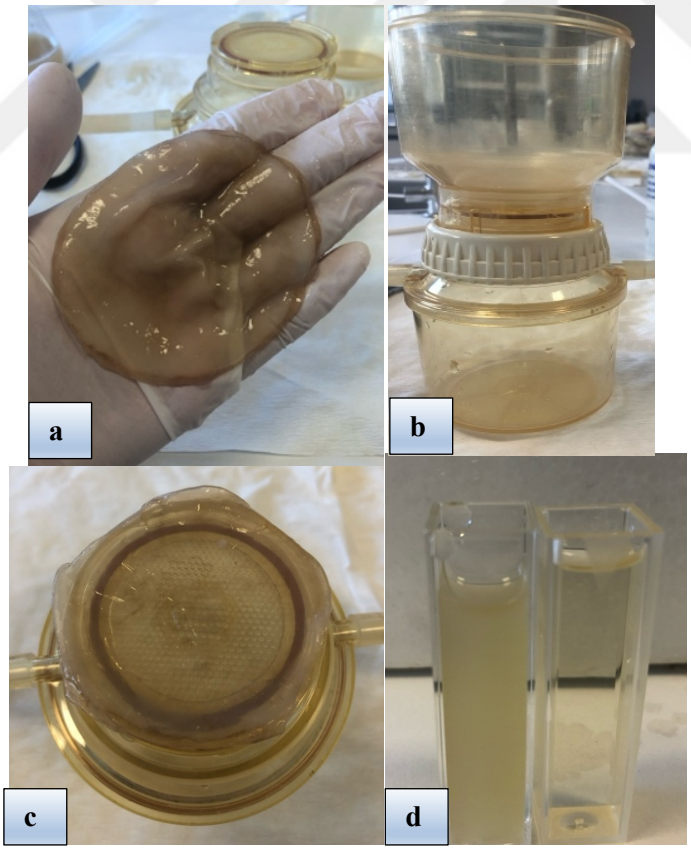
Ayrıca fonksiyonel grupların belirlenebilmesi amacıyla oda sıcaklığında kurutulmuş kompozit BS membranı ve modifiye edilmemiş kontrol BS membranının FTIR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.63.). FTIR analizinde kırmızı ile gösterilen spektrum saf BS'ye aittir. 3347, 2890, 1435, 1307, 1164, 1122, 1029, 679 ve 608 cm^{-1} dalga sayılarında oluşan pikler C-H, C-O, C-N, C-O ve C-H fonksiyonel gruplarından kaynaklanan titreşimlerle oluşan BS spesifik pikleridir. Siyah ile belirtilen spektrumda modifiye kompozit BS FTIR spektrumu bulunmaktadır. Buradaki pikler 3334, 2934, 1614, 1450, 1029 ve 594 cm^{-1} dalga sayılarında oluşmuştur. Kitosana spesifik pik 1614 cm^{-1} dalga sayısında yakalanmıştır. Bu karakterizasyon sonuçlarından hareketle kompozit BS membranın başarılı bir şekilde elde edildiği söylenebilir.



Şekil 4.63. BS membranlarının FTIR analizi.

4.7.2 Filtrasyon uygulamaları

Karakterizasyonu tamamlanan gümüş nanopartikül katkılı BS ve modifiye edilmemiş saf BS membranı farklı filtrasyon uygulamalarına tabi tutulmuştur. Öncelikle *Escherichia coli* bakterisi Nutrient Broth besi ortamında 37 °C sıcaklıkta 24 saat 120 rpm'de çalkalamalı şekilde inkübe edilerek büyütülmüştür. Ardından spektrofotometre 660 nm dalga boyunda 0.6 OD değerine denk gelecek şekilde seyreltmeler yapılarak bakteri miktarı 10^8 cfu/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. Bu konsantrasyonda *E. coli* içeren 20 ml'lik çözelti vakum altındaki filtrasyon modülünde filtrasyon membranı olarak kullanılan kompozit membrandan geçirilmiştir. Ardından filtrat sıvısının OD değeri ölçülerek başlangıç OD değeriyle kıyaslanmıştır. Aynı işlemler modifiye edilmemiş BS için de yapılmıştır. Saf selülozun başlangıç ve bitiş OD değerleri 0,685 ve 0,043 iken; modifiye bakteriyel selülozun başlangıç ve bitiş OD değerleri 0,685 ve 0,004'tür. Şekil 4.64.'te kompozit membranın yaş haliyle *E. coli* filtre etme düzeneği gösterilmiştir. Görselde filtrasyon sonrası *E. coli* içeren ortamın berrak hale dönüştüğü hali de bulunmaktadır.

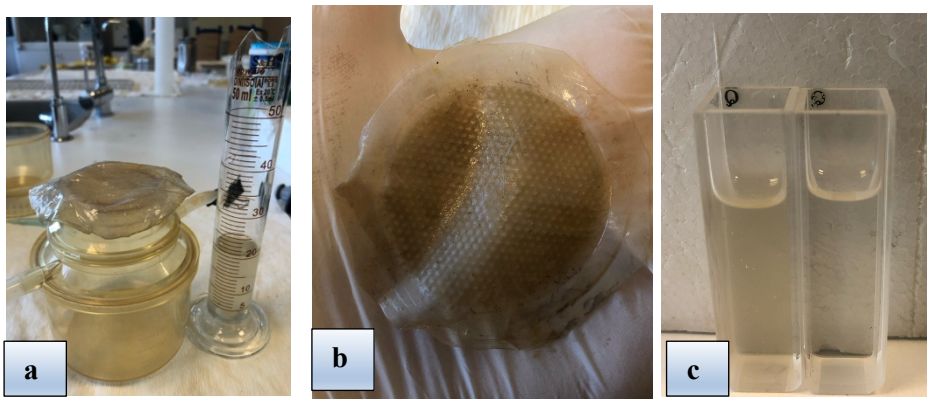


Şekil 4.64. BS-*E. coli* filtrasyon testi **a)** Kompozit BS membranı, **b)** Filtrasyon modülü yandan görünüşü, **c)** Filtrasyon modülü üstten görünüşü, **d)** Filtrasyon öncesi ve sonrası *E. coli* ortamı.

Ayrıca geliştirilmiş olan kompozit BS'nin ve saf BS'nin yüzde olarak su tutma kapasitesi ve yine yüzde olarak porozitesi ölçülmüştür. Kompozit BS'nin çap değeri 37 mm iken kalınlığı 1 mm'dir. İlk kuru ağırlığı 23,8 mg iken 24 saatlik suda bekleme süreci sonrasında yaş ağırlığı 106,1 mg olarak ölçülmüştür. Saf selülozun çap uzunluğu 35 mm, kalınlığı ise 0,5 mm olarak ölçülmüştür. İlk kuru ağırlığı 11,4 mg olarak ölçülmüş, 24 saat boyunca suda bekletilmiş ve ardından yaş ağırlığı 65,7 mg olarak ölçülmüştür.

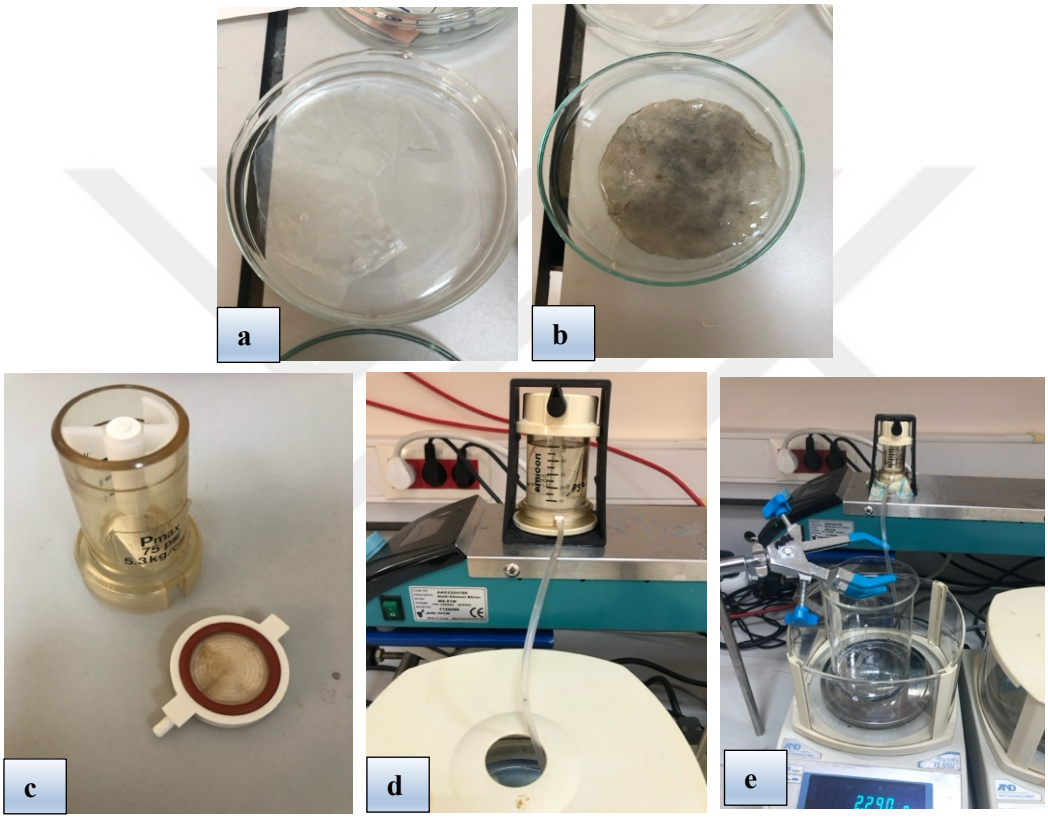
24 saatlik verilerle kompozit selülozun yüzdece su tutma kapasitesi %346 olarak saf selülozun ise %476 olarak ölçülmüştür. Kompozit BS'nin su tutma kapasitesi saf BS'ye göre daha düşük olarak elde edilmiştir. Kompozit BS'nin yüzde porozite değeri %7,65, saf BS'nin ise %11,29 olarak ölçülmüştür. Kompozit BS'nin yüzde porozite değeri daha düşük olarak tespit edilmiştir. SEM görüntüleri de bu veriyi desteklemektedir.

İkinci filtrasyon yöntemi olarak Şekil 4.65.'te görüldüğü üzere seyreltilmiş zeytin karasuyu örneği modifiye edilmiş BS membranıyla filtre edilmiştir. Şekil 4.65.a'da filtrasyon modülü ve filtre edilen örnek gösterilirken, b'de filtrasyon sonrası kompozit membranın görünümü, c'de ise sırasıyla filtre edilmemiş ve filtre edilmiş örneğinin bulanıklılığı gösterilmiştir. Aynı işlem saf BS'ye de uygulanarak türbiditeye bağlı olarak zeytin karasuyunun bulanıklılığının yüzdece giderilme verimi ölçülmüştür. Buna göre modifiye BS %54 oranında giderim sağlarken, saf BS zeytin karasuyunu %45 oranında gidererek türbiditede azalmayı sağlamıştır. BS'nin zeytin karasuyunda bulunan kirleticileri absorbe etme özelliğinden faydalanılmıştır.



Şekil 4.65. Zeytin kara suyu filtrasyonu **a)** Filtrasyon süreci, **b)** Filtrasyon sonrası membran, **c)** Filtre edilmemiş ve filtre edilmiş örnek.

Son olarak kompozit BS ve modifiye edilmemiş BS membranlarına dikey akış sistemde filtrasyon testi yapılmıştır (Şekil 4.66.). Kuru haldeki BS membranları filtrasyon öncesinde 3 saatlik bir süreçte su içerisinde bekletilerek şartlandırılmıştır. Ardından ayrı ayrı olarak farklı basınçlar altında filtrasyona tabi tutularak akı ve hidrolik su geçirgenlik değerleri hesaplanmıştır. Membranlar karıştırmalı dikey akış filtrasyon modüllerine yerleştirilerek farklı basınçlarda filtrat ağırlık değişimleri zamana göre bilgisayara bağlı teraziler yardımıyla ölçülmüştür.

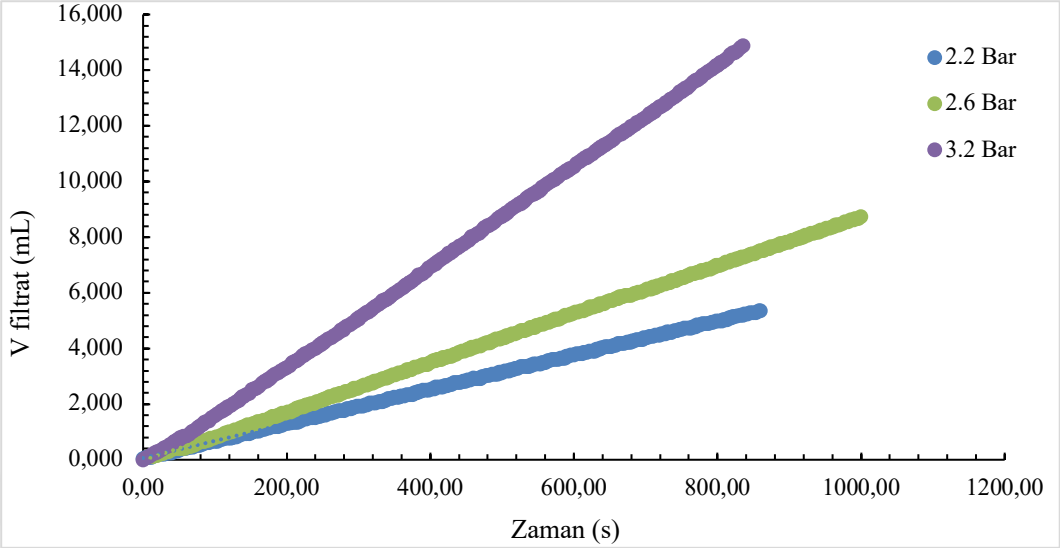


Şekil 4.66. BS-Dikey akışlı sistemde filtrasyon testi **a)** Saf BS, **b)** Kompozit BS, **c)** Filtrasyon modülü, **d)** Modülün sisteme dahil edilmesi, **e)** Filtrasyon işleminde tartım.

Şekil 4.67. ve 4.69.'daki filtrasyon verileri akı değerini (Jv, L/m^2.saat) hesaplamak için kullanılmıştır. Gerekli birim değişimleri yapılarak her bir basınç değerinde elde edilen doğruların eğimleri (Vp, mL/s) BS membran yüzey alanına (3,46 cm^2) oranlanarak hesaplanmıştır.

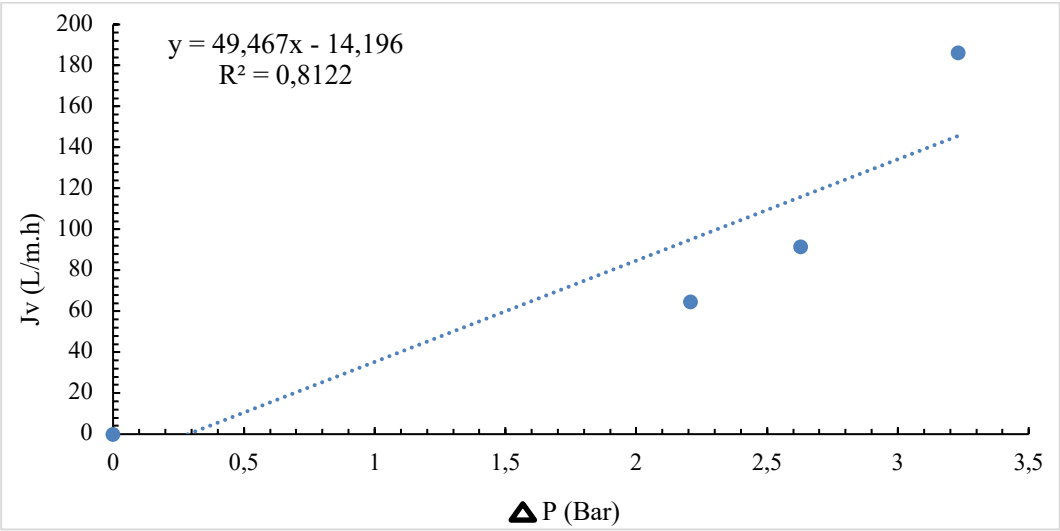
Akı değerlerinin basınca karşı değişimleri ise Şekil 4.68. ve 4.70.'te verilmiştir. Gerekli birim çevirmeleri yapılarak hesaplanan hidrolik geçirgenlik değeri (Lp, L/m^2.saat.bar) hesaplanan akı değerlerinin transmembran basınca karşı çizdirilmesiyle oluşan doğrunun eğimi kullanılarak elde edilmiştir.

Filtrat-zaman grafiklerinin R^2 değerleri 1'e yakındır. Saf selüloz için 2,2 bar, 2,6 bar ve 3,2 bar basınçtaki akı değerleri sırasıyla 64,5 L/m^2.h, 91,6 L/m^2.h ve 186,2 L/m^2.h olarak hesaplanmıştır.



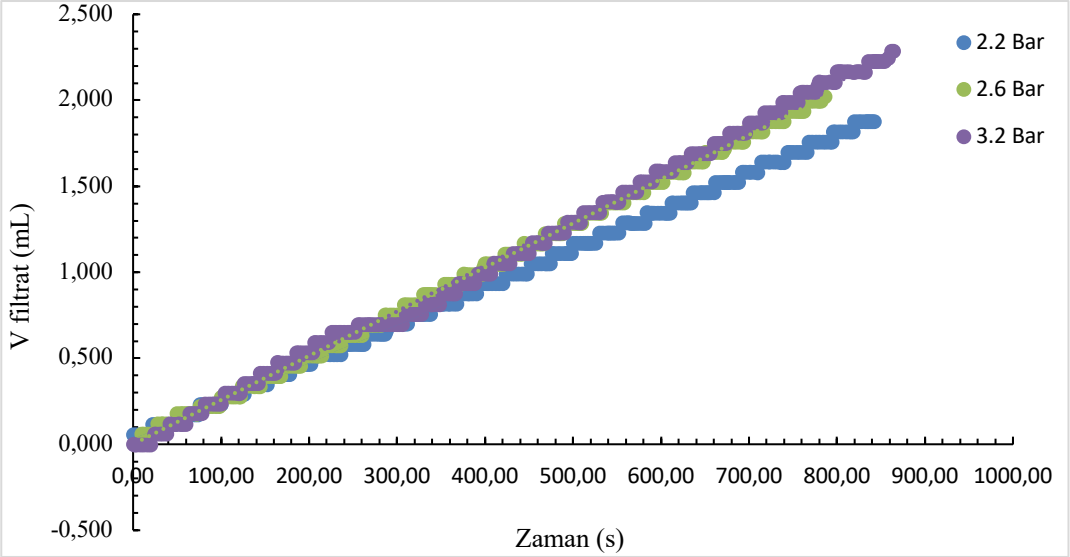
Şekil 4.67. Saf BS zamana göre farklı basınçlarda filtre edilen su miktarları.

Saf BS hidrolik geçirgenlik (Lp) değeri Şekil 4.68.'deki grafiğin eğiminden 49,47 L/m^2.h.bar olarak belirlenmiştir.



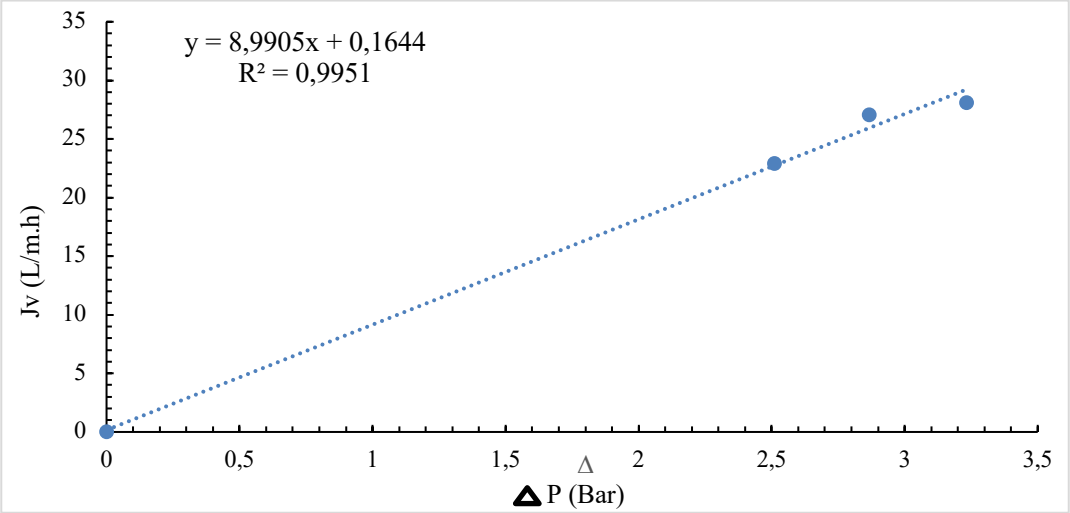
Şekil 4.68. Saf BS zamana göre hidrolik geçirgenlik grafiği.

