



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



MİKROALGLERDEN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

AĞBA, Hasan Cenk

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

MİKROALGLERDEN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

AĞBA, Hasan Cenk

Danışman: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2020

Hasan Cenk AĞBA tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Mikroalglerden Nanopartikül Üretimi ve Karakterizasyon” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 04/09/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Murat ELİBOL

.....

Raportör Üye : Doç Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

.....

Üye : Doç.Dr. Müge İŞLETEN HOŞOĞLU

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Mikroalglerden Nanopartikül Üretimi ve Karakterizasyon*” 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.

04 / 09 / 2020

İmzası

Hasan Cenk AĞBA



ÖZET**MİKROALGLERDEN NANOPARTİKÜL SENTEZLENMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

AĞBA, HASAN CENK

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Ağustos 2020, 129 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında yeşil sentez yöntemi ile hücre içi ve hücre dışı zengin metabolitler içeren *Galdieria sulphuraria* mikroalgi kullanılarak titanyum dioksit ve gümüş nanopartikül sentezleme ve kozmetik alanında kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

İlk olarak ön optimizasyon çalışmaları doğrultusunda metal çözeltisi konsantrasyonu ile hücre dışı metal: süpernatant ve hücre içi metal: biyokütle oranı iki farklı parametre olarak optimize edilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyon analizi UV-Vis spektrofotometre, Zeta Sizer Nanorange ve antibakteriyal aktivite testi ile gerçekleştirilmiştir. 3,4 mM Titanyum (IV) bis(amonyum laktat) hidroksit metal çözeltisi derişimi ve 7,8 metal çözeltisi/süpernatant (v/v) oranı ile optimum koşullarda nanopartiküller ile elde edilmiştir. Kontrollü bir şekilde ölçek büyütürerek titanyum dioksit nanopartiküller sentezlenmesi için Foto-Biyojenik Nanopartikül Reaktör (FBNP) sistemi kullanılmıştır. Bu reaktör sisteminde sentez sırasında nanopartikül boyut ve stabilitesini etkileyen inkübasyon süresi, pH ve karıştırma hızı parametleri optimize edilmiştir. Bu çalışma doğrultusunda pH 8,5'te 285 rpm karıştırma hızı ve 22 dakikalık inkübasyon süresi sonunda ortalama 120 nm çapında nanopartikül üretilmiştir. Optimum koşullarda sentezlenen titanyum dioksit nanopartiküllerinin karakterizasyonu işlemi gerçekleştirilerek kozmetik alanda kullanım potansiyelleri *in vitro* hücre kültürü denemeleri ile incelenmiştir.

Anahtar sözcükler: Metalik nanopartikül, *Galdieria sulphuraria*, yeşil sentez, karakterizasyon, biyoreaktör, kozmetik



ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES FROM MICROALGAE

AĞBA, Hasan Cenk

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELİBOL

August 2020, 129 pages

In this thesis, the aim is to investigate green synthesis of titanium dioxide and silver nanoparticle from *Galdieria sulphuraria* microalgae that containing rich intracellular and extracellular metabolites and potential use in cosmetics.

At first step, in the line with preliminary optimization studies, extracellular metal: supernatant ratio and intracellular metal: biomass ratio with metal solution concentration as two different parameters were optimized. The characterization analysis of nanoparticles was carried out with UV-Vis spectrophotometer, Zetasizer Nano Range, and antibacterial activity test. Nanoparticles synthesized under optimum conditions with 3,4 mM Titanium (IV) bis (ammonium lactate) dihydroxide metal solution concentration and 7,8 metal solution/ supernatant (v/v) ratio. Photo-Biogenic Nanoparticle Reactor (FBNP) system was used to synthesize titanium dioxide nanoparticles by scaling up in a controlled manner. In this reactor system, incubation time, pH and mixing rate parameters that affect on nanoparticle size and stability were optimized. In reactor system, titanium nanoparticles with an average of 120 nm diameter were produced after 22 minutes incubation period at a pH of 8,5 at 285 rpm. Titanium dioxide nanoparticles produced under optimum conditions were characterized and the potential use in cosmetics was also investigated by *in vitro* cell culture assays.

Keyword: Metallic nanoparticle, *Galdieria sulphuraria*, green synthesis, characterization, bioreactor, cosmetics

ÖNSÖZ

Benim için yüksek lisans süreci, lisans döneminde almış olduğum eğitim ve öğretim çıktıları ile belirli bir alanda uzmanlaşma gösterdiğim bir yolculuk oldu. Yüksek lisansın ilk senesinde almış olduğum teorik ve uygulamalı dersler doğrultusunda özgün bir araştırma konusu araştırma süreci başladı. O dönemlerde daha sonradan dahil olduğum 117M052 no'lu 'Mikroalglerden biyojenik nanopartikül sentezlenmesi, optimizasyonu ve biyoteknolojide kullanım potansiyelinin araştırılması' isimli TÜBİTAK-MAG projesi yüksek lisans tezimi şekillendirdi. Son dönemlerde çevre dostu ve toksik olmayan yeşil sentez yöntemi ile mikroorganizmalar kullanılarak biyojenik nanopartikül sentezleme çalışmalarına karşı ilgi gittikçe artmıştır. Bu alanda yapılan araştırmalar sonucunda mikroalglerin denemelerinin kısıtlı olduğu gözlemlenmiştir. Böylelikle mikroalgal metabolitler kullanılarak nanopartikül sentezlenme potansiyeli ve optimizasyon çalışmaları tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Akademik hayatımın ilk basamağı olan yüksek lisans kariyerimde böyle kapsamlı bir projede yer almak bilimsel anlamda bilgi ve becerilerimin gelişmesine katkıda bulunmuştur. Bu süreç boyunca olumlu veya olumsuz bir durum ile karşılaşıldığında alternatif ve pratik yolların daha önceden planmış olması gerektiğinin farkına vardım. Aynı zamanda tez boyunca haftalık planlanmalar yaparak zamanın nasıl daha verimli kullanılabileceğinin farkına vardım. Genel olarak yüksek lisans eğitim hayatımın başından sonuna baktığımda hem bilim hem de hayat tecrübesi anlamında kendim adına pek çok yol kat ettiğimi görebiliyorum. Tüm bu süreç boyunca deneyimleri ve bilgileri ile bana yol gösteren Prof. Dr. Murat ELİBOL'a teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

04/09/2020

Hasan Cenk AĞBA



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1.GİRİŞ.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1 Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji.....	3
2.2 Nanopartikül	5
2.3 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	5
2.3.1 Organik Nanopartiküller	6
2.3.2 İnorganik Nanopartiküller	7
2.4 Nanopartikül Üretim Prosesleri	10
2.4.1 Yukarıdan aşağıya(Top Down) nanopartikül sentezi	10
2.4.2 Aşağıdan yukarıya(Bottom Up) nanopartikül sentezi	10

2.5 Yeşil Nanoteknoloji	12
2.5.1 Yeşil Kimya	14
2.5.2 Biyojenik nanopartikül sentezinde kullanılan organizmalar.....	16
2.5.3 Yeşil sentez üretim mekanizmaları	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 Mikroalg Stok Kültürünün Hazırlanması.....	30
3.2 Mikroalg Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	31
3.2.1 Mikroskobik ile hücre sayımı	31
3.2.2 Kuru ağırlık ölçümü	31
3.2.3 Spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçümü	32
3.3 Biyokimsyal Analiz Yöntemleri.....	32
3.3.1 Toplam şeker tayini.....	32
3.3.2 Toplam protein tayini.....	34
3.4 Hücre İçi ve Hücre Dışı Nanopartikül Sentezi.....	35
3.4.1 Hücre dışı nanopartikül sentezi.....	35
3.4.2 Hücre içi nanopartikül sentezi.....	37
3.5 FBNP Reaktör Sistemi	39
3.5.1 FBNP reaktör sistemi ile titanyum nanopartikül sentezi	40
3.6 Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	43

3.6.1 Zeta-Sizer.....	43
3.6.2 Ultraviyole ve görünür alan spektroskopisi(UV-Vis)	43
3.6.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi(FTIR).....	44
3.6.4 Taramalı elektron mikroskobu(SEM).....	44
3.6.5 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyal tayini	44
3.6.6 Minimum inhibisyon konsantrasyon(MIC) belirlenmesi	45
3.7 Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları	46
3.7.1 Hücre hatları	46
3.7.2 MTT testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	46
3.7.3 Yara iyileştirme özelliğinin belirlenmesi.....	47
3.7.4 FITC ile işaretli nanopartiküllerin görüntülenmesi	47
4.BULGULAR ve TARTIŞMA	49
4.1 <i>Galdieria sulphuraria</i> Büyüme Kinetiği	49
4.2 Biyokimyasal Analizler	50
4.3 Ön Optimizasyon Denemeleri	52
4.3.1 Hücre dışı sentezlenen partiküllerin boyut analizi.....	52
4.4 Hücre İçi Sentezlenen Partiküllerin Boyut Analizi	61
4.5 Sentezlenen Partiküllerin UV-Spektrofotometrik Analizi.....	71
4.6 Sentezlenen Partiküllerin Antibakteriyal Analizi	73

4.7 FBNP Reaktör Sistemi ile Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Optimizasyon Çalışması.....	76
4.8 FBNP Reaktör Sistemi ile Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Karakterizasyonu	77
4.9 Optimize Edilerek Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Karakterizasyonu	82
4.10 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Analizi.....	87
4.11 Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları.....	90
4.11.1 Hücre kültürü	90
4.11.2 MTT testine dayalı sitotoksisite denemeleri	90
4.11.3 Yara iyileşmesine modeline bağlı biyoaktivite testi sonuçları.....	95
4.11.4 FITC-TiO ₂ nanopartiküllerin hücresel alımı.....	99
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR DİZİNİ	107
TEŞEKKÜR.....	125
ÖZGEÇMİŞ	127



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Nanopartiküllerin yapılarına göre sınıflandırılması.....	6
2.2 Organik nanopartiküller a) çubuk şeklinde polimer partikülleri, b) lipozomlar, c) katı-lipit partiküller d) protein bazlı partiküller e) katmanlı partiküller f) dendrimerler	6
2.3 Nanopartikül sentezleme yöntemleri	12
2.4 Gümüş nanopartiküllerin fungal yöntem ile biyojenik sentez mekanizması ...	19
2.5 Bitkisel yeşil sentez mekanizması.....	21
2.6 Mikroalglerden nanopartiküllerin biyosentezi için çeşitli yöntemler	23
2.7 Nanopartiküllerin hücre içi ve hücre dışı sentez yolları.....	27
3.1 <i>Galdieria sulphuraria</i> için stok kültür üretimi	30
3.2 FBNP reaktör sistemi kontrol(a) ve izleme(b) panosu ana ekran görüntüleri .	40
3.3 Reaktör kaplarının genel görüntüsü	40
3.4 <i>Galdieria sulphuraria</i> 'nın karıştırılmalı reaktörde kültivasyonu.....	42
4.1 <i>Galdieria sulphuraria</i> hücrelerinin zamana karşı hücre sayısı değerleri.....	49
4.2 <i>Galdieria sulphuraria</i> hücrelerinin zamana karşı optik yoğunluk değerleri ...	50
4.3 <i>Galdieria sulphuraria</i> hücrelerinin zamana karşı hücre sayısı değerleri.....	50
4.4 Standartlar ile elde edilen toplam şeker(a) ve protein(b) tayini eğrisi	51
4.5 Zeta-Sizer cihazı ile ortalama partikül çapı hesaplanan 2(a) ve 3(b) numaralı desenlerin sonucu	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Zeta-Sizer cihazı ile ortalama gümüş partikül çapı hesaplanan 4(a) ve 10(b) numaralı desen sonucu	61
4.7 Zeta-Sizer cihazı ile hücre içi ortalama gümüş partikül çapı hesaplanan 1 numaralı desen sonucu	66
4.8 Zeta-Sizer cihazı ile hücre içi ortalama titanyum partikül çapı hesaplanan 7 numaralı desen sonucu	70
4.9 Zeta-Sizer cihazı ile gümüş(a) ve titanyum(b) nanopartiküllerinin UV-Vis spektrofotometre analizi.....	73
4.10 FBNP reaktör sistemi ile sentezlenen titanyum nanopartikül inkübasyon görüntüsü.....	76
4.11 FBNP reaktör sistemi ile asidik ortamda sentezlenen titanyum nanopartikül inkübasyon görüntüsü	77
4.12 FBNP reaktörde sentezlenen 5(a), 7(b) ve 19(c) numaralı desenlerin ortalama titanyum partikül çapı.....	80
4.13 FBNP reaktör sisteminin CCD model optimizasyon çalışmasının üç boyutlu görüntüsü.....	81
4.14 Optimize edilen FBNP reaktörde sentezlenen titanyum nanopartikülünün görüntüsü.....	82
4.15 Optimize edilen ve farklı zamanlarda FBNP reaktörde sentezlenen ortalama titanyum partikül çapı.....	83
4.16 Etüvde cam petri(a) ve ependorflarda(b) kurutulan titanyum nanopartikül görüntüsü.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin UV-Vis spektrofotometre Ölçümü	85
4.18 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin FTIR görüntülemesi.....	86
4.19 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin SEM görüntüsü a) 65000x büyütme b) 100000x büyütme c) 120000x büyütme ve d) 120000x büyütme	87
4.20 MIC deneyinde aktive edilen test mikroorganizmaları ve 0.5 MacFarland standardı görüntüsü	88
4.21 MIC tayini inkübasyon öncesi(a) ve sonrası(b) mikropalakaların görüntüleri	89
4.22 a) <i>Detroit 551</i> hücrelerinin, b) <i>HaCaT</i> hücrelerinin 10X büyütmedeki ters faz ışık mikroskop görüntüleri (bar çizgisi 100 µm)	90
4.23 a) Direkt kurutma ve b) Santrifüj sonrası supernatant kurutma sonrası nanopartiküllerinin <i>HaCaT</i> hücreleri üzerinden denenilen 24, 48 ve 72. Saaatlerdeki MTT testi sonucu hazırlanan % canlılık grafikleri	92
4.24 a) Direkt kurutma ve b) Santrifüj sonrası supernatant kurutma sonrası nanopartiküllerinin <i>HaCaT</i> hücreleri üzerinden denenilen 24, 48 ve 72. Saaatlerdeki MTT testi sonucu hazırlanan % canlılık grafikleri	93
4.25 a) <i>HaCaT</i> hücrelerinin, b) <i>Detroit 551</i> hücrelerinin yara modeli kuyucuklardaki 10X büyütmedeki ters faz ışık mikroskopisi görüntüleri(bar çizgisi 100 µm)	95

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Bazı metallik nanopartiküllerin uygulama alanları (Gatto and Bardi, 2016)	8
2.2 Bazı metal oksit nanopartiküllerin özellikleri (Ealias and Saravanakumar, 2017).....	8
3.1 Cyanidium besin ortamı içeriği	31
3.2 Glukoz çözeltileri ile hazırlanan standartlar ve konsantrasyonları.....	33
3.3 Toplam protein tayini için standart grafik ve örnek hazırlanması.....	34
3.4 Titanyum (IV)bis (amonyum laktato) dihidroksit: Süpernanant için belirlenen deneme deseni.....	36
3.5 AgNO ₃ : Süpernanant için belirlenen deneme deseni.....	37
3.6 Titanyum (IV) bis (amonyum laktato) dihidroksit: Yaş biyokütle için belirlenen deneme deseni.....	38
3.7 AgNO ₃ : Yaş biyokütle için belirlenen deneme deseni	38
3.8 <i>Galdieria sulphuraria</i> süpernatantı ile FBNP reaktör sisteminde gerçekleştirilen titanyum nanopartikül üretimi için oluşturulan deneme deseni ...	41
4.1 <i>Galdieria sulphuraria</i> 'nın biyokimyasal analiz sonuçları.....	52
4.2 <i>Galdieria sulphuraria</i> süpernatantı ile hücre dışı titanyum nanopartikül sentezi için oluşturulan ön optimizasyon denemeleri	53
4.3 <i>Galdieria sulphuraria</i> süpernatantı ile hücre dışı gümüş nanopartikül sentezi için oluşturulan ön optimizasyon denemeleri	57

TABLOLAR DİZİNİ(devamı)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 <i>Galdieria sulphuraria</i> biyokütle aracılığıyla gümüş nanopartikül sentezinin ön optimizasyonu çalışması	63
4.5 <i>Galdieria sulphuraria</i> biyokütle aracılığıyla titanyum nanopartikül sentezinin ön optimizasyonu çalışması	67
4.6 Sentezlenen gümüş ve titanyum metalik nanoapartiküllere özgü antibakteriyal aktivite analizi	74
4.7 FBNP reaktör sistemi ile sentezlenen titanyum metaliklerine ait ortalama partikül yarıçapları	77
4.8 Design Expert programı ile oluşturulan deneme deseninin ANOVA sonuçları	80
4.9 CCD model ile gerçekleştirilen optimizasyon işlemi veri sonuçları.....	81
4.10 Kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki (200 µl) konsantrasyonları	88
4.11 MTT analizi sırasında kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki konsantrasyonları	91
4.12 <i>HaCaT</i> hücrelerinin yara modeli sonrası besin kontrolünde santrifüj sonrası süpernant (NP1)ve direk kurutma (NP2) sonrası elde edilen nanopartiküllerin uygulanma sonucu belli aralıklarla, 20x büyütmedeki ters faz ışık mikroskopi görüntüleri(bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)	96
4.13 <i>Detroit 551</i> hücrelerinin yara modeli sonrası besin kontrolünde direk kurutma (NP2) sonrası elde edilen nanopartiküllerin uygulanma sonucu belli aralıklarla, 10x büyütmedeki ters faz ışık mikroskopi görüntüleri(bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya).....	98
4.14 Hücresel alım analizi sırasında kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki konsantrasyonları	99

TABLOLAR DİZİNİ(devamı)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.15 Santrifüj sonrası süpernatantın kurutularak elde edilen farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin(NP1) hücresel alım sonucu elde edilen farklı büyütmelelerdeki floresan mikroskobu görüntüleri (bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)	101
4.16 Direk kurutma sonrası elde edilen farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin(NP2) hücresel alım sonucu elde edilen farklı büyütmelelerdeki floresan mikroskobu görüntüleri (bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
C	Karbon
H	Hidrojen
O	Oksijen
Au	Altın
Ag	Gümüş
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
Ti	Titanyum
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Fe	Demir
Pb	Kurşun
Zn	Çinko
Pt	Platin
Pd	Paladyum
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
MgO	Magnezyum oksit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CuO	Bakır oksit
NiO	Nikel oksit
ZnO	Çinko oksit
CO ₂	Karbon dioksit
HCl	Hidroklorik asit
TiO ₂	Titanyum dioksit
SiO ₂	Silisyum dioksit
NaOH	Sodyum hidroksit
ZrO ₂	Zirkonyum oksit
Fe ₂ O ₃	Ferrik oksit
Al ₂ O ₃	Aluminyum oksit
HAuCl ₄	Kloraurik asit
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
L	liter
g	gram
np	nanoparticle
ppm	parts per million
μl	mikroliter
nm	Nanometer
μm	Micrometer
mM	Milimolar
rpm	Revolution per minute
GO	Graphene Oxide
MTT	Metil Thiazol Tetrazolium
ATP	Adenosine Triphosphate
PBS	Phosphate-Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumin
FBS	Fetal Bovine Serum
RSM	Response Surface Methodology
CCD	Central Composite Design
TEM	Transmission Electron Microscope

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
SEM	Scanning Electron Microscope
HIV	Human Immunodeficiency Virus
GQD	Graphene Quantum Dots
EDX	Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy
XRD	X-ray Diffraction
ETS	Electron Transport Chain
PDI	Polydispersity Index
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
CFU	Colony Forming Unit
MIT	Massachusetts Technology Institute
CNP	Carbon Nanoparticle
AFM	Atomic Force Microscope
STM	Scanning Tunneling Microscopes
NEC	Nippon Electric Company
ISO	International Organization for Standardization
NNI	National Nanotechnology Initiative
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
MCF-7	Human Breast Carcinoma Cell Line
HeLa	Human Cervix Adenocarcinoma
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
HepG2	Human Hepatocyte Carcinoma
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
DH ₂ O	Deionized Water
HaCaT	Human Keratinocyte Cell Line
Detroit 551	Homo Sapiens Skin Normal
SWCNT	Single-Walled Carbon Nanotubes
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotubes
MM418 C1	Human Skin Melanoma
DMEM-HG	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
HR-TEM	High Resolution Transmission Electron Microscopy

1.GİRİŞ

Nanoteknoloji, boyutları 1-100 nm arasında değişen nano ölçekli malzemelerin uygulamalarını inceleyen dünya çapında önemli olan mühendislik ve bilim dallarından bir tanesidir (Leon et al., 2020). Nanoteknoloji günümüzde malzeme bilimi, gıda, biyoteknoloji ve tıp gibi yaşam bilimleri dahil olmak üzere birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Nanopartiküller ise boyut ve yapılarından dolayı benzersiz optik, manyetik, elektronik ve katalitik özellikleri ile nanoteknoloji çalışmalarında yer almaktadır. Biyoteknoloji tanım olarak temel ve doğa bilimleri ile mühendislik çalışmalarından yararlanarak biyolojik yöntemler ile birçok alanda hizmet ve ürün geliştirmek için kullanılan yöntemlerdir. Nanobiyoteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknoloji alanlarının birlikte kullanıldığı ve biyolojik yapıların nano boyutlarda çeşitli sorunların araştırılması ve anlaşılması için kullanıldığı araştırma alanlarından bir tanesidir (Jewett and Patolsky, 2013; Jain, K., 2017). Son zamanlarda, yeşil metal oksit nanopartiküller sentezi nanobiyoteknolojinin dikkat çekici konularından birisi olmuştur. Metal ve metal oksit nanopartiküller çöktürme, elektrokimyasal indirgenme gibi kimyasal yöntemler, püskürtme, lazer ablasyon, elektron ışını litografisi gibi fiziksel yöntemler ve bakteri, bitki, fungus, alg gibi farklı mikroorganizmaları kullanarak biyolojik yöntemler ile sentezlenebilir (Manik et al., 2020). Yeşil yöntem ile sentezlenen nanopartiküller, daha düşük üretim maliyeti, daha az toksisite ve çevresel tehlike göstermesi sebebiyle kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre daha güvenilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmıştır (Elsharawy et al.,2020). Metal nanopartiküllerin çevre dostu ve kolay üretim potansiyeline sahip olmasından dolayı ilaç, fotokataliz ve biyoteknoloji gibi alanlardaki uygulamaları da zamanla artış göstermiştir. Mikroalglerin üretim ölçeklendirmesinin kolay olması, yüksek büyüme hızı göstermesi, düşük maliyetli ve kolay hasatlanabilir olması nanopartikül çalışmalarında kullanılması düşünülen bir organizma olarak karşımıza çıkmıştır. Alg ekstraktları proteinler, lipitler, karbonhidratlar, karotenoidler, polifenoller, fikosiyantinler gibi biyoaktif ajanları içerebilmektedir. Bu biyoaktif bileşikler indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak yeşil sentez yönteminde kullanılmaktadır (Khanna et al., 2019; Arya et al., 2019). Yeşil sentez yöntemi ile mikroorganizmalar kullanılarak gümüş (Ag), altın (Au), bakır (Cu), çinko oksit (CeO_2), titanyum dioksit (TiO_2), demiroksit (Fe_2O_3) gibi metalik nanopartiküller sentezlenmiştir (Yugay et al., 2020). Yapılan araştırmalar sonucunda literatürde *Chlorella vulgaris*, *Klebsormidium flaccidum*, *Cosmarium impressulum*, *Tetraselmis seucica*, *Chlorella salina* mikroalg türleri ile hücre içi ve hücre dışı metalik nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir (Sharma et al.,

2016). Yapılan bu araştırmalarda genellikle metal çözeltisi ile tek konsantrasyonu denemeleri yapılmış ve sentezlenen nanopartiküllerin optimizasyon çalışmaları gerçekteştirilmemiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında; kırmızı bir alg türü olan *Galdieria sulphuraria* hücre içi ve hücre dışı metabolitleri kullanılarak uygun koşullarda titanyum ve gümüş metalik nanopartiküllerin biyosentez çalışmalarının gerçekteştirilmesi; optimize edilen koşullarda üretilen nanopartiküllerin *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri ile kozmetik alanındaki kullanım potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji

Nano terimi Yunanca bir kelime olan nanos olarak ifade edilen cüce anlamından gelmektedir. Aynı zamanda Cambridge sözlüğünde nano kelimesi, çok küçük anlamına gelen bir ön ek olarak kullanılmaktadır (Kargozar and Mozafari, 2018). Amerikalı fizikçi ve Nobel ödül sahibi Richard Feynman, 1959 yılında nanoteknoloji kavramını tanımladı. Amerikan Fizik Derneği'nin yıllık toplantısında Feynman, Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde "There's plenty of room at the bottom" başlıklı bir konferans verdi. Bu konferansta Feynman, "24 ciltlik Britannica ansiklopedisinin tamamını bir iğnenin başına neden yazamıyoruz?" hipotezi ile malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi için yeni düşünce yollarına ışık tuttu. Bu sebepten dolayı Richard Feynman modern nanoteknolojinin babası olarak kabul edilmiştir (Bayda et al., 2020, Bhushan, 2010).

Nanoteknoloji terimi ilk defa 1974 yılında Japon bilim adamı Norio Taniguchi tarafından yazılan bir makalede kullanılmıştır. Norio'nun yazmış olduğu makalede nanoteknoloji, maddenin bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması veya deformasyona uğraması olarak tanımlanmıştır (Hulla et al., 2015). Nanoteknoloji tarihindeki bir diğer önemli kişi olan Eric Drexler, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden (MIT) moleküler nanoteknoloji alanında ilk doktora derecesine sahip bilim adamı olmuştur. Nanoteknolojinin altın çağı Eric Drexler tarafından 1986 yılında yayınlanan "Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Gelecek Dönemi" ve "Nanosistem: Moleküler, Makine, İmalat ve Hesaplama" başlıklı kitapları ile başlamıştır. 1980'lerin ilk yıllarında, atomların veya moleküllerin görüntülenmesini mümkün kılan iki buluş nanoteknoloji alanında önemli ilerlemelere yol açmıştır. Nanoteknolojinin gelişmesinde önemli olan ilk atılım, 1981 yılında Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından IBM Zürih araştırma laboratuvarında icat edilen Tarama Tünel mikroskobu (STM) olmuştur. STM, ışınım için özel lens, ışık veya elektron kaynak gerektirmeyen, küçük nesnelerin yüzey kısmını üç boyutlu olarak gösteren yüksek çözünürlüğe ve güce sahip bir mikroskoptur. Binnig ve Rohrer 1986 yılında bu buluş ile Nobel Fizik Ödülü'ne layık görülmüştür (Bayda et al., 2020). İkinci önemli buluş olan 1986 yılında Gerd Binnig, Calvin Quate ve Christoph Gerber ilk Atomik Kuvvet Mikroskobunu (AFM) geliştirmiştir. AFM cihazı, mikroskop ucu kullanılarak malzeme yüzeyi üzerinde nano ölçekli görüntüleme, ölçüm ve işlemede kullanılan

en gelişmiş mikroskoplardan biridir (Requicha et al., 2001). 1985 yılında H. W. Kroto'nun ve R. E. Smalley'nin araştırma ekipleri tarafından 60 karbon atomundan oluşan Fulleren C60 adlı futbol şekilli bir molekül keşfedildi. Fulleren, tüp şeklinde içi boş bir küre olan ve tamamen karbon atomundan oluşan bir moleküldür. Bu keşfin ardından, 1991 yılında Japon NEC şirketi araştırmacılarından birisi olan Sumio Iijiman karbon nanotüpleri bulunduğunu açıklamıştır. ABD hükümeti 2000 yılına kadar Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ni başlatarak nanoteknoloji alanında araştırma ve geliştirme konusunda ilerlemenin yolunu açmıştır (Ochekpe et al., 2009). 21. yüzyılın başından itibaren tıp, biyoteknoloji, havacılık, enerji kullanımı, uzay çalışmaları, malzeme ve imalat gibi pek çok alanda nanoteknolojinin kullanımı adına önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Nanoteknoloji çalışmaları, 21. yüzyıldan itibaren bilim ve teknoloji adına büyük ölçüde gelişme göstereceği düşünülen teknolojilerinden biri olarak görülmektedir. Devlet kurumları, kamu ve özel araştırma merkezleri, üniversiteler ve endüstri tarafından nanoteknolojiyi geliştirmek amacıyla önemli miktarlarda yatırımlar yapılmaktadır (Calipinar ve Ulas, 2019). Nanoteknoloji, en az tek boyutta nanometre ölçeğinde olan malzeme ve cihazların tasarımı, karakterizasyonu ve uygulanmasında yer alan bir bilim ve mühendislik dalı olarak tanımlanabilir. Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), nanoteknoloji terimini yeni fonksiyonel özelliklere sahip yapılar, cihazlar ve sistemler oluşturmak için 100 nm'den düşük atomik, moleküler veya makromoleküler seviyede araştırma ve geliştirme olarak tanımlamıştır. Nanoteknolojinin kullanım alanları olarak ulusal güvenlik, biyoteknoloji, tekstil, su arıtımı, enerji, eczacılık, tıp gibi pek çok sektörü sayılmaktadır. Nanoteknoloji bu kadar geniş bir alanı kapsadığı için nanomalzemeler, nanobiyoteknoloji, nanotıp, nanobiyomekanik ve nanobiyofarmasötik gibi alt başlıklara ayrılmaktadır (Morais et al., 2014; Ball et al., 2019).