Şekil 4.69'daki filtrat-zaman grafiğinin eğrilerinin R^2 değerleri 1'e yakındır. Kompozit BS için 2,2 bar, 2,6 bar ve 3,2 bar basınçtaki akı değerleri sırasıyla 22,9 L/m^2.h, 27,1 L/m^2.h ve 28,1 L/m^2.h olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.69. Kompozit BS zamana göre farklı basınçlarda filtre edilen su miktarları.

Kompozit BS hidrolik geçirgenlik (Lp) değeri Şekil 4.70.'teki grafiğin eğiminden 8,99 L/m^2.h.bar olarak belirlenmiştir. Buna göre elde edilen kompozit membran daha seçicidir.



Şekil 4.70. Kompozit BS zamana göre hidrolik geçirgenlik grafiği.

Bu filtrasyon testleriyle elde edilen AgNP katkılı kompozit BS membranının farklı filtrasyon uygulamalarında geliştirilmek üzere çeşitli potansiyellere sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle yeşil tekniklerle üretilmiş biyolojik bir atık su arıtım membranının kullanım sonrasında çevreye zarar vermeden bozunabilir olması gelecek çalışmalara ışık tutmaktadır.

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda daha temiz teknolojilere, yenilenebilir kaynaklara ve çevre dostu süreçlere yönelik artan bir talep söz konusudur. Sürecin sadece çevre dostu olması değil, aynı zamanda hammaddenin ve nihai ürünün yenilenebilir bir kaynaktan gelmesi ve biyolojik olarak parçalanabilir olması da önemlidir. Lignoselülozik biyokütle, büyük ölçekte ürünlere dönüştürülebilen sürdürülebilir ve düşük maliyetli bir kaynağı temsil etmektedir (Mamilla et al., 2019). Geleneksel endüstriyel üretim sürecine kıyasla, bitki ekstraktlarının kullanıldığı sentez yöntemleri, reaktiflerin kullanımı ve proses güvenliği açısından avantajlı görünmektedir (Aslam et al., 2021). Tez çalışması kapsamında lignoselülozik bir kaynak olan deniz çayırı atıklarından yeşil sentez yöntemiyle metal nanopartiküllerin sentezlenerek potansiyel uygulamalarının araştırılması hedeflenmiştir. Turistik sahillerde değerlendirilmeyi bekleyen *Posidonia* ve *Zostera* gibi deniz çayırlarının atık yaprakları fenolik bileşenlerce zengindir, aynı zamanda farklı karbonhidrat içeriğine de sahiptir. Gallik ve protokateşuik asitler gibi saflaştırılmış fenolikler üzerine yapılan araştırmalar, metalin biyoredüksiyonu ve kaplanmasına sağlayan bu fonksiyonel grupların rolü olduğunu göstermektedir (Aslam et al., 2021). Bu nedenle çalışmada deniz çayırı atıklarının metal indirgeme özelliği hedeflenmiştir.

Fenolik bileşikler, hidroksil sübstitüentlerine bağlı aromatik halkalar tarafından oluşturulan, bitkilerden ikincil metabolitler olarak yaygın bir şekilde meydana gelen biyoaktif maddelerdir. Antioksidan, anti-enflamatuar, antimikrobiyal ve antitümoral özellikleriyle tanınırlar ve ilaç, gıda ve kozmetik endüstrileri tarafından oldukça talep edilirler. Doğal fenolik bileşikler, bitkiler ve gıda atıkları dahil olmak üzere çeşitli biyokütle kaynaklarından elde edilebilir. Fizikokimyasal özelliklerinin Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa yönetmeliklerine uygun olması, toksik olmayan ve çevre dostu bir çözücü olması nedeniyle fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için su önerilmiştir. Bununla birlikte, su, suda çözünen diğer safsızlıkların birlikte ekstraksiyonundan kaçınır, bu durum daha düşük ekstraksiyon verimine yol açabilir ve sadece hidrofilik ve polar bileşiklere karşı spesifiktir, bu durum da polar olmayan ve hidrofobik bileşiklere karşı daha az etkili olmasını sağlar (Wan Mahmood et al., 2019).

Son yıllarda geleneksel ekstraksiyon sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiş olan DES sistemleri Yeşil Kimya'nın bir bileşeni olarak çevre dostu ekstraksiyon sistemlerine dahil edilerek, ekstraksiyon verimini arttırabilir. Bu

nedenle atık deniz çayırlarından yeşil sentezle metal nanopartikül üretimi öncesinde DES ile ekstraksiyon araştırılarak spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde miktarı ve toplam şeker içeriği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla DES sistemi olarak ChCl:Üre (1:2) sistemi seçilmiştir ve ekstraksiyon koşulları sabitlenmiştir. Socas-Rodríguez ve arkadaşları (2021) bileşenlerinin yüksek viskoziteleri ve son derece düşük uçuculukları nedeniyle DES'lerin çoğu zaman buharlaştırılamadığını belirtmiştir. Ayrıca gerektiğinde, hedef bileşikler makro gözenekli reçine kolon kromatografisi kullanılarak DES'lerden geri kazanılabildiğini; alternatif olarak, DES özütlerinin, numune viskozitesini ve iyonik gücü azaltarak kromatografik analizi ve ardından spektroskopik veya spektrometrik ölçümü kolaylaştırmak için sıklıkla deiyonize su ile seyreltilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Aslında, birçok çalışma çözücü giderimini rapor etmemekte, analizleri ve çıkarılan bileşiklerin biyoaktif karakterizasyonunu DES'lerle birlikte gerçekleştirmektedir (Socas-Rodríguez et al., 2021). Bu nedenle bu çalışmada ekstraksiyondan nanopartikül üretimi aşamasına geçildiğinde ekstrakt, DES ile birlikte indirgeme reaksiyonunu gerçekleştirmiştir.

İlk olarak 2003 yılında Abbott ve arkadaşları tarafından önerilmiş olan karışım 2:1 molar oranındaki üre ve ChCl karışımıydı. Şu anda da en çok çalışan DES türlerinden biridir. Bu bileşenlerin erime noktaları sırasıyla 133 °C ve 302 °C iken; üre ve ChCl içeren nihai ötektik karışımın erime noktası 12 °C olarak tespit edilmiştir (Özel and Elibol, 2021). Ayrıca HBA ve HBD arasındaki hidrojen bağı yük delokalizasyonuna neden olur, bu da tek tek bileşenlerin kristalleşme kabiliyetini engeller ve sonuç olarak DES'in erime noktası her bir başlangıç bileşiğininkine kıyasla önemli ölçüde azalır. DES bileşenleri ile ekstrakte edilen bileşikler arasındaki güçlü hidrojen bağları proses verimini artırır ve bu verim geleneksel organik çözücülerle elde edilenden daha da yüksek olabilir. Özellikle hassas ekstrakte edilmiş bileşikler için "depolama" ve "koruyucu" ortam olarak avantajlı kabul edilir ve ekstraktlar, daha fazla enerji ve zaman alıcı prosedürlere ihtiyaç duymadan "elde edildiği gibi" kullanılabilir (Vieira et al., 2018).

Bu çalışmada ChCl:Üre (1:2) DES sistemiyle gerçekleştirilen ekstraksiyon koşulları %su miktarı:52,5, süre:60 dakika, sıcaklık:82,5 °C ve sıvı/katı oranı:35 mL/g olarak optimize edilmiştir. Alam ve arkadaşları tarafından (2021) ChCl-DES'lerin ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, sıvı-katı oranı ve su içeriğinin fenolik bileşik ekstraksiyon verimi üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. ChCl-DES'ler kullanılarak fenolik bileşiklerin ekstraksiyon mekanizması, katıdan sıvı faza kütle transferini içerdiğini, çünkü ChCl-DES'ler ve

fenolik bileşiklerin benzer polarite ve kimyasal etkileşimlere sahip olduğunu belirtmişlerdir (Alam et al., 2021). Diğer çalışmalarda da DES'lerin fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda oldukça başarılı oldukları belirtilmektedir. Deniz (2021) tez çalışmasında DES kullanarak yaptığı ultrason destekli ekstraksiyon ile elma posasındaki fenolik bileşiklerin ve ligninlerin eldesini amaçlamıştır. Fenolik madde tespitindeki çalışmasında en iyi koşullar DES'in hacimce %50 su içeriği, 60 dakika ekstraksiyon süresi, 60 °C ve katı yüklemesi %5 olarak belirlenmiştir (Deniz, 2021). Saravana ve arkadaşları DES ile yaptıkları çalışmada %70 oranındaki suyun kahverengi makroalglerden fukoidan polisakkarit eldesinde etkili olduğunu belirtmişlerdir (Saravana et al., 2018).

Spektrofotometrik tayinde elde edilen ekstraktın toplam şeker miktarı 75,584 µg/mL, toplam fenolik madde miktarı 50,380 mg GAE/mL ve antioksidan %inhibisyon değeri 55,162 olarak ölçülmüştür. LC-MS/MS tayini ile belirli standartlara göre fenolik içerik test edilmiştir. Bu sonuçlara göre ChCl:Üre (1:2) DES sistemi, deniz çayırı atık yapraklarından en yüksek miktar olarak protokateşuik asiti 1088,14 µg/L miktarında elde etmiştir. Ardından 206,88 µg/L olarak kafeik asit, 153,97 µg/L olarak p-kumarik asit, 104,57 µg/L olarak ferulik asit ve 69,33 µg/L olarak rosmarinik asit saptanmıştır. Pilavtepe (2012) deniz çayırı atıklarıyla yaptığı çalışmada CO_2 ekstraksiyonunu kullanarak Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC)'de geliştirilen metotla p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, şikorik asit ve benzoik asit fenolik bileşiklerini tespit etmiştir (Pilavtepe, 2012). Ayrıca çalışılan tüm DES sistemi ekstraktlarının antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri test edilmiştir.

Bir sonraki aşama yeşil sentez yöntemiyle gümüş, titanyum ve çinko nanopartiküllerin üretilmesi olmuştur. Bu aşamada da ön çalışmalar yapılmış ve üretim koşulları metal konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak belirlenmiştir. RSM tasarımı, etkileşimli reaksiyonları göz önünde bulundurarak tüm değişkenlerin aynı anda optimize edilmesine ve en uygun koşulların tahmin edilmesine olanak tanır. Bu, test edilen deneysel aralığa dayalı olarak seçilen yanıt kriterlerini tanımlayabilen ve maksimize edebilen etkileşimli ikinci dereceden polinom modelleri kullanılarak elde edilir (Vieira et al., 2018). Genellikle en az deneyle en uygun ekstraksiyon koşullarını belirlemek için yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılmaktadır (Mišan et al., 2020). RSM kullanılarak değişkenlerin istatistik tabanlı optimizasyonu klasik tek seferde tek değişken (OVAT) yaklaşımına göre avantajlıdır, çünkü değişkenler arasındaki etkileşimli etkilerin değerlendirilmesine

ve daha az sayıda deneyden elde edilen genel kapsamla değişken optimizasyonuna olanak tanır (Bajkacz and Adamek, 2017).

Üretilen nanopartiküllerin boyut ve PDI değerleri DLS spektrofotometresiyle ölçülmüştür. Ag-NP için metal molaritesi 1,891 mM, süre ise 2,025 saattir. Ti-NP için metal molaritesi 5,528 mM, süre 4,689 saatken, Zn-NP için metal molaritesi 8,809 mM, süre ise 2,025 saattir. Bu koşullarda üretilmiş Ag-NP, Ti-NP ve Zn-NP için boyut değerleri sırasıyla 163, 41 ve 310 nm iken, PDI değerleri 0,117, 0,387 ve 0,354 olarak ölçülmüştür. Nanopartiküllerin aglomerasyon eğilimi, uygulamalarını sınırlayan temel zorluklardan biridir. Bu durum, yüzey alanının ve bilindiği gibi hacimsel olarak daha küçük olması, parçacıkların kimyasal ve katalitik aktivitesinin daha düşük olması anlamına gelir. Metal nanopartiküller genellikle süspansiyonlarında ancak bazı yüzey aktif maddelerinin koordinasyonu ile iyi stabilite gösterebilirler. Bu yüzey aktif maddeler, yüzeyin etrafında koruyucu bir tabaka oluşturarak nanopartiküllerin kümelenmesini önlemeye yardımcı olabilir. Nanopartikül üretiminin ilk aşamalarında, ürünlerin demetlenmesini veya kümeleşmesini etkili bir şekilde önleyebilecek uygun bir çözücünün seçilmesi oldukça önemlidir. DES'ler, sentez reaksiyonu sırasında etkili dağıtıcılar olarak kullanılabilir. Bunun yanında şekil, boyut ve morfolojilerin belirlenmesinde rol oynayabilir. Ayrıca küçük ölçekli yapıları nano ölçeğe bölme yeteneğine sahiptirler ve bu özellik, işlevsel bir dağıtıcı çözücü olarak düşünülebilir (Abo-Hamad et al., 2015).

Bu şekilde üretilen nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerleri de kararlı olduklarını göstermiştir. FTIR, indirgeyici ajan olarak ekstrakttaki biyoaktif maddelerin metal iyonlarının nanopartiküllere indirgenme rolünün belirlenmesi ve nanopartiküllerin yüzey kimyasını karakterize etmek amacıyla kullanılmıştır. Fonksiyonel grupların varlığı nanopartiküllerin stabilitesi açısından önemlidir (Bagherzade et al., 2017). Nanopartikül, solvent ve ekstrakt karşılaştırılmalarına göre, nanopartikül sentezinden sonra ekstraktın spektrumunda bazı piklerin olmaması veya bazı yeni piklerin varlığı, indirgeyici ajanların performansı ve nanopartikül oluşumu için bir kanıttır (Mohammadi and Ghasemi, 2018). FTIR spektroskopisi aynı zamanda hidrojen bağı etkileşimlerini analiz etmek ve HBD ile HBA arasındaki bağ oluşturan DES'lerin yapısını tanımlamak için karakteristik bir tekniktir. Ekler kısmında verilen DES-FTIR spektrumu literatürle uyumludur (Banjare et al., 2018).

Yapılan bu çalışmada Ag-NP'nin pik verdiği dalga boyu 300 nm'dir. Bagherzade ve arkadaşları (2017), safran bitkisi atıklarıyla yaptıkları Ag-NP sentez çalışmasında benzer şekilde 350 nm dolaylarında pik elde etmişlerdir (Bagherzade et al., 2017). Başka bir çalışmada *Combretum erythrophyllum* bitkisi kullanılarak Ag-NP sentezlenmiş ve pik 370 nm dolaylarında elde edilmiştir (Jemilugba et al., 2019). Ti-NP'de ise 325-425 nm dalga boyu arasında pik elde edilmiştir. Caliskan ve arkadaşları (2022) mikroalg kullanarak yaptıkları Ti-NP üretimi çalışmasında 300-400 nm dalgaboyu arasında bant elde etmişler, Sethy ve arkadaşları (2020) ise *Syzygium cumini* ekstraktı kullanılarak yaptıkları Ti-NP çalışmasında 356 nm dalga boyunda pik elde etmişlerdir (Caliskan et al., 2022; Sethy et al., 2020). Çalışma kapsamında Zn-NP üretiminde 225-325 nm dalga boyunda pik elde edilmiştir. Yapılan literatür taramasında Elumalai ve Velmurugan *Azadirachta indica* ile yaptıkları nanopartikül çalışmasında 370 nm dalga boyunda pik elde ederken, Suresh ve arkadaşları (2015) *Cassia fistula* bitkisiyle Zn-NP üretiminde yaptıkları taramada 370 nm dalga boyunda pik elde etmişlerdir (Elumalai and Velmurugan, 2015; Suresh et al., 2015).

Karakterizasyonu tamamlanan nanopartiküllere antibakteriyel aktivite testi uygulanmış ve Ag-NP ile Zn-NP'de belirgin inhibisyon çapları ölçülmüştür. Literatürde gümüş nanopartiküllerin bakteriler üzerindeki aktivitesini açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir: (a) solunum zincirinin inaktivasyonu, (b) hücre zarının bozulması ve hücresel içeriğinin sızması, (c) protein denatürasyonuna ve hücre ölümüne neden olan fonksiyonel protein gruplarına bağlanma, (d) DNA replikasyonunun engellenmesi ve (e) bakteri hücre zarı boyunca besinleri taşıyan enzimlerin denatürasyonu (Singh et al., 2016). Behravan ve arkadaşları (2019), *Berberis vulgaris* yaprak ve kök sulu ekstraktlarından sentezledikleri gümüş nanopartikülleriyle antibakteriyel analiz yapmışlardır. Farklı parametrelerle sentezledikleri gümüş nanopartiküllerin hem disk difüzyon hem de minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemiyle *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesini test etmişlerdir (Behravan et al., 2019). Albukhaty ve arkadaşları (2022), sentezledikleri titanyum nanopartikülünün antibakteriyel etki gösterdiğini onaylamışlardır (Albukhaty et al., 2022). Elumalai ve Velmurugan (2015) *Azadirachta indica* bitkisi ile yaptıkları Zn-NP çalışmasında hem bakterilere karşı hem de mayalara karşı antimikrobiyal aktivite tespit etmişlerdir (Elumalai and Velmurugan, 2015).

Diğer bir biyolojik aktivite antibiyofilm aktivite testi olmuştur. Nanopartiküllerin içinde Ag-NP aktivitesi daha yüksek olarak elde edilmiştir. Erci

ve Torlak yaptıkları çalışmada *Thymus serpyllum* bitkisinin sulu ekstraktından Ag-NP sentezlemişler ve *S. aureus* bakterisiyle antibiyofilm aktivitesini tespit etmişlerdir (Erci and Torlak, 2019).

Ayrıca UV ışık etkisiyle metilen mavisi giderimini test etmek için fotokatalitik aktivite tayini yapılmış ve 2 saatlik süre sonunda AgNP'nin aktivitesi %76,78 olarak elde edilmiştir. Yapılan literatür taramasında titanyum ve çinko nanopartiküllerin bu aktiviteyi taşıdığı bildirilmesine rağmen konsantrasyon farklılığından kaynaklı olarak bu nanopartiküllerde aktivite saptanmamıştır. Sagadevan ve arkadaşları (2021), *Myristica frangans* tohum ekstraktından ürettikleri titanyum dioksit nanopartikülünün fotokatalitik aktivitesini hem metilen mavisinde hem de Kongo kırmızında tespit etmişlerdir (Sagadevan et al., 2021).

Boyalar tekstil, deri, kağıt yapımı, gıda katkı maddeleri, kozmetik ve diğer endüstrilerde yaygın olarak kullanılırlar. Aşırı boya içeren suyun uzun süreli alımı mutajenik ve kanserojenik olabilir, daha ciddi olarak insanların karaciğerine, sindirim sistemine ve merkezi sinir sistemine doğrudan ciddi zararlar verebilir. Bu nedenle, atık su çevreye deşarj edilmeden önce emisyonu karşılamak için boya içeren atık suyun arıtılması gerekmektedir. Flokülasyon, koagülasyonu çökeltme, fotokatalitik bozunma, biyolojik oksidasyon, iyon değişimi, adsorpsiyon ve membran filtrasyonu dahil olmak üzere çeşitli teknikler araştırılmış ve arıtma sürecine uygulanmıştır (Li, Q., et al., 2017). Metilen mavisi, mavi renkte olmakla birlikte indirgeyici bir ajana tabi kaldıklarında renksiz duruma döner. Boyalar ve pigmentler, ilaç ve tekstil gibi çeşitli kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır. Bu endüstriyel süreçler yıllık 150.000 tona kadar boyanın atık sulara salınmasından sorumludur. Atık sulardaki boyaların varlığı, renk değişimi nedeniyle insan gözü tarafından kolayca fark edilir ve sucul yaşam üzerinde bazı sucul türlerin fotosentetik aktivitesini tehlikeye atabilir. Ayrıca, bu kirleticiler karmaşık aromatik yapıları nedeniyle genellikle biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir. Literatürde bu özel boyanın giderimine ilişkin çok sayıda rapor mevcuttur. Boya giderimi için birçok teknik test edilmiştir. Bunun yanında mikrobiyolojik yükü fazla olan endüstriyel atık suların arıtılması da yine temiz sulara erişim açısından önemlidir. Selüloz bazlı malzemeler, atık su arıtımında çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Gago et al., 2020).

Zeytin kara suyu özellikle zeytinyağı üreticisi ülkeler için büyük bir çevresel sorun teşkil etmektedir. Ayrıştırılması zor olan büyük miktarda organik madde, özellikle de fitotoksik etkiden sorumlu olan fenolik bileşikler içermektedir. Her bir

üretim alanında, Aralık-Ocak ayları arasındaki hasat sezonunda zeytin karasuyu miktarı yılda 3 milyon m^3 olarak tahmin edilmektedir. Bu atığın kontrolsüz ve arıtılmadan temiz sulara deşarj edilmesi ciddi çevresel sorunlara yol açmaktadır (Elayadi et al., 2019). Bu nedenle bu kirleticinin membran sistemler yoluyla arıtılması önemlidir.

BS oldukça gözenekli bir biyopolimerdir ve bu malzemeyi filtrasyon amaçları için niteleyen küçük gözenekli retiküler bir yapıya sahiptir. BS aynı zamanda güçlü, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilirdir. Bununla birlikte, BS'nin bir filtrasyon membranı olarak kullanımı henüz yaygın olarak araştırılmamıştır ve suyun arıtılması için modifiye edilmiş veya edilmemiş BS membranlarının kullanımı hakkında çok az çalışma yayınlanmıştır (Galdino et al., 2020). Kullanılan karbon kaynaklarına göre de BS membranları modifiye edilebilmektedir. Bir çalışmada diğer koşulların sabit olduğu üretimlerde farklı karbon kaynaklarında farklı kalınlık ve yoğunlukta üretilmiş, fruktoz, glikoz, gliserol, sükroz, mannitol gibi farklı karbon kaynaklarından en yüksek verim gliserol ve fruktozda elde edilmiştir. Gliserolde daha yüksek akı elde edilmiştir onu takip eden ise fruktozdan elde edilen selülozdur ve özellikle ayırma saflaştırma uygulamalarında enerji etkili membran olarak potansiyele sahiptir. Yine gliserol ve fruktoz besinli örnekler daha büyük por boyutu dağılımıyla ve en yüksek por yüzey alanıyla en açık yapıları oluşturmuştur ve yüzey alanına bağlı olarak daha fazla azot adsorpsiyonuna sahiptir (Ashrafi et al, 2019).

Kimyasal yapıları nedeniyle kitosan ve selüloz, her iki bileşenin fonksiyonel grupları arasında hidrojen bağları yoluyla etkileşim gösterebilir (Urbina et al., 2018). Bu şekilde modifikasyona açık bulunan BS potansiyel bir kompozit membran haline gelebilir. Ayrıca literatürde kitosan ve polietilenimin gibi polimerlerin veya nanopartiküllerin (ZnO, CuO ve Ag) kullanımıyla modifiye edilen BS bazlı membranların *E. coli*'ye karşı ilginç antibakteriyel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Alves et al., 2020).

Elde edilen sonuçlara göre Ag-NP katkılı biyolojik bir kompozit membran olarak BS polimeri üretilmiş, kitosan ve Ag-NP bileşenleriyle bu membran daha seçici hale getirilmiştir. Gelecek araştırmalarda özellikle boya, antibiyotik gibi kirletici ajanların arıtılarak temiz su eldesinde bu tip membranlar önemlidir. Ag-NP membranda birikim veya kirlilik oluşmaması ve antibakteriyel özellik kazanması açısından önemli bir bileşen olarak önerilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında farklı avantajlara sahip yeşil sentez yönteminde başlangıç materyali olarak turistik sahillerde biriken *Posidonia* ve *Zostera* gibi deniz çayırı atıkları kullanılmıştır. Habitatı etkilememek adına sadece plajlardan toplanmış olan atık deniz çayırlarının olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılarak biyolojik bir sentezde değerlendirilmiştir. Öncelikle atık deniz çayırı yapraklarından derin ötektik çözücüler kullanılarak ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen ekstraktlara toplam fenolik madde ve toplam şeker analizleri yapılmıştır. Buradaki sonuçlardan hareketle bir sonraki basamakta kullanılmak üzere ChCl:Üre (1:2) solvent sistemi seçilmiştir. Bu ekstrakt kullanılarak yapılan ön çalışmalarda gümüş, titanyum ve çinko nanopartikülleri sentezlenmiştir. Yeşil sentez yoluyla elde edilen bu nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri ve biyolojik aktivite analizleri yapılmıştır.

Yapraklardaki hücre duvarının varlığı proseslerde dönüşüm verimlerinin düşük olmasına neden olabilmektedir. Biyoredüksiyonun gerçekleşebilmesi içinse biyoaktif bileşenlerin öncelikle ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Sıvı-sıvı veya katı faz ekstraksiyonu gibi geleneksel sistemlerde kullanılan çözücüler özellikle yüksek hacimlerde kullanıldıklarında hem maliyetli olmakta hem de çevre ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir. Buna göre Yeşil Kimya son yıllarda bu sıkıntıları ortadan kaldırmak için farklı çevre dostu yöntemler sunmaktadır. Bunlardan biri DES'lerin kullanıldığı ekstraksiyon sistemleridir. DES yenilenebilir, yeniden kullanılabilir, ucuz, biyobozunur, büyük ölçekte uygulanabilir olması, toksik olmaması ve düşük buhar basıncı, düşük yanıcılık, kolay hazırlık basamaklarına sahip olması gibi avantajları nedeniyle geleneksel organik çözücülere potansiyel bir alternatif olarak ilgi çekmiştir. DES ile yapılan uygulamalarda biyopolimerlerin çözünmesi ve bitkilerden fenolik bileşiklerin, şekerlerin, proteinlerin ekstraksiyonu da yer almaktadır.

Atık deniz çayırlarının ekstraksiyonunda farklı bileşenlere sahip DES'ler kullanılarak istatistiksel deney tasarımı yöntemleriyle yapılan çalışmalar sayesinde uygun sistem ve parametreler seçilmiştir. DES ile atık deniz çayırlarında bulunduğu ve indirgeme işlemini gerçekleştirmesi düşünülen fenolik bileşikler ve şekerler gibi bileşiklerin ekstraksiyonu doğrulanmıştır. Ekstraktlar LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilerek fenolik bileşik içeriği belirlenmiştir. Varlığı tespit edilen bu değerli bileşenler sayesinde geniş kullanım alanlarına sahip gümüş, çinko ve titanyum

nanopartiküllerinin biyojenik sentezi hedeflenmiştir. Nanopartiküllerin eldesinde de en iyi çalışma koşulları belirlenmiştir.

Metal iyonlarının metal nanopartiküllere indirgenmesi sırasında her metale özgü renk değişimleri meydana gelmektedir. İnkübasyon öncesi ve inkübasyon sonrası meydana gelen renk değişimleri reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında bir fikir vermektedir. Ancak bu çalışma kapsamında DES ile yapılan ekstraksiyon sonucu koyu renkli bir ekstrakt elde edilmiştir ve bunun sonucunda sentezlenen nanopartikülde görsel olarak renkte net bir değişim gözlemlenememiştir. Sadece Ag-NP'de zamana bağlı olarak gri renkte agregasyonlar oluşmuştur.

Elde edilen nanopartiküllerin UV-görünür spektrofotometre, dinamik ışık saçılımı (DLS) spektrometresi, zeta potansiyeli, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi gibi analizlerle karakterizasyonu yapılmıştır. UV-Görünür spektrofotometreyle yapılan ölçümler nanopartiküllerin üretildiğini göstermektedir. DLS ve PDI analizlerinde Zn-NP boyutu diğer nanopartiküllere göre yüksek çıkmıştır. Zeta potansiyeli, metal nanopartiküllerin kararlılığını ve dağılımını belirlemek için önemli bir parametre olarak kabul edilirken, aynı zamanda nanopartiküllerin çözeltide tuttuğu toplam yükü de gösterir. Sonuçlar, Ag-NP'lerin negatif yüklü biyomoleküllerle kaplandığını ve bu nanopartiküller arasındaki elektrostatik itme etkileşiminin olası agregasyonu önlediğini göstermektedir. FTIR analizinde nanopartikül oluşumuyla ilgili bağlar tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin farklı alanlarda uygulama bulabilmesi için antibakteriyel, antibiyofilm aktiviteleri ve fotokatalitik özellikleri tespit edilmiştir. Antibakteriyel özelliklerin geliştirilebilmesi için uygulanan nanopartikülün konsantrasyon arttırma çalışmaları takip edilebilir.

Geleneksel yöntemlerle üretilen nanopartiküllerle karşılaştırıldığında hala aşılması gereken engeller bulunmaktadır. Boyutlar ve şekiller üzerindeki kontrol en önemli sınırlama olmuştur. Aktif bileşenlerdeki farklılıklar, çeşitli coğrafi bölgelerde yetişen veya farklı mevsimlerde hasat edilen benzer bitkilerin bileşiminden bile kaynaklanabilir. Çalışma sonuçlarına öneri olarak pH, farklı ekstrakt/prekürsör oranları gibi parametreler değiştirilerek, özellikle çinko nanopartikülün boyutu azaltılıp aktivite iyileştirme çalışmalar yapılabilir. Titanyum nanopartikülünde ise kullanılan prekürsör metal çözeltisi değiştirilip yeni bir çalışmaya gidilebilir.

Özellikle selüloz türevli materyallerin başarılı şekilde atık su arıtımında kullanıldığı bilinmektedir. Membran proseslere nanopartiküllerin ve biyolojik elementlerin dahil edilmesi membran performanslarını arttırmaktadır. Nanopartiküllerin membranlarda kullanımı suyun geçirgenliği ve tıkanma problemlerinin çözümünde iyi bir yaklaşım olabilir. Gümüş nanopartiküller ve bunların kompozitleri, boya indirgeme ve uzaklaştırma alanında daha fazla katalitik aktivite göstermektedir. Atık su arıtım sistemlerinde kullanılmak üzere biyolojik bir membran geliştirilmesi ve yeşil sentez yöntemiyle üretilmiş olan Ag-NP'nin bir uygulaması olarak bu membrana dahil edilmesi bu tez çalışmasının son basamağı olmuştur. Bitkisel selüloza alternatif olarak bakteriler tarafından üretilen bakteriyel selüloz gözenekli yapısı sayesinde filtrasyon membranlarında kullanım potansiyeline sahiptir. Seçiciliğinin arttırılması için glutaraldehit ve kitosanla kaplanıp, Ag-NP ile modifiye edilmiş olan kompozit membran karakterizasyon sonrasında çeşitli filtrasyon testlerine tabi tutularak, hidrolik geçirgenlik değeri tespit edilmiştir. *E. coli* ve zeytin karasuyu ile yapılan filtrasyon çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalar ön çalışma niteliğindedir, bu nedenle filtrasyon testleri boya, antibiyotik ve nanoboyuttaki kirleticilerin arıtılmasında daha detaylı araştırmalar gerekmektedir. Hatta bu tarz biyolojik membranların veriminin düşmeden kullanım tekrarlılığı çalışılmalıdır. Elde edilen membranların kullanım ömürlerinin dolması sonrası biyolojik olmalarından dolayı doğaya zarar vermeden yaşam döngülerini tamamlamaları da önem arz etmektedir. Bu sonuçlar ışığında elde edilen bu biyolojik kompozit membran farklı uygulamalar için geliştirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abo-Hamad, A., Hayyan, M., AlSaadi, M. A., and Hashim, M. A., 2015, Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology, *Chemical Engineering Journal*, 273:551-567 pp.

Achamlale, S., Rezzonica, B. and Grignon-Dubois, M., 2009, Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon, *Food Chemistry*, 113:878-883 pp.

Agarwal, H., Kumar, S.V. and Rajeshkumar, S., 2017, A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach, *Resource-Efficient Technologies*, 3:406-413 pp.

Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L. and Ikram, S., 2016, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, *Journal of Advanced Research*, 7:17-28 pp.

Akçalı, B., Kaboğlu, G. and Güçlüsoy, H., 2019, A review on *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile coverage along the Turkish coasts until 2019, *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 25(1): 115-124 pp.

Akçora, C.M., 2011, Çandarlı – Dilek Yarımadası (Ege Denizi) kıyısal alanlarında yayılış gösteren *Posidonia oceanica* üzerindeki Chlorophyceae, Phaeophyceae ve Rhodophyceae ait epifit türler, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Aktan and Aysel, 2013, First National Workshop on Posidonia oceanica (L.) Delile on the coasts of Turkey.

Alam, M. A., Muhammad, G., Khan, M. N., Mofijur, M., Lv, Y., Xiong, W. and Xu, J., 2021, Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass, *Journal of cleaner production*, 309, 127445.

Albukhaty, S., Al-Bayati, L., Al-Karagoly, H. and Al-Musawi, S., 2022, Preparation and characterization of titanium dioxide nanoparticles and in vitro investigation of their cytotoxicity and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Animal Biotechnology*, 33(5):864-870 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Alves, A. A., Silva, W. E., Belian, M. F., Lins, L. S. G., and Galembeck, A., 2020, Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17:3997-4008 pp.

Arya, A., Mishra, V. and Chundawat, T. S., 2019, Green synthesis of silver nanoparticles from green algae (*Botryococcus braunii*) and its catalytic behavior for the synthesis of benzimidazoles, *Chemical Data Collections*, 20, 100190.

Ashrafi, Z., Lucia, L., and Krause, W., 2019, Bioengineering tunable porosity in bacterial nanocellulose matrices. *Soft Matter*, 15(45):9359-9367 pp.

Aslam, M., Abdullah, A. Z. and Rafatullah, M., 2021, Recent development in the green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using plant-based biomolecules for environmental and antimicrobial applications, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 98:1-16 pp.

Astudillo-Pascual, M., Domínguez, I., Aguilera, P.A., Garrido Frenich, A., 2021, New Phenolic Compounds in *Posidonia oceanica* Seagrass: A Comprehensive Array Using High Resolution Mass Spectrometry, *Plants*, 10(864).

Bagherzade, G., Tavakoli, M. M. and Namaei, M. H., 2017, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3):227-233 pp.

Bajkacz, S. and Adamek, J., 2017, Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products, *Talanta*, 168:329-335 pp.

Banjare, M. K., Behera, K., Satnami, M. L., Pandey, S. and Ghosh, K. K., 2018, Self-assembly of a short-chain ionic liquid within deep eutectic solvents, *RSC advances*, 8(15), 7969-7979 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Benito-Gonzalez, I., Lopez-Rubio, A. and Martinez-Sanz, M., 2018, Potential of lignocellulosic fractions from *Posidonia oceanica* to improve barrier and mechanical properties of bio-based packaging materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118: 542-551 pp.

Benito-Gonzalez, I., Lopez-Rubio, A., Martinez-Abad, A., Ballester, A., Falco, I., Gonzalez-Candelas, L., Sanchez, G., Lozano-Sanchez, J., Borras-Linares, I., Segura-Carretero, A. and Martinez-Sanz, M., 2019, In Depth Characterization of Bioactive Extracts from *Posidonia oceanica* Waste Biomass, *Marine Drugs*, 17 (409).

Bildik, F., 2021, Application of choline chloride as natural deep eutectic solvents for the green extraction of phenolic compounds from *Rheum ribes* leaves, *European Journal of Technique (EJT)*, 11(2):140-143 pp.

Brown, A.J., 1886, On an acetic ferment which forms cellulose, *J. Chem. Soc. Trans*., 49: 432-439.

Caliskan, G., Mutaf, T., Agba, H. C. and Elibol, M., 2022, Green Synthesis and Characterization of Titanium Nanoparticles Using Microalga, *Phaeodactylum tricornutum*, *Geomicrobiology Journal*, 39(1):83-96 pp.

Chen, Y., Zhou, X., Lin, Q., and Jiang, D. 2014, Bacterial cellulose/gelatin composites: in situ preparation and glutaraldehyde treatment, *Cellulose*, 21:2679-2693 pp.

Choi, S. M., and Shin, E. J., 2020, The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications, *Nanomaterials*, 10(3), 406.

Christopoulou, N., Kalogianni, D.P. and Christopoulos, T.K., 2021, *Posidonia oceanica* (Mediterranean tapeweed) leaf litter as a source of fluorescent carbon dot preparations, *Microchemical Journal*, 161:105787.

Clogston, J.D. and Patri, A.K., 2011, Zeta potential measurement, Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, 63-70 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Cocozza, C., Parente, A., Zaccone, C., Mininni, C., Santamaria, P. and Miano, T., 2011, Chemical, physical and spectroscopic characterization of *Posidonia oceanica* (L.) Del. residues and their possible recycle, *Biomass and Bioenergy*, 35:799-807 pp.

Cunha, S.C. and Fernandes, J.O., 2018, Extraction techniques with deep eutectic solvents, *Trends in Analytical Chemistry*, 105:225-239 pp.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., and Choi, Y. H., 2015, Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications, *Food chemistry*, 187:14-19 pp.

Das, A.K., Sharma, M., Mondal, D. and Prasad, K., 2016, Deep eutectic solvents as efficient solvent system for the extraction of K-carrageenan from *Kappaphycus alvarezii*, *Carbohydrate Polymers*, 136:930-935 pp.

De Lima Fontes, M., Meneguin, A. B., Tercjak, A., Gutierrez, J., Cury, B. S. F., Dos Santos, A. M., Ribeiro, S. J. L. and Barud, H. S., 2018, Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties, *Carbohydrate polymers*, 179:126-134 pp.

De Sanctis, M., Chimienti, S., Pastore, C., Piergrossi, V. and Di Iaconi, C., 2019, Energy efficiency improvement of thermal hydrolysis and anaerobic digestion of *Posidonia oceanica* residues, *Applied Energy*, 252:113457.

Deniz, S., 2021, Lignoselülozik Biyokütleden Derin Ötektik Çözücüler ile Değerli Ürünler Kazanımı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F., 1951, A colorimetric method for the determination of sugars, Nature, 168-167 pp.

Dural, M.U., Cavas, L, Papageorgiou, S.K. and Katsaros, F.K., 2011, Methylene blue adsorption on activated carbon prepared from *Posidonia oceanica* (L.) dead leaves: Kinetics and equilibrium studies, *Chemical Engineering Journal*, 168:77-85 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

El-Rafie, H.M., El-Rafie, M.H. and Zahran, M.K., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae*, Carbohydrate Polymers*, 96:403-410 pp.

Elayadi, F., El Adlouni, C., El Herradi, M. A. E., El Krati, M., Tahiri, S., and Naman, M.N.F., 2019, Effects of raw and treated olive mill wastewater (OMW) by coagulation-flocculation, on the germination and the growth of three plant species (wheat, white beans, lettuce), *Moroccan Journal of Chemistry*, 7(1), J-Chem.

Elumalai, K. and Velmurugan, S., 2015, Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.), *Applied Surface Science*, 345:329-336 pp.

Erci, F. and Torlak E., 2019, Antimicrobial and antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles by using aqueous leaf extract of *Thymus serpyllum*, *Sakarya University Journal of Science*, 23(3):333-339 pp.

EUCAST, 2020, Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/

Fawcett, D., Verduin, J.J., Shah, M., Sharma, S.B. and Poinern, G.E.J., 2017, A Review of Current Research into the Biogenic Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles via Marine Algae and Seagrasses, *Journal of Nanoscience*, 2017:1-15 pp.

Gago, D., Chagas, R., Ferreira, L. M., Velizarov, S., and Coelhoso, I., 2020, A novel cellulose-based polymer for efficient removal of methylene blue, Membranes, 10(1):13 pp.

Galdino Jr, C. J. S., Maia, A. D., Meira, H. M., Souza, T. C., Amorim, J. D., Almeida, F. C., ... and Sarubbo, L. A., 2020, Use of a bacterial cellulose filter for the removal of oil from wastewater, Process Biochemistry, 91:288-296 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., and Fernández-Bolaños, J., 2016, Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs), *Food chemistry*, 197:554-561 pp.

Grudniewska, A., de Melo, E. M., Chan, A., Gniłka, R., Boratynski, F., and Matharu, A. S., 2018, Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: a biorefinery approach, *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(11):15791-15800 pp.

Hawar, S. N., Al-Shmgani, H. S., Al-Kubaisi, Z. A., Sulaiman, G. M., Dewir, Y. H. and Rikisahedew, J. J., 2022, Green synthesis of silver nanoparticles from *Alhagi graecorum* leaf extract and evaluation of their cytotoxicity and antifungal activity, *Journal of Nanomaterials*, 2022(1), 1058119.

Hernandez-Pinero, J.L., Terron-Rebolledo, M., Foroughbakhck, R., Moreno-Limon S., Melendrez, M.F., Solis-Pomar, F. and Perez-Tijerina, E., 2016, Effect of heating rate and plant species on the size and uniformity of silver nanoparticles synthesized using aromatic plant extracts, *Appl Nanosci*, 6:1183-1190 pp.

Hoseinpour, V. and Ghaemi, N., 2018, Green synthesis of manganese nanoparticles: Applications and future perspective–A review, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 189:234-243 pp.

Isci, A., and Kaltschmitt, M., 2021, Recovery and recycling of deep eutectic solvents in biomass conversions: A review, *Biomass conversion and biorefinery*, 1-30 pp.

Isik, Z., Unyayar, A., and Dizge, N., 2018, Filtration and antibacterial properties of bacterial cellulose membranes for textile wastewater treatment, *Avicenna Journal of Environmental Health Engineering*, 5(2):106-114 pp.