Biyoteknoloji, moleküler, hücresel fonksiyonları anlamak ve bir kullanıma yönelik ürün veya hizmet geliştirmek için biyolojik organizmaları kullanan araştırma dalıdır. Nanobiyoteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknolojinin bir arada kullanılması ile nanoteknolojinin yaşam bilimlerinde uygulamalarını içermektedir (Alshora et al., 2016). Nanobiyoteknoloji alanı, biyolojik nanoyapıların moleküler ölçekteki özellikleri ve uygulamaları ile ilgilenmektedir. Böylelikle organik ve inorganik malzemelerden oluşan fonksiyonel nanoyapıyı oluşturmak için hücreler, hücresel bileşenler, nükleik asit ve proteinler gibi biyolojik sisteme ait parçaların

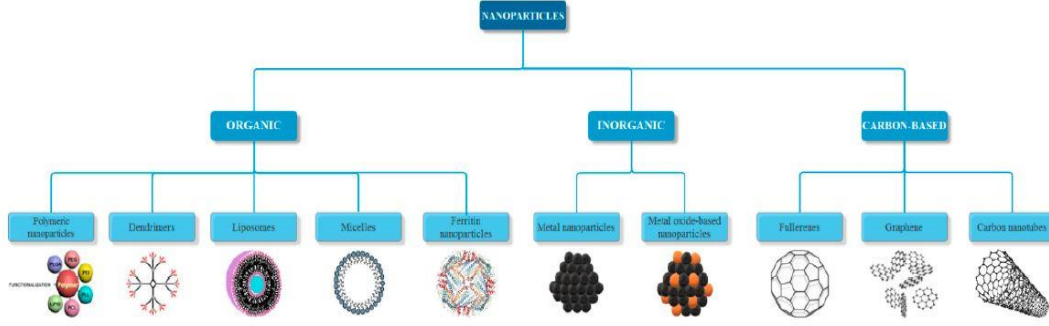
kullanıldığı bir alandır. Son gelişmeler ile nanobiyoteknoloji tıpta hem teşhis hem de terapötik teknikleri geliştirmek, hastalıkların önlenmesi, hücresel seviyelerde görüntü alınması için kullanılmaktadır. Nanobiyoteknoloji ilaç taşıyım sistemleri, görüntülenme, biyomalzeme, gıda, optik ve elektronik, biyosensörler ve *in vitro* teşhis dahil olmak birçok sektörde kullanılmaktadır (Fakruddin et al., 2010; Jain, 2017; Dowling et al., 2004). Nanobiyoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler doğrultusunda nanopartiküllerin biyolojik etkileri ve uygulamalarına olan ilginin arttığı görülmektedir.

2.2 Nanopartikül

Nanopartiküller (NP) birçok araştırma ve uygulama alanında genişlemeye devam eden tekno-ekonomik sektörü temsil etmektedir. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), nanopartikülleri nano ölçekli boyut veya yüzey yapısına sahip bir malzeme olarak tanımlamıştır. AB Komisyonu'na göre nanopartikül terimi, “boyutları 1-100 nm aralığında olan, kümelenmiş partiküller veya malzeme” olarak tanımlanmaktadır (Jeevanandam et al., 2018). Boyutu 100 nanometrenin (nm) altında olan nanopartiküller, daha yüksek ölçeklerdeki partiküllere kıyasla nano ölçekte benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemektedirler. Bu partiküller yüksek yüzey-hacim oranı, katalitik reaktivite, kimyasal stabilite, gelişmiş mekanik mukavemet ve antibakteriyal özellikleri ile avantaj sağlamaktadır (Ealias and Saravanakumar, 2017; Pavel et al., 2015). Nanopartiküllerin bu özellikleri ile ilaç dağıtım sistemleri, kimyasal ve biyolojik algılama, teşhis ve görüntüleme, biyoteknoloji, CO₂ yakalama, elektronik, tıp, tekstil üretimi ve su arıtma sistemleri gibi birçok uygulamalar alanlarında kullanılmaktadır (Khan et al., 2017; Bhushan, 2010).

2.3 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

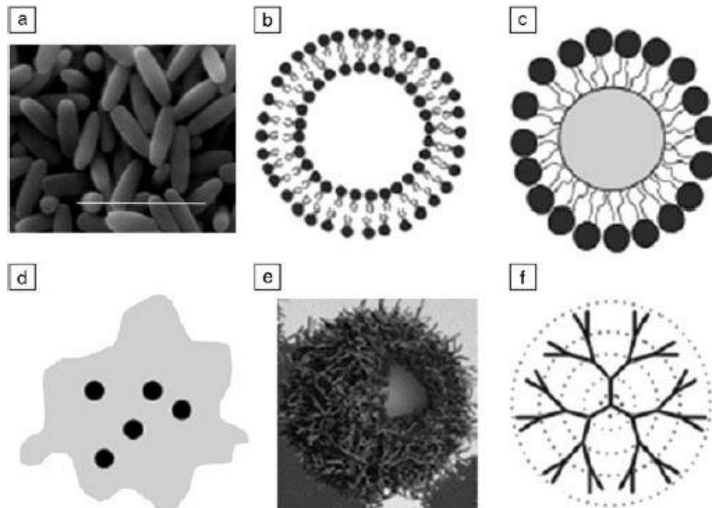
Nanopartiküller genel olarak morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılmışlardır. Nanopartiküller kökenlerine göre organik, inorganik ve karbon bazlı olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1) (Khan et al., 2017; Ealias and Saravanakumar, 2017).



Şekil 2.1 Nanopartiküllerin yapılarına göre sınıflandırılması (Teleanu et al.,2018)

2.3.1 Organik nanopartiküller

Organik nanopartiküller çoğunlukla lipitler veya polimerik organik bileşiklerden oluşan katı partiküller olarak tanımlanmaktadır. Organik nanopartiküller biyobozunur ve toksik olmayan özelliklere sahiptirler. Lipozomlar, ferritin, dendrimerler ve miseller organik nanopartikül olarak bilinmektedir (Cartaxo, 2018) (Şekil 2.2). Organik nanopartiküller genellikle katı forma sahip bir matrise sahiptir ve diğer molekülleri küresel olan yüzeylerinin dışında adsorbe etmektedir. Organik nanopartiküller ilaç salınım sistemleri, biyomedikal, gen terapisi, kataliz, sensör, farmasötik sektöründe lipozom vektörleri, polimersomlar, polimer-protein veya polimer ilaç konjugatlarında gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Romero and Maya, 2012; Khan et al., 2019).



Şekil 2.2 Organik nanopartiküller a) çubuk şeklinde polimer partikülleri, b) lipozomlar, c) katı-lipit partiküller d) protein bazlı partiküller e) katmanlı partiküller f) dendrimerler (Mitragotri and Stayton, 2014)

2.3.2 İnorganik nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller, partikül boyutuna bağlı olarak benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip yapılardır. Bu nanopartiküller yüksek stabiliteye, geniş yüzey alanına, eşsiz fizikokimyasal işlevliğe sahiptirler. Genel olarak metal ve metal oksit bazlı nanopartiküller olarak kategorize edilebilmektedir (Paul and Sharma, 2019; Lopez and Valcárcel, 2014).

2.3.2.1 Metalik nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, metal çözeltiler ile çeşitli yöntemlerle nanometrik boyutlarda sentezlenen partiküller olarak tanımlanmaktadır. Metalik nanopartiküller birçok özelliği ile nanoteknolojik ilerlemelerde öncülük etmiştir. Metal nanopartiküller optik, kimyasal ve elektriksel özellikleri nedeniyle dünya çapında çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Kumar et al., 2018; Asghari et al., 2016). Ve bunlara örnek olarak Metalik nanopartiküller, kataliz, nanoelektronik, yüzey destekli Raman spektroskopisi (SERS), biyomedikal ve mühendislikte çeşitli uygulamalara sahiptirler. Günümüzde bu partiküller, antikorlar, ligandlar ve ilaçlarla konjuge edilerek hedefli ilaç salınım sistemlerinde, tanısal görüntüleme gibi biyoteknoloji alanlarda geniş bir kullanım potansiyele sahiptirler (Pandey and Dahiya, 2016). Metalik nanopartikül sentezi için yaygın olarak bakır (Cu), altın (Au), alüminyum (Al), kobalt (Co), demir (Fe), kurşun (Pb), titanyum (Ti) gümüş (Ag) ve çinko (Zn) metalleri kullanılmaktadır (Tablo 2.1).

Altın nanopartiküller, biyoyumlu, toksik etkisi olmayan, ilaçların etkinliğini arttıran benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip, kan akışı ile hedeflenen bölgeye kolayca ulaşabilen özellikler gösteren yapılardır. Gümüş nanopartiküller ise, biyonsensör çalışmalarında, kanser tedavileri, yara iyileştirmesini artırma ve antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar etkileri ile tıp sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Alüminyum nanopartikülleri ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır. Demir oksit nanopartiküller manyetik özelliklerinden yararlanılarak, yüklü partiküllerin uygulanan manyetik alanlarla belirli hedef dokulara ulaşmasında kullanılmaktadır (Pandey and Dahiya, 2016; Gatto and Bardi, 2016; Hasan, 2015).

Tablo 2.1 Bazı metallik nanopartiküllerin uygulama alanları (Gatto and Bardi, 2016)

Uygulama Alanları	Metal Nanopartikül
Antibakteriyal	Ag, Cu, TiO ₂
Kanser Terapisi	Ag, Au
Tanı	Au
İlaç Taşınım Sistemleri	Au, Al
Görüntüleme	Ag, Au, Pt, Pd
Yara iyileştirme	Ag

2.3.2.2 Metal oksit bazlı nanopartiküller

Metal oksit nanopartiküller yüksek yüzey alanına, iyi mekanik stabiliteye ve biyouyumluluğa sahip partiküllerdir. Bu özellikleri ile metal oksit nanopartikülleri biyomedikal alanında terapötikler, biyo görüntüleme ve biyosensör alanında kullanılmaktadır. Aynı zamanda metal oksit nanopartiküller, malzeme kimyası, tıp, tarım, bilgi teknolojisi, optik, elektronik, kataliz, çevre, enerji gibi sektörlerde kullanımı yaygındır. Metalik oksit nanopartiküller sentezi için yaygın olarak MgO, ZnO, ZrO₂, CuO, TiO₂, NiO gibi çeşitli partiküller kullanılmaktadır (Fernandez- Garcia and Rodriguez, 2009; Chavali and Nikolova, 2019) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Bazı metal oksit nanopartiküllerin özellikleri (Ealias and Saravanakumar, 2017)

Özellikler	Metal Oksit Nanopartikül
Reaktif ve stabil olmayan	Fe ₂ O ₃
Antibakteriyal, antifungal	ZnO
Yüksek yüzey alanı, bakteri büyümesini inhibe edici	TiO ₂
Nem, ışık ve sıcaklığa hassas	Al ₂ O ₃
Düşük toksisite, birçok molekülle etkileşebilir	SiO ₂

2.3.2.3 Karbon bazlı nanopartiküller

Karbon bazlı nanopartiküller (CNP), iç çekirdekte karbon atomları bulunan yeni bir nanomateriyal sınıfını oluştururlar. Karbon elementi, atomik seviyede polimerize olabilen ve çok uzun karbon zincirleri oluşturabilen yapılardır. Karbon atomu dış elektron katmanında bulunan dört elektron nedeniyle dört değerliğe sahiptir. Böylelikle tek, çift veya üçlü kovalent bağlar ile diğer elementlere bağlanabilmektedir (Zaytseva and Neumann, 2016). Karbon nanopartikülleri fiziksel, kimyasal, optik, mekanik, termal özellikleri nedeniyle bilim ve mühendislikte büyük ilgi görmüştür. Karbon bazlı nanopartiküller, yüksek stabilite, güçlü iletkenlik, düşük toksik etki, çevre dostu, biyouyumlu ve

yüksek yüzey alanı gibi özellikleri ile birçok çalışma alanında ön plana çıkmıştır. Bu partiküller biyosensör, kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği, kanser terapisi, tanı ve görüntüleme gibi çeşitli biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Karbon bazlı nanopartiküller, fulleren, grafen, karbon nanotüpler gibi karbon nanoformlarına sahip farklı yapılar içeren organik sınıflara ayrılmaktadır (Yan et al., 2016; Testa et al., 2019).

Grafen, tek karbon atomdan oluşan ve iki boyutta katmanlara sahip allotropik bir karbon formudur. Grafen yapısal olarak sağlam ancak oldukça esnek maddelerdir. Aynı zamanda son derece yüksek mekanik sertlik ve termal kararlılık gibi birçok fiziksel özelliği vardır. Bu özellikleri ile grafen türevleri kimya, malzeme, fizik ve biyomedikal gibi alanlarda kullanılmaktadır. Yeni grafen ailesinin üyeleri olan grafen oksit (GO), grafen kuantum noktaları (GQD) tıp alanında biyosensörler, ilaç salınım sistemleri, biyogörüntüleme gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Lin et al., 2016; Zaytseva and Neumann, 2016).

Karbon nanotüpler, grafen tabakalarından oluşan birkaç nanometre çapında silindirik yapılar olarak tanımlanmaktadır. Karbon nanotüpler uzunluk, çap ve katman sayısı bakımından değişkenlik göstermektedir. Karbon nanotüpler yapılarına göre tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) iki ana gruba ayrılmaktadır. Genellikle tek duvarlı karbon nanotüplerin çapları 1-3 nm boyut ve birkaç mikrometrelik bir uzunluğa sahiptir. Çok duvarlı karbon nanotüplerin ise çapları 5-40 nm boyut ve uzunluğu yaklaşık 10 µm'dir (Maiti et al., 2019; Zaytseva and Neumann, 2016). Karbon nanotüplerin mekanik mukavemet, yüksek elektrik iletkenliği gibi fiziksel özellikleri biyomalzeme olarak kullanılmasına avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle karbon nanotüpler çeşitli hastalıkların algılanması, tıbbi teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadır. Karbon nanotüpler, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle terapötik molekülleri konjüge etmek için ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmıştır (Cha et al., 2013).

Fullerenler, karbonun allotropik bir modifikasyon çeşidi olarak yer almaktadır. C60 molekülünün önemli bir özelliği yüksek simetrisidir. Fulleren ailesi, küresel bir yüzeyde merkezinde karbon atomlarından oluşan bir dizi atomik karbon kümesi olarak tanımlanmaktadır. C60 molekülünün en önemli özelliklerinden birisi yüksek simetriye sahip olmasıdır (Bakry et al., 2007). Birçok bilim insanı C60 molekülünün eşsiz şekli ve kimyasal modifikasyonunu kullanarak terapötik tedaviler için C60 türevlerini geliştirmiştir. C60 molekülünün

kullanıldığı son derece ümit verici araştırma anti-insan immün yetmezlik virüsü (HIV) aktivitesidir. Yapılan araştırma sonucunda benzersiz moleküler yapısı ve hidrofobik özelliği ile virüsün aktif bölgesine bağlanarak HIV proteaz aktivitesini inhibe edebilen bir grup suda çözünür C60 türevi keşfedilmiştir. Böylelikle diğer önemli HIV enzimlerini hedefleyerek anti-HIV aktivitesi gösteren çeşitli C60 türevleri geliştirilmiştir. Bu sonuçlar, C60 türevlerinin gelecekte güçlü bir AIDS terapötik grubu olabileceğini göstermektedir (Cha et al.,2013; Castro et al., 2017).

2.4 Nanopartikül Üretim Prosesleri

Nanoteknoloji modern çağda ilaç, enerji, çevre, bilgi teknolojisi, havacılık bilimi gibi geniş uygulama alanları ile topluma fayda sağlaması amacıyla son teknolojik gelişme olarak kabul görmektedir. Nanopartiküllerin bu kadar geniş uygulama yelpazesinde kullanılabilmesi için en önemli hususlardan bir tanesi de istenilen nanopartikülleri tasarlamak için çeşitli sentez yöntemlerine hâkim olmaktır (Dhand et al., 2015).

Nanopartikül sentez yöntemleri temel olarak "yukarıdan aşağıya (top down)" ve "aşağıdan yukarıya (bottom up)" olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.3).

2.4.1 Yukarıdan aşağıya(Top Down) nanopartikül sentezi

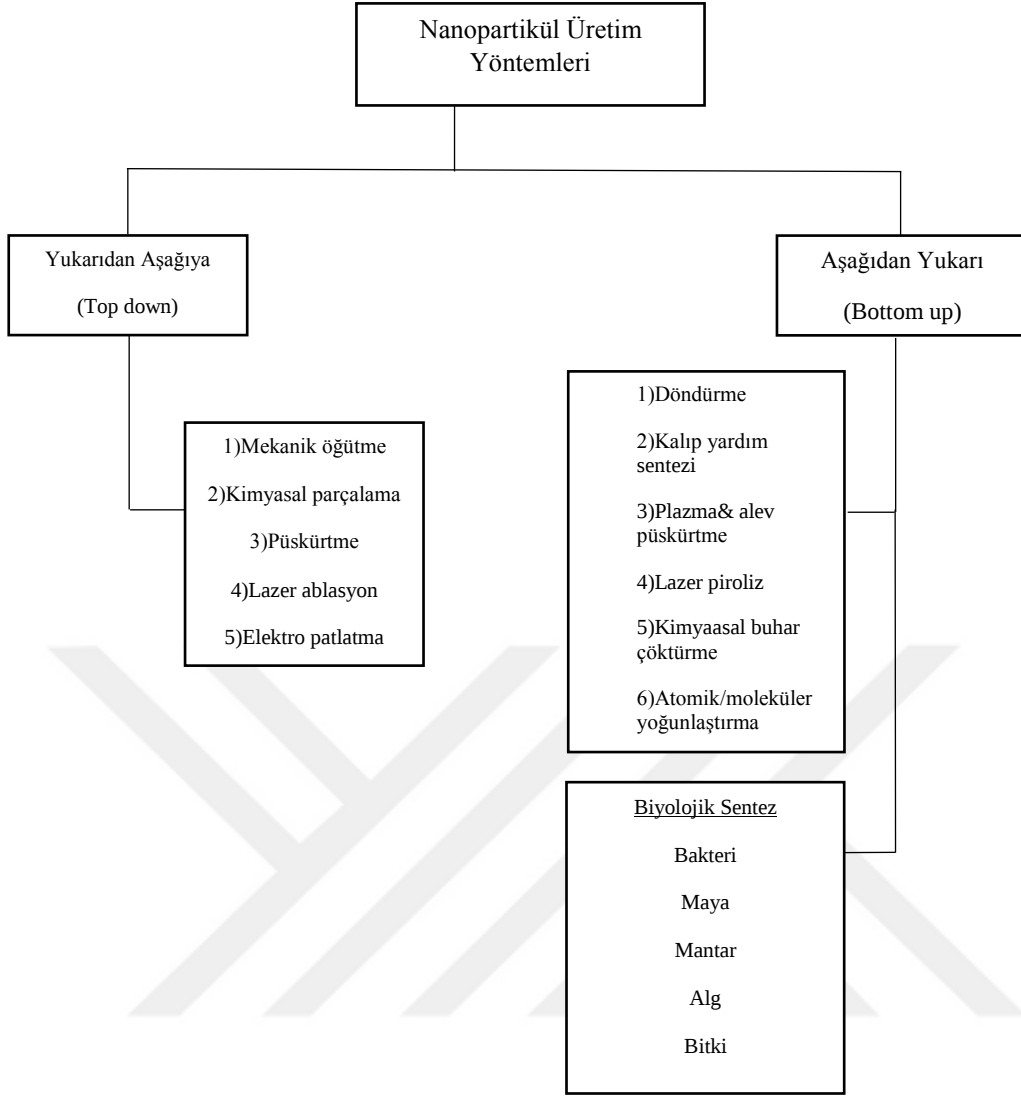
Yukarıdan aşağıya sentez yöntemi hacimsel malzemenin farklı fiziksel ve kimyasal işlemlerle parçalanarak nano boyutlu parçacıklar elde etmesi ile gerçekleşmektedir. Bu yaklaşımda nanolitografi, lazer ablasyon, elektron ışını litografisi, sonikasyon, püskürtme, mekanik öğütme ve termal ayrıştırma en yaygın kullanılan sentez yöntemlerinden bazılarıdır (Ealias and Saravanakumar, 2017). Yukarıdan aşağı yaklaşımı uygulanması kolay olmasına rağmen istenilen şekilde ve küçük boyutta partikül sentezlenmesi için uygun bir yöntem değildir. Bu yöntem ile ilgili diğer bir problem ise nanopartiküllerin yüzey kimyasında ve fizikokimyasal özelliklerinde değişiklik görülebilmektedir (Jamkhande et al., 2019; Sadhasivam et al., 2020).

2.4.2 Aşağıdan yukarıya(Bottom Up) nanopartikül sentezi

Aşağıdan yukarıya yaklaşım, atomik veya moleküler boyuttaki malzemelerin fiziksel ve kimyasal yöntemlerle kontrollü bir şekilde nanoyapılar

oluşturulmasını ifade etmektedir. Nanoyapıların bu yöntemle elde edilmesi karmaşık ve zor süreçler içermektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda sol-jel, eğiirme, kimyasal buhar çöktürme, alev püskürtme, lazer piroliz ve biyosentez en yaygın kullanılan üretim yöntemlerdir. Bu yöntemde ana hedef, farklı kimyasal bileşime, boyutlara, morfolojilere ve monodispersiteye sahip nanopartikül sentezi gerçekleştirmektir (Khanna et al., 2019; Alsamhary, 2020).

Nanopartiküllerin kimyasal yöntemlerle sentezlenmeleri son dönemlerde çok fazla yaygınlaşmıştır. Çünkü bu üretim yönteminde indirgenme işlemi sırasında yüksek enerjiye ihtiyaç duyulmaksızın boyut ve şekil bakımından homojen parçacıklar üretilmektedir. Fakat bu kimyasal yöntemlerde hidrazin, potasyum betarutrat, gibi kansere, genetik ve hücrel toksisiteye neden olan riskli kimyasallar kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin sentezi kullanılan bazı kimyasallar toksik, tahriş edici, yanıcı ve çevreye zararlı olarak kabul edilmektedir (Kalimuthu et al., 2020; Alsamhary, 2020). Bu nedenle daha çevre dostu ve kararlı olan nanopartiküller sentezlemek için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu belirtilen ihtiyaçlar doğrultusunda hassas ve çevre dostu olan yeşil sentez yöntemi ortaya çıkmıştır. Nanoteknoloji ve mikrobiyal biyoteknolojiyi birbirine bağlayan yeşil kimya, bakteri, mantar, maya, alg, virüs gibi canlı organizmaları kullanarak biyolojik nanopartikül sentezlenmesi olarak tanımlanmıştır. Nanoteknoloji sektöründe yeşil sentez yöntemi partikül üretiminde yükselen bir araştırma dalı olmaya başlamıştır. Biyojenik nanopartikül üretimi toksik kimyasalların düşük oranda kullanılmasından dolayı çevre dostu, biyouyumlu, yüksek tekrarlanabilir, uygun maliyetli olmasında konusunda avantaj sağlamaktadır. Yeşil sentez yöntemi sıfır değerli metal, metal oksit ve tuz nanopartikülleri sentezlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dhand et al., 2015; Kalimuthu et al., 2020; Sajid and Płotka-Wasyłka, 2020).



Şekil 2.3 Nanopartikül sentezleme yöntemleri (Khan et al., 2017)

2.5 Yeşil Nanoteknoloji

Nanoteknoloji fiziksel veya kimyasal işlemlerin uygulanmasıyla belirli özelliklere sahip nanopartiküllerin sentezlendiği bir bilimi dalı olarak karşımıza çıkmıştır. Nanomalzemeler son on yılda çeşitli özellikleri ve uygulamaları ile bilimsel araştırmalarda dikkat çekici hale gelmiştir. Nanopartiküller benzersiz fiziksel, kimyasal, termal ve elektriksel özellikleri nedeniyle sağlık, tarım, elektronik, otomobil ve çevre yönetimi alanlarında geniş bir uygulama alanlarına sahiptir (Shah et al., 2015). Nanopartiküller, ilaç yükleme, hedefli ilaç taşınımı, tümör hücresi hedefleme, tümör yerini saptama kabiliyeti, teşhis, terapötik potansiyeli nedeniyle tıpta da öne çıkan bir çalışma konusu haline gelmiştir. Birçok nano ürünün bu özellikleri sonucunda biyoimplantlar, farmasötik ürünler, kozmetikler, filtreler, biyobelirteçler, görüntüleme ajanları, biyosensörler, doku

mühendisliği iskeleleri gibi insan yaşamının kalitesini artırmak amacıyla ticarileştirilmiştir (Bai et al., 2018; Devatha and Thalla, 2018).

Nanopartiküller genel olarak fiziksel ve kimyasal tekniklerle sentezlenerek stabil hale getirilmektedir. Nanopartiküllerin bu yöntemler ile sentezi, çevresel toksisite, sitotoksisite ve karsinogenisite gibi potansiyel tehlikeleri neden olan toksik malzemelerinin kullanılmasını içermektedir. Bu toksisite problemleri kullanılan organik çözücüler, indirgeyici ajanlar ve stabilizatörlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bazı nanopartiküllerin yapı, boyut, şekil ve yüzey kimyası gibi faktörlerden dolayı toksik olabileceği doğrulanmıştır. Bundan dolayı toksik ajanlarla sentezlenen nanopartiküllerin klinik ve biyomedikal uygulamalarda kullanımı kısıtlanmıştır. Bu nedenle nanopartikül sentezi için yüksek verimli, düşük maliyetli, toksik olmayan ve çevre dostu yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (Shah et al., 2015; Thakkar et al., 2010).

Bilim insanları günümüzde kimyasal ve fiziksel nanopartikül sentezinin yan etkileri önlemek için yeşil yollar denemeye başlamıştır. Kimyasal teknolojidaki “daha yeşil” olarak adlandırılan çevre dostu süreçler giderek daha popüler hale gelmiştir (Devatha and Thalla, 2018). Son zamanlarda yeşil sentez, ekosistemi biyolojik olarak bozunabilir maddeler ile sınırlandırmak için ortaya çıkan bir yaklaşımdır. Araştırmacılar tarafından yeşil nanoteknoloji, nanomalzemelerin kullanılmasından dolayı kaynaklanan çevresel ve insan sağlığı risklerini azaltarak çevre dostu olan yeni ürünlerin sentezlenmesine teşvik etme yönünde yeni bir bakış açısını tanımlamaktadır (Nasrollahzadeh et al., 2019; Krishnaswamy and Orsat, 2017).

Nanoteknoloji çalışmalarının insan üzerindeki etkisi açısından çeşitli endişeler bulunmaktadır. Çünkü nanopartiküller canlı sistemler tarafından kolayca emilebilmektedir. Aynı zamanda nanopartiküllerin insan vücudu içinde farklı etkileşimleri üzerine yapılan bazı araştırmalar ile belirli düzeyde toksik etkiler ortaya çıkarmıştır. Yeşil nanoteknoloji, yeşil bilim ilkesi olarak kabul edilen düşük enerji kullanarak en az atık açığa çıkaran, çevreye veya insan sağlığına zarar vermeden nanomalzemeler ve ürünler sentezi olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji çalışmalarında aynı zamanda enerji tasarrufu sağlayan, zararlı çözücüler yerine su kullanan, nanopartiküllerin yapılarını değiştirerek toksisitesinin azaltılması, geri dönüştürülebilmesi ve tekrar kullanılabilir olması büyük önem taşımaktadır (Nasrollahzadeh et al., 2019; Bai et al., 2018; Krishnaswamy and Orsat, 2017).

Yeşil nanoteknoloji, nanomalzemelerin üretimi ve kullanımı için sürdürülebilir, güvenli, ekonomik ve çevre dostu olan yeşil kimya prensiplerini içermektedir. Yeşil kimya yöntemi, kimyasal bazlı maddelerin yerine biyolojik malzemeler olan biyokütle, fitokimyasallar ile üretim yapılmaktadır. Yeşil nanoteknoloji yaklaşımı, nanomalzemelerin güvenilir bir şekilde üretilmesi için iyi tanımlanmış kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip yetkin alternatif stratejiler geliştirmeyi amaçlamaktadır (Bai et al., 2018; Lu and Ozcan, 2015).

2.5.1 Yeşil kimya

Son zamanlarda artan çevresel kaygılar dolayı araştırmacılar, çevre için ekolojik tehdit oluşturabilecek zararlı kimyasalların kullanımından kaçınmaya çalışmışlardır. Metal nanopartiküllerin sentezinde en sık kullanılan kimyasallar arasında yeşil kimyasal reaktifleri olarak kabul edilmeyen sodyum borohidrid (NaBH_4), tiyoller ve aminler kullanılmaktadır. Sodyum borohidrid, metal tuzlarının nanopartiküllere indirgenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartikül sentezinde sodyum borohidrid kullanımı sırasında kolloidal stabilizasyon korunması için kaplama moleküllerinin eklenmesini gerektirmektedir. Stabilize edici ajanlar genellikle tiyoller, aminler alkanetiolatlar, dodekantol, dodesilamin gibi maddeler kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasalların nanopartikül sentezi sırasında kullanılması çevre zararları ile ilgili bazı tartışmaları arttırmıştır. Aminotiyollerin *in vitro* sitotoksik etkilere neden olduğu, tiyol radikallerinin, doku hasarına sebep olduğu, âminlerin cilt, gözler ve mukoza zarlarında ciddi tahrişe neden olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar daha çevre dostu olan yeşil yaklaşımlara odaklanarak yenilikçi alternatifler aramaya başlamıştır (Syed et al., 2015; Raveendran et al., 2003)

Yeşil kimya yöntemi, doğal ürünlerden elde edilen çevre dostu biyo indirgeyici ve kaplayıcı ajanlara dayanan nanopartikül sentezleme yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Yeşil yaklaşımlar çevre dostu, ekolojik, doğal ürün olan proteinler, amino asitler, vitaminler, polisakkaritler, polifenoller, terpenoidler gibi fitokimyasalların ve organik asitlerin genellikle dengeleyici ve stabilize ajanlar olarak kullanılmasını içermektedir. Yeşil kimya yöntemine göre toksik olmayan kimyasalların, çözücülerin ve yenilenebilir malzemelerin kullanılması dikkate alınması gereken konular arasındadır (Nadaroglu vd., 2017).

Nanopartiküllerin biyolojik sentezi sırasında mikroorganizmalar veya ekstraktlar, içerdiği stabilize edici ve kaplayıcı ajanlardan sebebiyle başka bir

ajana ihtiyaç duymamaktadır. Nanopartikül sentezi sırasında partiküllerin homojen dağılım gösterebilmesi için reaksiyon çözeltisi, kaplayıcı ve indirgeyici ajan büyük önem taşımaktadır. Kaplayıcı ajanlar yaygın olarak nanopartiküllerin kolloidal yapısının sentezi ve stabilizasyonu, morfolojisinin kontrolü ve yüzeyi kümeleşmeden koruması için kullanılmaktadır (Duan et al., 2015; Kharisova et al., 2019). Nanopartikül sentezinden kaplayıcı ajan olarak toksik olmayan yapıları ile biyomoleküller kullanılmaktadır. Kaplayıcı biyomoleküllere örnek olarak proteinler, peptitler çeşitli amino asitler, lipitler, nişasta, kitosan, dekstran gibi polisakkaritler kullanılmaktadır. Maruyama ve arkadaşları, kaplayıcı ajan olarak L-histidin aminoasidi kullanarak 4-7 nm boyutunda altın nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Çalışma sonunda amino asitlerde bulunan amino ve karboksil grupları, nanopartikül yüzeyinin indirgenmesine ve kaplanmasına yardımcı olmuştur (Vaid et al., 2020; Sharma et al., 2019; Duan et al., 2015). Polisakkaritler, glikozik bağlarla birbirine bağlanan, tekrarlayan mono veya disakkarit yapılara sahip bir polimerik karbonhidrat molekülleri sınıfından oluşmaktadır. Nanopartikül sentezi için kullanılan polisakkaritler düşük maliyetli, hidrofilik, kararlı, güvenli, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmadıkları için kaplayıcı ajanlar olarak işlev görmektedir. Bazı durumlarda, polisakkaritler hem indirgeyici hem de kaplayıcı ajanlar olarak işlev görebilmektedir. Polisakkarit yapısında bulunan karmaşık hidrojen bağları yapısı sentezlenen nanopartiküllerin kümelenmesini önlemektedir. Dekstran, çeşitli uzunluğa sahip zincirleri olan birçok glikoz molekülünden oluşan karmaşık dallı bir polisakkarittir. Dekstran hidrofilik, biyoyumlu, toksik olmayan özellikleri ile birçok metal NP'nin kaplanması için kullanılır. Polisakkaritler, NP'lerin üretimi için toksik kimyasalların yerini alan yenilenebilir yeşil alternatiflerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Böylelikle çevreyi toksik kimyasal ajanların tehlikeli etkilerinden uzaklaştırmıştır (Sharma et al., 2019; Duan et al., 2015; Raveendran et al., 2003). Bitki ekstraktları polifenoller, flavonoidler, tannik asit, terpenoidler, askorbik asitler, karboksilik asitler, aldehidler, amidler gibi fitokimyasalların ile üretilen nanopartiküllerde toksisiteye neden olmadığı ve güçlü indirgeyici ajanlar olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir. Fitokimyasallar, nanomalzemelerde uzun süreli stabilizasyon sağlayabilen kaplayıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır (Vaid et al., 2020; Bai et al., 2018).

Biyolojik nanopartikül yöntemleri, yeşil kimya yaklaşımına mükemmel uyum sağlamaktadır. Böylelikle toksik olmayan, kararlı, çevre dostu ve uygun maliyete sahip biyolojik nanopartiküller elde edilmektedir. Biyoloji merkezli yeşil kimya yöntemleri, bakteri, virüs, maya, bitki özleri, mantarlar, bitkiler ve

algler gibi canlı formlarının kullanılmasından oluşmaktadır. Bugüne kadar, doğal ürünlerin nanopartikül sentezi için uygulamaları geniş bir şekilde araştırılmamıştır. Bu nedenle, yeşil üretim yönteminin daha fazla yayılabilmesi için daha çok araştırılması ve deneyimlenmesi gerekmektedir (Kharisova et al., 2019; Duan et al., 2015; Vaid et al., 2020).

2.5.2 Biyojenik nanopartikül sentezinde kullanılan organizmalar

Nanopartiküllerin biyolojik olarak üretilmesinde, bitkilerden elde edilen özütler, bakteriler, mantarlar, algler gibi mikroorganizmalar kullanılarak metal iyonlarının hücre dışı veya hücre içi olacak şekilde indirgenmesini içeren yöntemler bulunmaktadır (Khanna et al., 2019).

2.5.2.1 Nanopartiküllerin bakteriyel yöntem ile sentezi

Son dönemlerde nanopartiküllerin sentezinde doğada bulunan mikroorganizmaların uygulamalarına olan ilgi artmaktadır. Bakteriyel yöntem ile nanopartikül sentezi ilk olarak 1984 yılında Haefeli tarafından rapor edilmiştir. Haefeli, gümüş madeninden izole edilmiş *Pseudomonas stutzeri* AG259 bakteri suşunun gümüş nanopartikülleri sentezleyebildiğini bildirmiştir (Khandel and Kumar Shahi, 2016). Bakteriler doğada genellikle farklı ve zorlu çevresel koşullara maruz kalmaktadırlar. Bu zorlu koşullar karşısında bakteriler ortamdaki yüksek metalik iyon konsantrasyonlarından kaynaklanan toksisite gibi stres faktörlerine karşı doğal savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bakteriler ortamda bulunan yüksek konsantrasyona sahip metalik iyonlar ile başa çıkabilmek için biyolojik strateji olarak redoks ortam değişiklikleri, hücre içi metallerin toplanması, çöktürmesi ve hücre dışı sentezleme yolu gibi farklı işlemler gerçekleştirmektedir. Aynı zamanda bakterilerin, genetik modifikasyonu ve kullanım kolaylığı nanopartikül sentezinde kullanımı konusuna hızla önem kazandırmıştır (Jamkhande et al., 2019; Shah et al., 2015)

Bakteri hücreleri metal iyonlarını indirgeme reaksiyonu ile oksidasyon durumlarını değiştirerek biyolojik olarak çözünür hale getirmek için biyomineralizasyon, biyoağartma ve biyoakümülyasyon gibi çeşitli biyolojik işlemleri gerçekleştirmektedir (Gautam et al., 2019). Bakteri hücreleri biyolojik nanopartikülleri hücre içi veya hücre dışı olacak şekilde gerçekleştirmektedir. Hücre dışı biyosentez yöntemi süpernatant ve hücre dışı ekstraktların kullanılması ile bakteri hücrelerinin olmaksızın gerçekleştirilmektedir. Hücre dışı sentez yöntemi

karmaşık alt akım işleminden sahip olmadığı hücre içi sentez yöntemine göre tercih edilmektedir (Ovais et al., 2018). Metal nanopartikül sentezi için hücre içi ve dışı genellikle *Actinobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium sp.* ve *Pseudomonas sp.* gibi bakteri türleri kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda bakteriler genellikle gümüş (Ag), altın (Au), platin(Pt), titanyum dioksit(TiO₂) ve çinko oksit(ZnO) gibi metalik nanopartikül sentezinde kullanılmıştır. Nanopartikül sentezi sırasında kritik olarak pH, sıcaklık, inkübasyon süresi gibi fiziksel koşullardaki değişiklikler sentezlenen partiküllerin farklı boyut ve şekillerde olmasına neden olmaktadır (Gautam et al., 2019; Malik et al., 2014; Khandel and Kumar Shahi, 2016).

Ali ve ark., (2016) Ardebil ilindeki kaplıcalardan elde edilen termofilik bakteri türü olan *Bacillus Sp.* AZ1 ile yeşil sentez yöntemini kullanarak çevre dostu bir hücre dışı Ag nanopartikülü sentezlemişlerdir. Bakterilerin hücre dışı nanopartikül üretim mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen bir biyokimyasal reaksiyonla metal iyonlarının biyoindirgenerek gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, Ag nanopartiküllerini 30nm boyutunda üreten araştırmacılar üretim sırasında nitrat redüktaz enziminin, Ag⁺ iyonları oksidasyonuna yardımcı olduğu düşünülmüşlerdir. Aynı zamanda yapılan çalışmada araştırmacılar, Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının Gram negatif bakterilerinkinden daha kalın olmasından dolayı Ag nanopartikülleri Gram negatif organizmalara karşı daha yüksek bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Deljou and Goudarzi, 2016).

Maheshkumar ve ark., (2019) Gram negatif ve deniz bakterisi olan *P. Haeundaensis*'in çevre dostu bir yöntem olan hücre içermeyen süpernatantını kullanarak altın iyonlarının indirgenmesi ile hücre dışı sentez yoluyla Au nanopartikül üretilmesi rapor edilmiştir. 48 saat boyunca 25 °C sıcaklıkta inkübe edilen *P. Haeundaensis* santrifüj edilerek elde edilen süpernatant kısmı 2mM kloroaurik asit ile karıştırılarak farklı sıcaklık ve zamanlarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon boyunca yakut kırmızından pembe doğru değişmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan UV-Vis spektrofotometresi ile 537 nm dalga boyu ölçülmüştür ve bu değer yapılmış diğer çalışmalardaki sonuçlarla benzer çıkmıştır. Bu çalışmada sentezlenen AuNP'ler ortalama olarak 20.93 nm ve küresel boyutta elde edilmiştir. Diğer bir karakterizasyon yöntemi olarak kullanılan FTIR sonucunda *P. haeundaensis* süpernatantı kullanılarak sentezlenen AuNP'lerin bazı proteinler, enzimler ve metabolitler ile çevrili

olduğunu ispatlanmıştır. Bu proteinlerin, metal tuzunu indirgemesine yardımcı ve indirgeme işlemiyle oluşan nanopartikülleri kaplayan enzimler olabileceğine düşünülmüştür (Patil et al., 2019).

2.5.2.2 Nanopartiküllerin fungal yöntem ile sentezi

Funguslar çeşitli uygulamalarda kullanılabilen çeşitli bileşik üretebilmektedir. Mikroskopik lifli mantarlar ve diğer mantar türleri tarafından yaklaşık 6.400 biyoaktif maddenin üretildiği bilinmektedir (Guilger-Casagrande and Lima, 2019). Mikonanoteknoloji, funguslar kullanarak uygun maliyetli, yüksek derecede stabil ve boyut kontrolü olan NP'lerin sentezi olarak adlandırılan bir araştırma alanıdır. Mikosentez üretim yöntemi, fungusların çeşitliliği, yüksek metal toleransı ve metal iyonları biriktirme yetenekleri sebebiyle tercih edilmektedir (Gautam et al., 2019).

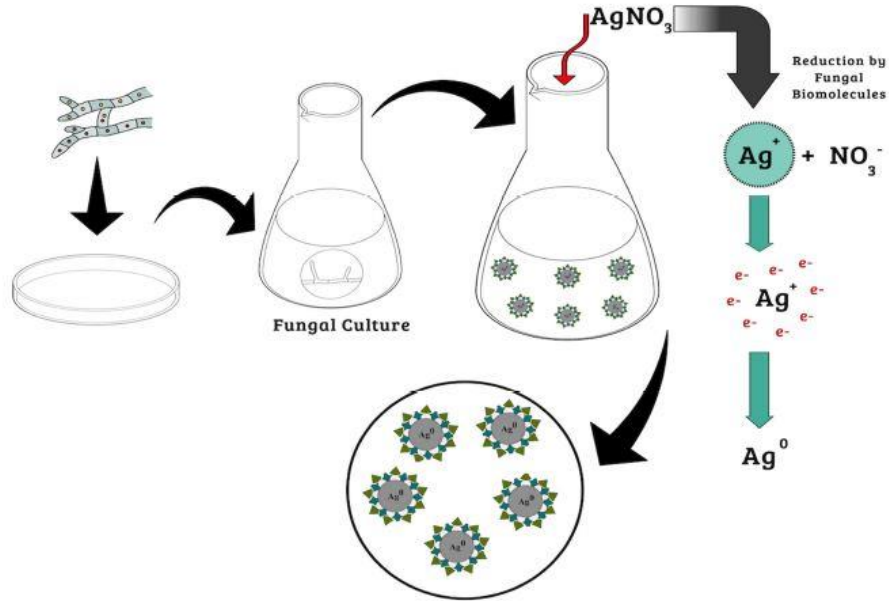
Funguslar, bakterilere kıyasla metalik nanopartikül sentezi için bazı avantajlı özelliklere sahiptir. Fungusların biyokütle başına büyük miktarlarda protein ve enzim salgıması, hücre duvarı ve içi metal bağlanma kapasitesinin yüksek olması, biyoreaktörlerde misellerlerinin daha yüksek akış basıncına ve çalkalanmaya karşı dayanıklı olması nanopartikül üretiminde avantaj sağlamaktadır (Kalimuthu et al., 2020; Kalpana and Devi Rajeswari, 2018).

Funguslardan biyolojik NP sentezinde ilk araştırma, Numata ve ark. tarafından 2004 yılında *Schizophyllum commune* türü kullanılarak saflaştırılmış polisakkaritlerden(β -1,3-glukan) Schizophyllan adı verilen nano lifler üretilmiştir. Funguslar, biyolojik nanopartikülleri hücre dışı ve hücre içi olarak şekilde sentezlemektedir. Gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezi fungal süpernatantta bulunan enzimlerin, gümüş iyonlarını indirgeyerek nanometrik ölçekte gümüş (Ag^0) NP üretme reaksiyonlarına göre gerçekleştiği bilinmektedir (Şekil 2.4). Nanopartikül sentezinde genellikle *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigates*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* ve *Penicillium brevicompactum* gibi funguslardan elde edilen hücre biyokütlesi veya hücre dışı bileşenler kullanılmıştır (Owaid, 2019; Jamkhande et al., 2019; Velusamy et al., 2016).

Clarence ve ark., (2020) *Chonemorpha fragrans* izole edilmiş endofitik bir suş olan *Fusarium solani* ATLOY-8 kullanılarak altın nanopartiküllerin antikanser potansiyellerini araştırmayı amaçlamışlardır. *Fusarium solani*

biyokütlesi ile 1mM HAuCl₄ çözeltisi karanlıkta 48 saat boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda sarımsı miselyumların rengi mavimsi gri rengi olarak değişmiştir. Nanopartiküllerin boyutları ortalama 40 ile 45 nm arasında, UV-Vis spektroskopisinde 551 nm dalga boyu ölçülerek daha önceki çalışmalara benzer sonuçlar vermiştir. Altın nanopartiküller antikanser aktiviteleri MCF-7 ve HeLa hücre hatları üzerinde denenmiş ve güçlü sitotoksik etkiler göstermiştir (Clarance et al., 2020).

Li ve ark., (2012) *Aspergillus terreus* kültür süpernatantı kullanarak oda sıcaklığında Ag⁺ iyonunun indirgenmesi ile gümüş nanopartiküller sentezlemişlerdir. *A. terreus* süpernatantı içerisine AgNO₃ çözeltisi ilave edildikten sonra inkübasyon sonrası ortam rengi açık sarıdan kahverengiye dönüşmüştür ve bu renk değişimi Ag NP'lerin sentezlendiğini açıkça göstermiştir. Karakterizasyonda kullanılan UV-Vis spektroskopisinde 440 nm dalga boyunda güçlü bir pik vermiştir. Araştırma sırasında süpernatant içerisine NADH ilave edildiğinde, reaksiyonun birkaç dakika içinde tekrardan başladığını ve 440 nm dalga boyunda güçlü bir pik verdiği gözlemlendi. Negatif bir kontrol olarak, AgNO₃ çözeltisine sadece NADH ilave edildiğinde ise 440 nm'de hiçbir bant gözlenmedi. Bu sonuçlar doğrultusunda araştırmacılar NADH'nin *A. terreus* tarafından AgNP'lerin sentezinde anahtar bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir (Li et al., 2012).



Şekil 2.4 Gümüş nanopartiküllerin fungal yöntem ile biyojenik sentez mekanizması (Guilger-Casagrande and Lima, 2019)

2.5.2.3 Nanopartiküllerin bitkisel yöntem ile sentezi

Uzun yıllar boyunca bitkiler, etrafındaki ortamlardan inorganik metalleri indirgeme, absorblama ve biriktirme yeteneği göstermişlerdir. Bitki dokular çevre kirliliğini önemli ölçüde azaltmak için etkili biyolojik modifikasyonlar uygulanabilen canlılardan biridir. Bitkilerin bu ilgi çekici özelliklerinden dolayı biyolojik olarak metal nanopartikül üretiminde çevre dostu bir yöntem olabileceği düşünülmüştür (Chokkareddy and Redhi, 2018; Shamaila et al., 2016).

Mikroorganizmalar yardımıyla üretilen biyolojik nanopartiküllerin sentez hızı, bitkisel materyal içeren yollara göre çok iyi aseptik koşulların sağlanması, besin ortamların daha pahalı olmasından dolayı endüstriyel olarak kullanılması uygun değildir. Bu nedenle, nanopartiküllerin biyolojik sentezine potansiyel olarak bitki sistemlerin araştırılmasına ilgi artmıştır. Bitkilerin yeşil sentez yönteminde kullanılması sırasında yüksek basınç, enerji, sıcaklık veya toksik kimyasallara gerek duyulmamaktadır. Diğer üretim yöntemlerine göre bitki bazlı üretimlerin daha kararlı, ölçek büyütmenin daha kolay, çevre dostu, düşük üretim maliyet, kısa üretim süresi gibi özelliklere sahip olması metalik nanopartikül sentezi için çekici bir platform haline getirmektedir (Keijok et al., 2019; Velusamy et al., 2016; Malik et al., 2014).

Metalik nanopartikül sentezinde kök, yaprak, çiçek, kabuk, lateks, tohum ve kök gibi bitki parçalarının ekstraktları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkiler ekstraktları metalik iyonların indirgenmesi ve daha sonra stabilize edilmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülen polifenoller, proteinler, alkaloidler, fenolik asitler, şekerler, terpenoidler gibi çevre dostu biyoaktif maddeler içermektedir. Reaksiyon sırasında bitki ekstraktı, reaksiyon çözeltisinin ve metal tuzunun konsantrasyonu, reaksiyon süresi, sıcaklığı, pH'ı gibi parametrelerin sentezlenen nanopartiküllerin boyutunu, kalitesini ve morfolojisini üzerinde etki gösterdiği bilinmektedir (Shamaila et al., 2016; Chokkareddy and Redhi, 2018; Shah et al., 2015).

Bitki ekstraktlarından nanopartikül üretiminde, bitki ekstraktı oda sıcaklığında basitçe bir metal tuzu çözeltisi ile karıştırılmaktadır. Bu karıştırma sırasında tek veya iki değerliğe sahip metal iyonlarının oksidasyonu işlemi ile sıfır değerliğe sahip partiküllere dönüştürülmesi ve indirgenmiş metal atomlarının çekirdeklenmesi gerçekleşmektedir. Nanopartikül sentezini sırasında ilk olarak kültür ortamında gözlemlenen renk değişimi incelenmektedir. Bitki ekstratları

kullanılarak genellikle Au, Ag, Cu, ZnO gibi metalik nanopartikül biyosentez çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5) (Verma et al., 2019; Malik et al., 2014; Shamaila et al., 2016).



Şekil 2.5 Bitkisel yeşil sentez mekanizması (Shamaila et al., 2016)

Jebril ve ark., 2020 yılında yayınladıkları makalesinde., *Melia azedarach* yapraklarından elde ettikleri ekstrakt ve gümüş nitrat (AgNO_3) metal çözeltisinden gümüş nanopartikülleri sentezlemiştir. Araştırmacılar üretilen gümüş NP'leri bir ziraat uygulaması olarak Tunusta üretilen patlıcanlarda mantar patojeni olarak yaygın bulunan *Verticillium dahliae*'in karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda mantar önleyici olarak kullanılmasını amaçlamıştır. *M. azedarach* yaprak ekstraktının rengi gümüş nanopartiküllerin indirgenmesiyle açık sarı renginden kahverengiye dönüşmüştür. Karakterizasyon sonucunda UV-Vis spektroskopisinde 400 nm dalga boyunda tipik bir pik ve 18-30 nm arasında değişen küçük küresel nanopartiküller gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan gümüş nanopartiküllerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda, *V. dahliae* karşı antifungal aktivite gösterdiği ve bu tür inhibisyon sonucunun yeni bir araştırma yolu açabilecek etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Jebril et al., 2020).

Khandanlou ve ark., 2020 yılındaki çalışmasında ise *Tasmannia lanceolata* yaprak ekstraktında bulunan biyoaktif moleküller ile kloraurik asit (HAuCl_4) çözeltisi kullanarak altın nanopartiküller sentezlemiştir. Sentezlenen altın nanopartiküllerin, *Backhousia citriodora* yaprak ekstraktı tarafından daha önceden sentezlenen Au NP ile kıyaslanması için insan karaciğer kanseri (HepG2), meme kanseri (MCF-7) ve melanom (MM418 C1) gibi kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisi açısından incelenmiştir. Biyolojik altın nanopartiküller *in vitro* antikanser çalışmasında HepG2 ve MM418 kanser hücrelerine kıyasla MCF-7 kanser hücrelerin karşı daha büyük inhibitör aktivite göstermiştir. *Tasmannia lanceolata* yaprak ekstraktı kullanılarak sentezlenen Au-NP'ler, *Backhousia citriodora* türüne kıyasla kanser hücrelerine karşı daha yüksek inhibitör aktivite göstermiştir (Khandanlou et al., 2020).

2.5.2.4 Nanopartiküllerin algal yöntem ile sentezi

Algler, tatlı ve deniz suları, nemli yüzeyler gibi farklı ortamlarda yaşayabilen tek hücreli veya çok hücreli organizmalardır. Algler, geçmişte deniz altında bulunan inorganik elementlerin büyük miktarını azaltan bir organizma olduğu düşünülmektedir. Bu ağır metalleri biriktiren bir mikroorganizma olması nedeniyle araştırmacılar tarafından nanopartikül sentezleme potansiyeli açısından yeni yaklaşımlar sunmuşlardır. Alglerin önümüzdeki dönemlerde özellikle gıda ve sıvı yakıt üretiminde uzun vadeli, sürdürülebilir bir organizma olarak çeşitli uygulamalarda kullanılması planlanmaktadır (Öztürk, 2019; Menon et al., 2017; Shankar et al., 2016).

Yeşil sentez yönteminde alglerin yapılarında bulunan klorofil, karotenoidler, astaksantin, fenol, flavonoid, protein, vitamin ve mineraller gibi biyolojik olarak aktif bileşikler metal indirgeyici ajan olarak kullanılmaktadır. Bu fotokimyasal maddeler dışında metalik nanopartikülü kaplayan ve stabil kalmasına yardımcı ajanlar olarak karboksil, hidroksil ve amin gibi fonksiyonel gruplar içermektedir (Shankar et al., 2016; Ramzan and Yousaf, 2018).

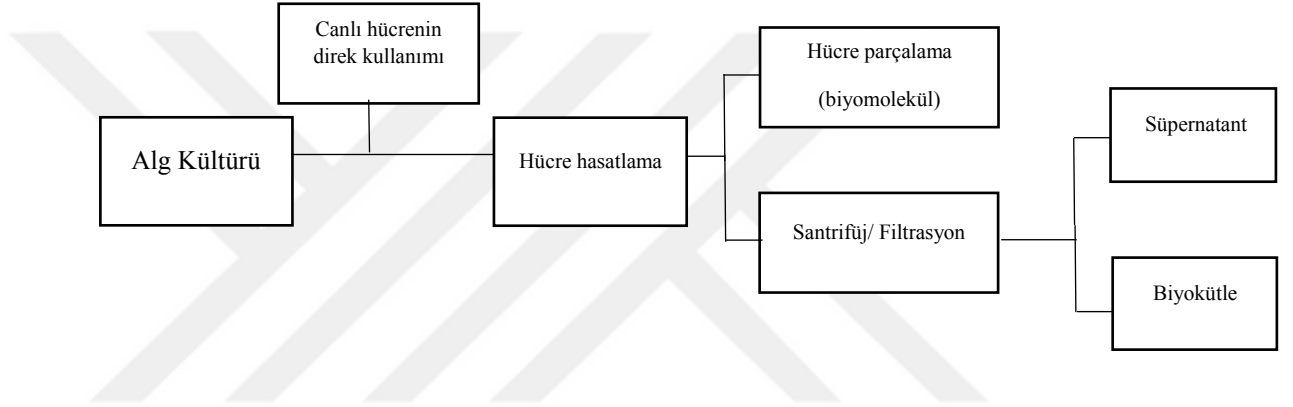
Algler boyut olarak mikrometre aralığında mikroalgler ve mikro ölçeğinden daha büyük boyutta makroalgler olarak ikiye ayrılmaktadır (Zikalala et al., 2018). Mikroalgler, atık su arıtımı, biyoyakıt üretimi ve ticari açıdan çeşitli katma değer yüksek ürünlerin büyük ölçekli üretimi için kullanılmaktadır. Araştırmacılar tarafından mikroalgler, toksik metalleri daha az toksik forma dönüştürme yetenekleri ile dikkat çekmişlerdir. Alg bazlı üretimde zararlı çözenler kullanılmadığı için çevre dostu olması, proses kontrolünün kolaylığı, daha az enerji kullanılması, zengin biyokütle içeriğine sahip olması ve alt akım işlem basamaklarının ihtiyacının azlığından dolayı daha ekonomik olması gibi avantajlara sahip bir yöntemdir (Jacob et al., 2020; Shankar et al., 2016; Rahman et al., 2020).