Jablonský, M., Škulcová, A., Malvis, A., and Šima, J., 2018, Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents, *Journal of biotechnology*, 282:46-66 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S. S., Raju, P. S., and Bawa, A. S., 2008, The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:2593-2599 pp.

Jemilugba, O. T., Parani, S., Mavumengwana, V. and Oluwafemi, O. S., 2019, Green synthesis of silver nanoparticles using *Combretum erythrophyllum* leaves and its antibacterial activities, *Colloid and interface science communications*, 31, 100191.

Karakavuk, E., 2020, Doğal derin ötektik çözücüler ile kuşburnu meyve, çekirdek ve atığından biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon ve mikroenkapsülasyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu, Ortak Doktora Programı, T.C. Munzur Üniversitesi Atatürk Üniversitesi.

Khan, H., Kadam, A., and Dutt, D., 2020, Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of Lactobacillus genus, *Carbohydrate Polymers*, 229, 115513.

Khane, Y., Benouis, K., Albukhaty, S., Sulaiman, G. M., Abomughaid, M. M., Al Ali, A., ... and Dizge, N., 2022, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous *Citrus limon* zest extract: Characterization and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties, Nanomaterials, 12(12), 2013.

Křížek, T., Bursová, M., Horsley, R., Kuchař, M., Tůma, P., Čabala, R., and Hložek, T., 2018, Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids, *Journal of Cleaner Production*, 193:391-396 pp.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., and Bielecki, S., 2002, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4):189-195 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Li, G., Nandgaonkar, A. G., Habibi, Y., Krause, W. E., Wei, Q., and Lucia, L. A., 2017, An environmentally benign approach to achieving vectorial alignment and high microporosity in bacterial cellulose/chitosan scaffolds, *RSC advances,* 7(23):13678-13688 pp.

Li, Q., Li, Y., Ma, X., Du, Q., Sui, K., Wang, D., ... & Xia, Y., 2017, Filtration and adsorption properties of porous calcium alginate membrane for methylene blue removal from water, *Chemical Engineering Journal*, 316:623-630 pp.

Maltaş, E., Uysal, A., Yıldız, S. and Durak, Y., 2010, Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. *Fresen Environ Bulletin*, 19:3094-9pp.

Mamilla, J. L., Novak, U., Grilc, M., and Likozar, B., 2019, Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals, *Biomass and bioenergy*, 120:417-425 pp.

Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., and Choi, Y. H., 2020, The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector, *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(15):2564-2592 pp.

Mittal, A.K., Chist, Y. and Banerjee, U.C., 2013, Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 31:346-356 pp.

Mohammadi, F. M. and Ghasemi, N., 2018, Influence of temperature and concentration on biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using cherry extract, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8:93-102 pp.

Mulia, K., Krisanti, E., Terahadi, F., and Putri, S., 2015, Selected natural deep eutectic solvents for the extraction of α-mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp, *Int. J. Technol*, 6(7):1211-1220 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Mutaf Kılıç, T., 2020, *Porphyridium cruentum* Mikroalginden biyojenik nanopartiküllerin sentezlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Özel N. and Elibol M., 2021, A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes, *Carboyhdrate Polymers*, 262:117942.

Pilavtepe M., 2012, Kirlilik oluşturan atık deniz fanerogamlarının süperkritik CO2 ekstraksiyonunun matematiksel modellemesi ve rafinat fazdaki biyokütleden biyoetanol eldesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Pilavtepe, M., Celiktas, M.S., Sargin, S. and Yesil-Celiktas, O., 2013, Transformation of *Posidonia oceanica* residues to bioethanol, *Industrial Crops and Products*, 51:348-354 pp.

Pilavtepe, M., Yucel, M., Helvaci, S.S., Demircioğlu, M. and Yesil-Celiktas, O., 2012, Optimization and mathematical modeling of mass transfer between *Zostera marina* residues and supercritical CO_2 modified with ethanol, J. *of Supercritical Fluids*, 68:87-93 pp.

Płotka-Wasylka, J., Rutkowska M., Owczarek K., Tobiszewski, M. and Namiesnik, J., 2017, Extraction with environmentally friendly solvents, *Trends in Analytical Chemistry*, 97:12-25 pp.

Sagadevan, S., Lett, J. A., Vennila, S., Prasath, P. V., Kaliaraj, G. S., Fatimah, I., ... and Lee, C. T., 2021, Photocatalytic activity and antibacterial efficacy of titanium dioxide nanoparticles mediated by *Myristica fragrans* seed extract, Chemical Physics Letters, 771, 138527.

Sapsford, K.E., Tyner, K.M., Dair, B.J., Deschamps, J.R. and Medintz, I.L., 2011, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal Chem.*, 83: 4453–4488 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Saravana, P.S., Cho, Y., Woo, H. and Chun, B., 2018, Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis, *Journal of Cleaner Production*, 198:1474-1484 pp.

Sethy, N. K., Arif, Z., Mishra, P. K., and Kumar, P., 2020, Green synthesis of TiO2 nanoparticles from *Syzygium cumini* extract for photo-catalytic removal of lead (Pb) in explosive industrial wastewater. *Green Processing and Synthesis*, 9(1):171-181 pp.

Shabaani, M., Rahaiee, S., Zare, M. and Jafari, S.M., 2020, Green synthesis of ZnO nanoparticles using loquat seed extract; Biological functions and photocatalytic degradation properties, *LWT-Food Science and Technology*, 134:110133.

Singh, D., Rawat, D. and Isha., 2016. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles from *Origanum majorana* and *Citrus sinensis* leaf and their antibacterial activity: a green chemistry approach, *Bioresources and Bioprocessing*, 3:1-7 pp.

Socas-Rodríguez, B., Torres-Cornejo, M. V., Álvarez-Rivera, G., and Mendiola, J. A., 2021, Deep eutectic solvents for the extraction of bioactive compounds from natural sources and agricultural by-products, *Applied Sciences*, 11(11), 4897.

Stumpf, T. R., Yang, X., Zhang, J., and Cao, X., 2018, *In situ* and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 82:372-383 pp.

Sun, B., Zhang, L., Wei, F., Abdulrahman, A. A., Xu, X., Li, W., Chen, C., Lin, J., Zhang, H., and Sun, D., 2020, *In situ* structural modification of bacterial cellulose by sodium fluoride, *Carbohydrate polymers*, 231, 115765.

Suresh, S., Karthikeyan, S. and Jayamoorthy, K., 2016, FTIR and multivariate analysis to study the effect of bulk and nano copper oxide on peanut plant leaves, *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, 1:343–350 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Tomas, F., Hernan, G., Mañez-Crespo, J., Arona, A., Meléndez, D. H., Reynés, X., ... and Ballesteros, E., 2024, Mass flowering and unprecedented extended pseudovivipary in seagrass (*Posidonia oceanica*) after a Marine Heat Wave, Marine Pollution Bulletin, 203, 116394.

Urbina, L., Guaresti, O., Requies, J., Gabilondo, N., Eceiza, A., Corcuera, M. A., and Retegi, A., 2018, Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters, *Carbohydrate Polymers*, 193:362-372 pp.

Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A., Ferreira, I. C., and Ferreira, O., 2018, Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L, *Industrial Crops and Products*, 115:261-271 pp.

Wan Mahmood, W. M. A., Lorwirachsutee, A., Theodoropoulos, C., and Gonzalez-Miquel, M., 2019, Polyol-based deep eutectic solvents for extraction of natural polyphenolic antioxidants from *Chlorella vulgaris*, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(5):5018-5026p.

Wang, Y., Guo, Y., Yang, C., Meng, H., Li, S., Sarp, S., and Li, Z., 2023, Bio-inspired fabrication of adsorptive ultrafiltration membrane for water purification: Simultaneous removal of natural organic matters, lead ion and organic dyes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 109798.

Wanichapichart, P., Kaewnopparat, S., Buaking, K., and Puthai, W., 2002, Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xyllinum*, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 24(4):855-862 pp.

Yılmaz Öztürk, B., Yenice Gürsu, B. and Dağ, İ., 2020, Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*, *Process Biochemistry*, 89: 208-219 pp.

Zdanowicz, M., Wilpiszewska, K., & Spychaj, T., 2018, Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review, *Carbohydrate polymers*, 200, 361-380 pp.

Zhang, H., Xu, X., Chen, C., Chen, X., Huang, Y., and Sun, D., 2019, *In situ* controllable fabrication of porous bacterial cellulose, *Materials Letters*, 249:104-107 pp.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince değerli tecrübelerini ve zamanını paylaşarak tezimin şekillenmesine ve böyle bir çalışmanın oluşmasına rehberlik eden, her daim çalışma motivasyonuma ışık tutan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a teşekkürü bir borç bilirim. Her zaman bilgi ve tecrübelerini paylaşarak özellikle de membran alanında yol almamı sağlayan ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yılmaz YÜREKLİ'ye teşekkür ederim. Bu süreçte önerileriyle çalışmanın ilerlemesine katkı sağlayan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Tez İzleme Komitesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL'e ve Sayın Doç. Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU'ya teşekkür ederim. Ayrıca Tez Savunma Jürisi hocalarım Sayın Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tülay ÖNCÜ ÖNER'e katkıları için teşekkürü borç bilirim.

Kullanılan materyal olarak deniz çayırı atık örneklerinin toplanmasında yasal izni veren T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Tez çalışmasında bulunan FGA-2021-23345 No'lu projeye sağladığı finansal destek sebebiyle Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince benimle laboratuvar altyapılarını paylaşarak tez verilerimin zenginleşmesini sağlayan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aylin DELİORMANLI'ya teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sürecinde ders, sınav, sunum gibi her türlü koşturmada birlikte olduğum, kafa karışıklıklarında her zaman birlikte çözüm bulduğum çalışma arkadaşlarım Hilal TOP HAYTAOĞLU'na ve Nihal ÖZEL'e, doktoramın son dönemlerinde tanıdığım ve benden desteklerini esirgemeyen Ege AKÇAY'a ve Zülal GÜNAY'a ve ayrıca bu süreçte karşılaştığım bütün Nanobiyoproses ve Proses Analitik Teknolojisi Laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca bende emekleri olan hocalarıma, özellikle Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne, destekleri için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dekanlığına ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü aileme, destek ve anlayışı için ofis arkadaşım Araş. Gör. Tuğçe MUTAF KILIÇ'a ve değerli öğrencilerime teşekkür ederim.

Son olarak, tüm yaşamım boyunca her daim bana destek olan, bu yolda yılmadan azimle yürümemi sağlayan canım annem Nimeti İNAM'a, canım babam Hayri İNAM'a, yol göstericim abim İlker İNAM'a, ablam Betül İNAM'a, adeta bu tez çalışmasıyla birlikte büyüyen enerjisiyle, uzakta bile olsa sesiyle ve görüntüsüyle her zaman manevi desteğini hissettiren canım yeğenim Cemre Tuna İNAM'a ve benimle birlikte olan adını sayamadığım tüm dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

14/02/2025

Ayşegül İNAM

ÖZGEÇMİŞ

Öğrenim Bilgileri

Doktora: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü (2018-Devam ediyor)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü (2015-2018)

Lisans: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü (2010-2015)

İş Tecrübesi

Araştırma Görevlisi: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü (2018-Devam ediyor)

Makaleler

İnam, A., Özel, N., Günay, Z., Elibol, M. (2024). Production of Silver Nanoparticles from Seagrass Wastes by Green Synthesis and Determination of Their Antimicrobial Activities. Erzincan University Journal of Science and Technology(SUIC), 82-98.

Özel, N., **İnam, A.,** & Elibol, M. (2024). Exploring deep eutectic solvents for enhanced extraction of bio-active compounds from microalgae biomass. Journal of Molecular Liquids, 407(125237), 1–9.

Inam, A., & Oncel, S. S. (2021). Photobioreactors as potential tools for environmentally friendly and sustainable buildings. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-12.

Kitap Bölümleri

İnam, A., & Elibol, M. (2024). Yeşil Sentez Yöntemiyle Nanopartikül Üretimi ve Biyoteknolojik Uygulamaları. Biyomühendislikte Güncel Yaklaşımlar. Bidge Yayınları, 1, 67-89.

Inam, A., Oncu-Oner, T., & Deniz, I. (2024). Algae in Biomedicine. Cell Biology and Translational Medicine-Advances in Experimental Medicine and Biology**.** Springer, 1, 147-163.

Mutaf, T., **Inam, A.,** & Deniz, I. (2023). Life cycle assessment of biofuels. In Bioenergy Engineering (pp. 535-549). Woodhead Publishing.

Inam, A., & Deniz, I. (2023). Introduction to bioenergy; current status, merits & demerits. In Bioenergy Engineering (pp. 1-15). Woodhead Publishing.

Inam, A., Mutaf, T., & Deniz, I. (2022). Sustainable biorefineries for circular bioeconomy. In Biomass, Biofuels, Biochemicals (pp. 3-28). Elsevier.

Inam, A., Taymaz, E. R., Uslu, M. E., Binay, B., & Deniz, I. (2021). Volumetric Mass Transfer Coefficient Measurement in a Stirred Tank Reactor. In Bioreactors in Stem Cell Biology: Methods and Protocols (pp. 17-25). New York, NY: Springer US.

Bildiriler

Yalçın, G., **İnam, A.,** Çöven, F. O., & Öncü Öner, T. (2024) Green synthesis of titanium nanoparticles using *Nigella sativa* seeds and titanium (iv) bis ammonium lactate hydroxide characterization antibacterial and cytotoxic properties, 1st International Ankara Scientific Research and Innovation Congress, Tam metin bildiri.

Çöven, F.O., **İnam, A.,** & Öncü Öner, T. (2024). Determination of antibacterial and cytotoxic activities of roots of *Ferula elaeochytris*. 3rd International Ege Congress on Scientific Research, Tam metin bildiri.

İnam, A., Karadeniz, Y. A., & Öncü Öner, T. (2024). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Prunus avium* stems extracts: Characterization cytotoxic and antibacterial properties. International Biotechnology And Nanotechnology Congress Bio-NanoTech24, Tam metin bildiri.

Çöven, F. O., **İnam, A.,** & Öncü Öner, T. (2024). Comparison of biological activities of ethanol and aqueous extracts of bracts of *Bougainvillea glabra*. International Multidisciplinary Ecology and Environmental Studies Congress, Londra, Tam metin bildiri.

İnam, A., Çöven, F. O., & Öncü Öner, T. (2024). Investigation of cytotoxic and antibacterial activities of roots of *Glycyrrhiza glabra*. 7. International Food, Agriculture and Veterinary Sciences Congress, Tam metin bildiri.

Top Haytaoğlu, H., **İnam, A.,** Öncü Öner, T., & Elibol, M. (2024). Antibacterial and cytotoxic activity of silver and zinc oxide nanoparticles synthesized using deep eutectic solvent extraction of the sea cucumber-*Holothuria tubulosa*. International Sustainability in Life Congress, Aydın, Özet bildiri.

İnam, A., Özel, N., Günay, Z., & Elibol, M. (2024). Production of silver nanoparticles from seagrass wastes by green synthesis and determination of their antimicrobial activities. International Sustainability in Life Congress, Aydın, Özet bildiri.

İnam, A., Özel, N., Günay, Z., & Elibol, M. (2024). *Agropyron repens* bitkisinden yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartikül üretimi ve antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi. VIII. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Manisa, Özet bildiri.

İnam, A., Çöven, F. O., & Öncü Öner, T. (2024). Derin ötektik çözücü ve etanol kullanılarak elde edilen *Achillea filipendulina* bitki ekstraktlarının antibakteriyel ve sitotoksik aktivitelerinin karşılaştırılması. VIII. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Manisa, Özet bildiri.

İnam, A., & Öncel, S. Ş. (2018). Photobioreactors as potential tools for environmentally friendlly and sustainable buildings. 7th Global conference on global warming 2018, Tam metin bildiri.

Projeler

Dökülmüş Yılan Derisi Etanol ve Metanol Ekstraktlarının Antiviral, Antibakteriyel ve Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitelerinin Saptanması, TÜBİTAK 1002 Projesi, Araştırmacı, 26.09.2024-devam ediyor

Gümüş Nano Partikül Katkılı Floresan Karbon Noktaların Üretimi, Karakterizasyonu ve Kitosan Esaslı Yara Örtüsü Geliştirilmesinde Kullanımı, TÜBİTAK 3501 Projesi, Bursiyer, 05.09.2024-devam ediyor

Enzimatik Membran Reaktörlerin Proses Verimlilikleri Açısından İncelenmesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Genel Araştırma, Araştırmacı, 03.09.2023, devam ediyor

Farklı Mikroalg Türlerinin Dermal Fibroblast Hücreleri Üzerinde Antibakteriyel, Antiviral ve Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Alt Yapı, Araştırmacı, 12.06.2023-devam ediyor

Kara Havuç DMSO, Metanol ve Su Ekstraktlarının Sitotoksik ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Karşılaştırılması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Hızlı Destek, Araştırmacı, 27.11.2023-15.05.2024

Vitex agnus-castus L. (hayıt) ekstraktları kullanılarak üretilen titanyum nanopartikülün sitotoksik, antibakteriyel ve antiviral özelliklerinin belirlenmesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Hızlı Destek, Araştırmacı, 5.05.2022-20.09.2023

Derin Ötektik Çözücü Kullanılarak Ekstrakte Edilen Deniz Çayırı Atıklarından Biyojenik Nanopartikül Sentezi ve Bu Nanopartiküllerin Karakterizasyonu/Potansiyel Uygulamalarının Araştırılması, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Genel Araştırma, Araştırmacı, 12.11.2021-29.01.2024

Sürdürülebilir ve Yaşanabilir Bir Dünya İçin Biyoekonomi Çalıştayı, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi-Bilimsel Toplantı Düzenleme, Araştırmacı, 12.11.2021-02.03.2022

Mikroalglerden Potansiyel Biyoaktif Moleküllerin Araştırılması ve Gen Regülasyonlarının İncelenmesi (Algactive), TÜBİTAK Uluslararası Konnect Projesi, Bursiyer, 01.03.2017-1.03.2018

EKLER

EK-1

ChCl:Üre (1:1) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları

ChCl:Üre (1:1) DES sisteminin kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında Run'lara göre toplam fenolik (mg/mL) ve toplam şeker miktarlarının (µg/mL) ortalama değerleri Şekil 1'de verilmiştir. Burada en dikkat çeken ayrıntı su miktarının %0 olduğu durumda fenolik maddenin elde edilemediği durumudur. Bu sonuçlara göre yapılan parametre değerlendirmeleri ve ANOVA testi ilerleyen aşamalarda program ekran görüntüleriyle belirtilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg/mL	Response 2 Toplam şeker ug/mL
13	1	17,5	60	82,5	45	0,145468	57,9769
21	2	35	80	30	40	0,0999814	44,7096
17	3	0	80	65	40	0	9,67657
9	4	17,5	60	47,5	45	0,0942956	37,1188
14	5	52,5	60	82,5	45	0,0844925	66,2607
4	6	52,5	100	47,5	35	0,0363595	42,6964
2	7	52,5	60	47,5	35	0,0891	33,7525
15	8	17,5	100	82,5	45	0,200071	61,7063
11	9	17,5	100	47,5	45	0,095668	29,198
5	10	17,5	60	82,5	35	0,173798	63,9175
16	11	52,5	100	82,5	45	0,0656707	66,0627
10	12	52,5	60	47,5	45	0,0300856	31,8713
7	13	17,5	100	82,5	35	0,136057	61,1782
28	14	35	80	65	40	0,0998833	64,3465
27	15	35	80	65	40	0,0968444	57,0528
25	16	35	80	65	40	0,102922	48,604
18	17	70	80	65	40	0,0607691	57,4323
6	18	52,5	60	82,5	35	0,0676313	98,3729
19	19	35	40	65	40	0,0964523	47,3828
1	20	17,5	60	47,5	35	0,10998	34,5446
23	21	35	80	65	30	0,16527	89,7591
24	22	35	80	65	50	0,129489	55,8317
3	23	17,5	100	47,5	35	0,0970405	38,802
29	24	35	80	65	40	0,144193	64,9736
26	25	35	80	65	40	0,122921	52,2673
22	26	35	80	100	40	0,0879236	65,8317
8	27	52,5	100	82,5	35	0,0663569	115,799
30	28	35	80	65	40	0,123411	53,3894
20	29	35	120	65	40	0,131449	76,6238
12	30	52,5	100	47,5	45	0,0374379	34,1815

Şekil 1. Design Expert programında ChCl:Üre (1:1) sisteminin sonuç çıktısı.

Dört temel faktörün iki farklı sonuç üzerine etkisi çalışılmıştır. Buna göre deneme deseninde iki adet yanıt bulunduğu için bu yanıtlar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

ChCl:Üre (1:1) sisteminde toplam fenolik madde analizi

Design Expert programında ilk yanıt olarak toplam fenolik madde miktarı için yapılan analizde model "Quadratic" olarak önerilmiştir (Şekil 2).