Altın, gümüş, bakır gibi metalik nanopartikül sentezi için sıklıkla çalışılan alg türleri olarak *Chlorella vulgaris*, *Gelidiella acerosa*, *Ulva fasciata*, *Cladosiphon okamuranus*, *Sargassum muticum*, *Kjellmaniella crassifolia*, *Sargassum longifolium*, *Phaeodactylum tricornatum*, *Fucus vesiculosus* belirtilmiştir (Ramzan and Yousaf, 2018). Yeşil sentez yöntemiyle alglerden sentezlenen ilk nanopartikül çalışması araştırmacılar tarafından 2007 yılında *Chlorella vulgaris* kullanılarak altın nanopartiküller üretimi olarak karşımıza

çıkıştır. Yapılan bu çalışmada $[AuCl_4]^-$ iyonlarının 12 saat boyunca karıştırılarak algal ekstraktlar ile biyoindirgenmesi sağlanarak hücre dışı altın nanopartiküller sentezlenmiştir (Thakkar et al., 2010; Rahman et al., 2020).

2.5.3 Yeşil sentez üretim mekanizmaları

Araştırmacılar tarafından nanopartiküllerin biyosentezini metal tuzlarının hücre içine alınarak indirgenme reaksiyonu gerçekleştirmesine ‘hücre içi’ ve doğrudan hücre içermeyen süpernatant ve biyomolekül ekstraktları kullanarak gerçekleştirmesine ‘hücre dışı’ yöntem olarak tanımlanmıştır (Dahoumane et al., 2016) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Mikroalglerden nanopartiküllerin biyosentezi için çeşitli yöntemler (Rahman et al., 2020)

2.5.3.1 Hücre içi sentez yöntemi

Hücre içinde gerçekleşen bu yöntemde mikroalglerin ön işleme gerek duyulmadan fotosentez, solunum ve azot fiksasyonu gibi metabolik yollarla metal tuzlarının indirgenme işlemi gerçekleştirmektedir. Hücre içi nanopartikül sentezinde indirgeyici ajan olarak fotosentez sırasında elektron taşıma sistemi (ETS) yoluyla enerji üretme basamaklarında yer alan NADPH veya NADPH bağımlı redüktaz enzimi ve solunumda yer alan tilakoid membranlarında bulunan ETS'nin kullanıldığı düşünülmektedir (Khann et al., 2019) (Şekil 2.7).

Mikroalglerin hücre duvarı metalik nanopartiküllerin biyosentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Alglerin hücre duvarı negatif yüklü olmasına rağmen metal iyonları pozitif yük içermektedir. Bu iki zıt yük arasında elektrostatik bir etkileşim kuvveti oluşmaktadır. Alglerin hücre duvarında bulunan enzimler yardımı ile toksik metalleri toksik olmayan metal nanopartiküllerine

dönüştürmektedir ve elektrostatik çekim yoluyla partiküller hücre duvarından yayılmaktadır (Khandel and Kumar Shahi, 2016; Menon et al., 2017).

Parial ve ark., 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada yeşil alg türü olan *Rhizoclonium fontinale* ve *Ulva intestinalis* tallus kısımları kloroaurik asit ile 20°C'de 72 saat boyunca reaksiyona girerek yeşil renkten mor renge doğru görsel bir renk değişikliği göstererek Au NP'lerin üretimi doğrulamıştır. Bu çalışma sırasında toz haline getirilmiş alg biyokütlesi ile bir hafta boyunca inkübe edilen kloroaurik asit sonucunda renk değişimi gözlemlenmemiştir. Bu sebeple altın çözeltisinin indirgenme reaksiyonun hücresel metabolizma ve enzimler içeren metabolik yollar ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Parial et al., 2012).

Senapati ve ark., bir alg türü olan *Tetraselmis kochinensis* ile 1 mM HAuCl₄ çözeltisiyle 48 saat boyunca inkübe ederek hücre içi altın nanopartiküller elde etmişlerdir. İnkübasyon sırasında biyoindirgenme süreci UV-Vis spektroskopisi, TEM üzerinden rutin olarak ölçülerek gözlemlenmiştir. Biyolojik AuNP'ler UV-Vis spektroskopisinde 540 nm dalga boyunda belirgin bir pik göstermiştir. Alg hücrelerinin zamanla mor renge dönüşmesi altın nanopartiküllerin hücre içi sentezlendiğinin açıkça göstermiştir. TEM sonuçlarına göre 5-35 nm boyutlarında küresel altın nanopartikülleri hücre duvarı ve sitoplazmik zar üstünde görüntülenmiştir. Araştırmacılar bunun nedeni olarak alg hücre duvarı ve sitoplazmik membranında metal iyonlarını indirgeyici enzimlerin daha yüksek oranda bulunduğunu düşünmüşlerdir (Senapati et al., 2012).

Bir başka çalışmada, yeşil alg türü olan *Chlorococcum humicola* biyokütlesi ve ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikül sentezi üzerinde çalışılmış ve üretilen nanopartiküllerin antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri TEM, FTIR, EDAX kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AgNP'lerin mikroyapı karakterizasyonu UV-Vis, TEM, EDAX, FESEM, SAED ve FTIR kullanılarak yapıldı. TEM analizi sonucunda AgNP'lerin 4-16 nm boyutunda, UV-Vis spektroskopisinde 440 nm absorbans olarak ölçülmüştür. Alg ekstraktının gümüş nitrat çözeltisi ile inkübasyonu sonrası yeşil rengin koyu sarı rengine dönmesi fitokimyasalların gümüş iyonları indirgenerek AgNP ürettiğini göstermiştir. FTIR analizi ile nanopartiküllerin biyosentezinden protein moleküllerinin sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda üretilen Ag nanopartiküllerinin disk difüzyon yöntemi sonucunda *E. coli*'ye karşı 13 mm zon çapında antibakteriyel aktivite göstermiştir (Jena et al., 2015).

Brayner ve ark., 2012 yılında *Euglena gracilis* mikroalgine Fe^{+2} / Fe^{+3} iyonlarını ilave edilerek iki çizgili ferrihidrit nanopartiküllerinin hücre içi biyosentezini incelenmiştir. Karakterizasyon işleminde yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (RTEM) analizinde küresel, 1 nm boyutunda nanopartikül elde edilmiş ve XRD analizi ile iki çizgili ferrihidrit partiküllerine ait iki geniş pik bulunmuştur (Brayner et al., 2012).

2.5.3.2 Hücre dışı sentez yöntemi

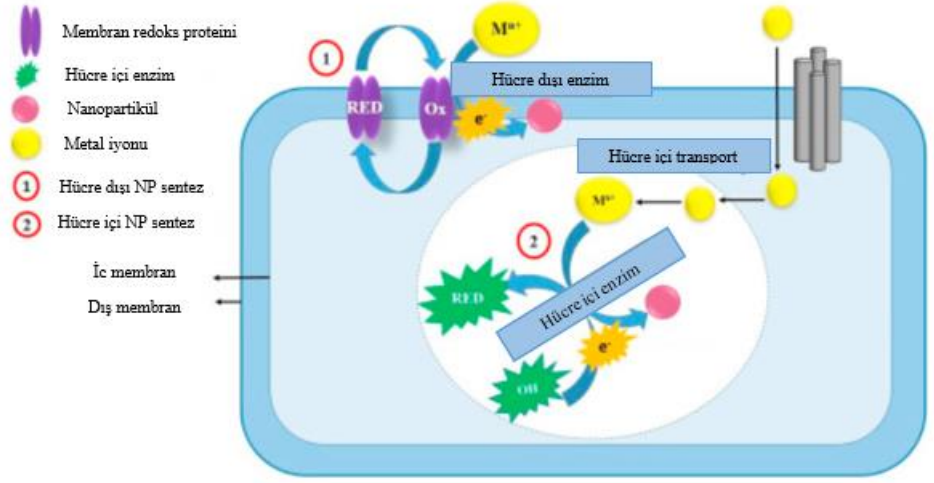
Hücre dışı nanopartikül sentez yöntemi metal iyonlarının hücre yüzeyinde tutulması ile enzimler yardımıyla iyonların indirgenmesi işlemlerini içermektedir (Siddiqi and Hussien, 2016) (Şekil 2.7). Bu yöntem yüzeyde bulunan mikrobiyal proteinler ve salgılanan enzimlere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Biyolojik olarak nanopartikül sentezinde önemli basamaklar arasında biyokütle ve biyosentezleyici ajanların üretilmesi yer almaktadır. Biyokütle üretimi sırasında hücre dışı sentez yönteminde kullanılan indirgeyici şeker olan polisakkaritler ortama dışarıdan eklenmektedir. Aynı zamanda hücre duvarından bulunan lipitler, proteinler, nükleik asitler gibi biyomoleküllerde metal iyonların indirgeme reaksiyonlarında yer almaktadır (Ramzan and Yousaf, 2018). Yapılan çalışmalar sonucunda nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi kofaktörler, NADH'ye bağlı enzimler tarafından elektron taşıma sistemi ile elektronun NADH'den aktarılması yoluyla indirgeyici ajanlar olarak yer aldığı düşünülmektedir (Ovais et al., 2018). Araştırmalar aynı zamanda metal iyonlarının indirgeyerek nanopartikül sentezinde görev alan enzimler arasında nitrat redüktazın etkili olduğu belirlenmiştir. Hücre dışı sentez yönteminde indirgeyici ajan olarak nitrat redüktaz dışında proteinler, peptitler ve diğer kofaktörler yer almaktadır. Enzimler aynı zamanda nanopartiküllere daha yüksek stabilite sağlamaktadır ve ortamdaki topaklanmayı azaltarak bir kaplayıcı ajan olarak daha görev almaktadır (Sadhasivam et al., 2020; Patil and Kim, 2018).

Bu yöntemle ile yapılan ilk çalışma 1980 yılında Beveridge ve Murray tarafından altın klorür çözeltisi ile *Bacillus subtilis* hücre duvarından altın nanopartiküller sentezlenmiştir (Alsamhary, 2020). Govindi ve ark., kahverengi bir alg türü olan *Sargassum wightii* ile hücre dışı gümüş nanopartikül sentezini incelemişlerdir. Hücre dışı sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu UV-Vis spektroskopisi, FT-IR, XR ve HR-TEM ile gerçekleştirilmiştir. Filtre edilen biyokütle 1mM $AgNO_3$ çözeltisi oda sıcaklığında ile inkübasyona bırakılmıştır. Gümüş nanopartiküllerin farklı inkübasyon zamanlarında örnekler alınarak UV-

Vis spektroskopisinde ölçüldüğünde 431 nm dalga boyunda absorbands değeri gözlemlenmiştir. TEM analizi sonucunda nanopartiküller genellikle küresel yapıda, boyut olarak 8-17 nm arasında değişiklik göstermiştir. Sentezlenen Au-NP'ler *Staphylococcus aureus*, *Bacillus rhizoids*, *Escherisia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenik canlılara karşı mikrobiyal aktivite göstermiştir (Govindaraju et al., 2009).

Oza ve ark., 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada *Chlorella pyrenoidusa* ekstraktı kullanarak farklı pH koşullarında stabil altın nanopartikülleri sentezledikleri belirtmişlerdir. Kurutulmuş alg biyokütlesi 1M NaOH ve HCl çözeltisi ile farklı pH'lar ayarlanarak 100 ppm konsantrasyonunda HAuCl_4 ile 48 saat boyunca güçlü karıştırma yardımıyla inkübe edilmiştir. Araştırma sonucunda düşük pH değerinde nanopartiküller topaklanma gösterirken pH 10 olduğunda topaklanmanın daha geç gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Düşük pH koşullarında nanopartikül oluşumunda etkili amino, karboksilik asit gibi fonksiyonel gruplar yüksek proton konsantrasyonundan dolayı pozitif yüke sahiptirler. Partikül oluşumunda pH alkaliniteye aralığına doğru yükseldikçe bu grupların indirgenme potansiyelleri artarak termodinamik açıdan daha kararlı yapılar oluşmaktadır. *Chlorella pyrenoidusa* redüktazlar ve dehidrojenaz bakımından zengin olduğu için NADH'ye bağlı Au^{+3} iyonunun Au indirgenerek nanopartikül sentezine yardımcı olarak düşünülmüştür. Aynı zamanda araştırmacılar nitrat redüktazlarının, altın nanopartikül üretimi sırasında kaplayıcı ajan olarak işlev gören en etkili NADH bağımlı enzim olduğu belirtmişlerdir (Oza et al., 2012).

Bir başka çalışma da Patel ve ark., (2015) sekiz farklı mikroalg ve siyanobakteri hücresinin biyokütle ve süpernatantını kullanarak iki farklı gümüş nanopartikül üretim yöntemi gerçekleştirmiştir. Hücreler log büyüme fazına geldiğinde santrifüj cihazı ile biyokütle ve süpernatant kısım ayrılarak 1 mM AgNO_3 çözeltisi ilave edilerek aliminyum sarılı cam şişelerde hem karanlıkta hem florasan ışık altında 72 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. TEM karakterizasyon analizi sonucunda Ag-NP'ler, kullanılan organizmaya bağlı olarak genelde 13-31 nm boyutlarında arasında ve küresel, ince uzun yapıda görüntülenmiştir. Bu çalışma sonucunda gümüş nanopartikül sentezinde aktif bileşik olarak kültür ortamında bulunan polisakkarit gibi hücre dışı bir molekül olduğu düşünülmüştür. Farklı siyanobakteri ve mikroalg suşları tarafından üretilen Ag NP'ler, antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ancak siyanobakterilerde daha büyük zonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Patel et al., 2015).



Şekil 2.7 Nanopariküllerin hücre içi ve hücre dışı sentez yolları (Sengani et al., 2017)

Bu tez çalışmasında bir mikroalg türü olan *Galdieria sulphuraria* kullanılarak nanoteknoloji alanında en sık kullanılan metalik gümüş ve titanyum nanopartiküllerin biyolojik yollarla sentezlenmesi amaçlanmıştır. *Galdieria sulphuraria*, ilk çağlardaki zamana ait ökaryotik canlılardan biri olduğu düşünülen tek hücreli bir kırmızı alg türü olarak kabul edilmektedir. *Galdieria sulphuraria* sıcak sülfür kaynakları veya toprakları gibi volkanik ortamlarda ve madenlerde bulunmaktadır. Bu kırmızı alg türü pH 0-4 gibi yüksek asidik ve 56 °C'ye kadar çıkabilen yüksek sıcaklık koşullarında fotoototrofik, fotoheterotrofik veya kemoheterotrofik şekilde büyüebilmektedir. Bu zorlu koşullar altında *Galdieria sulphuraria*, metabolik esneklik kazanarak adaptasyon geliştirmişlerdir (Martinez-Garcia et al., 2016; Oesterhelt et al., 2007).

Son dönemlerde ekstremofilik canlıların sahip olduğu eşsiz metabolik yeteneklerinden dolayı biyoteknolojik çalışmalarda kullanım potansiyellerinin araştırılması konusunda bir ilgi artışı vardır. Çünkü dünyada bu koşullar çok az ökaryotik canlı tarafından tolere edilebilmektedir. Aynı zamanda bu alg türleri ağır metallere karşı toleranslıdır ve yüksek konsantrasyonda bu metalleri ortamdan absorbe edebilmektedir. Asidik ortamlarda metallerin kolay bir şekilde iyonize hale gelerek çözünmektedir. Bu nedenle algler, çözünmüş bu metalleri daha kolay bir şekilde absorbe edebilmektedir (Hirooka and Miyagishima, 2016; Martinez-Garcia et al., 2016). *Galdieria sulphuraria*, zorlu ortam koşullarına karşı adaptasyon göstermesinden dolayı metal iyonlarını indirgeme potansiyelinin yüksek olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda bu alg hücreleri şekeri, amino

ve organik asitleri karbon kaynağı olarak kullanarak yaşamsal faaliyetleri sürdürmektedir (Vítová et al., 2016; Oesterhelt et al., 2007).

Heterotrofik büyüme koşulları altında *Galdieria sulphuraria* kültürlerinin ürettikleri fikosiyanın biyomolekülü hastalık tanılarında floresan işaretleyici, gıda ve kozmetik sektöründe boya maddesi olarak yüksek miktarlarda kullanılmaktadır (Hirooka and Miyagishima, 2016; Rahman et al., 2020). Aynı zamanda bu alg türleri protein ve diğer makro besin maddeleri bakımından önemli bir potansiyeli sahiptirler. Yapılan bir çalışma sonucunda ototrofik ve heterotrofik koşullarda *Galdieria. sulphuraria* hücrelerinin biyokütle içeriği incelendiğinde makrobesin olarak yaklaşık %69 polisakkarit, %26 protein ve düşük oranda lipid olduğu gözlemlenmiştir. Hücrenin kültür ortamındaki mikro besin içeriği ise beta karoten, karotenoid, bazı B grubu vitaminler, fikobiliprotein dışında sadece ototrofiklerin ürettiği klorofil a, astaksantin ve lutein bulunmaktadır (Graziani et al., 2013; Modeste et al., 2019). Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde polisakkarit, protein gibi hücresel metabolitlerin hem indirgeyici hem de kaplayıcı ajan olarak yer aldığını araştırılmıştır.

İnsan yönelik geliştirilen kozmetik, tıbbi, gıda vs. ürünlerin faz çalışmalarından önce *in vitro* ve *in vivo* biyoaktivite testlerinin yapılması gerekmektedir. Çok sayıda farklı amaca yönelik biyoaktivite testleri olmasına rağmen *in vitro* koşullarda test edilebilen en yaygın olanları antimikrobiyal etki, toksisite, yaşlanma karşıtı ve yara iyileştirme etkisi testleri sayılabilmektedir (Asnaashari et al., 2017). Kozmetik ürünlerin test edilmesi için de uzun yıllar kullanılmış olmalarına rağmen, 2013 yılında Avrupa Birliği'nde yürürlüğe giren hayvanlar üzerindeki kozmetik test yasağı Türkiye'de de uygulamaya girmiştir. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Yönetmeliği'nde yapılan değişikliklerle, hayvanlar üzerinde yapılmış testlere tabi tutulan kozmetik ürünlerinin satışı ve ithalatı yasaklanmıştır. Buna göre; hayvanlar üzerinde yapılan testlerle üretilebilirliği raporlanan bileşenleri veya bileşenlerin kombinasyonlarını içeren kozmetik ürünlerin piyasaya sürülmesi ve ayrıca, yeni geliştirilen kozmetik ürünlerin faz öncesi araştırmalarda *in vivo* deney hayvanlarında denenmesi katiyen yasaklanmıştır. Kozmetik ürünlerin faz çalışmalarında uygulanabilirliği, *in vitro* hücre ve doku kültürü biyoyoumluluk ve biyoaktivite testlerine tabi tutulmasıyla yasallaştırılmıştır (Köse vd., 2017; Avrupa Parlamentosu ve Birliği, 2013).

Bu tez çalışması kapsamında *Galdieria sulphuraria* 'nın hücre içi ve hücre dışı metabolitleri kullanarak titanyum ve gümüş metal çözeltisi ile hücre içi ve hücre dışı biyolojik nanopartikül sentezleme potansiyeli araştırılmıştır. Literatür araştırmaları incelendiğinde genellikle mikro ve makroalglerden altın ve gümüş nanopartikül sentezleme potansiyelleri araştırılmıştır. Kırmızı alg türü olarak daha önceki araştırmalarda *Gracilaria corticata*, *Jania rubins*, *Gelidiella acerosa* hücreleri kullanılarak gümüş nanopartikülleri sentezlenmiştir (Khanna et al., 2019). Bu çalışmalar incelendiğinde nanopartikül sentezi sırasında herhangi bir optimizasyon çalışmadığı yapılmadığı için tez sırasında en uygun koşullara sahip metalik nanopartikül sentezlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması sırasında 117M052 numaralı TÜBİTAK Projesi kapsamında tasarlanmış olan foto-biojenik nanopartikül (FBNP) reaktör sistemi kullanılarak sıcaklık, pH, karıştırma hızı, süre gibi farklı koşullarda kontrollü bir şekilde titanyum nanopartiküllerinin daha yüksek hacimlerde hücre dışı üretimi amaçlanmıştır. Hücresi uzaklaştırılmış süpernatant kullanılarak sentezlenen titanyum nanopartiküllerin *in vitro* biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilerek kozmetik alanında kullanım potansiyeli de incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mikroalg Stok Kültürünün Hazırlanması

Tez çalışmasında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü alg kültür koleksiyonunda bulunan kırmızı bir alg türü olan *Galdieria sulphuraria* kullanılmıştır. Cam tüpte bulunan stok kültürlerin yatak agardan başlanarak aşamalı olarak ölçek büyütme işlemi 100 mL ve 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Mikroalg kültürü için besi ortamı olarak Tablo 3.1' de gösterilen, Cyanidium ortamı kullanılmıştır. Kültivasyon için hazırlanan besi ortamı kullanılmadan önce 121 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca otoklavlanarak (Hirayama Hiclave HVE-50, Japonya) steril edilmiştir. Hazırlanan besi ortamına hücreler, laminar akışlı kabin içerisinde steril bir şekilde inokülasyon oranı %10 olacak şekilde erlenlerin içerisinde aşılmalıdır. Hücrelerin heteterofik koşullardaki kültivasyonu çalkalamalı inkübatörün dışı alimünyüm folyo ile sarılarak karanlık ortamda, $45 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 *Galdieria sulphuraria* için stok kültür üretimi

Tablo 3.1 Cyanidium besin ortamı içeriği

Cyanidium besin ortamı	
Bileşik	Miktar
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5g/500ml
K ₂ HPO ₄	0,01g/500ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01g/500ml
Toprak suyu	15ml
Glukoz	5g/500ml

3.2 Mikroalg Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Biyolojik nanopartikül sentezi sırasında optimum büyüme koşulları altında biyokütle en yüksek miktarda üretildiği logaritmik büyüme fazında üretim sonlandırılıp hasatlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında en uygun logaritmik büyüme fazın belirlenmesi için günlük olarak mikroskopik hücre sayımı, kuru ağırlık ve yüzey plazmon rezonanslarının belirlenmesi için zamana karşı grafikleri oluşturulmuştur.

Hücrelerin büyüme eğrisi çıkarılırken kültürasyon işlemi 250 mL'lik erlenlerde 120 mL çalışma hacmi olacak şekilde gerçekleştirildi. Her kültürden günlük örnekler alınarak analizler üç paralelli olacak şekilde tekrarlanmıştır.

3.2.1 Mikroskopik ile hücre sayımı

Günlük mikroskopik hücre sayım işlemi Thoma sayım lamı yardımıyla yapılmıştır. Erlenide bulunan hücre kültürü pipetleme işlemi ile homojen hale getirilip Thoma lamı üstüne eklenerek mikroskop yardımıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Mikroskop yardımı ile kuyucuktaki hücre sayısı 100'den fazla sayıldığında 10 veya 100 kat olacak şekilde seyreltme yapılarak sayım tekrar yapılmıştır. Thoma lamı üzerinde belirli bir hacimdeki hücre sayısı aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre sayısı(hücre/ml)} = \text{Lam üzerinde sayılan toplam hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$

3.2.2 Kuru ağırlık ölçümü

Mikroalglerin kuru ağırlık ölçümü filtrasyon ve kurutma işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Erleniden 2 mL örnek alınarak 0,45 µm çapındaki Whatman GF/C filtreden geçirilmiştir. Örnek içerisinde bulunan çözünmüş tuz ve minerallerin uzaklaştırılması için aynı hacimde distile su eklenerek yıkama işlemi

yapılmıştır. Daha sonra örnekler 60°C sıcaklıktaki etüvde (Wisd WiseVen, Almanya) 24 saat boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Son olarak oda sıcaklığında desikatör yardımıyla soğutulan kurutulmuş filtre kâğıtlarının hassas terazi (OHAUS, Explorer Pro, ABD) ile ağırlıkları ölçülmüştür. Darası alınan filtre kâğıdının ağırlığı son ağırlıktan çıkartılarak ml başına düşen hücre konsantrasyonu (mg/mL) hesaplanmıştır.

3.2.3 Spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçümü

Mikroalg hücrelerinin yapılan araştırmalar sonucunda UV-spektrofotometre (Optizen POP, MECASYS) ile 800 nm dalga boyunda günlük olarak optik yoğunluk ölçümü gerçekleştirilmiştir (Sarian et al., 2016). Yapılan günlük optik yoğunluk analizleri ile hücre konsantrasyonundaki değişim takip edilmektedir. Örneklerin UV-spektrofotometre ile absorbands değeri 1'den yüksek ölçüldüğü durumlarda distile su ile gerekli seyretlemeler yapılarak ölçümler tekrarlanmıştır.

3.3 Biyokimsaya Analiz Yöntemleri

3.3.1 Toplam şeker tayini

Mikroalglerde biyokütle ve süpernatant içerisindeki toplam şeker miktarının belirlenmesi için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan Dubois yöntemi kullanılmıştır (Dubois et al., 1956).

3.3.1.1 Standart eğrinin hazırlanması

Toplam şeker miktarının belirlenmesi için %5'lik fenol çözeltisi kullanılmaktadır. Bu çözelti için 5 gram fenol tartılarak 100 mL distile su ile çözdürülmüştür.

Standart eğri oluşturmak için kullanılan glukoz çözeltisi içinse; 0,1 gram glukoz tartılarak balon jöjeye aktarılmış ve içerisine 100 mL distile su eklenerek 1000 ppm'lik glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 100 ppm (%0.01)'lik glikoz çözeltisi elde etmek için başka bir balon jöjeye 1000 ppm'lik çözeltiden 10 mL pipet yardımıyla çekilmiş ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Tablo 3.2'de belirtilen standart glukoz çözeltileri sırasıyla hazırlanmıştır.

Tablo 3.2 Glukoz çözeltileri ile hazırlanan standartlar ve konsantrasyonları

	%0.01'lik glukoz (mL)	Distile su (mL)	Glukoz konsantrasyonu (µg/mL)
Kör	0	0,5	0
Standart 1	0,1	0,4	20
Standart 2	0,2	0,3	40
Standart 3	0,3	0,2	60
Standart 4	0,5	0	100

Hazırlanan cam tüplerin içerisine %5'lik fenol çözeltisinden 0.5 mL ve derişik sülfirik asitten 2.5 mL eklenerek tüplerin ağzı kapatılmıştır. Ardından tüpler vortekslenerek soğuması için 15 dakika su dolu bir beher içerisinde bekletilmiştir. Bekletilme sonrasında tüpler tekrardan vortekslenmiş ve standart küvetlere aktarılmıştır. Küvetlerdeki standartlar UV-Vis spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve standart eğriler oluşturulmuştur.