Fit Summary

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0,1348	0,0269	0,1149	-0,1652	
2FI	0,8674	0,0170	-0,0330	-0,6079	
Quadratic	**0,0645**	**0,0311**	**0,2503**	**-1,1042**	**Suggested**
Cubic	0,0226	0,2014	0,7644	-2,9184	**Aliased**

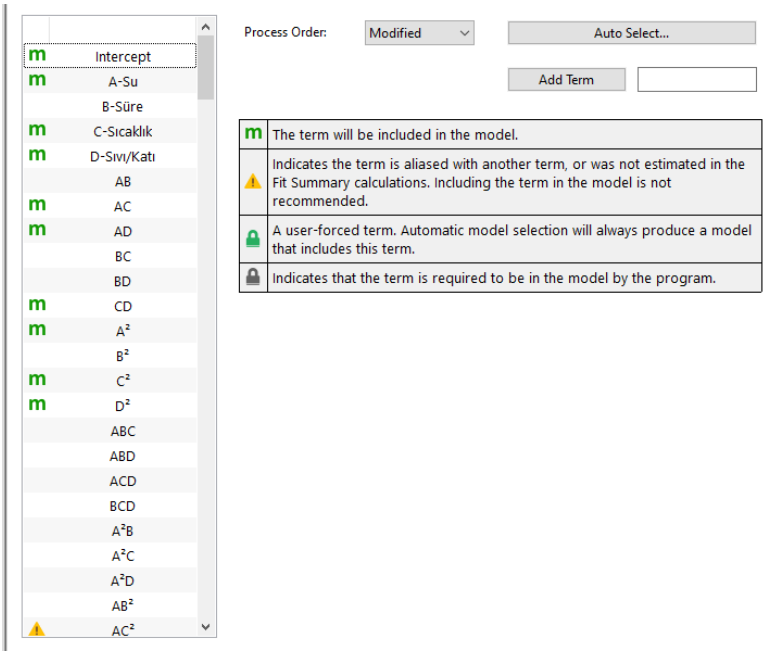
Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	0,2982	1	0,2982			
Linear vs Mean	0,0134	4	0,0033	1,94	0,1348	
2FI vs Linear	0,0049	6	0,0008	0,4036	0,8674	
Quadratic vs 2FI	**0,0163**	**4**	**0,0041**	**2,79**	**0,0645**	**Suggested**
Cubic vs Quadratic	0,0187	8	0,0023	5,09	0,0226	Aliased
Residual	0,0032	7	0,0005			
Total	0,3546	30	0,0118			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 2. ChCl:Üre (1:1)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



Şekil 3. ChCl:Üre (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

Programda yapılan ANOVA testine göre en çok etkisi olan parametre % su miktarıdır, sürenin etkisi ise en azdır. Modelin anlamlı olabilmesi için Process Order modifiye edilmiş, B parametresi, ikinci derecesi ve ikili ilişkileri ortadan kaldırılmıştır (Şekil 3). Design Expert programında deney modelini daha anlamlı hale getirmek amacıyla p değeri 0.1'den büyük olan bazı model değişkenlerini elimine etmek gerekmektedir.

Analysis of Variance

ANOVA for Reduced Quadratic model

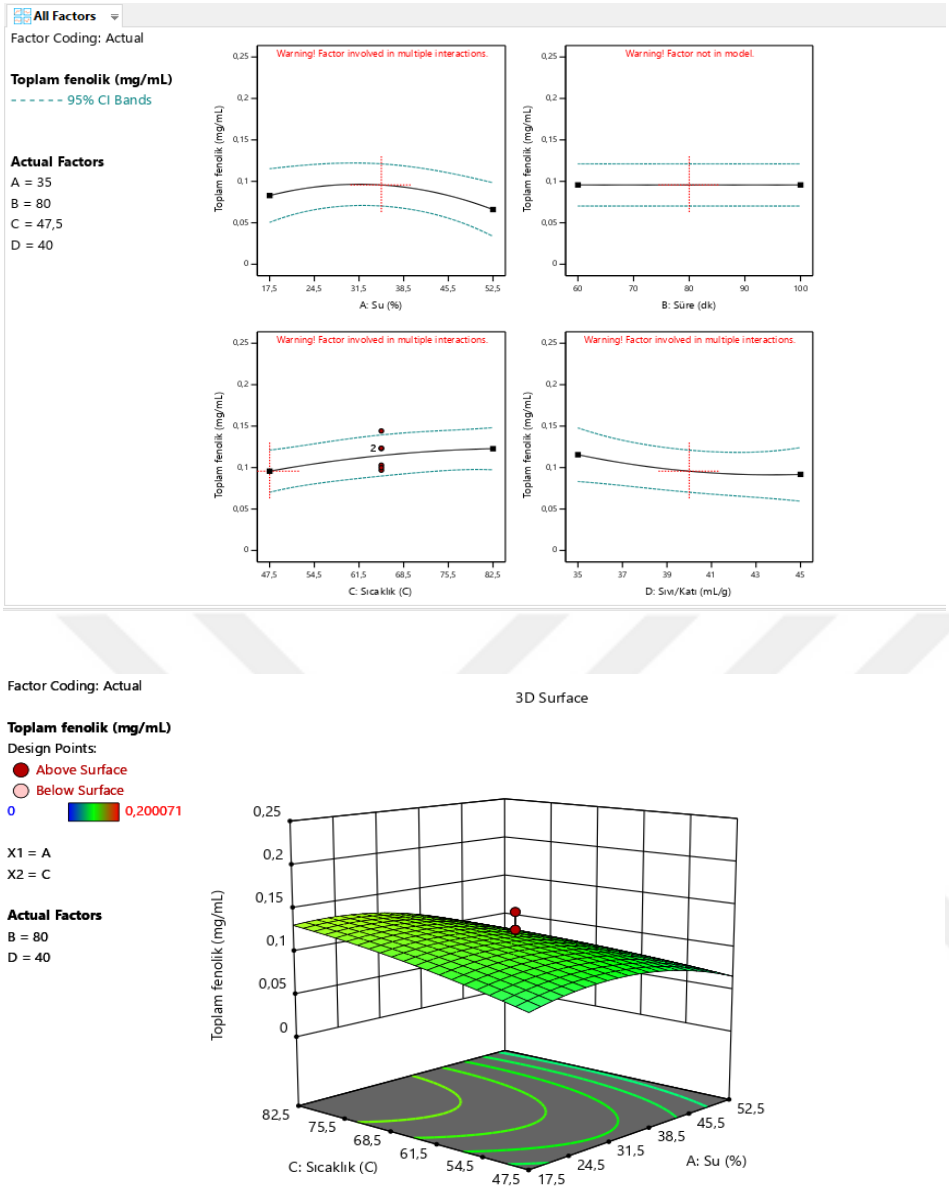
Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0326	9	0,0036	3,05	0,0181	significant
A-Su	0,0086	1	0,0086	7,22	0,0142	
C-Sıcaklık	0,0044	1	0,0044	3,71	0,0683	
D-Sıvı/Katı	0,0004	1	0,0004	0,3144	0,5812	
AC	0,0017	1	0,0017	1,47	0,2393	
AD	0,0002	1	0,0002	0,1918	0,6661	
CD	0,0010	1	0,0010	0,8462	0,3686	
A^2	0,0126	1	0,0126	10,63	0,0039	
C^2	0,0008	1	0,0008	0,6738	0,4214	
D^2	0,0018	1	0,0018	1,51	0,2333	
Residual	0,0238	20	0,0012			
Lack of Fit	0,0221	15	0,0015	4,36	0,0563	not significant
Pure Error	0,0017	5	0,0003			
Cor Total	0,0564	29				

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

Şekil 4. ChCl:Üre (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

Programa girilen toplam fenolik madde miktarı ile istatistiksel deney tasarımında ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. P değeri programdaki her bir katsayının anlamlılığını test etmek için değerlendirilmektedir. Buna göre P'nin değeri ne kadar küçükse karşılık gelen katsayı o kadar anlamlıdır ve 0.05'ten küçük P-değerleri, model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Yani istatistiksel anlamda 'p-value' 0,05'ten küçük ise model anlamlıdır. Bu aşamada ANOVA testine göre model "significant", lack of fit değeri ise "not significant" olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 5. ChCl:Üre (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

Tüm faktörlerin toplam fenolik madde miktarına olan ayrı ayrı etki grafikleri ile en çok etkisi olan parametreler olan % su miktarı ve sıcaklığın üç boyutlu etkisinin olduğu grafiker Şekil 5'teki gibi verilmiştir.

ChCl:Üre (1:1) sisteminde toplam şeker analizi

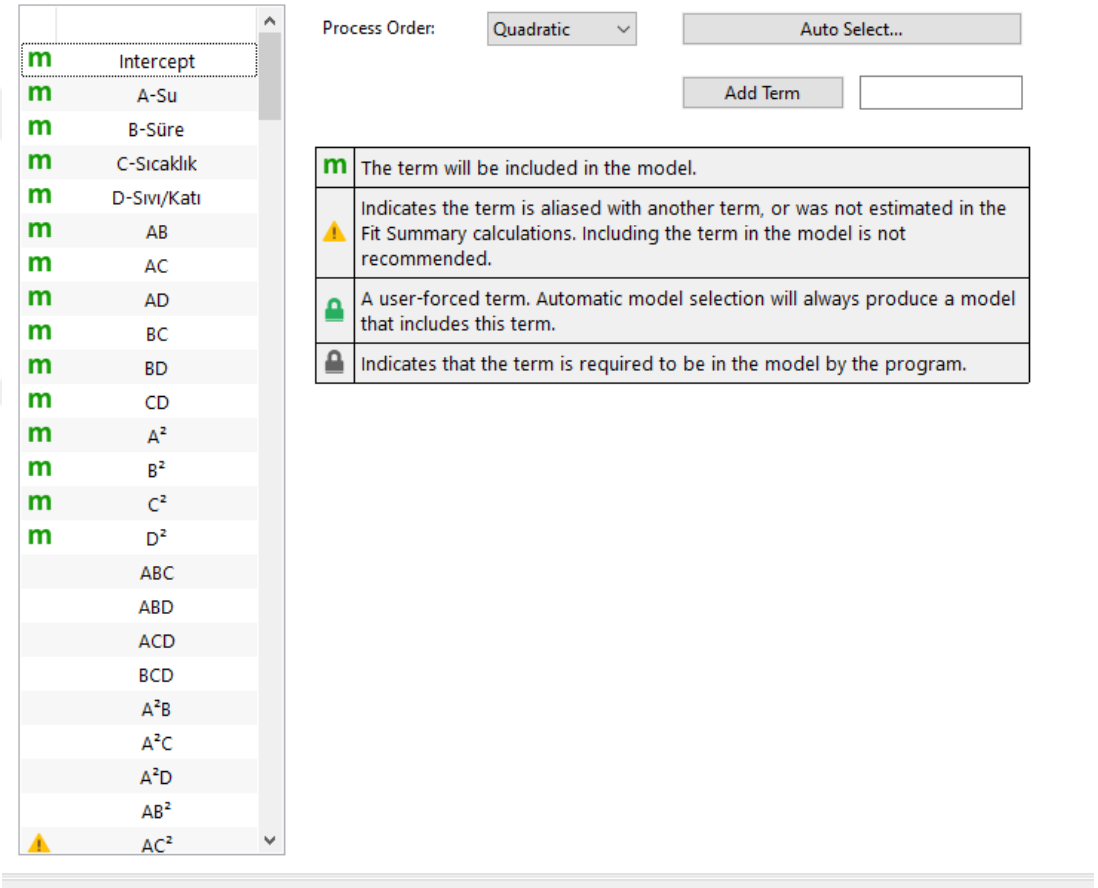
Fit Summary | Sequential Model Sum of Squares [Type I] | Model Summary Statistics | Lack of Fit Tests

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	**< 0.0001**	**0,0336**	**0,5578**	**0,4129**	**Suggested**
2FI	0,3353	0,0342	0,5808	0,3171	
Quadratic	**0,0507**	**0,0669**	**0,7068**	**0,1978**	**Suggested**
Cubic	0,0197	0,5318	0,9118	0,2917	Aliased

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	91999,49	1	91999,49			
Linear vs Mean	**8347,95**	**4**	**2086,99**	**10,14**	**< 0.0001**	**Suggested**
2FI vs Linear	1437,73	6	239,62	1,23	0,3353	
Quadratic vs 2FI	**1659,44**	**4**	**414,86**	**3,04**	**0,0507**	**Suggested**
Cubic vs Quadratic	1759,03	8	219,88	5,36	0,0197	Aliased
Residual	287,30	7	41,04			
Total	1,055E+05	30	3516,36			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 6. ChCl:Üre (1:1)-Toplam şeker miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



Şekil 7. ChCl:Üre (1:1)-Toplam şeker yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

ChCl:Üre (1:1) sistemiyle ile yapılan ekstraksiyon sonrası üçer tekrarlı olan toplam şeker miktarı ortalama sonuçları programa girildiğinde toplam şeker miktarı için yapılan tasarımda önerilen modellerden biri "Quadratic"tir (Şekil 6 ve Şekil 7).

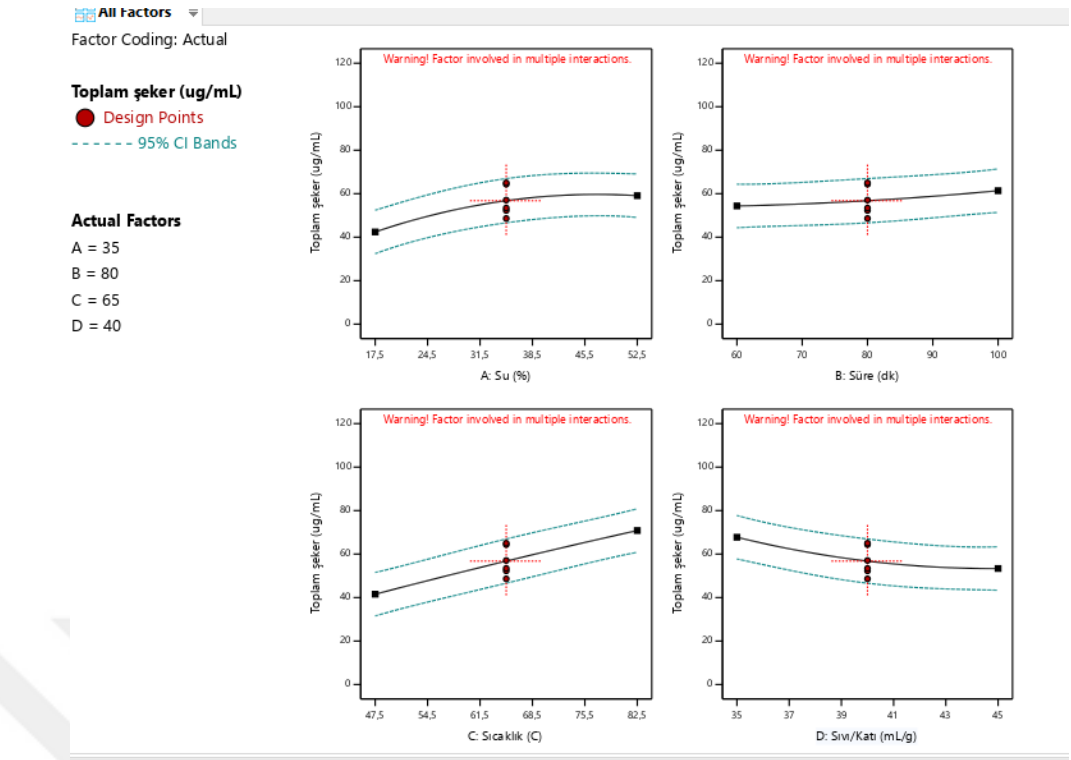
Analysis of Variance

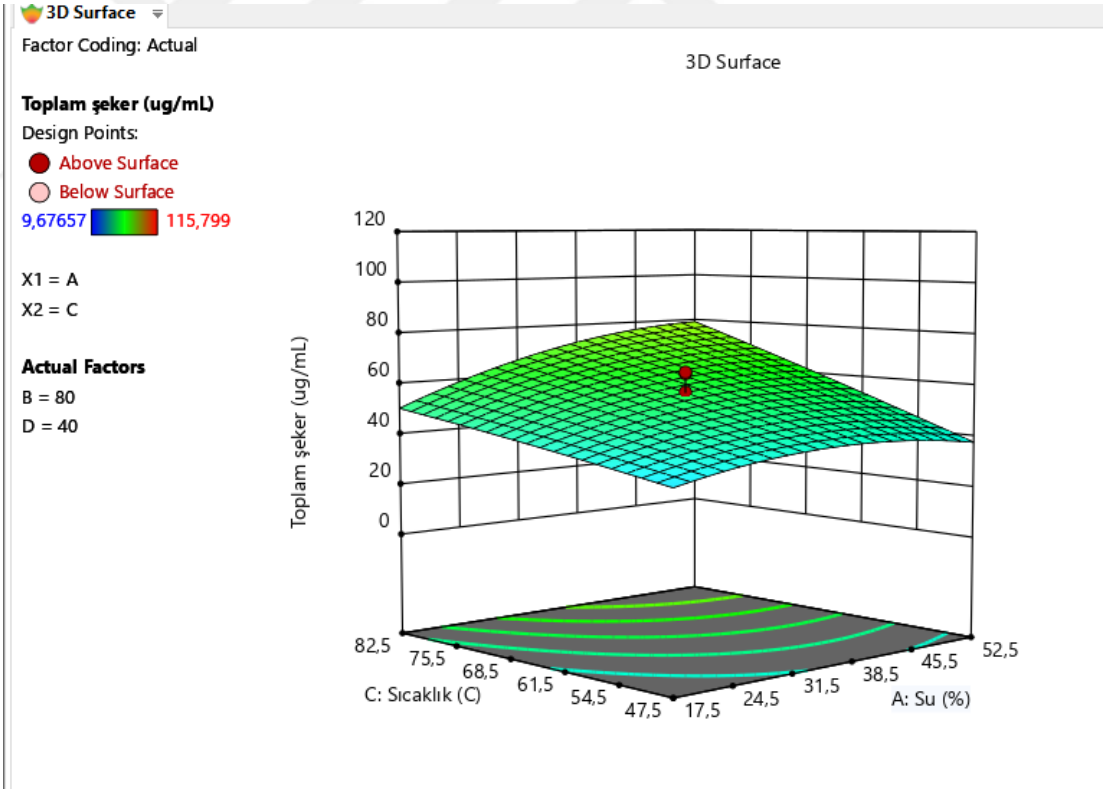
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	11445,12	14	817,51	5,99	0,0007	significant
A-Su	1667,77	1	1667,77	12,23	0,0032	
B-Süre	296,04	1	296,04	2,17	0,1614	
C-Sıcaklık	5143,71	1	5143,71	37,70	< 0.0001	
D-Sıvı/Katı	1240,44	1	1240,44	9,09	0,0087	
AB	60,67	1	60,67	0,4447	0,5150	
AC	611,05	1	611,05	4,48	0,0514	
AD	398,02	1	398,02	2,92	0,1082	
BC	7,06	1	7,06	0,0517	0,8231	
BD	56,13	1	56,13	0,4114	0,5309	
CD	304,81	1	304,81	2,23	0,1557	
A^2	995,27	1	995,27	7,30	0,0164	
B^2	32,49	1	32,49	0,2382	0,6326	
C^2	9,70	1	9,70	0,0711	0,7933	
D^2	393,25	1	393,25	2,88	0,1102	
Residual	2046,33	15	136,42			
Lack of Fit	1823,16	10	182,32	4,08	0,0669	not significant
Pure Error	223,17	5	44,63			
Cor Total	13491,45	29				

Şekil 8. ChCl:Üre (1:1)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

Programda yapılan ANOVA testine göre parametrelerden %su miktarı ve sıcaklığın etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre model “significant”, lack of fit değeri ise “not significant” olarak belirlenmiştir (Şekil 8).

Tüm faktörlerin toplam şeker miktarına olan ayrı ayrı etki grafikleri ve % su miktarı ile sıcaklığın üç boyutlu etkisi ise Şekil 9’da verilmiştir. Buna göre % su ve sıcaklığın artış gösterdiği durumda toplam şeker miktarının da artacağı görünmektedir. Sürenin etkisi ise daha yumuşak geçişe sahiptir.