3.2.1.2 Biyokütlenin toplam şeker miktarı

Mikroalg hücreleri logaritmik büyüme evresinin sonuna geldiğinde biyokütle ve süpernatant kısmı birbirinden ayırmak için 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır. Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi için elde edilen biyokütle bir gece boyunca liyofilize (Christ, Alpha 1-2 L-D Plus, Almanya) edilmiş ve sonrasında -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Ayırma işlemi sonrası süpernatant ise, hücre atıkları gibi safsızlıkların uzaklaştırabilmesi için birkaç tekrar olacak şekilde filtre kâğıdı ile vakumlu filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonrasında elde edilen süpernatant analizler için +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Hasat sonrası -20 °C'de muhafaza edilen biyokütleden 1 mg kuru ağırlık tartılmış ve 2 mL distile su ile çözündürülmüştür. Hazırlanan süspanse karışımının homojen hale gelmesi için 25°C'deki su banyosunda 5 dakika boyunca ultrasonikasyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süspansiyondan gerekli seyreltmeler yapılarak yukarıda açıklanmış olan şeker tayini işlemleri uygulanarak hücre içi toplam şeker tayini elde edilmiştir.

3.2.1.3 Süpernatantın toplam şeker miktarı

Hasat sonrası +4°C'de bekletilen süpernatant 0.5 mL örnek alınmış ve cam tüplere aktarılmıştır. Kör için de 0.5 mL distile su cam tüpe eklenmiştir. Cam tüplere %5'lik fenol çözeltisinden 0.5 mL ve derişik sülfirik asitten 2.5 mL eklenerek cam tüplerin ağzı kapatılır. Tüpler vorteks ile karıştırılarak soğuması

için 15 dakika boyunca bir beher içerisinde bekletilmiştir. İşlem sonunda örnekler küvetlere aktarılmış ve UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 490 nm dalga boyundaki köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Daha önceden oluşturulan glukoz standart eğrisinde standart denklemine göre ölçülen absorbans değeri yerine koyularak örnekteki toplam şeker miktarı belirlenmiştir. UV-Vis spektrofotometrede ölçülen absorbans değeri standart glukoz konsantrasyon aralığında değil ise örnekte gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Yapılan seyreltme oranı ile konsantrasyon çarpılarak şeker miktarı hesaplanır.

3.3.2 Toplam protein tayini

Hasat sonrası elde edilen biyokütle ve süpernatant içerisindeki toplam protein miktarının belirlenmesi için Lowry protein metodu kullanılmıştır (Lowry et al., 1951).

3.3.2.1 Standart eğrinin hazırlanması

%5'lik Na_2CO_3 çözeltisi (Reaktif A) ile %1'lik K-Na-Tartarat çözeltisi içerisinde %0,5'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi (Reaktif B) hazırlanmıştır. 50 mL Reaktif A içerisine 2 mL Reaktif B eklenerek Reaktif C elde edilmiştir. Daha sonra 1 N Folin-Ciocalteu solüsyonu (Reaktif D) hazırlanmıştır. Standart eğri oluşturmak için 0,7g/L Sığır Serum Albümini (BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. Tablo 3.3'te belirtilen hacimlerde tüpler ile işlem gerçekleştirilmiştir

Tablo 3.3 Toplam protein tayini için standart grafik ve örnek hazırlanması

	Kör	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Örnek
BSA (mL)	-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	-
DH_2O (mL)	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	-
Örnek(mL)	-	-	-	-	-	-	0,5
1N NaOH(mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5 dakika süresince 100 °C'deki su banyosunda bekletilir.							
Reaktif C(mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Reaktif D(mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Reaktif D ilave edildikten sonra tüpler laboratuvar koşullarında 30 dakika boyunca inkübe edilmiş ve UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 750 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Reaktif A, B, C toplam protein tayininde taze hazırlanmış ve her denemeler için yeni standart eğri oluşturulmuştur.

3.3.2.2 Biyokütlenin toplam protein tayini

Biyokütle içerisindeki toplam protein miktarının belirlenmesi için 0,1 mg kuru biyokütle cam tüpe alınmış ve 2 mL distile su ile süspanse edilmiştir. Süspanse haldeki biyokütleden pipet yardımıyla 0,5 mL çekilmiş ve yukarıda anlatılan işlemler gerçekleştirilerek hücre içi protein miktarı belirlenmiştir.

3.3.2.3 Süpernatantın toplam protein tayini

Buzdolabında +4°C'de muhafaza edilen süpernatant oda sıcaklığına getirilerek 0,5 mL örnek cam tüp içerisine alınmıştır. Tablo 3.3'te belirtilen Lowry methodu uygulanarak 750 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüş ve hesaplanan kalibrasyon eğri denkleminde yararlanarak süpernatant içerisindeki toplam protein miktarı belirlenmiştir.

3.4 Hücre içi ve Hücre Dışı Nanopartikül Sentezi

Bu tez çalışmasında *Galdieria sulphuraria* mikroalg kültürü ile hem hücre içi hem hücre dışı yollarla biyolojik metal nanopartikül sentezleme potansiyeli araştırılmıştır. Hücrelerin kültivasyonu sırasında optimum büyüme koşullar gösterdiği logaritmik evrenin bitiminde üretim sonlandırılarak 4100 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hasatlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasatlama işlemi ile biyokütle ve süpernatant kısım birbirinden ayrılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılarak pellet haldeki biyokütle distile su ile yıkanarak tekrardan santrifüj edilmiştir. Hücre dışı nanopartikül sentezinde kullanılacak hücre içermeyen süpernatant ise kirlilik ve safsızlıkların uzaklaştırılması için tekrardan santrifüj edilmiştir ve kaba filtre kâğıdı ile en son filtre edilmiştir. Süpernatant kısım hemen kullanılmayacaksa +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Ön optimizasyon çalışmaları için hücre içi ve hücre dışı nanopartikül sentezinde hem metal konsantrasyonu hem de metal çözeltisi: biyokütle oranı(v/v) ile yapılan tüm çalışmalar erlen ölçeğinde gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Hücre dışı nanopartikül sentezi

Mikroalg kültürünün hasat sonrası santrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant kısım biyokütleden ayrılmıştır. Süpernatant içerisinde birçok algal

indirgeyici ajanlar bulunduğu için biyolojik nanopartikül sentezinde faydalı olacağı düşünülmüştür. Hücre dışı nanopartiküllerin sentezlenmesi için algal süpernatant ile titanyum ve gümüş metal çözeltileri ile kullanılmıştır. Uygulamaya başlamadan önce yapılan literatür araştırması sonucunda süpernatant ve metal içeren çözeltilerin minimum/maksimum konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir.

Deney sırasında Biyo-NP sentez optimizasyonu için deneme deseninin oluşturulması için Design Expert programında Yüzey Yanıt Yöntemlerinden (Response Surface Methodolgy) biri olan Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design) deneme deseni kullanılmıştır. Metal konsantrasyonları yapılan araştırmalar sonucunda Titanyum (IV) bis (amonyum laktato) dihidroksit için 1-10 mM ve AgNO₃ için 1-10 mM olacak şekilde belirlenmiştir (Arya et al., 2019; Behravan et al., 2019; Sana and Dogiparthi, 2018; Pereira et al., 2020; Thakur et al., 2019; Srinivasan et al., 2019; Velayutham et al., 2012). Diğer bir parametre olan hacimce metal çözeltisi: süpernatant oranının (v/v) minimum ve maksimum değerleri 0.2-10 aralığında belirlenmiştir. Çalışma hacmi olarak 50 mL'lik erlenlerde analizler için yeterli olması için 20 mL olarak belirlenmiştir. Design Expert programında her metal için optimize edilecek değerler Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4 Titanyum (IV)bis (amonyum laktato) dihidroksit: Süpernanant için belirlenen deneme deseni

Deneme	Metal Çözeltisi: Süpernatant (v/v)	Metal Konsantrasyon (mM)
1	5,1	5,05
2	5,1	5,05
3	0,2	5,05
4	8,56	8,55
5	8,56	1,55
6	5,1	5,05
7	5,1	5,05
8	5,1	10
9	1,64	1,55
10	5,1	5,05
11	10	5,05
12	5,1	0,1
13	1,64	8,55

Tablo 3.5 AgNO₃: Süpernanant için belirlenen deneme deseni

Deneme	Metal Çözeltisi: Süpernatant (v/v)	Metal Konsantrasyon (mM)
1	5,1	10
2	5,1	5,5
3	0,2	5,5
4	8,56	2,32
5	8,56	8,68
6	5,1	5,5
7	5,1	5,5
8	5,1	1
9	1,64	2,32
10	5,1	5,5
11	10	5,5
12	5,1	5,5
13	1,64	8,68

Design Expert programı ile biyolojik nanopartikül sentezi için oluşturulan deneme desenlerinde süpernant, metal çözeltisi içerisine saniyede 1 damla olacak şekilde büret yardımıyla eklenmiştir. Erlen içerisinde bulunan metal çözeltisi işlem sonuna kadar balık yardımıyla sürekli karıştırılmıştır. Süpernatant içerisinde yer alan metabolitlerin metalik çözelti ile indirgenmesi için erlenler çalkalamalı inkübatörde sabit 25°C'de ve 200 rpm hızında 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Literatür araştırması sonucunda metalin indirgeme reaksiyonu sonucunda kültür ortamda renk değişikliği gerçekleştiği bilinmektedir. Bu denemeler sırasında renk değişiminin anlaşılması için negatif kontrol olarak süpernant içermeyen metal çözeltisi ve pozitif kontrol olarak metal içermeyen süpernatant çözeltisi kullanılmıştır. Üretim sonrasında nanopartiküllerin karakterizasyonu için örnekler +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 Hücre içi nanopartikül sentezi

Hasat sonrası elde edilen mikroalgal biyokütle ile hem hücre içi hem hücre dışı olmak üzere iki farklı nanopartikül üretim metodu gerçekleştirilmiştir. Süpernant ile hücre dışı nanopartikül üretiminde olduğu gibi değişken parametreler metal çözeltisi konsantrasyonu ve yaş biyokütle olarak belirlenmiştir. Literatür araştırması sonucunda yaş biyokütlenin minimum ve

maksimum değeri 0.1-5 mg/ml aralığında belirlenmiştir. (Babu and Gunsekaran, 2009; Singh et al., 2019). Design Expert programı ile iki farklı metal çözeltisi için oluşturulan deneme deseni Tablo 3.6 ve 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.6 Titanyum (IV) bis (amonyum laktato) dihidroksit: Yaş biyokütle için belirlenen deneme deseni

Deneme	Yaş Biyokütle (mg/ml)	Metal Konsantrasyon (mM)
1	2,55	5,05
2	4,95	9,91
3	0	5,05
4	8,56	9,91
5	8,56	0,19
6	5,1	5,05
7	5,1	5,05
8	5,1	5,05
9	1,64	10
10	5,1	0,19
11	10	5,05
12	5,1	0,1
13	1,64	5,05

Tablo 3.7 AgNO₃: Yaş biyokütle için belirlenen deneme deseni

Deneme	Yaş Biyokütle (mg/ml)	Metal Konsantrasyon (mM)
1	2,55	5,5
2	2,55	5,5
3	0,19	1,17
4	2,55	1
5	0,19	9,8
6	5	5,5
7	4,91	9,8
8	2,55	5,5
9	2,55	5,5
10	2,55	5,5
11	4,91	1,17
12	0,1	5,5
13	2,55	10

Biyokütleden hem içi hem hücre dışı nanopartikül sentezi için mikroalg kültürü logaritmik faz sonunda 4100 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kültür ortamından süpernatant kısım uzaklaştırılarak biyokütle elde edilmiştir. Hücre dışı nanopartikül sentezi sırasında kültür ortamına bağlı kirlilik ve tuzun uzaklaştırılması için biyokütle 3 defa distile su ile yıkanmıştır. Design Expert programında belirlenen deneme desenlerine göre yaş biyokütle hassas terazi ile tartılmıştır ve uygun konsantrasyondaki metal çözelti ile süspanse edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Deneme sırasında pozitif kontrol olarak metal çözeltisi içermeyen yaş biyokütle ve negatif kontrol olarak hücre içermeyen metal çözeltisi kullanılmıştır. Inkübasyon sonunda süspanse haldeki biyokütle 4100 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir ve elde edilen biyokütle daha sonra karakterizasyon çalışmaları için +4°C’de muhafaza edilmiştir.

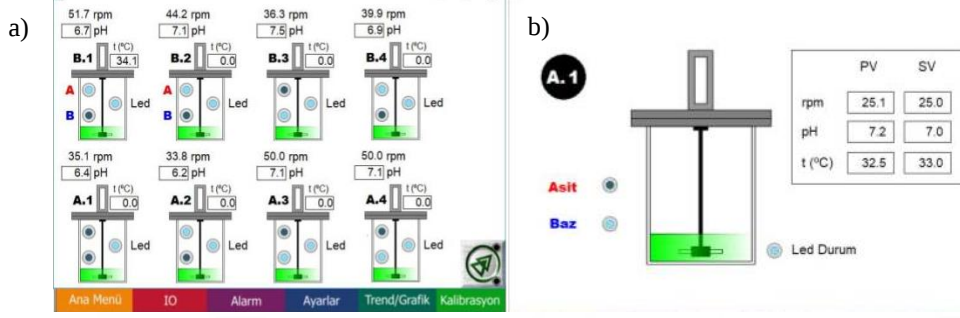
Hücre içi nanopartikül sentezlenmesi sırasında algal yaş biyokütle, 5 mL distile su ile süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki biyokütle çözeltisi ultrasonikasyon cihazı ile %90 güç uygulamasıyla 9 devir/dk olacak şekilde parçalama işlemi uygulanmıştır. Parçalanmış hücre santrifügasyon cihazı ile 4100 rpm’de 3 dakika boyunca hücresel atıklardan uzaklaştırılmıştır. Santrifügasyon sonrası süpernatant kısma geçtiği düşünülen nanopartiküller, ortamdan uzaklaştırılarak karakterizasyon analizi için buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5 FBNP Reaktör Sistemi

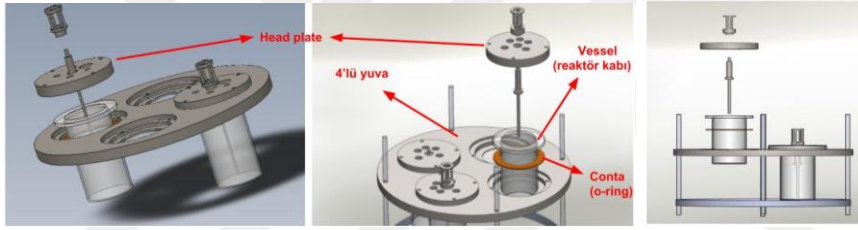
Galdeiria sulphuraria mikroalg türünün titanyum ve gümüş çözeltileri ile biyojenik nanopartikül sentezleme potansiyeli araştırması için gerçekleştirilen ön optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları analiz edildiğinde hücre içermeyen süpernatant ile hücre dışı titanyum nanopartikül sentezlenmesine karar verilmiştir.

Foto-Biyojenik Nanopartikül Sentezi (FBNP) isimli fotobiyoreaktör sistemi, 117 M 052 numaralı TÜBİTAK Projesi kapsamında başta Pikolab Mühendislik olmak üzere proje ekibi tarafından tasarlanmıştır. FBNP reaktör sistemi, nanopartiküllerin daha kontrollü koşullarda ve yüksek hacimlerde sentezlenmesine yardımcı bir tasarım olarak düşünülmüştür. Reaktör sistemi, 100-150 mL çalışma hacmine sahip aynı anda paralel olarak çalışabilen 8 adet ana malzemesi borosilikat olan karıştırılmalı kaplardan oluşmaktadır. Karışıma kaplarının üst kısmına karıştırıcı motor, şaft, impeller, sıcaklık ve renk ölçüm

sensörü monte edilmiştir. Dokunmatik kontrol paneli ile sıcaklık, pH, karıştırma hızı, renk parametresi takip edilebilmekte ve dosya olarak kaydedilmektedir (Şekil 3.2-3.3). Reaktör kontrol ünitesinde bulunan peristaltik pompa yardımı ile reaktör kaplarının içerisine süpernatant ile metal çözeltisinin aktarımı ve numune alımı işlemi gerçekleştirilmektedir.



Şekil 3.2 FBNP reaktör sistemi kontrol(a) ve izleme(b) panosu ana ekran görüntüleri



Şekil 3.3 Reaktör kaplarının genel görüntüsü

3.5.1 FBNP reaktör sistemi ile titanyum nanopartikül sentezi

Ön optimizasyon çalışmaları sırasında sabit tutulan karıştırma hızı, pH ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin daha önce yapılmış olan araştırmalar sonucunda nanopartikül sentezini etkilediği bilinmektedir. Bu parametreler üzerinde yoğunlaşılması için seçilen üretim yöntemi ve metal çözelti konsantrasyonu üzerinden yeni bir optimizasyon çalışması olarak Design Expert programı üzerinden Yüzey Yanıt Metodolojisi (CCD) ile yeni bir deneme deseni oluşturulmuştur. FBNP reaktör sistemi için optimize edilecek üç farklı parametre Tablo 3.8' de verilmiştir.

Tablo 3.8 *Galdieria sulphuraria* süpernatantı ile FBNP reaktör sisteminde gerçekleştirilen titanyum nanopartikül üretimi için oluşturulan deneme deseni

Deneme	Karıştırma Hızı (rpm)	İnkübasyon süresi (dk)	pH
1	285	47	6,5
2	217	73	8,5
3	217	22	8,5
4	400	47	6,5
5	353	73	8,5
6	285	47	6,5
7	285	47	10
8	285	5	6,5
9	285	47	6,5
10	285	47	4,4
11	217	22	4,4
12	217	73	4,4
13	353	73	4,4
14	353	22	8,5
15	353	22	6,5
16	285	47	6,5
17	285	47	6,5
18	170	47	6,5
19	285	47	3
20	285	90	6,5

Biyojenik titanyum nanopartikül üretiminde kullanılan *Galdieria sulphuraria* 'nın kültivasyonu Şekil 3.4'te görüldüğü gibi karıştırmalı biyoreaktör sisteminde (Sartorius, BiostatA) çalışma hacmi 1,6 L, 180 rpm karıştırma hızı, 1 vvm'lik havalandırma ve 42°C'de işletim parametreleri olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroalg hücreleri için hazırlanan Cynadinium besi ortamı biyoreaktör sistem içerisine aktararak 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Otoklavlama işlemi öncesinde gerekli olan proplar, örnek alma

haznesi, impeller da reaktöre uygun bir şekilde yerleştirilmiştir. Kültivasyon sırasında pH ve sıcaklık parametreler bilgisayardaki kontrol paneli ile anlık olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 3.4 *Galdieria sulphuraria*'nın karıştırırmalı reaktörde kültivasyonu

Mikroalg hücrelerinin maksimum büyüme gösterdiği 11. günde kültivasyon sonlandırılıp 4100 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hasatlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Biyokütle kısımdan ayrılan süpernatant kültürden kaynaklanan hücresel atıklarından uzaklaştırılması için tekrardan santrifüj edilmiş ve sonrasında kaba filtrasyon işlemi uygulanarak daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Ön optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen veriler doğrultusunda optimum titanyum çözeltisi konsantrasyonu 3,4 mM ve titanyum çözeltisi: süpernatant hacimsel oranı 7,8 olarak belirlenmiştir. FBNP reaktör sisteminde nanopartikül sentezi sırasında 133 ml titanyum çözeltisi ve 17 ml algal süpernatant kullanılarak çalışma hacmi 150 ml olarak belirlenmiştir. Reaktöre ilk olarak oda sıcaklığındaki metal çözeltisi aktararak karıştırma işlemi başlatılmıştır. Daha sonra kontrol panelinde bulunan peristaltik pompa yardımı ile süpernatant saniyede 1 damla olacak şekilde metal çözeltisine aktarılmıştır. Üretim pH'ının kontrolü panel üzerinden izlenmiştir ve pH ayarlaması için 0,1 M H₂SO₄ ve 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Reaktörler deneme desenindeki parametrelerine göre oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir reaktörde karıştırma işlemi sonlandırılmış ve örnekler falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüplerde bulunan örnekler petri kaplarında 25 ml ve ependorflarda 1.5 ml olacak şekilde 60°C sıcaklıktaki etüv içerisinde 1 gece boyunca kurutulmaya bırakılmıştır (Bavanilatha et al., 2019). Kurutma sonrası elde edilen toz haldeki nanopartiküller karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Aynı zamanda üretim sonrasında reaksiyona girmemiş

kimyasalların uzaklaştırılması için nanopartiküller, 10000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek süpertant kısım 60 °C’de etüvde kurutularak çalışmalarda kullanılmıştır (Arabi et al., 2020)

Nanopartiküllerin karakterizasyon işlemi olarak gerçekleştirilen ortalama partikül çapları deneme deseni sonucu olarak programa girilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda desen optimize edilerek minimum partikül boyutuna sahip ortam koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda en uygun nanopartiküller FBNP reaktör sistemi yeniden sentezlenerek *in vitro* hayvan hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.6 Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

Tez kapsamında sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon fizikokimyasal analizleri için UV-spektrofotometre ile yüzey plazmon rezonansını, FTIR ile indirgen fonksiyonel gruplar, Zeta-sizer ile harmonik ortalama partikül çapı, SEM ile yüksek çözünürlükte boyut görüntülenmesi gibi ölçüm yöntemleri kullanılmıştır.

3.6.1 Zeta-Sizer

Malvern, Zetasizer Nano Range cihazı düşük konsantrasyonlarda nanopartikül içeren örneklerin boyut ve dağılımlarını belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ön optimizasyon ve FBNP reaktör ile sentezlenmiş nanopartiküllerin ortalama çapı ve dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer kullanılmıştır (Murdock et al., 2008).

3.6.2 Ultraviyole ve görünür alan spektroskopi(UV-Vis)

UV-Vis spektrofotometre, bir ışık demetinin sıvılar ve opak katı maddelerden geçtikten sonra örnek yüzeyinden yansıyarak partiküllerin absorbladıkları ışınım yoğunluğunu ölçmektedir. Bu tez çalışması sırasında nanopartiküllerin 200-500 nm dalga boyun aralığında maksimum absorbans verdiğini belirlemek için kullanılmıştır (Titus and Samuel, 2019).

3.6.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi(FTIR)

FTIR cihazı nano yapıdaki malzemelerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini, belirli fonksiyonel grupların etkileşimleri ve durumları hakkında bilgi vermektedir. Bu tez çalışmasında FTIR ölçümleri kullanılarak nanopartiküllerin indirgeme ve kaplayıcı ajan olarak rol oynayan algal potansiyel metabolitlerin belirlenmesi için kullanılmıştır (Mourdikoudis et al., 2018)

3.6.4 Taramalı elektron mikroskobu(SEM)

FBNP reaktör sistemi ile sentezlenen titanyum nanopartiküllerinin yüzey morfolojileri ve boyutsal analizleri için Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) tarafından SEM cihazı görüntülemesi kullanılmıştır (Raliya et al., 2014).

3.6.5 Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyal tayini

Mikroalgal metabolitler ile sentezlenen nanopartiküllerin antibakteriyal etkisi belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Deney sırasında gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram negatif *Escherichia coli* bakterileri kullanılmıştır. Yatak agarda bulunan test bakterileri öze yardımı ile kabin içerisinde steril koşullarda Muller Hilton Broth içeren cam tüplere inoküle edilir ve 24 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılarak aktive edilmiştir. Bakteri koloni sayısının belirlenmesi 0.5 McFarland çözeltisi ile eş değer bulanıklıkta olacak şekilde değerlendirilmiştir. Cam tüp içerisindeki kültür ortamının bulanıklığının McFarland standartına ile aynı olması için 50 µl steril serum fizyolojik ilave edilir. Test mikroorganizmaları solüsyonları aseptik koşullarda 100 µl Müller Hilton Agar besiyeri içeren petrilere aktararak steril L-bağet yardımıyla yayılmıştır. İçerisinde Müller Hilton Agar bulunan petrilere steril diskler koyulmadan önce disklere emdirilecek nanopartikül çözeltisi, negatif kontrol kullanılan metal çözeltisi içermeyen süpernatant, pozitif kontrol olarak kullanılan ticari antibiyotik olan gentamisin petrilere konumları belirlenmiştir. Disklere gentamisin antibiyotiğinde 10 µl, metal çözeltisi içermeyen süpernatanttan 20 µl, antinbakteriyal aktive tespiti için her bir örnekten 70 µl nanopartikülleri içeren numune emdirilmiştir. Ardından kuruyan diskler önceden belirlenen noktalara, steril pens yardımıyla test organizmalarının yayıldığı petri kaplarına yerleştirilmiştir. Bu işlem sonunda petri kapları etüv içerisinde 37°C’de

24 saat boyunca inkübasyona alınmıştır. 24 saat sonra oluşan zonlar cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir.

3.6.6 Minimum inhibisyon konsantrasyon(MIC) belirlenmesi

Mikroalgal metabolitler ile sentezlenen nanopartiküllerin bakterinin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyonunu belirlemek için MIC analizi gerçekleştirilmiştir. Test organizmaları olarak *Escherichia coli* (Gram-negatif) ve *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) Müller Hilton Broth içeren cam tüplere ekilmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Cam tüplerde aktive edilen *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizma miktarı 10^8 CFU/ml eşdeğer bulanıklığa sahip 0.5 McFarland çözeltisi ile ayarlanmıştır. Steril serum fizyolojik ile belirli seyreltme yapılarak 10^6 CFU/ml mikroorganizma süspansiyonu mikrodilüsyon yönteminde kullanılmıştır. MIC belirlenmesi için 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılmıştır. Test organizmaları 2 paralelli olacak şekilde tekrar yapılmıştır. 1A-H, 2A-H, kuyucuklarında etüvde kurutulan titanyum dioksit nanopartikülleri, 3A-H, 4A-H kuyucuklarında ependorflarda santrifüj sonrası yıkama işlemi gerçekleştirilen titanyum dioksit nanopartikülleri, 5A-D ve 6 A-D kuyucuklarında kontrol grupları *S. aureus* üzerine etkisi test edilmiştir. 7A-H, 8A-H, kuyucuklarında titanyum dioksit nanopartikülleri, 9A-H, 10A-H kuyucuklarında ependorflarda santrifüj sonrası yıkama işlemi gerçekleştirilen titanyum dioksit nanopartiküllerinin, 5F-H ve 6F-H kuyucuklarında kontrol grupları *E. coli* üzerinde etkisi test edilmiştir. 5A-H ve 6A-H kuyucukları sadece besiyeri, hücre ve besiyeri, gentamisin ve hücre içermektedir ve negatif kontrol olarak su kullanılmıştır. 5A-H üst kuyucukları *S. aureus* için, 5A-H alt kuyucukları *E. coli* için pozitif kontrol bakteri içeren ve antimikrobiyal ajan içermeyen besiyeri olarak kullanılmıştır. Besiyeri olarak Muller Hinton Broth kullanılmıştır. Titanyum nanopartiküllerin etkisinin test edildiği hatlardaki ilk kuyucuğa ilk olarak 40 µl numune eklenilmiştir. Aynı hat üzerindeki diğer kuyucuklara 20 µl besiyeri eklenmiştir. Daha sonra ilk kuyucuktaki 40 µl numuneden pipet yardımıyla 20 µl çekilerek diğer kuyucuğa aktarılmıştır. Seri seyreltme yapılarak her kuyucuktan 20 µl diğer kuyucuğa pipet yardımıyla aktarılmıştır ve en son kuyucuktan 20 µl çekilerek atık kabına atılmıştır. Seyreltme yapıldıktan sonra kuyucukların içerisine 160 µl besiyeri, son olarakta test mikroorganizma süspansiyonundan 20µl ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 10mg/mL konsantrasyonunda gentamisin antibiyotigi ile gerçekleştirilmiştir. MİK işlemi bitirdikten sonra mikrolakalar 37°C’de 24 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir.