Şekil 9. ChCl:Üre (1:1)-Toplam şeker yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

Mentol:Asetik Asit (1:1) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları

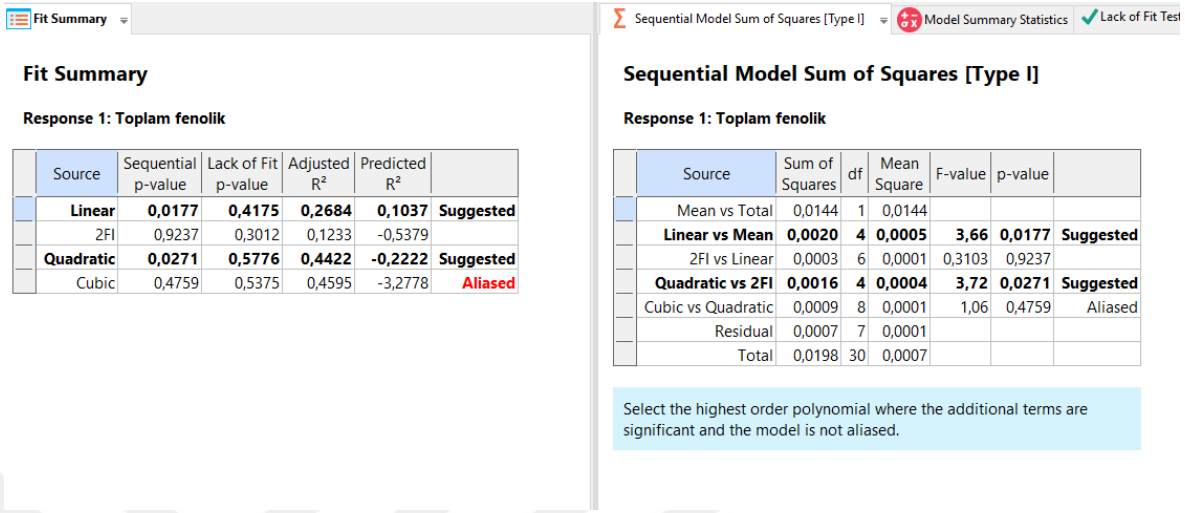
Hidrofobik bir DES sistemi olan Mentol:Asetik asit (1:1)'in kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında Run'lara göre toplam fenolik (mg/mL) ve toplam şeker miktarlarının (µg/mL) ortalama değerleri Şekil 10'da verilmiştir. Burada en dikkat çeken ayrıntı su miktarının %0 olduğu durumda fenolik maddenin elde edilemediği ve diğer sistemlere göre daha yüksek şeker elde edilmesi durumudur. Bu sonuçlara göre yapılan parametre değerlendirmeleri ve ANOVA testi ilerleyen aşamalarda program ekran görüntüleriyle belirtilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg/mL	Response 2 Toplam şeker ug/mL
13	1	17,5	60	82,5	45	0,0204786	107,004
21	2	35	80	30	40	0,00538188	71,2281
17	3	0	80	65	40	0	25,4195
9	4	17,5	60	47,5	45	0,00979325	173,868
14	5	52,5	60	82,5	45	0,0384182	266,047
4	6	52,5	100	47,5	35	0,0209687	212,548
2	7	52,5	60	47,5	35	0,0194983	204,858
15	8	17,5	100	82,5	45	0,0125381	220,898
11	9	17,5	100	47,5	45	0,0129302	160,535
5	10	17,5	60	82,5	35	0	86,8056
16	11	52,5	100	82,5	45	0,03783	123,967
10	12	52,5	60	47,5	45	0,00959719	157,433
7	13	17,5	100	82,5	35	0,0407709	350,007
28	14	35	80	65	40	0,0294974	282,713
27	15	35	80	65	40	0,0413591	281,063
25	16	35	80	65	40	0,0334186	318,159
18	17	70	80	65	40	0,0182239	255,386
6	18	52,5	60	82,5	35	0,0209687	245,287
19	19	35	40	65	40	0,0269486	196,311
1	20	17,5	60	47,5	35	0,00675431	128,522
23	21	35	80	65	30	0,0208707	171,69
24	22	35	80	65	50	0,0102834	110,7
3	23	17,5	100	47,5	35	0,00891098	136,707
29	24	35	80	65	40	0,0202825	222,086
26	25	35	80	65	40	0,0162633	169,083
22	26	35	80	100	40	0,0414571	641,855
8	27	52,5	100	82,5	35	0,0236156	296,047
30	28	35	80	65	40	0,0414571	212,218
20	29	35	120	65	40	0,0516523	223,736
12	30	52,5	100	47,5	45	0,0166554	163,208

Şekil 10. Design Expert programında Mentol:Asetik asit (1:1) sisteminin sonuç çıktısı.

Programda iki yanıt da ayrı ayrı analiz edilerek deneme modelleri oluşturulmuştur.

Mentol:Asetik Asit (1:1) sisteminin toplam fenolik madde analizi



Fit Summary

Fit Summary

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	**0,0177**	**0,4175**	**0,2684**	**0,1037**	**Suggested**
2FI	0,9237	0,3012	0,1233	-0,5379	
Quadratic	**0,0271**	**0,5776**	**0,4422**	**-0,2222**	**Suggested**
Cubic	0,4759	0,5375	0,4595	-3,2778	**Aliased**

Sequential Model Sum of Squares [Type I] | Model Summary Statistics | Lack of Fit Test

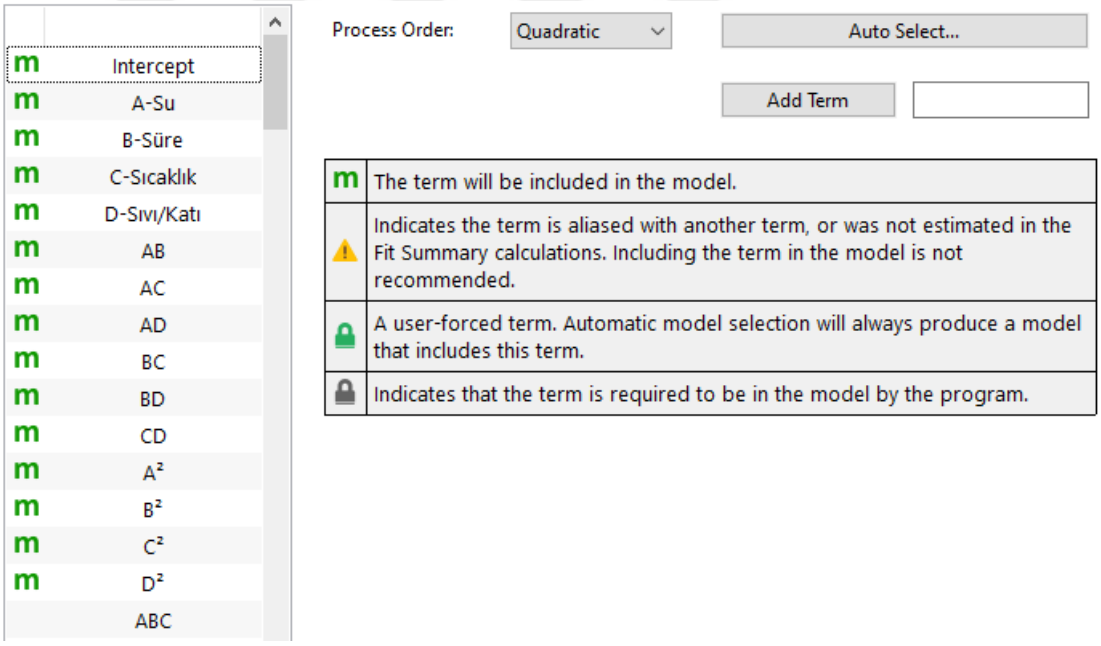
Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	0,0144	1	0,0144			
Linear vs Mean	**0,0020**	**4**	**0,0005**	**3,66**	**0,0177**	**Suggested**
2FI vs Linear	0,0003	6	0,0001	0,3103	0,9237	
Quadratic vs 2FI	**0,0016**	**4**	**0,0004**	**3,72**	**0,0271**	**Suggested**
Cubic vs Quadratic	0,0009	8	0,0001	1,06	0,4759	Aliased
Residual	0,0007	7	0,0001			
Total	0,0198	30	0,0007			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 11. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



Intercept
A-Su
B-Süre
C-Sıcaklık
D-Sıvı/Katı
AB
AC
AD
BC
BD
CD
A^2
B^2
C^2
D^2
ABC

Process Order: Quadratic

Auto Select...

Add Term

m	The term will be included in the model.
⚠	Indicates the term is aliased with another term, or was not estimated in the Fit Summary calculations. Including the term in the model is not recommended.
🔒	A user-forced term. Automatic model selection will always produce a model that includes this term.
🔒	Indicates that the term is required to be in the model by the program.

Şekil 12. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

Mentol:Asetik asit (1:1) sisteminin kullanıldığı ekstraksiyonda toplam fenol madde analizi için yapılan tasarımda model "Quadratic veya Linear" olarak

önerilmiştir (Şekil 11). Quadratic proseste modelin anlamlılığı yakalanmıştır (Şekil 12 ve Şekil 13).

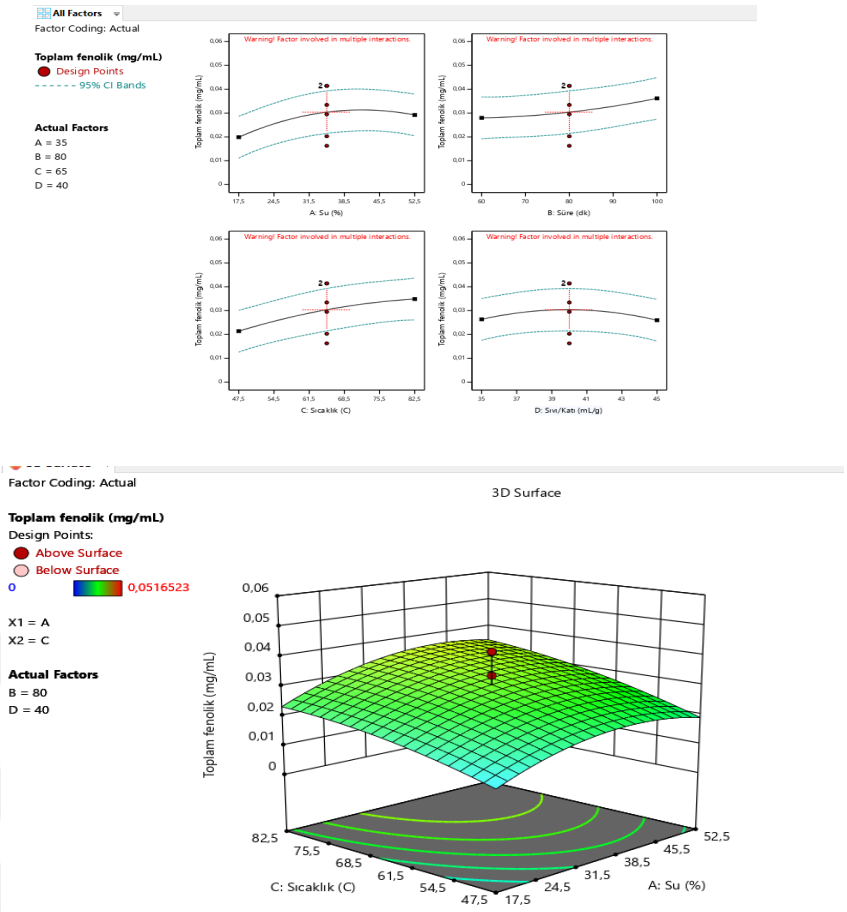
ANOVA for Quadratic model

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0039	14	0,0003	2,64	0,0360	significant
A-Su	0,0005	1	0,0005	4,97	0,0415	
B-Süre	0,0004	1	0,0004	3,83	0,0693	
C-Sıcaklık	0,0011	1	0,0011	10,39	0,0057	
D-Sıvı/Katı	8,145E-07	1	8,145E-07	0,0078	0,9309	
AB	0,0000	1	0,0000	0,4523	0,5115	
AC	0,0000	1	0,0000	0,2089	0,6542	
AD	0,0000	1	0,0000	0,1964	0,6640	
BC	0,0000	1	0,0000	0,2647	0,6144	
BD	0,0001	1	0,0001	1,23	0,2852	
CD	0,0001	1	0,0001	0,5756	0,4598	
A^2	0,0009	1	0,0009	8,92	0,0092	
B^2	0,0001	1	0,0001	0,7657	0,3953	
C^2	0,0001	1	0,0001	1,34	0,2657	
D^2	0,0005	1	0,0005	4,66	0,0474	
Residual	0,0016	15	0,0001			
Lack of Fit	0,0010	10	0,0001	0,9173	0,5776	not significant
Pure Error	0,0006	5	0,0001			

Şekil 13. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

Tüm faktörlerin toplam fenolik madde miktarına olan ayrı ayrı etki grafiklerinde istenen eğilimler takip edilmektedir. Tüm faktörlerin etki grafikleri ile en çok etki sahibi olan % su miktarı ile sıcaklık parametrelerinin üç boyutlu etkisinin olduğu grafik Şekil 14'teki gibi verilmiştir.



Şekil 14. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

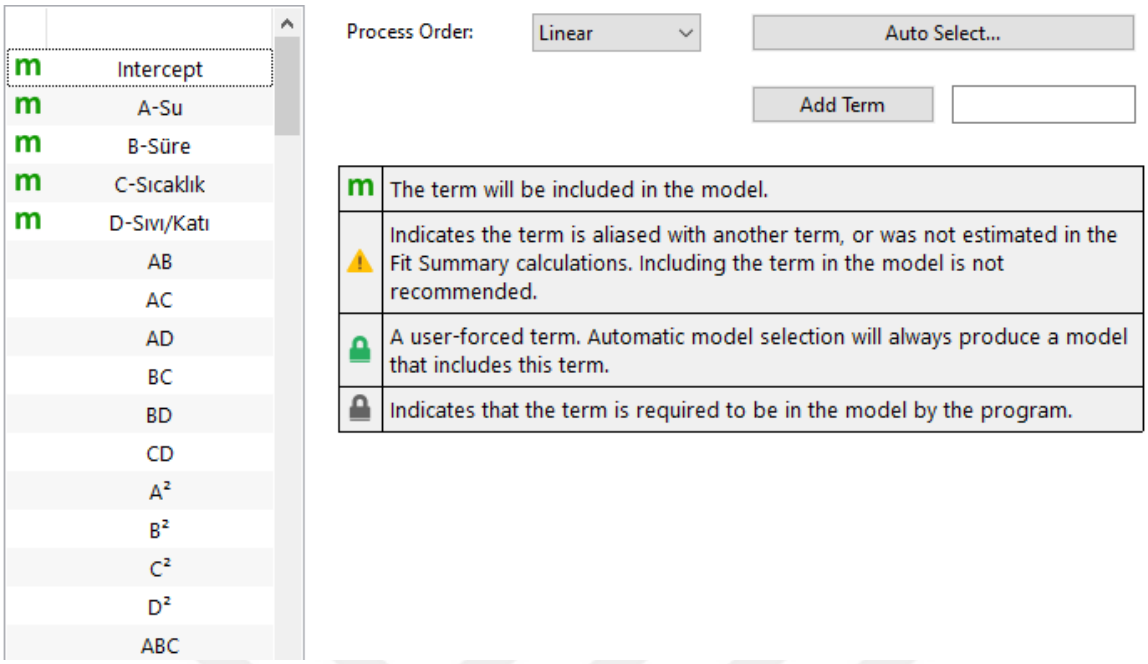
Mentol:Asetik Asit (1:1) sisteminin toplam şeker analizi

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	**0,0212**	**0,0835**	**0,2563**	**0,0325**	**Suggested**
2FI	0,7972	0,0583	0,1560	-0,4428	
Quadratic	0,1175	0,0851	0,3270	-0,8217	
Cubic	0,0219	0,6467	0,7906	-0,2257	**Aliased**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	1,288E+06	1	1,288E+06			
Linear vs Mean	**1,302E+05**	**4**	**32539,69**	**3,50**	**0,0212**	**Suggested**
2FI vs Linear	31954,97	6	5325,83	0,5046	0,7972	
Quadratic vs 2FI	74296,76	4	18574,19	2,21	0,1175	
Cubic vs Quadratic	1,079E+05	8	13489,61	5,15	0,0219	Aliased
Residual	18331,83	7	2618,83			
Total	1,650E+06	30	55012,05			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 15. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam şeker miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



Şekil 16. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam şeker yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

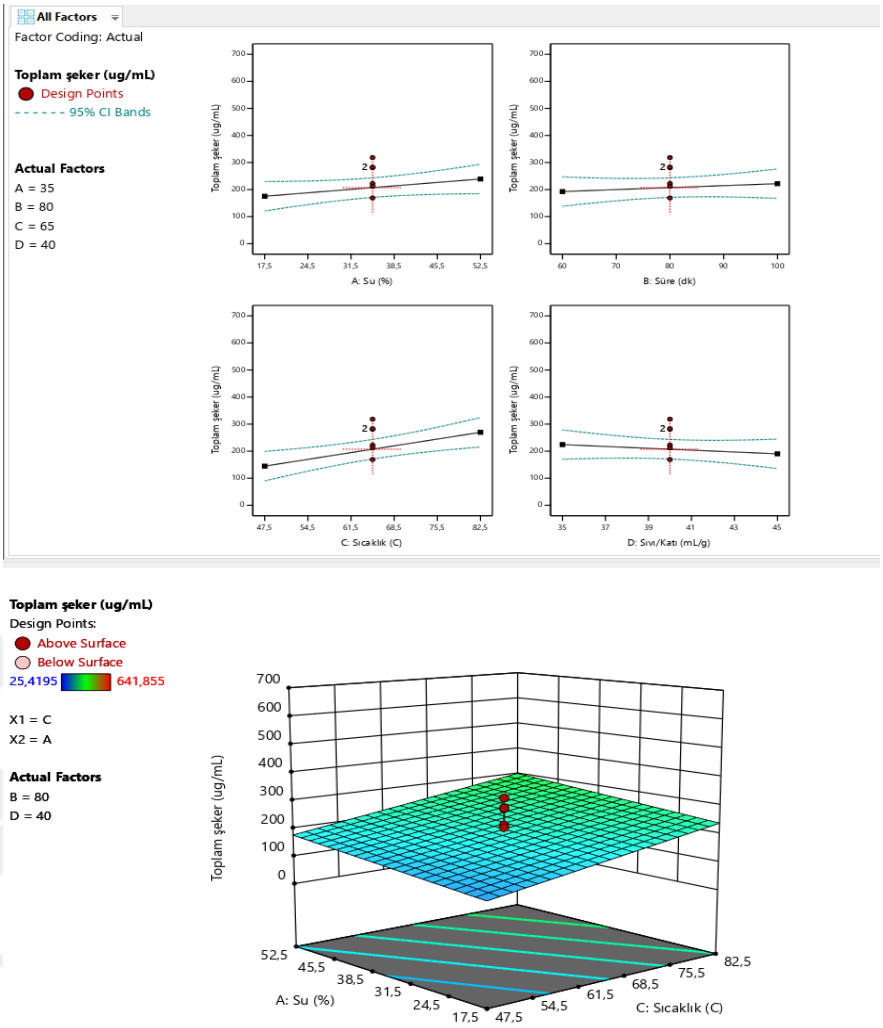
Bu ekstraksiyon sonucu toplam şeker miktarı için yapılan analizde model "Linear" olarak önerilmiştir (Şekil 15). Buna göre sadece belirtilen katsayıların kendileri model üzerinde etkilidir (Şekil 16). ANOVA testine göre model "significant", lack of fit değeri ise "not significant" olarak belirlenmiştir (Şekil 17).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1,302E+05	4	32539,69	3,50	0,0212	significant
A-Su	24383,32	1	24383,32	2,62	0,1179	
B-Süre	5073,41	1	5073,41	0,5455	0,4670	
C-Sıcaklık	93704,63	1	93704,63	10,08	0,0040	
D-Sıvı/Katı	6997,40	1	6997,40	0,7524	0,3940	
Residual	2,325E+05	25	9300,02			
Lack of Fit	2,171E+05	20	10855,07	3,52	0,0835	not significant
Pure Error	15399,01	5	3079,80			
Cor Total	3,627E+05	29				

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

Şekil 17. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

Buna göre lineer etkinin en çok sıcaklık parametresiyle sağlanabildiği ilişki grafiklerinden anlaşılmaktadır. Üç boyutlu grafikte ise % su miktarı ve sıcaklığın lineer olarak toplam şeker miktarı üzerinde doğrusal bir artış etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 18).



Şekil 18. Mentol:Asetik asit (1:1)-Toplam şeker yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

.

ChCl:Gliserol (1:2) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları

Çalışmadaki dördüncü DES sistemi olan ChCl:Gliserol (1:2)'ün kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında Run'lara göre toplam fenolik (mg/mL) ve toplam şeker miktarlarının (µg/mL) ortalama değerleri Şekil 19'da verilmiştir. Önceki sistemlerde olduğu gibi su miktarının %0 olduğu durumda fenolik maddenin elde edilememiştir. Bu sonuçlara göre yapılan parametre değerlendirmeleri ve ANOVA testi ilerleyen aşamalarda program ekran görüntüleriyle belirtilmiştir.