3.7 Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları

Galdieria. sulphuraria'nın mikroalgal süpernatantı ile hücre dışı sentezlenen titanyum nanopartiküllerin kozmetik alanda etkinliği ve uygulanabilirliği Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı'ndan temin edilen sağlıklı insan deri keratinosit (*HaCat*) ve deri fibroblastik (*Detroit 551*) hücre hatları üzerinde MTT'ye dayanan sitotoksikite ve yara modeliyle incelenen biyoaktivite testlerinin gerçekleştirilerek incelenmiştir. Yapılan bu testlerden alınan sonuçlar karşılıklı olarak analiz edilmiş, kozmetik ürünlerin testinde kullanılması planlanan algal kaynaklı nanopartiküllerin etkisi incelenmiştir. Biyoyumluluk testlerinden olan sitotoksikite deneyleri, *in vitro* koşullarda bir test bileşiğinin, genellikle belirlenmiş bir inkübasyon periyodundan sonra kalan canlı hücrelerin sayısını belirleyerek, kültür içindeki hücreler için toksik olup olmadığını ölçmektedir.

3.7.1 Hücre hatları

Tez kapsamında kozmetik amaçlı üretilen biyolojik titanyum nanopartikülleri sitotoksikite ve biyoaktivite testleri için Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı Hücre Kültürü Koleksiyonunda bulunan *HaCat* ve *Detroit 551* hücre hatları kullanılmıştır. *HaCat* ve *Detroit 551* hücrelerinin büyüme ortamı olarak %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serum-FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %0,1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren %90 (v/v) DMEM-HG besin ortamı kullanılmıştır. Tez kapsamında, hücre hatlarının iki günde bir besin ortamları değiştirilmiştir, hücreler ters faz mikroskop ile tek tabaka olacak şekilde yüzeyi kapladıklarında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7.2 MTT testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

Titanyum nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin belirlenmesinde, hücre canlılığının ölçülmesine yönelik kalorimetrik bir yöntem olan metil thiazol tetrazolium (MTT) testi uygulanmıştır. Bu test sırasında hücre hatları 1×10^5 hücre/mL başlangıç konsantrasyonunda 96-gözlü pleytin gözlerine (1×10^4 hücre/bir pleyt gözü) ekildi ve 24 saat boyunca inkübasyona (37°C, %5 CO₂) bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besin ortamı dikkatli bir şekilde çekildi ve nanopartiküllerin belirlenen konsantrasyonlarından (200 µg/mL – 6.25 µg/mL arası toplamda 6 seyreltme) ve negatif-pozitif kontrol solüsyonları

dahil her göze 100'er µl olacak şekilde ekleme yapıldı. Hücreler tekrardan inkübasyona (37°C, %5 CO₂) bırakıldı ve 24-48-72. saatlerde MTT testi uygulandı. Bu sürecin sonunda hücre içeren tüm gözlere 5mg/ml konsantrasyonunda %10 MTT solüsyonu içeren serumsuz besin ortamından 100'er µl eklendi ve 3 saat boyunca 37°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra MTT içeren her gözdeki besin ortamları dökülerek, formazan kristalleri çözündürülmesi için dimetil sülfoksit solüsyonundan 100'er µl kadar eklendi. Ardından yeterli çalkalama işleminden sonra mikroplyt okuyucusu kullanılarak 570 nm/ 690 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü. Hücre canlılığı şu formülden hesaplandı; $[(AE - AB) / (AC - AB)]$. Burada AE; deney örneklerinin absorbansı, AC; işlem görmemiş örneklerin absorbansı ve AB, boş kontrol grubu absorbans değeridir.

3.7.3 Yara iyileştirme özelliğinin belirlenmesi

MTT testi sonrasında biyoaktif konsantrasyonu belirlenen titanyum nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki yara iyileştirme özelliğinin belirlenmesinde migrasyon denemesi uygulanmıştır. Migrasyon denemeleri İbidi firması tarafından sağlanan iki kuyucuktan oluşan biyoyumlu silikon (İbidi, Culture-Insert-2 well, 80206) malzeme ile gerçekleştirilmiştir. Pasajlama sırasında HaCat ve Detroit 551 hücreleri flasktan alınarak hemasitometre yöntemiyle mikroskopta sayılmıştır. Sayım sonrasında her iki kuyucuğa 70 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir. Hücreler ekildikten iki gün sonrasında yüzeyi tamamen kapladığında proliferasyonun durdurulması için serumsuz ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroskop yardımıyla hücrelerin yüzeyi tamamen kaplandığını kontrol edilmiştir. Hücreler yüzeyi tamamen kapladığında steril bir pens yardımıyla kuyucuklar yavaşça çıkarılmıştır. Hücrelerin tekrar yapışmaması adına hücreler, Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkanmıştır Kontrol grubu olarak hücre üretiminde kullanılan hazır DMEM HG besin ortamı kullanılmıştır. Yara modeli 0. saatten itibaren ters faz ışık mikroskobu altında 24 saat boyunca kontrol edilmiştir.

3.7.4 FITC ile işaretli nanopartiküllerin görüntülenmesi

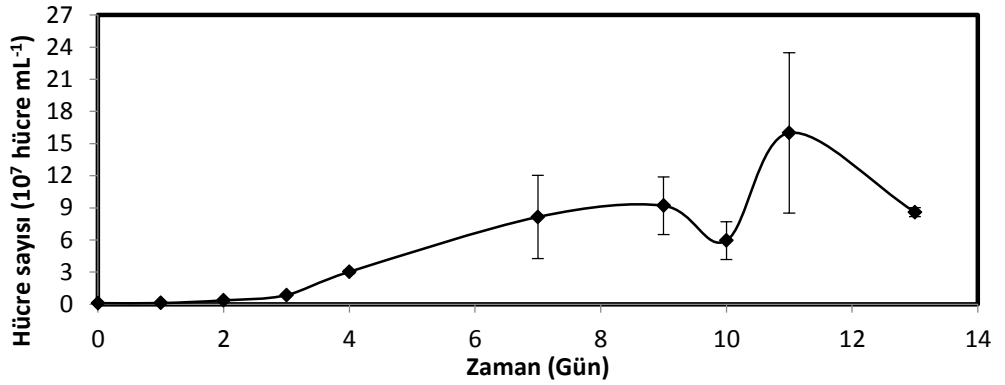
Titanyum dioksit nanopartiküllerinin sağlıklı insan deri keratinosit (*HaCaT*) hücre hatlarında görüntülenmesi floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek gerçekleştirilmiştir. Analiz için *HaCaT* hücreleri 12-gözlü pleytin gözlerine (1x10⁴ hücre/bir pleyt gözü) ekilmiştir ve 24 saat boyunca inkübasyona

(37°C, %5 CO₂) bırakılmıştır. Floresan etikleme için 5 mg/mL saf metanol ile çözdürülen FITC'den 250 µl çekilerek 100 µl (10mg/ml) titanyum dioksit nanopartikülleri ile süspanse hale getirilmiştir. Hazırlanan süspanسیون çözeltisi oda sıcaklığında 1000 rpm karıştırma hızında bir gece boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bekletme sonrası çözelti 7000 rcf (9789 rpm) hızında santrifüjlenmiş ve steril distile su ile süpernatant renksiz olana kadar santrifüj işlemi devam etmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen FITC-TiO₂ nanopartikülleri PBS ile süspanse edilerek tekrardan 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanarak karanlıkta +4°C'de muhafaza edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besin ortamı dikkatli bir şekilde çekilmiştir ve taze DMEM-F12 ortamı ile değiştirilmiştir. FITC-TiO₂ nanopartikülleri belirlenen konsantrasyonda (25-50-100 µg/ml) ve kontrol grubu dahil her göze toplam 2 ml olacak şekilde ekleme yapıldı ve hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde tekrardan inkübasyona bırakılmıştır. FITC-TiO₂ nanopartikülleri 24 ve 48. saatlerde floresan mikroskobu altında incelenmiştir (Jochums et al., 2017).

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *Galdieria sulphuraria* Büyüme Kinetiği

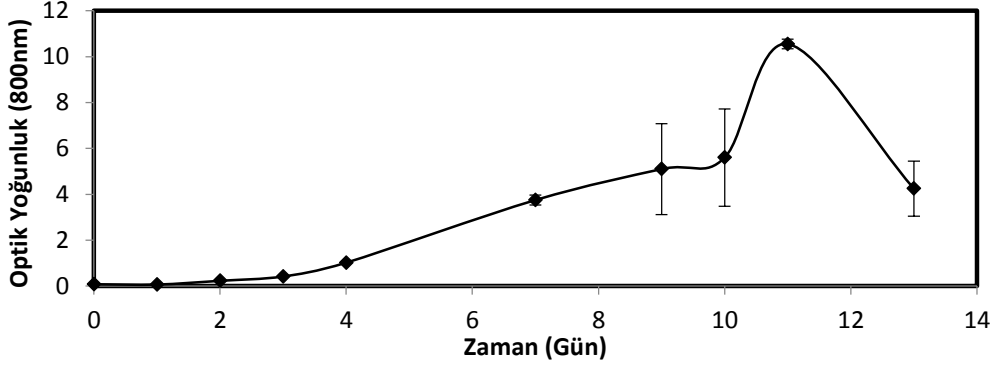
Kırmızı bir mikroalg türü olan *Galdieria sulphuraria* mikroalgi optimum pH ve sıcaklık koşullarında kültivasyonu gerçekleştirilmiş ve günlük yapılan kuru biyokütle, mikroskopik hücre sayımı ve spektrofotometrik analizler yapılarak büyüme kineği çıkartılmıştır. Yapılan her bir analiz sonucu ile elde edilen verilerin zamana karşı grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 4.1 *Galdieria sulphuraria* hücrelerinin zamana karşı hücre sayısı değerleri

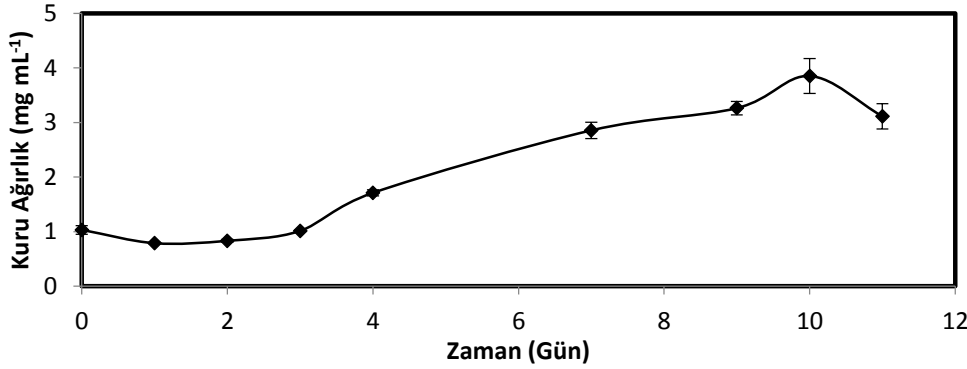
Yapılan literatür çalışmaları *Galdieria sulphuraria* hücre kültürlerinin mikсотrofik, heterotrofik ve ototrofik büyüme yöntemleriyle kültivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda mikroalglerin heterotrofik ve mikсотrofik ortam koşullarında daha yüksek konsantrasyonda biyokütle eldesi ve daha hızlı uyum fazı gösterdiği gözlemlenmiştir (Lopez et al., 2019; Sakurai et al. 2016). Bu tez çalışması sırasında *Galdieria sulphuraria*'nın heterotrofik koşullarda kültivasyonu gerçekleştirilmiştir. Günlük analizler 3 paralelli olacak şekilde karşılaştırılmış ve bu üç değerin aritmetik ortalaması alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

Şekil 4.1'deki veriler incelendiğinde mikroskopik hücre sayısının 11. günde maksimum değerinin 1.6×10^8 hücre/ml olduğu gözlemlenmiştir. Hücreler logaritmik büyüme evresine ise 4. günden itibaren girmiştir. Yapılan hücre sayımı sırasında uygun pipetleme işleminin gerçekleştirilmemesi kuyucuklar içerisindeki hücre yoğunluğundan dolayı üst üste çakışan bir görüntü gözlemlenmesine neden olmuştur. Bu durum bazı günlerde yanlış hücre sayısının belirlenmesine neden olmuştur.



Şekil 4.2 *Galdieria sulphuraria* hücrelerinin zamana karşı optik yoğunluk değerleri

Şekil 4.2 incelendiğinde hücrelerin optik yoğunluk değerleri mikroskobik hücre sayımı analizi ile benzerlik göstermiş ve 800 nm’de maksimum absorbans 11. günde elde edilmiştir.



Şekil 4.3 *Galdieria sulphuraria* hücrelerinin zamana karşı hücre sayısı değerleri

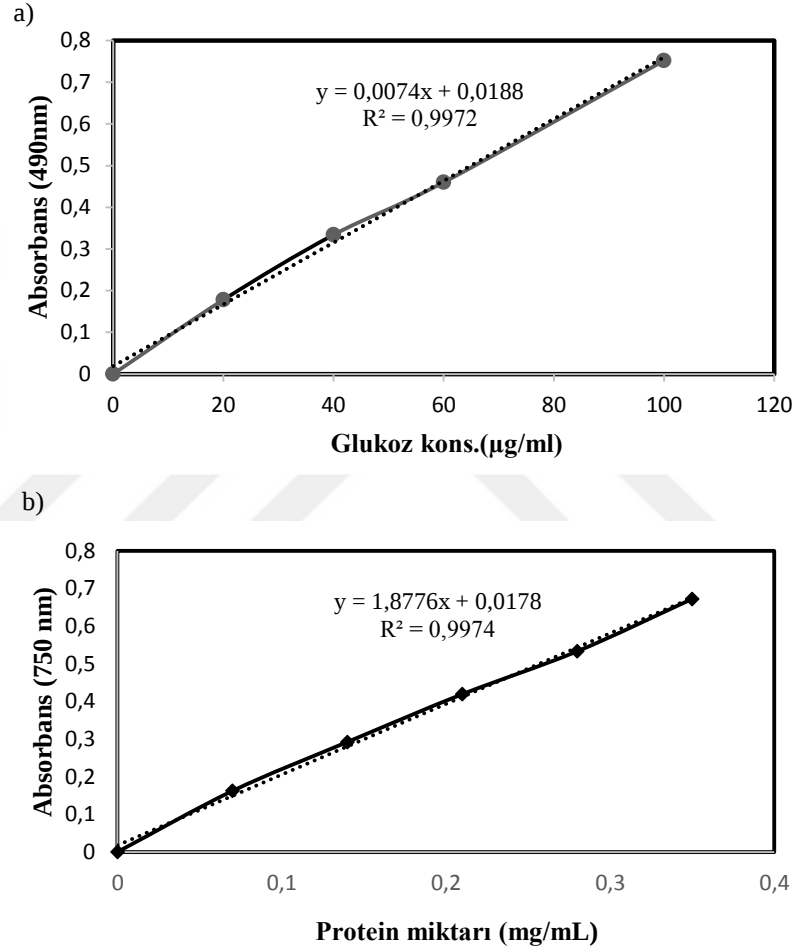
Mikroalg hücrelerinin Şekil 4.3’te maksimum kuru ağırlık konsantrasyonu 10. günde 4 mg/ml olarak elde edilmiştir. Günlük yapılan analiz verilerinden yola çıkarak hücre içi ve hücre dışı nanopartikül sentezi için gerekli olan *Galdieria sulphuraria* mikroalginin kültivasyonun durağan faza girmeden maksimum hücre yoğunluğuna ulaştığı 11. günde sonlandırılmasına karar verilmiştir.

4.2 Biyokimyasal Analizler

Nanopartikül biyosentezinde kullanılan biyolojik indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak hücresel metabolitler önemli rol oynamaktadır. Biyolojik nanopartikül sentezinde metal iyonlarını indirgenmesinde proteinler, polisakkaritler, alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler gibi biyomoleküller yer

almaktadır (Shavandi et al., 2019; Chowdhury et al., 2014). Bu literatür bilgileri doğrultusunda heterotrofik koşullarda kùltivasyonu gerçekleştirilen hùcrelerin hasat sonrası elde edilen süpernatant ve biyokùtlenin toplam şeker ve protein miktarı belirlenmiştir.

Toplam protein tayini için kullanılan Lowry tekniğinde ve toplam şeker tayini için kullanılan Dubios tekniğ i ile lùlen standartlar sonrası elde edilen grafikler şekil 4.4'te gösterilmiştir.



şekil 4.4 Standartlar ile elde edilen toplam şeker(a) ve protein(b) tayini eğrisi

Kùltivasyon sonunda gerçekleştirilen biyokimyasal analizler sonrası, standartlardan elde edilen denklemler kullanılarak köre karşı absorbans değeri denklemlerde y, şeker veya protein miktarı ise denklemlerde yerine konularak hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1 *Galdieria sulphuraria*'nın biyokimyasal analiz sonuçları

Biyokimyasal Metabolit	Hücre İçi	Hücre Dışı
Toplam Şeker Tayini	1,4908 µg glikoz/mg biyokütle	12,024 µg glikoz/ml süpernatant
Toplam Protein Miktarı	0,2006 mg protein/mg biyokütle	0,816 mg protein/ml süpernatant

4.3 Ön Optimizasyon Denemeleri

Hücre içi ve hücre dışı biyojenik nanopartikül sentezi ön optimizasyon denemeleri erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Ön optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyon sonuçları tablolar ve şekiller halinde düzenlenmiştir.

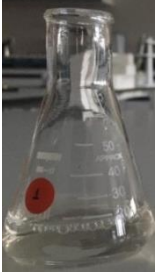
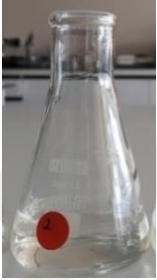
4.3.1 Hücre dışı sentezlenen partiküllerin boyut analizi

Bu tez çalışmasının ön optimizasyon denemelerinde iki farklı metal çözeltisi ve *Galdieria sulphuraria* mikroalgal metabolitlerinin biyolojik nanopartikül sentezleme potansiyeli ve optimizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Ön optimizasyon çalışmalarında metal konsantrasyonu ve hücre dışı süpernatant: metal çözeltisi, hücre içi biyokütle: metal çözeltisinin hacimsel oranları iki farklı parametre olarak belirlenmiştir. Bu parametreler için uygun deneme deseni Design Expert programı tarafından oluşturulmuştur.

Literatür araştırmaları sonucunda metal iyonlarının indirgenerek nanopartikül sentezi sırasında ortamda renk değişimi gözlemlenmektedir. Bu renk değişiminin incelenmesi için ön optimizasyon çalışmalarında erlenlerin ilk ve son hali fotoğraflanmıştır.

Titanyum metali için oluşturulan deneme deseni ve karakterizasyon sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 *Galdieria sulphuraria* süpernatantı ile hücre dışı titanyum nanopartikül sentezi için oluşturulan ön optimizasyon denemeleri

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R1</u> 5,05mM Ti 5,05mM (Ti: Sp)			100,9
<u>R2</u> 8,55mM Ti 8,56mM (Ti: Sp)			57,61
<u>R3</u> 5,05 mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			112,3
<u>R4</u> 5,05mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			139

Tablo 4.2 (devam)

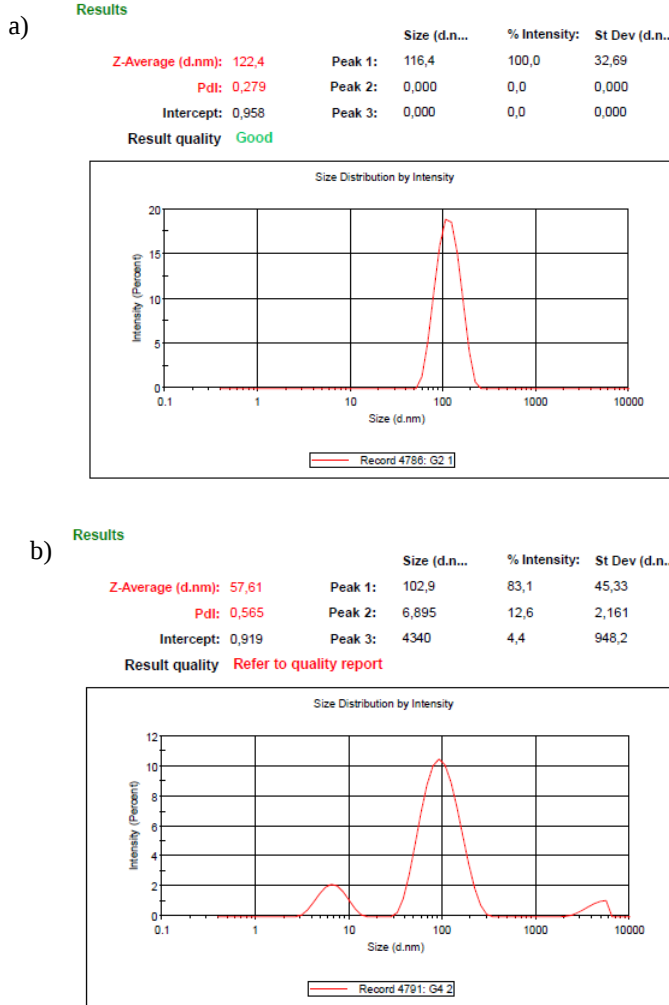
Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R5</u> 1,55mM Ti 8,56mM (Ti: Sp)			165,1
<u>R6</u> 0,1mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			166,4
<u>R7</u> 10mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			67,03
<u>R8</u> 1,55mM Ti 1,64mM (Ti: Sp)			1747
<u>R9</u> 5,05mM Ti 0,2mM (Ti: Sp)			925,3

Tablo 4.2 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R10</u> 5,05mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			104,9
<u>R11</u> 5,05mM Ti 10mM (Ti: Sp)			495,8
<u>R12</u> 5,05mM Ti 5,1mM (Ti: Sp)			94,35
<u>R13</u> 8,55mM Ti 1,64mM (Ti: Sp)			1135

Ön optimizasyon çalışmalarında titanyum metal konsantrasyon aralığı 1-10 mM olacak şekilde hücre dışı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında açık beyaz renge sahip süpernatant çözeltisi inkübasyon sonrası daha koyu ve bulanık beyaz renge doğru geçen bir değişim göstermiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin Zeta-Sizer cihazı ile ortalama harmonik partikül çapları hesaplanmıştır. Genel olarak titanyum metali ile yapılan denemelerden iyi sonuçlar elde edilmiştir. Deneme 8, 9 ve 13 numaralı çalışmada partikül çapları 500 nm'den üstünde ölçülmüştür. Bu tez çalışma sırasında partikül çapının en az 200 nm altında olmasını amaçladığımız için bu denemelerdeki oranlar dikkate

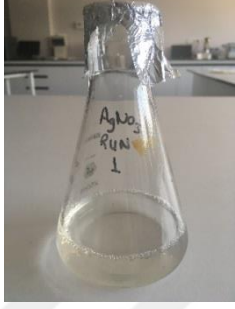
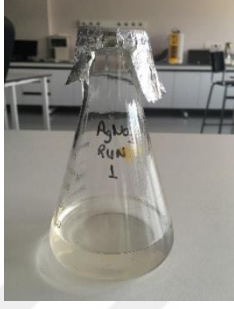
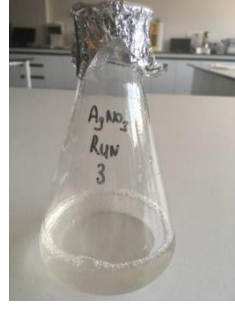
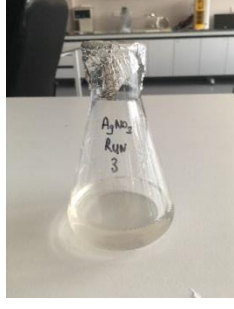
alınmıştır. Süpernatant denemelerinde en düşük metal konsantrasyonu ile 166,4 nm partikül çapı ölçülmüştür. Metal: süpernatant hacimsel oranı 8.56 ve metal konsantrasyonu 8,55 mM olan deneme 2’de ise en düşük partikül çapı 57,61 nm olarak ölçülmüştür. Zeta-Sizer cihazı aynı zamanda üretim sonunda elde edilen süspansiyon içerisindeki nanopartiküllerin boyut olarak homojen dağılıma sahip olup olmadığını belirten PDI (poly dispersity index) değerini hesaplamaktadır. Bu deneme deseninde PDI değeri 0,279 ölçülmüş ve partikül dağılımının homojen olduğunu göstermiştir. Şekil 4.5’te belirtildiği üzere deneme 3’ten elde edilen partiküllerin grafiksel görüntüsünde tek bir eğrinin olması boyut olarak homojen yapılara sahip partiküller sentezlendiğini göstermektedir. Bu durum deneme 2 ile kıyaslandığında daha fazla eğrinin bulunması çok farklı yapı ve boyutlarda partiküllerin bulunduğu belirtmektedir. Nanopartiküllerin düşük partikül çapına sahip olması ve homojen bir dağılım göstermesi araştırmalarda daha çok tercih edilmektedir.