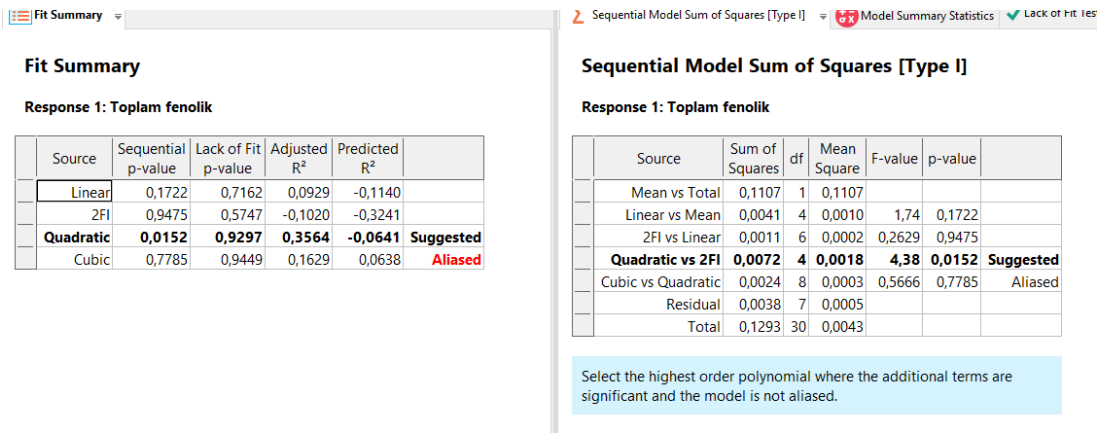
Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg/mL	Response 2 Toplam şeker ug/mL
13	1	17,5	60	82,5	45	0,0536619	80,0726
21	2	35	80	30	40	0,0288602	1,42574
17	3	0	80	65	40	0	3,68647
9	4	17,5	60	47,5	45	0,0361145	30,8647
14	5	52,5	60	82,5	45	0,0426335	80,0726
4	6	52,5	100	47,5	35	0,0662589	125,716
2	7	52,5	60	47,5	35	0,066847	75,0891
15	8	17,5	100	82,5	45	0,0597398	96,6403
11	9	17,5	100	47,5	45	0,0476821	37,3003
5	10	17,5	60	82,5	35	0,0851297	128,422
16	11	52,5	100	82,5	45	0,0651805	88,9835
10	12	52,5	60	47,5	45	0,0696899	64,363
7	13	17,5	100	82,5	35	0,0509171	134,429
28	14	35	80	65	40	0,0188611	56,6073
27	15	35	80	65	40	0,0945407	48,6205
25	16	35	80	65	40	0,0626807	67,8284
18	17	70	80	65	40	0,0209687	50,6172
6	18	52,5	60	82,5	35	0,0781206	167,564
19	19	35	40	65	40	0,0648374	66,1782
1	20	17,5	60	47,5	35	0,0472899	150,865
23	21	35	80	65	30	0,0856199	20,5677
24	22	35	80	65	50	0,0816006	50,9307
3	23	17,5	100	47,5	35	0,0337617	2,44884
29	24	35	80	65	40	0,0695429	47,5314
26	25	35	80	65	40	0,0872864	53,4719
22	26	35	80	100	40	0,118068	63,571
8	27	52,5	100	82,5	35	0,0721407	150,766
30	28	35	80	65	40	0,0804243	39,7756
20	29	35	120	65	40	0,0817967	55,0891
12	30	52,5	100	47,5	45	0,0522405	133,406

Şekil 19. Design Expert programında ChCl:Gliserol (1:2) sisteminin sonuç çıktısı.

Programda iki yanıt da ayrı ayrı analiz edilerek deneme modelleri oluşturulmuştur.

ChCl:Gliserol (1:2) sisteminin toplam fenolik madde analizi

Bu sistemdeki fenolik madde analizinde Quadratic önermeye rağmen (Şekil 20) B parametresi olan sürenin diğer parametrelerle ikili ilişkileri elendiği takdirde (Şekil 21) modelin anlamlı olması sağlanmaktadır (Şekil 22). Buna göre toplam fenolik madde analizinde en etkili parametreler su miktarı ve sıcaklık olarak tespit edilmiştir.



Fit Summary

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Model Summary Statistics

Lack of Fit Tes

Fit Summary

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0,1722	0,7162	0,0929	-0,1140	
2FI	0,9475	0,5747	-0,1020	-0,3241	
Quadratic	**0,0152**	**0,9297**	**0,3564**	**-0,0641**	**Suggested**
Cubic	0,7785	0,9449	0,1629	0,0638	**Aliased**

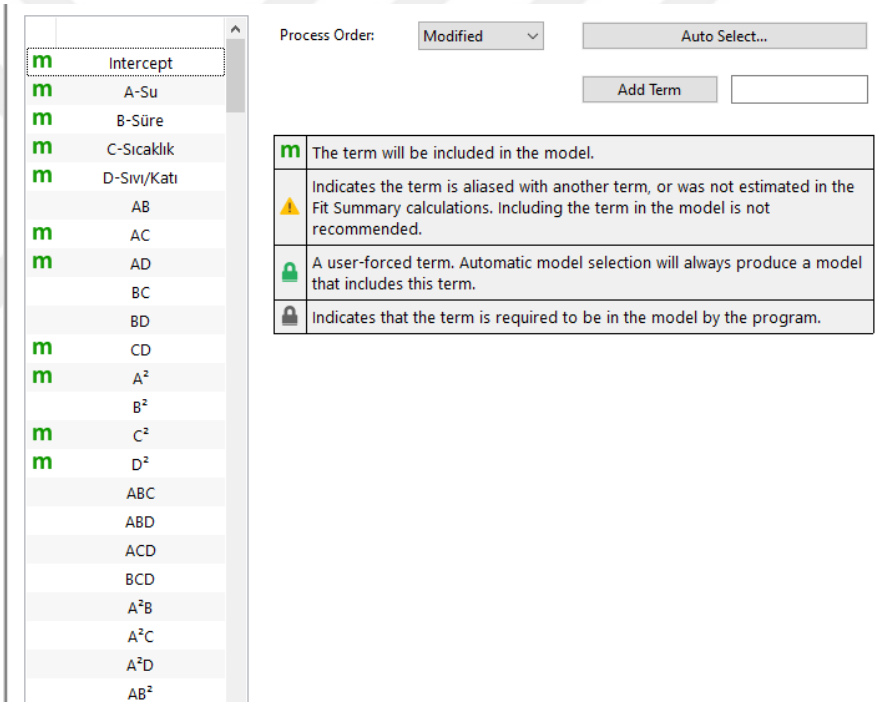
Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	0,1107	1	0,1107			
Linear vs Mean	0,0041	4	0,0010	1,74	0,1722	
2FI vs Linear	0,0011	6	0,0002	0,2629	0,9475	
Quadratic vs 2FI	**0,0072**	**4**	**0,0018**	**4,38**	**0,0152**	**Suggested**
Cubic vs Quadratic	0,0024	8	0,0003	0,5666	0,7785	Aliased
Residual	0,0038	7	0,0005			
Total	0,1293	30	0,0043			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 20. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



Şekil 21. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

ANOVA for Reduced Quadratic model

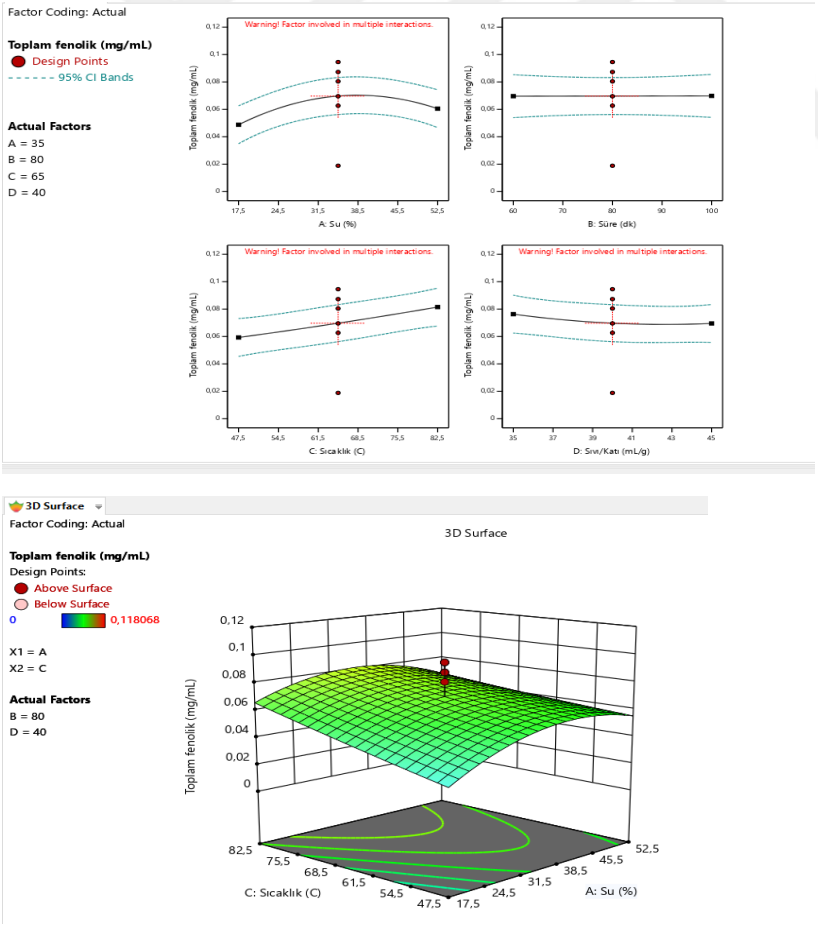
Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0120	10	0,0012	3,43	0,0101	significant
A-Su	0,0008	1	0,0008	2,37	0,1405	
B-Süre	2,306E-07	1	2,306E-07	0,0007	0,9798	
C-Sıcaklık	0,0029	1	0,0029	8,45	0,0090	
D-Sıvı/Katı	0,0003	1	0,0003	0,7945	0,3839	
AC	0,0004	1	0,0004	1,19	0,2886	
AD	0,0001	1	0,0001	0,2037	0,6568	
CD	0,0002	1	0,0002	0,5752	0,4575	
A^2	0,0064	1	0,0064	18,26	0,0004	
C^2	0,0000	1	0,0000	0,0353	0,8529	
D^2	0,0003	1	0,0003	0,8218	0,3760	
Residual	0,0066	19	0,0003			
Lack of Fit	0,0030	14	0,0002	0,2877	0,9701	not significant
Pure Error	0,0037	5	0,0007			
Cor Total	0,0186	29				

Factor coding is **Coded**.

Şekil 22. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

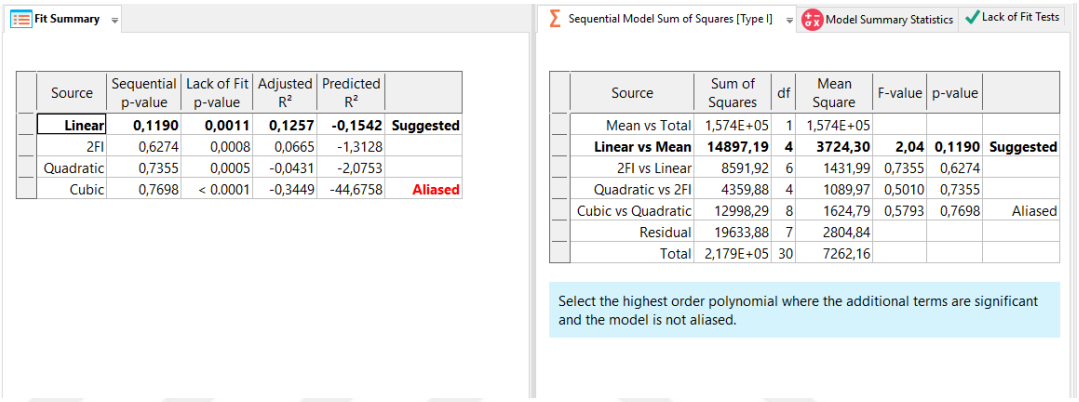
Şekil 23'teki faktörlerin etki grafiklerine bakıldığında istenen trend yakalanmıştır. Sürenin fenolik madde üzerinde değişen bir etkisi olmazken, eğer şekli % su faktöründe elde edilmiştir.



Şekil 23. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

ChCl:Gliserol (1:2) Sisteminin Toplam Şeker Analizi

ChCl:Gliserol (1:2) sistemiyle ile yapılan ekstraksiyon sonrası üçer tekrarlı olan toplam şeker miktarı ortalama sonuçları programa girildiğinde toplam şeker miktarı için yapılan tasarımda önerilen model "Linear"dir (Şekil 24 ve Şekil 25). Ancak model anlamlılığı yakalanamamıştır (Şekil 26). Grafiklere göre en az etkisi olan parametre süredir. Diğer parametreler yanıtı lineer olarak etkilemiştir (Şekil 27).



Fit Summary

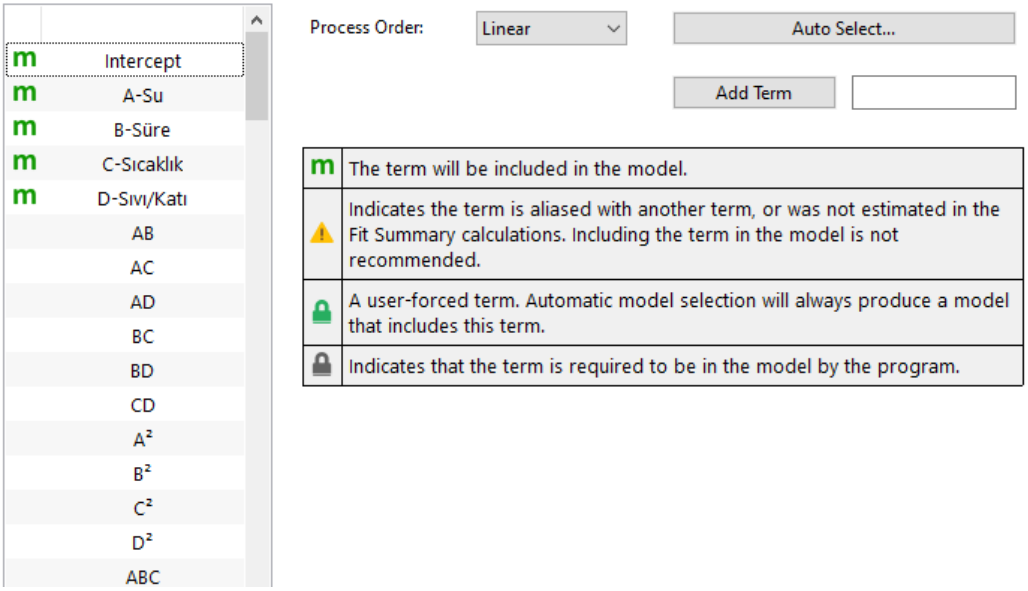
Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	**0,1190**	**0,0011**	**0,1257**	**-0,1542**	**Suggested**
2FI	0,6274	0,0008	0,0665	-1,3128	
Quadratic	0,7355	0,0005	-0,0431	-2,0753	
Cubic	0,7698	< 0.0001	-0,3449	-44,6758	**Aliased**

Sequential Model Sum of Squares [Type I] | Model Summary Statistics | Lack of Fit Tests

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	1,574E+05	1	1,574E+05			
Linear vs Mean	**14897,19**	**4**	**3724,30**	**2,04**	**0,1190**	**Suggested**
2FI vs Linear	8591,92	6	1431,99	0,7355	0,6274	
Quadratic vs 2FI	4359,88	4	1089,97	0,5010	0,7355	
Cubic vs Quadratic	12998,29	8	1624,79	0,5793	0,7698	Aliased
Residual	19633,88	7	2804,84			
Total	2,179E+05	30	7262,16			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 24. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam şeker miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı..

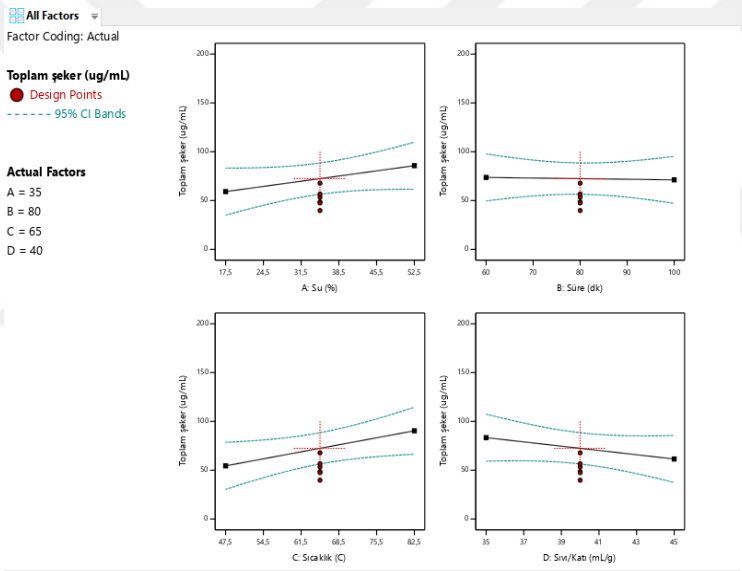


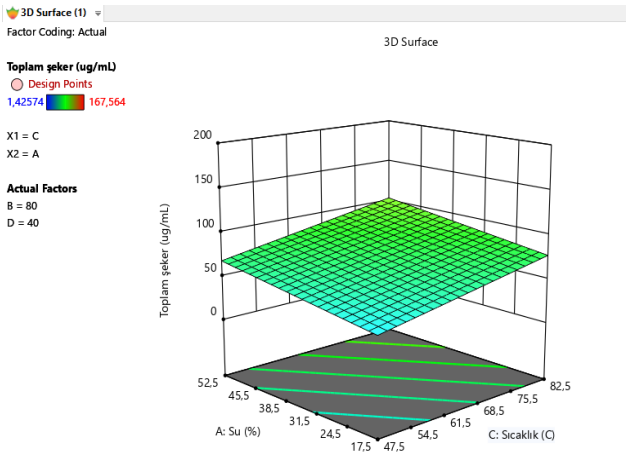
Şekil 25. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam şeker yanıtı modelinde faktörlerin etkisi. program çıktısı.

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	14897,19	4	3724,30	2,04	0,1190	not significant
	A-Su	4234,17	1	4234,17	2,32	0,1401	
	B-Süre	37,01	1	37,01	0,0203	0,8879	
	C-Sıcaklık	7746,80	1	7746,80	4,25	0,0498	
	D-Sıvı/Katı	2879,22	1	2879,22	1,58	0,2205	
	Residual	45583,96	25	1823,36			
	Lack of Fit	45129,77	20	2256,49	24,84	0,0011	significant
	Pure Error	454,20	5	90,84			
	Cor Total	60481,16	29				

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

Şekil 26. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.





Şekil 27. ChCl:Gliserol (1:2)-Toplam şeker yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı..

ChCl:Asetik Asit (1:2) Sisteminin Ekstraksiyon Sonuçları

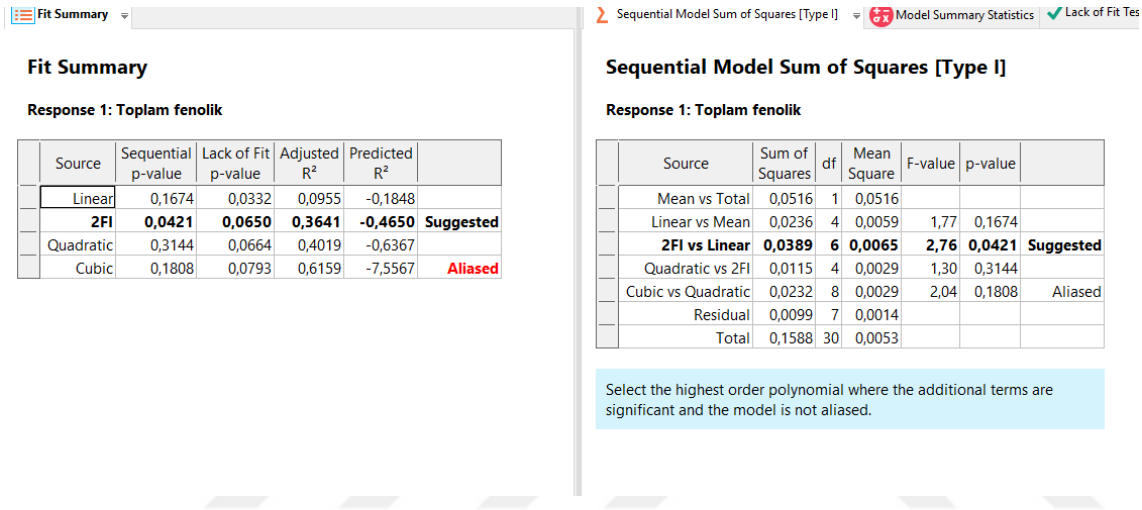
Çalışmadaki son DES sistemi olan ChCl:Asetik asit (1:2)'in kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında Run'lara göre toplam fenolik (mg/mL) ve toplam şeker miktarlarının (µg/mL) ortalama değerleri Şekil 28'de verilmiştir. Bu sistemde birçok Run'da fenolik madde elde edilememiştir. Asetik asitin fenolik madde eldesinde olumsuz etki gösterdiği söylenebilir. Bu sonuçlara göre yapılan parametre değerlendirmeleri ve ANOVA testi ilerleyen aşamalarda program ekran görüntüleriyle belirtilmiştir.