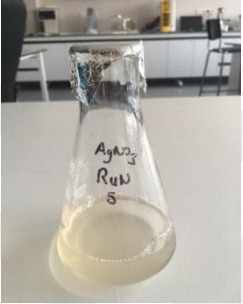
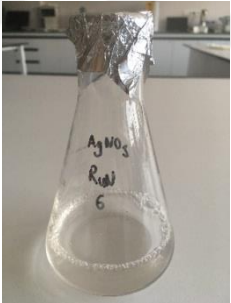
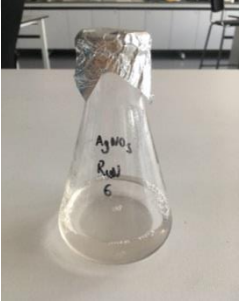
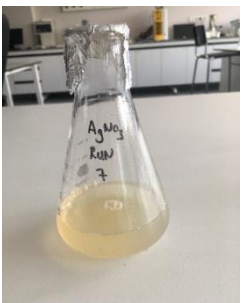
Şekil 4.5 Zeta-Sizer cihazı ile ortalama partikül çapı hesaplanan 2(a) ve 3(b) numaralı desenlerin sonucu

Hücre dışı gümüş nanopartikül sentezi sırasında kullanılan erlenlerin reaksiyon önce ve sonrası görüntüleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

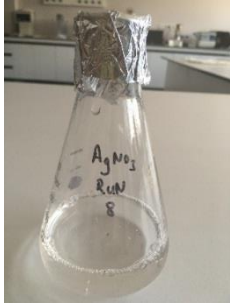
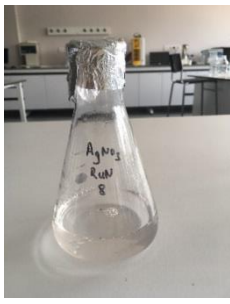
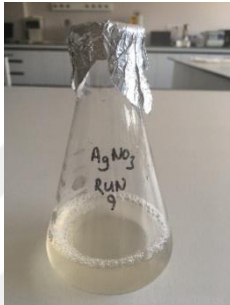
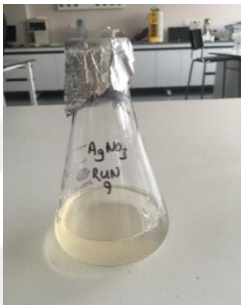
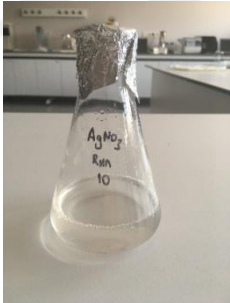
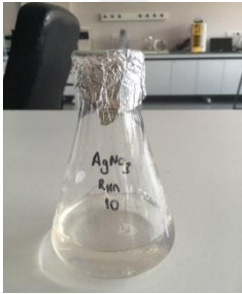
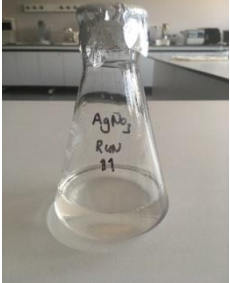
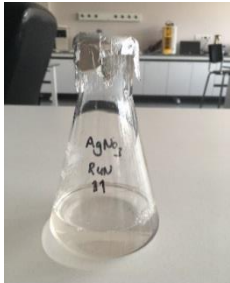
Tablo 4.3 *Galdieria sulphuraria* süpernatantı ile hücre dışı gümüş nanopartikül sentezi için oluşturulan ön optimizasyon denemeleri

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R1</u> 10 mM AgNO ₃ 5,1 (AgNO ₃ : Sp)			1202
<u>R2</u> 2,32 mM AgNO ₃ 8,56 (AgNO ₃ : Sp)			2929
<u>R3</u> 5,5 mM AgNO ₃ 5,1 (AgNO ₃ : Sp)			1135

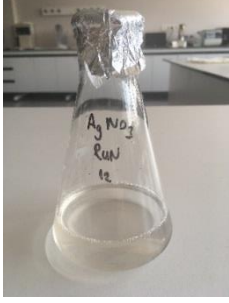
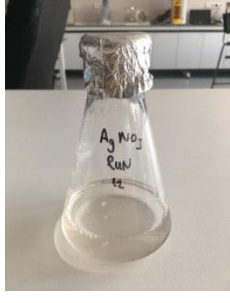
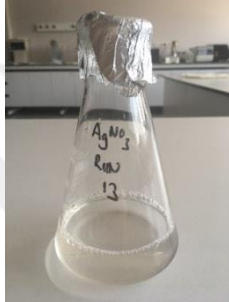
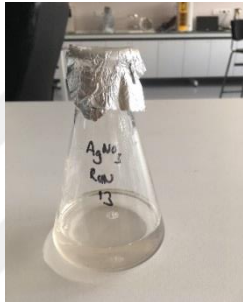
Tablo 4.3 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R4</u> 5,5 mM AgNO ₃ 5,1(AgNO ₃ : Sp)			1181
<u>R5</u> 8,68 mM AgNO ₃ 1,64 (AgNO ₃ : Sp)			1134
<u>R6</u> 5,5 mM AgNO ₃ 5,1(AgNO ₃ : Sp)			1465
<u>R7</u> 5,5 mM AgNO ₃ 0,2(AgNO ₃ : Sp)			1495

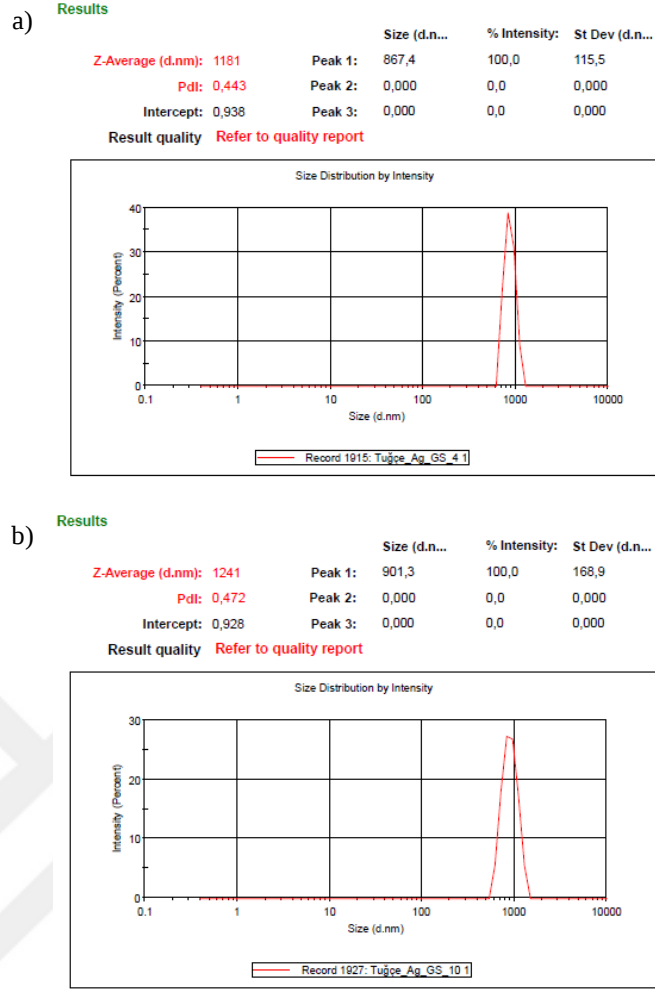
Tablo 4.3 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R8</u> 5,5 mM AgNO_3 10(AgNO_3 : Sp)			1402
<u>R9</u> 2,32 mM AgNO_3 1,64 (AgNO_3 : Sp)			1638
<u>R10</u> 1 mM AgNO_3 5,1(AgNO_3 : Sp)			1241
<u>R11</u> 8,68 mM AgNO_3 8,56 (AgNO_3 : Sp)			1182

Tablo 4.3 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R12</u> 5,5 mM AgNO ₃ 5,1 (AgNO ₃ : Sp)			1701
<u>R13</u> 5,5 mM AgNO ₃ 5,1 (AgNO ₃ : Sp)			1532

Deneme deseninde ortalama partikül çapı genel olarak 1000 nm üzerinde ölçülmüştür. İnkübasyon sonunda deneme numaraları 5, 9, 12 ve 13 olan desenlerde daha erlen içindeki ortam renginin opaklaştığı gözlemlenmiştir. Deneme 2 ve 9’da herhangi bir renk değişimi olmamıştır. Bu homojen görüntü partikül çapı analizi sırasında tek yapılı ve düşük PDI değerine sahip ölçümler elde etmemizi sağlamıştır. Bulanık görüntü içerisinde meydana gelen agregasyonlar ortalama harmonik partikül çapını değiştirmektedir. Bu deneme deseninde optimum değer olan 5,5 mM AgNO₃ metal konsantrasyonu ve hacimsel oranda 5,1 değerindeki AgNO₃ çözeltisi: algal süpernant ile 1181 nm partikül çapı ölçülmüştür. Partiküllerin mikron boyutlarda ortalama çapa sahip olmalarının nedeni olarak analiz için buzdolabında bekletilmesi ve zamanla oluşan flokların çökelti oluşturarak heterojen bir çözelti oluşturması söylenebilir. Şekil 4.6’da partiküllerin PDI değerleri ve grafiksel eğri dağılımı görülmektedir. En düşük partikül çapına sahip olan deneme 4’te PDI değeri 0,443 olarak ölçülmüştür. Bu değer yüksek olması çözelti içerisinde partikül boyutlarının homojen yapıda olmadığı ve floklardan dolayı oluşan düzensiz yapıların boyut aralığını etkilediğini belirtmektedir. Her iki grafiği de incelediğimizde çan eğrisinin çok sivri, düzgün olmayan dağılım gösterdiği ve boyut olarak 1000 nm’ye yakın değerler içerdiği belirtilmiştir.



Şekil 4.6 Zeta-Sizer cihazı ile ortalama gümüş partikül çapı hesaplanan 4(a) ve 10(b) numaralı desen sonucu

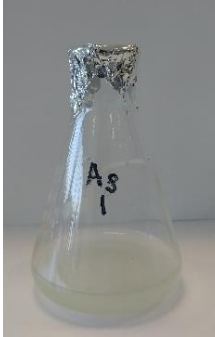
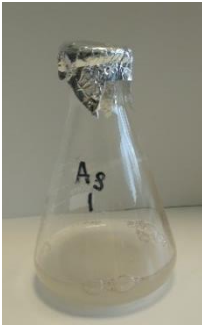
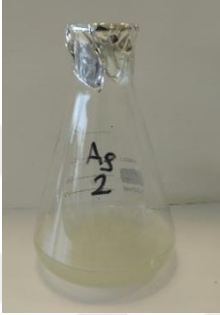
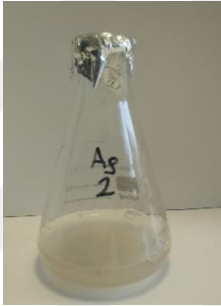
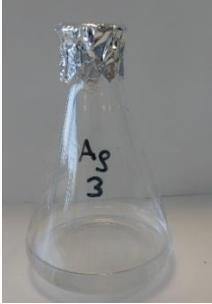
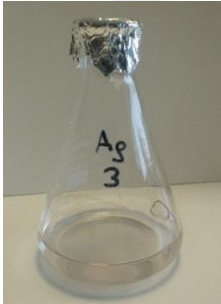
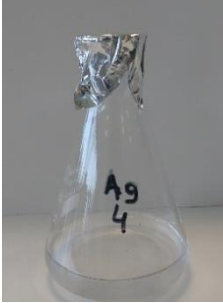
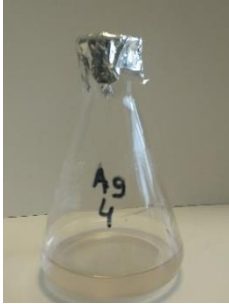
4.4 Hücre İçi Sentezlenen Partiküllerin Boyut Analizi

Hücre içi biyojenik nanopartikül sentezi *Galdieria. sulphuraria* yaş biyokütlesi ile metalik çözeltilerin farklı konsantrasyonları süspanse edilerek gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin logaritmik büyüme evresi sonunda hasatlama işlemi ile biyokütle süpernatanttan uzaklaştırılmıştır. Algal biyokütle ile Titanyum (IV)bis (amonyum laktato) dihidroksit ve AgNO_3 metal çözeltileri deneme deseninde belirlenen aralıklara göre inkübe edilmiştir. Hücre içi nanopartikül sentezinin hücre membranı aracılığıyla metabolik yollar ile metal tuzlarının indirgenmesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu nedenle inkübasyon sonunda sonikasyon ile hücre parçalama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücresel partiküllerin besin ortamına geçişi sağlanmıştır. Partikül karakterizasyon analizleri bu ortamdan numune alınarak gerçekleştirilmiştir. Metalik nanopartikül sentezini sırasında reaksiyon gerçekleşmesi veya gerçekleşmemesi durumu ortamda

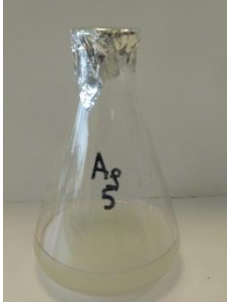
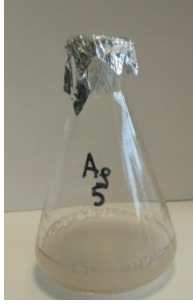
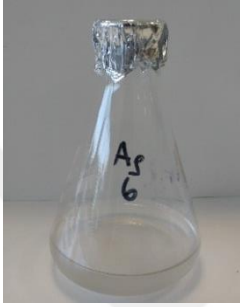
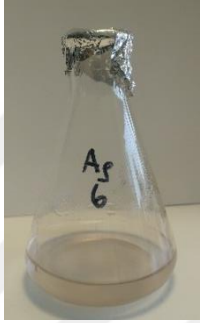
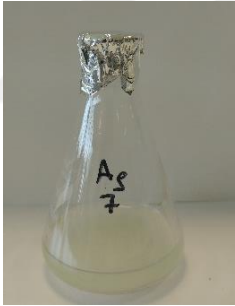
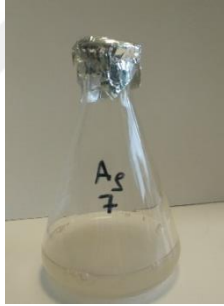
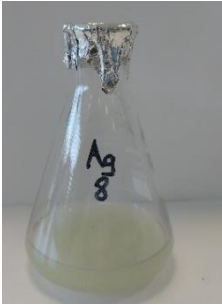
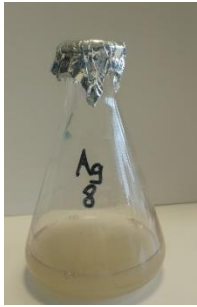
görülen renk değişikliği ile izlenebilmektedir. Otari ve ark., 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada hücre içi metalik nanopartikül sentezi sırasında *Rhodococcus sp.* tarafından AgNO_3 metal çözeltisinin indirgenmesi sonucunda ortam renginin beyazdan kahverengiye doğru değiştiğini gözlemlemiştir. İnkübasyon sonrasında renksiz ortamın kahverengiye doğru değişiklik göstermesi nanopartikül sentezinin gerçekleştiğini belirtmektedir (Ota et al., 2015). Yapılan bir diğer çalışmada Soleimani ve Pirkoohi, alg kültürü ile Ag^+ iyonunun biyo indirgenmesi sonucunda gümüş nanopartiküle dönüşmesinin ilk göstergesi olarak ortam rengindeki karakteristik değişiklik olduğunu söylemiştir. *Chlorella vulgaris*'den gümüş nanopartikül biyosentezi ile yapılan araştırma sırasında ortamdaki hücresel yeşil rengin ilk olarak fildişi daha sonra kahverengiye dönüştüğü belirtilmiştir. Araştırmacılar bu sentez işlemini mikroalg hücreleri tarafından redüktaz enzimlerin kültür ortamına salgıladığını ve gümüş iyonlarının bu enzimler tarafından indirgenerek partiküllere dönüştürdüğünü düşünmektedir (Soleimani and Pirkoohi, 2017).

Galdieria sulphuraria yaş biyokütlesi ile hücre içi gümüş nanopartikül sentezi ait deneme deseni inkübasyon öncesi ve sonrasına ait görseller Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Yaş biyokütlenin yeşilimsi rengi inkübasyon sonrasında grimsi kahverengi renge dönmüştür. Bu renk değişimi karakterizasyon öncesi gümüş iyonlarının indirgenme reaksiyonu ile partikül oluşturduğunun göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Biyokütlerdeki hacimsel artış rengi daha da koyulaştırmıştır. Daha önce süpernatanttan hücre dışı nanopartikül denemeleri sırasında belirgin bir renk değişimi gözlemlenmemiştir. Bu durum hücresel redüktaz enzimlerin ve metabolitlerin süpernatant ortamına göre daha fazla oranda bulunmasından dolayı kaynaklanmaktadır. Zeta sizer ile ortalama nanopartikül çapı analiz edildiğinde 11 numaralı deneme haricinde genelde 1000 nm'nin altında boyut ölçülmüştür. En düşük nanopartikül çapı 5,5 mM konsantrasyon AgNO_3 ve hacimsel oranı 2,55 mg/ml biyokütle olan 1 numaralı deneme deseninde gözlemlenmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere yapılan analiz sonucunda PDI değeri 0,094 ve ortalama partikül çapı 165,5 nm boyutu olarak ölçülmüştür. PDI değerinin düşük olması tek düzen ve homojen bir dağılıma sahip partikül sentezlendiğinin göstergesidir. Bu analiz sırasında hem PDI değerinin düşük olması hem de sonuç kalitesinin iyi olacak şekilde sonuçlanması uygun nanopartikül sentezlendiğini göstermektedir. Hücre dışı sentez yöntemi ile hücre içi yöntemle göre kıyaslandığında daha düşük partikül yarıçapı ve PDI değeri ölçülmüştür. Bu durumdan dolayı hücresel metabolitlerin hem indirgenme hem stabilizasyon ajanı olarak daha etkili olduğu düşünülmektedir.

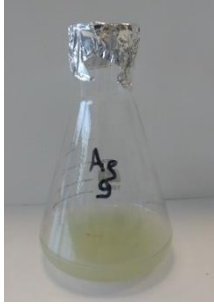
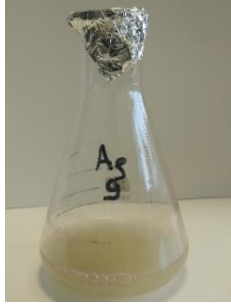
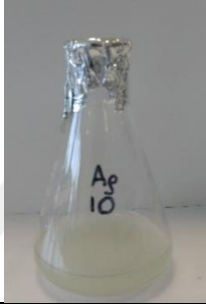
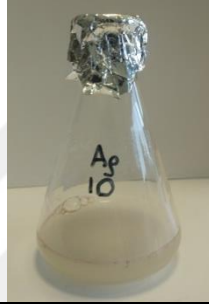
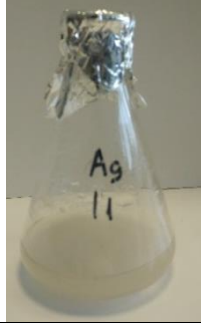
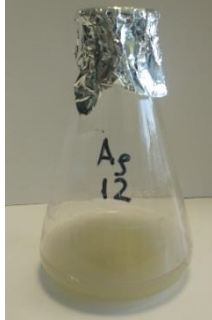
Tablo 4.4 *Galdieria sulphuraria* biyokütle aracılığıyla gümüş nanopartikül sentezinin ön optimizasyonu çalışması

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R1</u> 5,5 mM AgNO ₃ 2,55 mg/ml biyokütle			165,5
<u>R2</u> 5,5 mM AgNO ₃ 2,55 mg/ml biyokütle			196,7
<u>R3</u> 5,5 mM AgNO ₃ 0,1 mg/ml biyokütle			504,9
<u>R4</u> 1,17 mM AgNO ₃ 0,19 mg/ml biyokütle			198

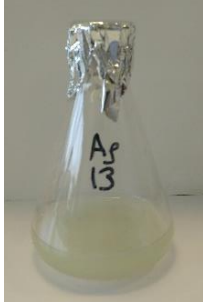
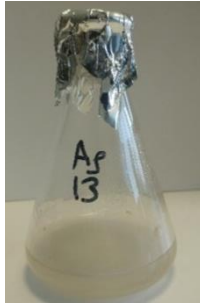
Tablo 4.4 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R5</u> 10 mM AgNO ₃ 2,55 mg/ml biyokütle			202,2
<u>R6</u> 9,83 mM AgNO ₃ 0,19 mg/ml biyokütle			506,4
<u>R7</u> 1 mM AgNO ₃ 2,55 mg/ml biyokütle			332,7
<u>R8</u> 9,83 mM AgNO ₃ 4,91 mg/ml biyokütle			566,1

Tablo 4.4 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R9</u> 5,5 mM AgNO_3 2,55 mg/ml biyokütle			218,7
<u>R10</u> 5,5 mM AgNO_3 5 mg/ml biyokütle			184,5
<u>R11</u> 5,5 mM AgNO_3 2,55 mg/ml biyokütle			1712
<u>R12</u> 1,17 mM AgNO_3 4,91 mg/ml biyokütle			314,6

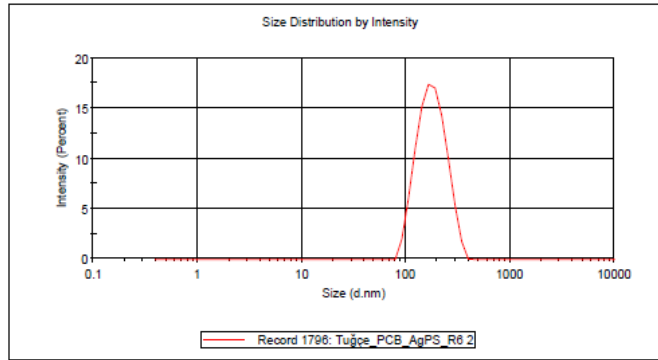
Tablo 4.4 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R13</u> 5,5 mM AgNO ₃ 2,55 mg/ml biyokütle			697,8

Results

Z-Average (d.nm): 165,5
 Pd: 0,094
 Intercept: 0,936
 Result quality Good

Size (d.nm)	% Intensity	St Dev (d.nm)
Peak 1: 182,8	100,0	55,86
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

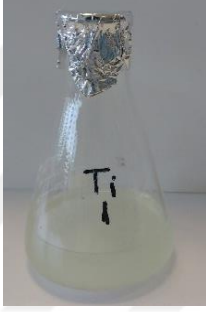
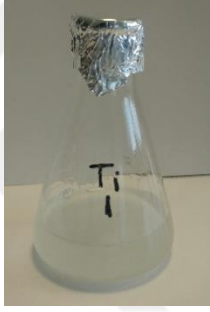
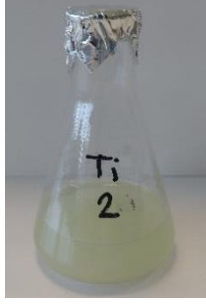
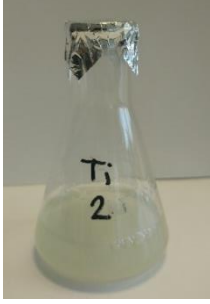
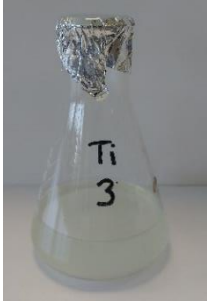
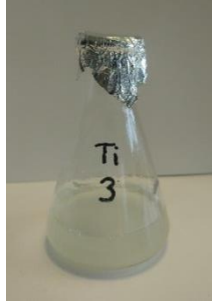


Şekil 4.7 Zeta-Sizer cihazı ile hücre içi ortalama gümüş partikül çapı hesaplanan 1 numaralı desen sonucu

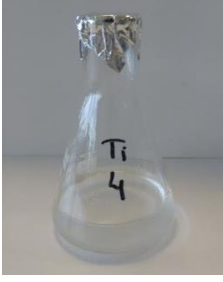
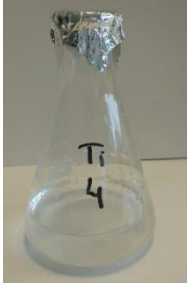
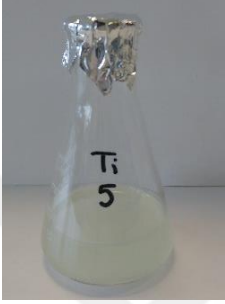
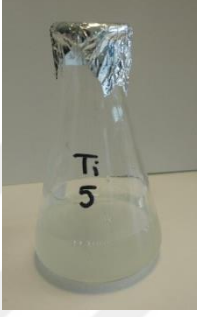
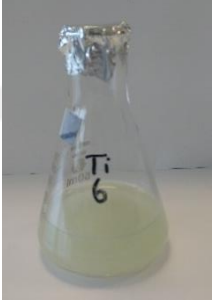
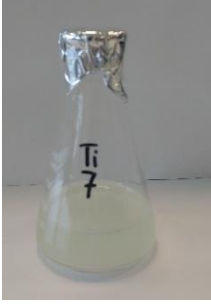
Hücre içi nanopartikül sentezinde titanyum metal çözeltisininön optimizasyonu denemeleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir. *Galdieria sulphuraria* yaş biyokütlesi ile titanyum çözeltisinin inkübasyon öncesi ve sonrası kültür ortamında renk değişimler incelenmiştir. Santhoshkumar ve ark., 2014 yılında tropikal bir meyve olan *Psidium guajava*'nın yaprak ekstraktalarını kullanarak biyolojik titanyum nanopartikül sentez çalışması gerçekleştirmiştir. İnkübasyon öncesinde bitkisel metabolitler ile reaksiyona giren metal çözeltisinde renk değişimi görülmemiştir. Araştırmacılar tarafından yaprak ekstraktlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda ortam renginin yeşil renge döndüğü ve nanopartikül sentezlendiği belirtilmiştir. Tez kapsamından algal biyokütle ile gerçekleştirdiğimiz reaksiyon sonunda erlenler içinde ortam rengi beyazdan daha yeşilimsi ve kırık beyazımsı bir hale gelmiştir. Ortalama partikül çaplarına genel olarak bakıldığında deneme 1,3 ve 5 numaralı desen dışında 1000 nm boyutunda

ölçülmüştür. En düşük partikül çapı 173,5 nm sahip 5,05 mM konsantrasyonunda 7 numaralı desen ile sentezlenmiştir. Şekil 4.8' e bakıldığında 7 numaralı desende partiküller homojen bir dağılım sahip olmasına rağmen yayılım eğrisinde bazı kirliliklerde görülmektedir. Aynı zamanda partiküllerin PDI değeri 0,234 ve sonuç kalitesi iyi olarak belirlenmiştir. Hücre dışı yöntem ile karşılaştırıldığında boyut olarak daha büyük nanopartiküller elde edilmiştir. Reaksiyon sonrasında +4°C'de muhafaza edilen örneklerde zaman içinde floklar oluşmuş ve partikül ortalama çapı zamanla artış göstermiştir.

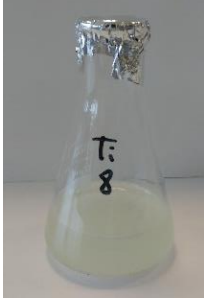
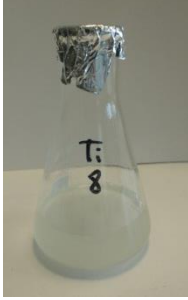
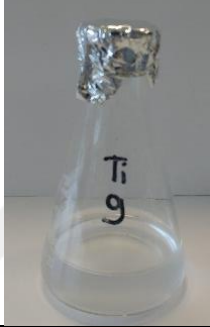
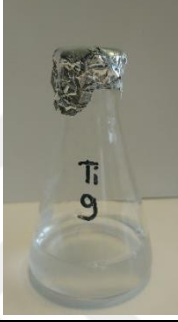
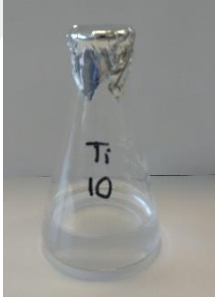
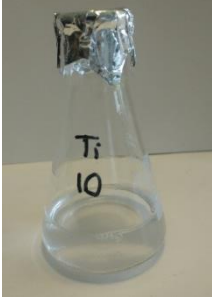
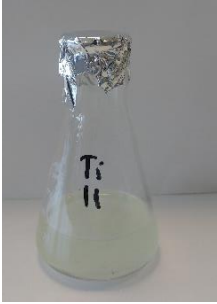
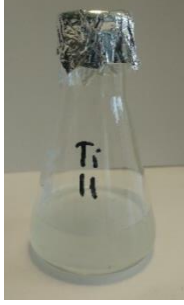
Tablo 4.5 *Galdieria sulphuraria* biyokütle aracılığıyla titanyum nanopartikül sentezinin ön optimizasyonu çalışması

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R1</u> 5,05mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			1202
<u>R2</u> 0,19 mM Ti 4,95 mg/ml biyokütle			197,7
<u>R3</u> 5,05 mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			1135

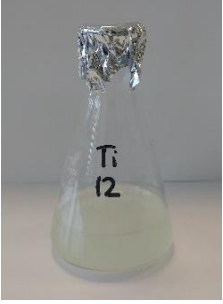
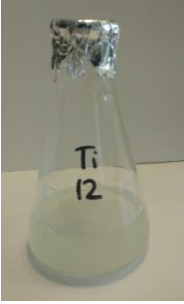
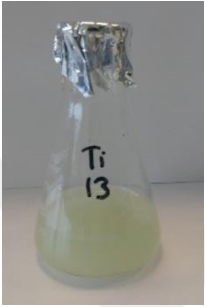
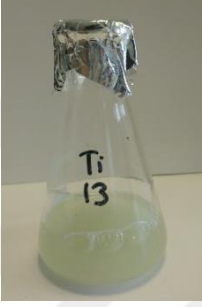
Tablo 4.5 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R4</u> 0,19mM Ti 0,15mg/ml biyokütle			193,7
<u>R5</u> 0,1mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			1134
<u>R6</u> 5 mM Ti 5,05 mg/ml biyokütle			218,5
<u>R7</u> 5,05mM Ti 0,2 mg/ml biyokütle			173,5

Tablo 4.5 (devam)

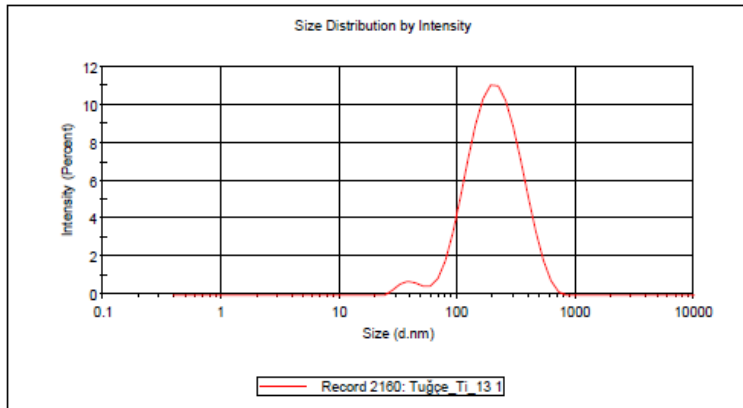
Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R8</u> 5,05mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			238,2
<u>R9</u> 9,09mM Ti 1,64 mg/ml biyokütle			195,8
<u>R10</u> 5,05 mM Ti 0,1 mg/ml biyokütle			270,9
<u>R11</u> 5,05mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			238

Tablo 4.5 (devam)

Deneme	İnkübasyon Öncesi	İnkübasyon Sonrası	Zeta-Sizer(nm)
<u>R12</u> 10mM Ti 2,55 mg/ml biyokütle			195,6
<u>R13</u> 9,91 mM Ti 4,95 mg/ml biyokütle			213

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 173,7	Peak 1: 228,0	96,8	111,4
Pdl: 0,234	Peak 2: 42,39	3,2	9,513
Intercept: 0,955	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4.8 Zeta-Sizer cihazı ile hücre içi ortalama titanyum partikül çapı hesaplanan 7 numaralı desen sonucu

4.5 Sentezlenen Partiküllerin UV-Spektrofotometrik Analizi

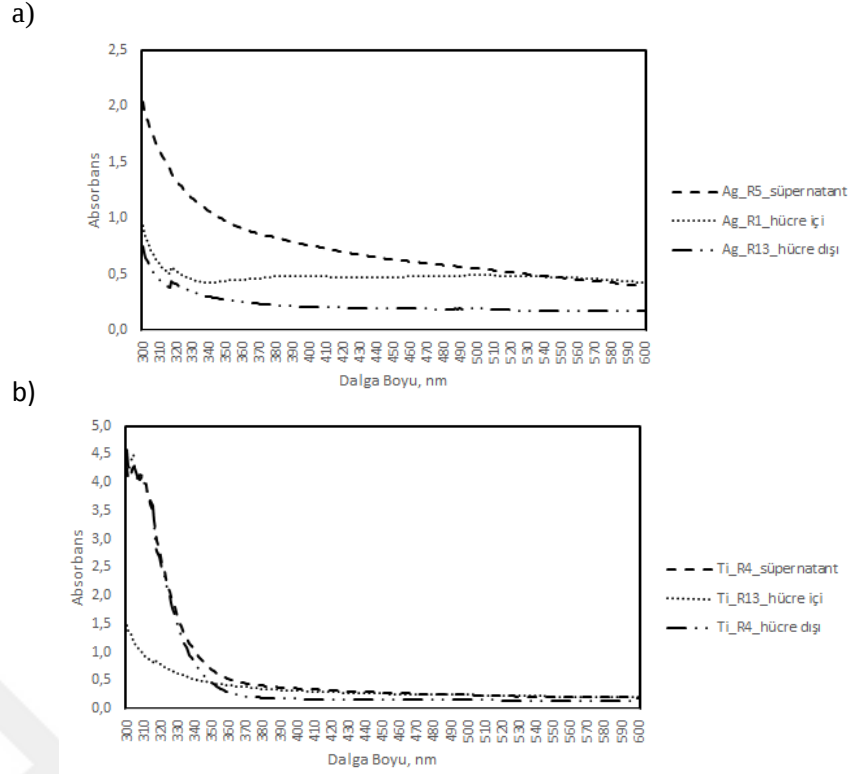
UV spektroskopi (UV-Vis), bir örnekten yansıyan ışığı ölçerek referans bir malzeme ile yansıyan ışığın yoğunluğu karşılaştırmaktadır. Nanopartikül yüzeyinin boyutu, şekli ve kırılma indeksinden dolayı sahip olduğu optik özellikleri ile UV-Vis spektrofotometre malzemelerin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan önemli bir cihaz olarak yer almaktadır. Aynı zamanda nanopartiküller yüzey plazmon rezonansı birbirinden farklı olduğu için farklı optik ışıklar yaymaktadır (Mourdikoudis et al., 2018).