Std	Run	Factor 1 A:Su %	Factor 2 B:Süre dk	Factor 3 C:Sıcaklık C	Factor 4 D:Sıvı/Katı mL/g	Response 1 Toplam fenolik mg/mL	Response 2 Toplam şeker ug/mL
13	1	17,5	60	82,5	45	0	274,248
21	2	35	80	30	40	0,047486	85,9802
17	3	0	80	65	40	0,159192	130,98
9	4	17,5	60	47,5	45	0	111,541
14	5	52,5	60	82,5	45	0	251,591
4	6	52,5	100	47,5	35	0,0238116	150,271
2	7	52,5	60	47,5	35	0	91,2277
15	8	17,5	100	82,5	45	0	285,502
11	9	17,5	100	47,5	45	0,0654746	101,541
5	10	17,5	60	82,5	35	0,00371536	282,63
16	11	52,5	100	82,5	45	0,115568	287,927
10	12	52,5	60	47,5	45	0,0291053	112,053
7	13	17,5	100	82,5	35	0,0394965	264,644
28	14	35	80	65	40	0	121,03
27	15	35	80	65	40	0,0238606	145,551
25	16	35	80	65	40	0,00572499	139,182
18	17	70	80	65	40	0	150,469
6	18	52,5	60	82,5	35	0,0819438	294,594
19	19	35	40	65	40	0,0123911	130,535
1	20	17,5	60	47,5	35	0,1986	123,653
23	21	35	80	65	30	0,00278407	183,802
24	22	35	80	65	50	0,0137635	149,743
3	23	17,5	100	47,5	35	0,217324	140,056
29	24	35	80	65	40	0	138,323
26	25	35	80	65	40	0,0682685	126,475
22	26	35	80	100	40	0	166,706
8	27	52,5	100	82,5	35	0,024988	295,98
30	28	35	80	65	40	0,00199982	143,769
20	29	35	120	65	40	0,00464665	154,33
12	30	52,5	100	47,5	45	0,104589	110,502

Şekil 28. Design Expert programında ChCl:Asetik asit (1:2) sisteminin sonuçları program çıktısı.

ChCl:Asetik Asit (1:2) sisteminin toplam fenolik madde analizi

Programda iki yanıt da ayrı ayrı analiz edilerek oluşturulan deneme modellerine göre ilk yanıt olarak toplam fenolik madde miktarı için yapılan analizde model "2FI" olarak önerilmiştir (Şekil 29). İkili faktörlerin etkisinin olduğu bu model BC, BD ve CD etkileri çıkarılarak modifiye edildiği takdirde (Şekil 30) model anlamlı hale gelmiştir (Şekil 31).



Fit Summary

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0,1674	0,0332	0,0955	-0,1848	
2FI	**0,0421**	**0,0650**	**0,3641**	**-0,4650**	**Suggested**
Quadratic	0,3144	0,0664	0,4019	-0,6367	
Cubic	0,1808	0,0793	0,6159	-7,5567	**Aliased**

Sequential Model Sum of Squares [Type I] | Model Summary Statistics | Lack of Fit Tes

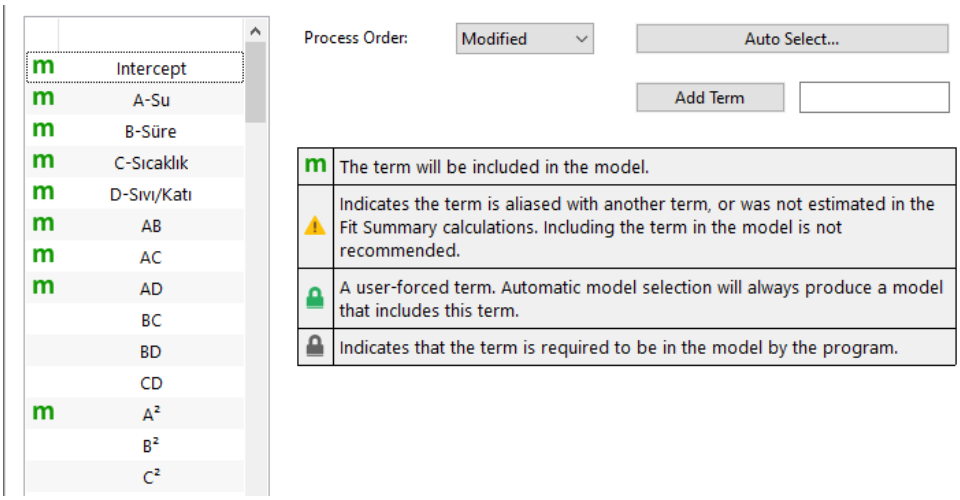
Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Mean vs Total	0,0516	1	0,0516			
Linear vs Mean	0,0236	4	0,0059	1,77	0,1674	
2FI vs Linear	**0,0389**	**6**	**0,0065**	**2,76**	**0,0421**	**Suggested**
Quadratic vs 2FI	0,0115	4	0,0029	1,30	0,3144	
Cubic vs Quadratic	0,0232	8	0,0029	2,04	0,1808	Aliased
Residual	0,0099	7	0,0014			
Total	0,1588	30	0,0053			

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Şekil 29. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam fenolik madde miktarı yanıt model özellikleri program çıktısı.



m	Intercept
m	A-Su
m	B-Süre
m	C-Sıcaklık
m	D-Sıvı/Katı
m	AB
m	AC
m	AD
	BC
	BD
	CD
m	A^2
	B^2
	C^2

Process Order: Modified

Auto Select...

Add Term

m	The term will be included in the model.
⚠	Indicates the term is aliased with another term, or was not estimated in the Fit Summary calculations. Including the term in the model is not recommended.
🔒	A user-forced term. Automatic model selection will always produce a model that includes this term.
🔒	Indicates that the term is required to be in the model by the program.

Şekil 30. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

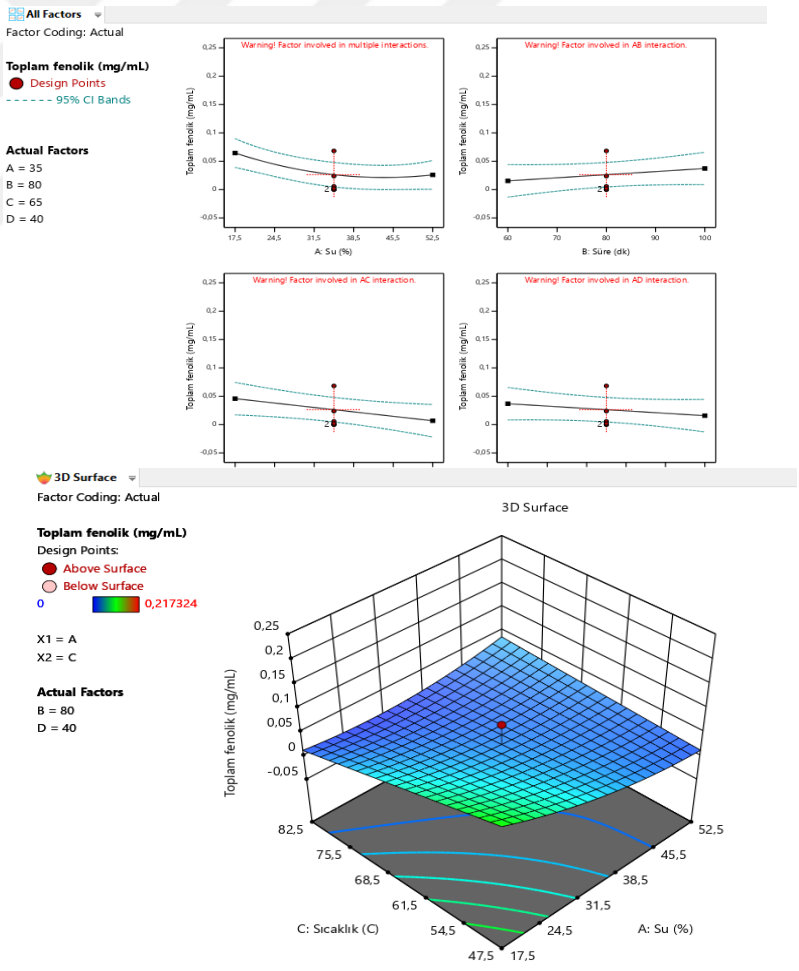
ANOVA for Reduced Quadratic model

Response 1: Toplam fenolik

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,0662	8	0,0083	4,25	0,0037	significant
A-Su	0,0089	1	0,0089	4,58	0,0442	
B-Süre	0,0029	1	0,0029	1,47	0,2385	
C-Sıcaklık	0,0091	1	0,0091	4,69	0,0421	
D-Sıvı/Katı	0,0027	1	0,0027	1,37	0,2548	
AB	0,0001	1	0,0001	0,0461	0,8320	
AC	0,0158	1	0,0158	8,12	0,0096	
AD	0,0164	1	0,0164	8,41	0,0086	
A^2	0,0103	1	0,0103	5,30	0,0316	
Residual	0,0409	21	0,0019			
Lack of Fit	0,0373	16	0,0023	3,23	0,0997	not significant
Pure Error	0,0036	5	0,0007			
Cor Total	0,1072	29				

Şekil 31. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

Programda yapılan ANOVA testine göre en çok etkisi olan parametre % su miktarı ve sıcaklıktır (Şekil 32).

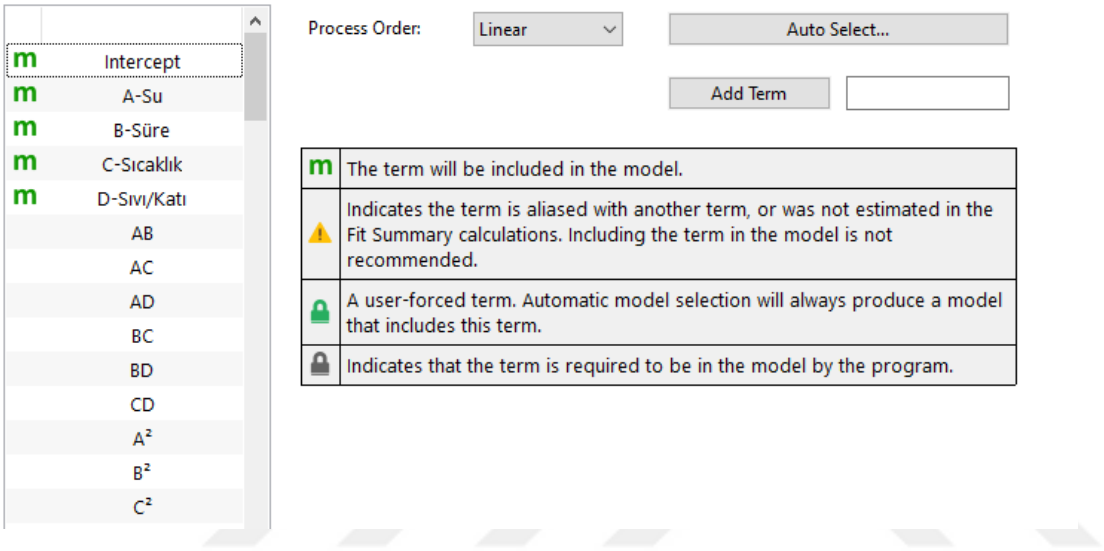


Şekil 32. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam fenolik madde yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

.

ChCl:Asetik Asit (1:2) sisteminin toplam şeker analizi

ChCl:Asetik asit (1:2) sistemiyle ile yapılan ekstraksiyonunda toplam şeker miktarı için yapılan tasarımda programın önerisi dahilinde yapılan "linear" proseste (Şekil 33) anlamlılık yakalanmıştır (Şekil 34). Lineer etkinin ise sıcaklıkla olduğu üç boyutlu grafikten açık bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 35).



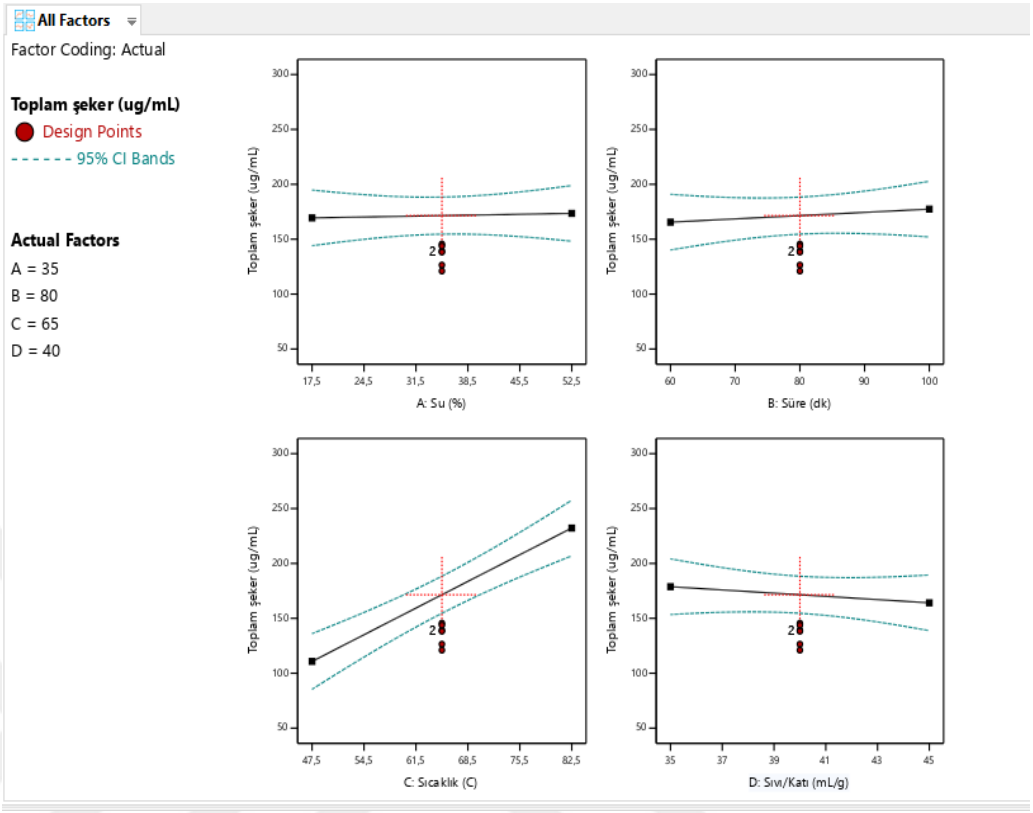
Şekil 33. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam şeker yanıtı modelinde faktörlerin etkisi program çıktısı.

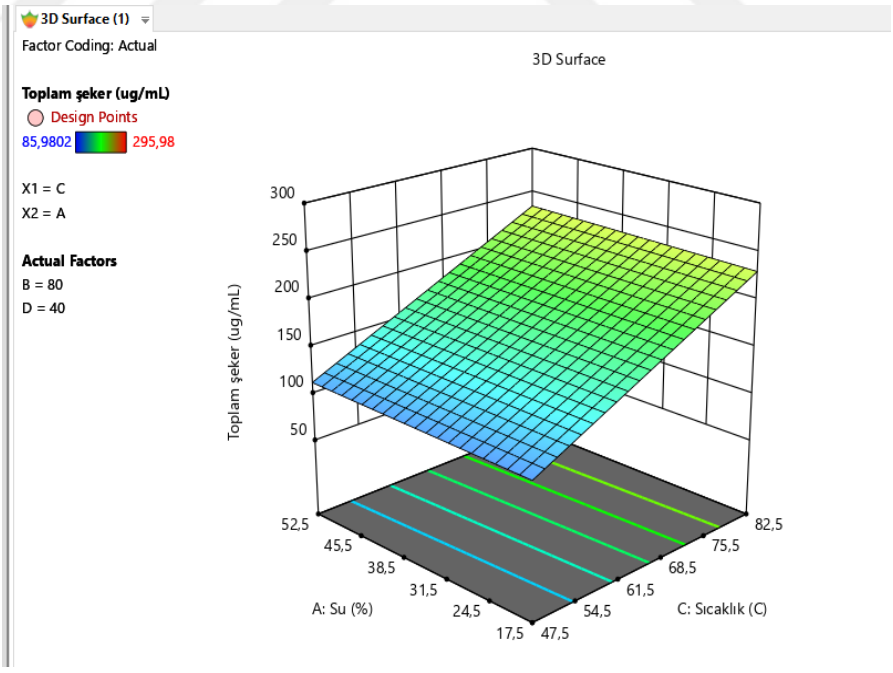
Analysis of Variance | Fit Statistics | Model Comparison Statistics | Coefficients

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	90781,56	4	22695,39	11,23	< 0.0001	significant
A-Su	101,30	1	101,30	0,0501	0,8246	
B-Süre	845,80	1	845,80	0,4186	0,5235	
C-Sıcaklık	88539,82	1	88539,82	43,82	< 0.0001	
D-Sıvı/Katı	1294,64	1	1294,64	0,6408	0,4310	
Residual	50511,75	25	2020,47			
Lack of Fit	50030,28	20	2501,51	25,98	0,0009	significant
Pure Error	481,47	5	96,29			
Cor Total	1,413E+05	29				

Factor coding is **Coded**.

Şekil 34. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam şeker yanıtı model anlamlılığı program çıktısı.

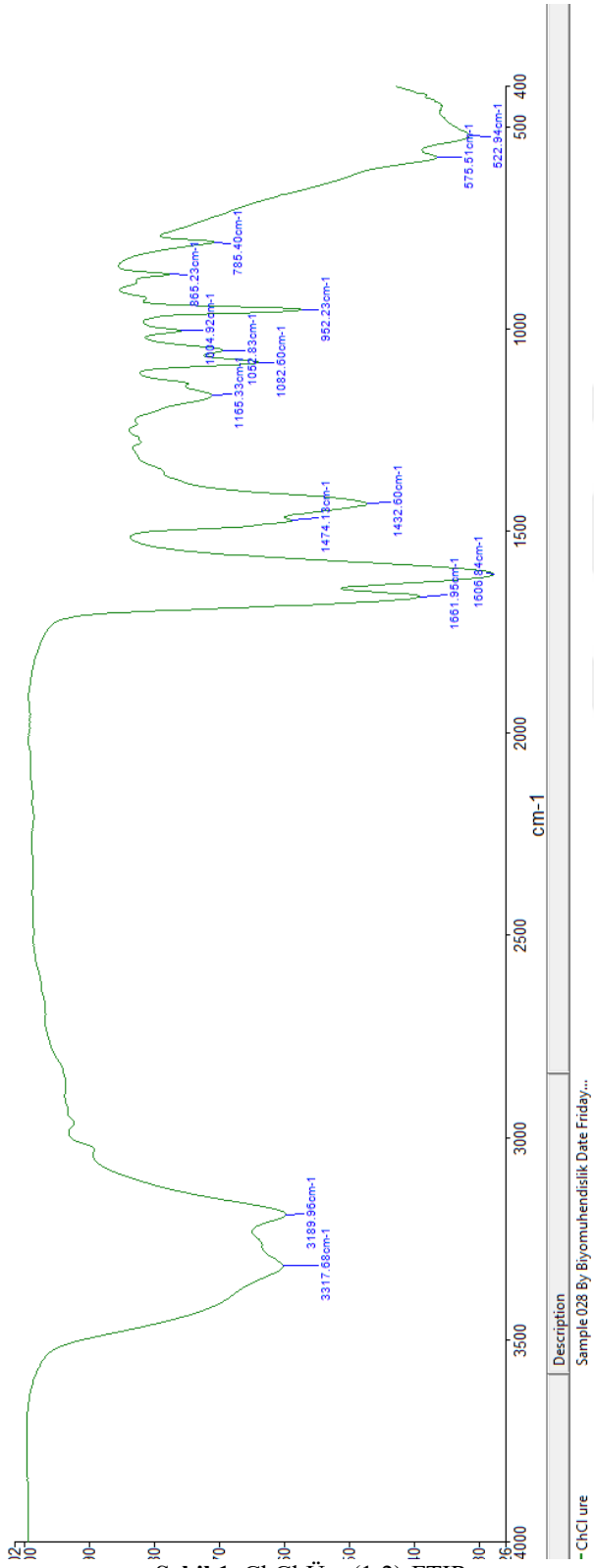




Şekil 35. ChCl:Asetik asit (1:2)-Toplam şeker yanıtı faktörlerin etki grafikleri program çıktısı.

EK-2

ChCl:Üre (1:2) DES FTIR sonucu



Şekil 1. ChCl:Üre (1:2)-FTIR