Hücre dışı ve hücre içi sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında UV-Vis spektrofotometresinde maksimum dalga boyu analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucu ile uygun absorbans pikleri araştırmalar sonucu belirlenerek istenilen partiküllerin sentezlendiği ispatlanmıştır. Şekil 4.9'da titanyum ve gümüş metalik nanopartiküllerin UV-Vis spektrofotometrede taranmış ve grafik halinde gösterilmiştir. FBNP reaktör sistem öncesinden hem maksimum absorbans değeri hem de ortalama partikül çapları belirlenen partiküller arasından optimum üretim değeri belirlenmiştir.

Hücre içi ve hücre dışı sentezlenen gümüş nanopartiküllerin UV-vis spektrofotometrede dalga boyu 300 ve 600 nm aralığında incelenmiştir. Hücre içi sentezlenen nanopartiküllerin yüzey plazmon bandının 318 nm dalga boyunda 0,56 absorbans ölçülmüştür. Hücre dışında partiküller ise hücre içi ile benzer 320 nm'de bir pik vermiştir ve 0,49 absorbans değeri sahip plazmon rezonans belirlenmiştir (Şekil 4.9). Yapılan literatür araştırmaları sonucunda elde edilen yüzey plazmon rezonans pikleri karşılaştırılmıştır. Rafie ve ark., dört farklı makroalg türüne ait ekstraktları kullanarak ile gümüş nanopartikül sentezleme potansiyellerini incelemiştir. Araştırma sonucunda yüzey absorbans pikinin 380 nm'lerde vermeye başlamış ve maksimum absorbans pikinin 407-424 nm arasında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Öztürk ve arkadaşları da kırmızı alg türü olan *Gelidium corneum* ekstaraktı ile gümüş nanopartikül sentezlemişler ve 190-1000 nm aralığında UV-Vis spektrofotometre ile absorbans ölçmüşlerdir. Analiz sırasında yüzey plazmon rezonans bandı 420-430 nm ve maksimum absorbans piki 450 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir. Bir diğer çalışmada Jebril ve arkadaşları *Melia azedarach* bitkisel metabolitlerinden sentezledikleri gümüş nanopartikülleri yaklaşık 400 nm dalga boyunda tek yüzey plazmon rezonans bandı göstermiş ve bu durum partiküllerin küresel şekle sahip olduğunu kanıtlamaktadır (Rafie et al., 2013; Öztürk et al., 2020, Jebril et al., 2020). Tez

kapsamında hücre içi ve hücre dışı gümüş nanopartiküllerin UV-Vis spektrofotometre analizinde absorbans değerleri farklılık göstermiştir. Bunun nedeni olarak sentezlenen partiküllerin homojen dağılım göstermemesi, ortalama partikül çapının 100 nm ve üzerinde olması, partiküllerin zamanla flokleşarak yüzey üzerinde absorplamanın azalması etkili olduğu düşünülmüştür.

Titanyum nanopartiküllerinin ön optimizasyon çalışmaları sonucu UV-vis spektrofotometrede dalga boyu 300 ve 310 nm’lerde ölçülmüştür. Hücre içi sentezlenen nanopartiküllerin yüzey plazmon bandının gümüş nanopartikülünde olduğu gibi 318 nm dalga boyunda 0,85 yüzey rezonansı görüntülenmiştir. Hücre dışı 105 nm boyutlara sahip nanopartiküller 304, 308 ve 310 nm dalga boyunda pik göstermiştir. Subhapriya ve Gomathipriya, 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada *Trigonella foenumnano* yaprak ekstraktları ile sentezledikleri titanyum dioksit nanopartikülleri 400 nm dalga boyunda güçlü bir absorbans gösterdiğini belirtmişlerdir. Srinivasan ve arkadaşları yeşil sentez yöntemi ile sentezledikleri titanyum dioksit nanopartiküllerin yaklaşık 240 ve 320 nm pik verdiğini; Maurya ve arkadaşları, *Bixa orellana* aracılığı ile sentezledikleri titanyum dioksit nanopartiküllerinin 285 nm dalga boyunda geniş bir absorbans pik verdiğini ve maksimum absorbans pik 306 nm’de görüldüğünü belirtmişlerdir (Subhapriya and Gomathipriya, 2018; Srinivasan et al., 2019; Maurya et al., 2019). Bu tez çalışması kapsamında iki farklı partiküle ait absorbans analizleri literatür ile kıyaslandığında titanyum dioksit nanopartiküllerin benzer aralıklarda olduğu görülmektedir. Gümüş nanopartiküllerinin hem absorbans değerlerinin literatürden farklı olması hem de çok düşük pik alanı göstermesinden dolayı harmonik ortalama partikül çapının farklı olmasından dolayı olabileceği düşünülmüştür.



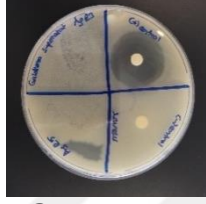
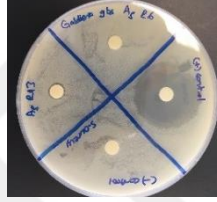
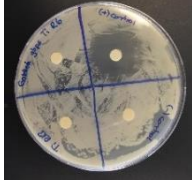
Şekil 4.9 Zeta-Sizer cihazı ile gümüş(a) ve titanyum(b) nanopartiküllerinin UV-Vis spektrofotometre analizi

4.6 Sentezlenen Partiküllerin Antibakteriyal Analizi

Galdieria sulphuraria hücresel metabolitleri kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin antibakteriyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bakteri türleri olarak gram (+) *Staphylococcus aureus* ve gram (-) *Escherichia coli* türleri kullanılmıştır. Disklere emdirilen nanopartiküllerin 24 saatlik inkübasyon sonunda agarlı besin ortamında oluşturdukları inhibisyon zonları ölçülerek analiz gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası bazı örneklerin disk görüntüleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Nanopartiküllerin antibakteriyal etkileri belirlenirken en düşük yarıçapa sahip deneme desenleri seçilmiştir. Diskler incelendiğinde gümüş nanopartiküllerinin Gram (-) bakteriler üzerinde daha iyi inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Gram (+) bakterilerin hücre duvarında bulunan daha kalın peptidoglikan yapısı antibakteriyal ajanlara karşı daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır (Handoko et al., 2017). Gümüş nanopartiküller, bakterilerin hücre zarı yüzeyinden geçerek hücre içi ATP sızıntısına yol açmakta ve bu durum membran geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Ali et al., 2016). Titanyum nanopartiküllerin antibakteriyal etkileri her iki bakteri türü içinde yaklaşık 7mm zon çapı ile benzer sonuçlar göstermiştir. Hücre

dışı titanyum nanopartiküllerinin Gram (+) üzerinde antibakteriyal etkisi daha yüksek aktivite göstermiştir. Genel olarak bakıldığında gümüş ve titanyum nanopartikülleri hem pozitif hem de negatif bakteriler üzerinde benzer antibakteriyal özellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6 Sentezlenen gümüş ve titanyum metalik nanopartiküllere özgü antibakteriyal aktivite analizi

Metal	Yöntem	Gram(+)	Gram(-)
Ag	Hücre İçi	 R3:X R5:X	 R3:8mm R5:8.5mm
	Hücre Dışı	 R6:7mm R13:8,2mm	 R6:7mm R13:8,2mm
Ti	Hücre İçi	 R4:X R8:X	 R4:7mm R8:8mm
	Hücre Dışı	 R6:7mm R13:6,5mm	 R6:6,2mm R13:6,5mm

Tez kapsamında gerçekleştirilen ön optimizasyon çalışmasında nanoteknoloji alanında sıklıkla kullanılan gümüş ve titanyum metal çözeltileri ile kırmızı alg türü olan *Galdieria sulphuraria*'nın hücre içi ve hücre dışı metabolitleri aracılığı ile nanopartikül sentezleme potansiyelleri araştırılmıştır. Erlenlerde gerçekleştirilen optimizasyon işleminde metal konsantrasyonu ve farklı hacimsel orana sahip metal çözeltileri ile süpernatant/biyokütle parametre olarak belirlenmiştir. Design Expert programında belirlenen 13 farklı deney tasarımı sonucunda elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları sonuçları ile üretim genel olarak değerlendirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin boyut olarak

hücre içi ve hücre dışı denemeleri genel olarak titanyum partiküllerine göre daha yüksek ve çok yapılı bir dağılım eğrisi göstermiştir. Gümüş metalinin indirgenme reaksiyon sonucunda her iki deneme deseninde renk değişimi gözlemlenmiştir. UV-Vis spektrofotometrik analizlere bakıldığında maksimum yüzey plazmon bandı literatür ile kıyaslandığında daha düşük dalga boylarında ve değer aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyal ajan olarak birçok alanda kullanıldığını literatür araştırması sonucunda elde edilmiştir. Ancak antibakteriyal aktivite için yaptığımız disk difüzyon testi sonucunda gümüş partiküllerinin Gram (-) bakterisi olan *E. coli* üstünde etki göstermediği belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için +4°C muhafaza edilen nanopartiküller zamanla flok yapılar oluşturarak ortamda agregasyona neden olmuştur. Bu durum nanopartiküllerin stabilizasyonun işlemleri konusunda sorun yaşatmıştır. Titanyum metalinin indirgenme reaksiyon sonucunda her iki deneme deseninde belirgin renk değişimi gözlemlenmiştir. Titanyum nanopartiküllerin kendi içinde kıyaslandığında hücre dışı sentez yönteminde partikül boyutu olarak genel olarak 200 nm altında ve PDI değeri daha düşük olarak ölçülmüştür. Zeta sizer cihazı ile analiz sonucu homojen bir yapıya sahip ve düzgün dağılım eğrisi gösteren grafikler elde edilmiştir. Aynı zamanda UV-Vis spektrometresinde yaklaşık elde edilen 310 nm dalga boyunda yüzey plazmon bandı literatür ile benzer olarak elde edilmiştir. Bu analiz koşulları doğrultusunda titanyum nanopartikülüne ait uygun dalga boyunun elde edildiği anlaşılmaktadır (Maurya et al., 2019). Reaksiyon sonrasında buzdolabında bekletilen titanyum nanopartiküllerinin zamanla flok yapılar oluşturmadığı ve uzun süre boyunca bu stabilizasyonunu koruduğu gözlemlenmiştir. Hücre dışı titanyum nanopartikül sentezinin uygun yüzey plazmon bandı göstermesi, düşük partikül yarıçapı ve PDI değerine sahip olması, uzun süreli stabilizasyonu, ölçek büyütme işleminin kolaylığı ve hücre içi yöntemle göre ayırma saflaştırma prosesinin kolaylığından dolayı FBNP reaktör sisteminde kullanılmasına karar verilmiştir. Tezin bundan sonraki çalışmalarında titanyum metal çözeltisi ve indirgeyici ajanlar içeren süpernant kullanılmasına karar verilmiştir.

Zeta-Sizer cihazı ile ölçülen süpernanttan elde edilen hücre dışı ortalama partikül boyut verileri Design Expert programında kullanılan Merkezi Kompozit Tasarım kısmına girilmiştir. Program üzerinden en düşük harmonik partikül çapı seçilerek optimize edildiğinde titanyum: süpernant hacimsel oranı(v/v) 7,8 ve metal konsantrasyonu 3,4 mM olarak belirlenmiştir.

4.7 FBNP Reaktör Sistemi ile Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Optimizasyon Çalışması

Ön optimizasyon çalışmaları sonrası FBNP reaktör sisteminde süpernatant aracılığı ile hücre dışı sentezlenecek olan titanyum nanopartikülleri için yeniden optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu optimizasyon çalışmasında nanopartikül sentezlenmesinde etkili olan pH, karıştırma hızı(rpm) ve inkübasyon süresi(dk) gibi üç farklı parametrenin etkisi incelenmiştir. Optimize edilmesi istenilen üç parametre Design Expert programında Yüzey Yanıt Yöntemlerinden (Response Surface Methodolgy) biri olan Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design) deneme deseni kullanılmıştır. Deneme deseninde pH (3-10), karıştırma hızı (200-400rpm) ve inkübasyon süresi (5-90dk) aralığında belirlenmiştir. Belirlenen parametrelerin minimum ve maksimum değer aralıkları doğrultusunda 20 run'lık bir deneme deseni oluşturulmuştur.



Şekil 4.10 FBNP reaktör sistemi ile sentezlenen titanyum nanopartikül inkübasyon görüntüsü

FBNP reaktör sisteminde titanyum dioksit metal çözeltisi ile peristaltik pompa yardımı ile reaktör içerisine saniyede bir damla olacak şekilde süpernatant eklenmiştir. Reaksiyon sırasında ortam rengi yavaş yavaş değişim göstermiştir ve reaksiyon sonunda hafif kırık beyaz bir renge dönüşmüştür (Şekil 4.10). İnkübasyon sonunda gözlemlenen bu renk değişimleri genellikle daha bazik ortamlarda gözlemlenmiştir. Çünkü *Galdieria. sulphuraria*'nın besin ortamı içeriğinin asidik olmasından dolayı metal iyonları ile bazik ortamda indirgenme reaksiyonu gerçekleştirmesi daha kolay bir şekilde olmaktadır. Optimizasyon denemelerinde pH değeri 3 olan 19 numaralı desende inkübasyon sırasında ortam rengi bulanıklaşmaya ve flok yapılar oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.11). İnkübasyon sonrasında beyazımsı partikül içeren örneklerin boyut analizi yapıldığında 1000 nm'nin üzerinde ölçüm sonuçları elde edilmiştir. Tüm deneme desenlerinin inkübasyon sonunda +4°C'de muhafaza edilmiştir. Buzdolabında

bekletilen diğer örneklerde daha sonrasında herhangi bir flok yapı oluşumu gözlemlenmemiş ve agregasyon sorunu yaşanmamıştır. Bu durum nanopartiküllerin ilerleyen zamanlarda karakterizasyon analizlerinde kullanılabilirliğini ifade etmektedir.



Şekil 4.11 FBNP reaktör sistemi ile asidik ortamda sentezlenen titanyum nanopartikül inkübasyon görüntüsü

4.8 FBNP Reaktör Sistemi ile Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Karakterizasyonu

FBNP reaktör sisteminde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında nanopartiküllerin üretim sonunda Zeta-Sizer cihazı ile ortalama partikül çaplarının analizleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.7’de görüldüğü gibi farklı zamanlarda sentezi gerçekleştirilen titanyum naopartiküllerin ortalama boyut ölçümleri verilmiştir.

Tablo 4.7 FBNP reaktör sistemi ile sentezlenen titanyum metaliklerine ait ortalama partikül yarıçapları

Deneme	Karıştırma Hızı (rpm)	İnkübasyon süresi (dk)	pH	Partikül yarıçapı
1	285	47	6,5	150,4
2	217	73	8,5	128,9
3	217	22	8,5	127,8
4	400	47	6,5	130,2
5	353	73	8,5	121
6	285	47	6,5	139,2

Tablo 4.7 devam

7	285	47	10	107,1
8	285	5	6.5	137,3
9	285	47	6.5	153,9
10	285	47	4,4	133,9
11	217	22	4,4	145,1
12	217	73	4,4	140,4
13	353	73	4,4	134,4
14	353	22	8,5	116,6
15	353	22	6,5	127,3
16	285	47	6,5	138,1
17	285	47	6,5	154,4
18	170	47	6,5	129,7
19	285	47	3	1601
20	285	90	6,5	122,7

Denemelerde nanopartiküllerin ortalama harmonik çapları incelendiğinde genel olarak birbirine çok yakın ölçülmüştür. 19. deneme deseni haricinde partikül boyutları genel olarak 150 nm ve altı olarak hesaplanmıştır. En düşük partikül boyutu pH'ı 10, karıştırma hızı 285 rpm ve inkübasyon süresi 47 dk olan 7 numaralı deneme deseni göstermiştir. Benzer ortam koşullarına sahip deneme desenlerinde partikül boyutları 138,1, 150,4, 133,9 ve 139,2 nm olarak ölçülmüştür. Böylelikle birbirine benzer koşullarda üretilen nanopartiküllerin her biri için ayrı bir standardizasyon gerekmektedir. Bazı örneklerin Zeta-Sizer analiz sonuçları Şekil 4.12'de gösterilmiştir. 5 numaralı deneme deseni ise PDI değeri 0,263 ve çan eğrisi olarak düzgün bir yapı görüntülenmiştir. Bu desende iyi bir sonuç alındığı için partiküllerin homojen bir yapı gösterdiği doğrulanmıştır. 7 numaralı deneme deseni PDI değeri 0.305 olarak ölçülmesine rağmen sonuç kalitesi olarak iyi yanıt alınamamıştır. Program üzerinden bu hatanın çok yapıları bir dağılıma sahip olduğu bildirilmiştir. Son olarak ortam pH'ı en düşük olan 19 numaralı desende titanyum nanopartikül sentezi sırasında flok yapıların oluştuğu ve bundan dolayı reaktör içerisinde agregasyona gözlemlenmişti. Bu partiküllerin ortalama çapı 1601 nm ve PDI değeri 0.987 olarak ölçülmüştür. Desen grafiği incelendiğinde çoklu ve yapısal olarak düzgün olmayan eğri çanları görülmüştür. Bu desende homojen olmayan ve mikron boyutlarında partiküller olduğu belirlenmiştir. 8 ve 9 numaralı deneme desenlerine bakıldığında inkübasyon sırasında pH 6.5 ve karıştırma hızı 285 rpm olarak benzerlik gösterirken

inkübasyon süresi olarak iki farklı değer gerçekleştirilmiştir. 8 numaralı denemede 5 dakika sentez yapılırken 9 numaralı denemede 47 dk sentez yapılmıştır. Partikül boyutları kıyaslandığında çok büyük fark olmamasına rağmen 8 numaralı denemede daha düşük ortalama partikül çapı ve homojen dağılım elde edilmiştir. Aynı zamanda inkübasyon süresinin daha kısa olmasından dolayı maliyet ve zaman açısından avantaj sağlamaktadır.

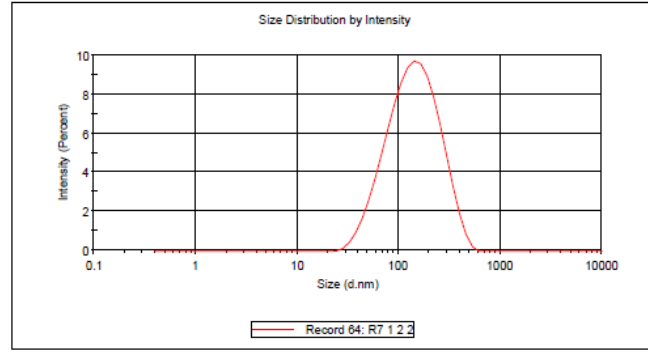
Design Expert programı çıktıkları olarak girilen nanopartikül boyutları sonucunda tüm desen optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda minimum partikül çapı değeri veren ortam koşulları belirlenmiştir.

a)

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 107,1	Peak 1: 158,9	100,0	88,59
Pdl: 0,305	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,939	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

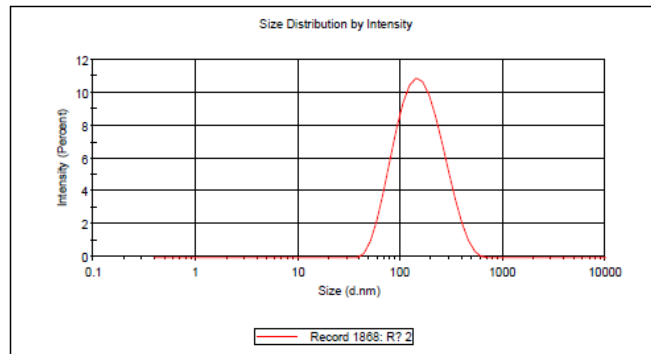


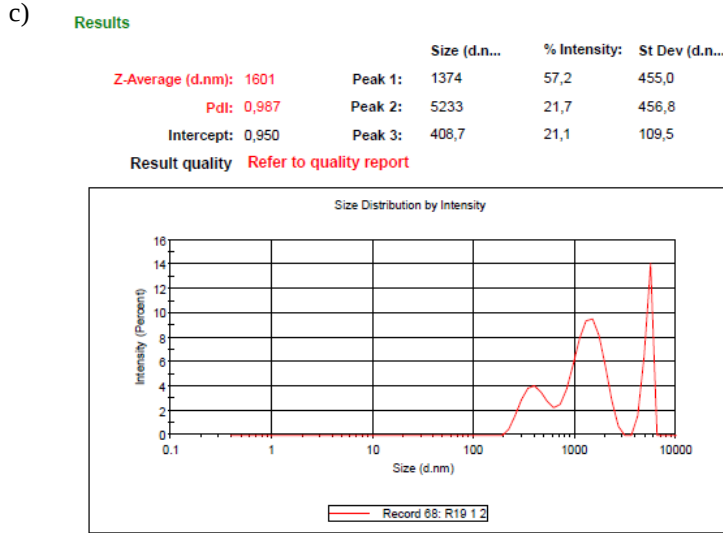
b)

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 121,0	Peak 1: 169,8	100,0	87,89
Pdl: 0,263	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,941	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good





Şekil 4.12 FBNP reaktörde sentezlenen 5(a), 7(b) ve 19(c) numaralı desenlerin ortalama titanyum partikül çapı

Tablo 4.8’de FBNP reaktöründe sentezlenen titanyum nanopartiküllerinin optimizasyonu için oluşturulan modelin istatistiksel analizi ANOVA ile yapılmıştır. Modelin F değeri 1,57 olarak analiz edilmiştir ve p değerine bakıldığında modelin anlamlı olmadığı belirtilmiştir ($p < 0.05$). ANOVA testine göre sadece farklı pH değişkeni ile gerçekleştirilen denemelerin interaksyonu anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Deneme deseni sonucunda nanopartiküllerin harmonik ortalama çaplarının birbirine çok yakın olmasından dolayı inkübasyon süresi ve karıştırma hızının sentez aşamasında sistem üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı anlaşılmıştır.

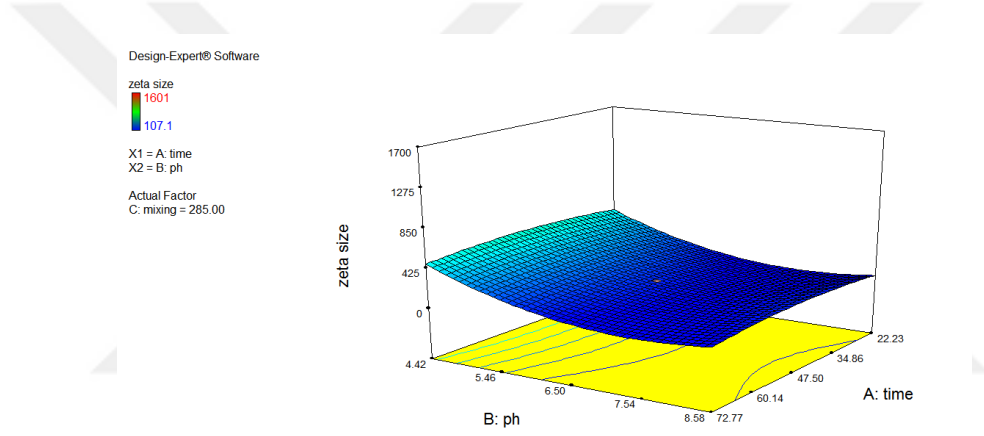
Tablo 4.8 Design Expert programı ile oluşturulan deneme deseninin ANOVA sonuçları

Kaynak	SS	DF	MS	F-value	p-value	
Model	1.198E+006	9	1.331E+005	1.57	0.2472	not significant
A-zaman	20.31	1	20.31	2.388E-004	0.9880	
B-pH	4.739E+005	1	4.739E+005	5.57	0.0399	
C-rpm	129.53	1	129.53	1.523E-003	0.9696	
AB	41.86	1	41.86	4.923E-004	0.9827	
AC	28.5	1	39.5	3.352E-004	0.9858	
BC	85.15	1	85.15	1.001E-003	0.9754	
A²	50305.98	1	50305.98	0.59	0.4596	
B²	5.588E+005	1	5.588E+005	6.57	0.0282	
C²	50336.09	1	50336.09	0.59	0.4594	
Residual	8.503E+005	10	85030.07			

Tablo 4.8 (devam)

Lack of Fit	8.499E+005	5	1.700E+005	2118.46	< 0.0001	Significant
Pure Error	401.19	5	80.24			
Cor Total	2.048E+006	19				
Std. Dev.	291.60	R-Squared	0.5849			
Mean	206.97	Adj R-Squared	0.2113			
C.V. %	140.89	Pred R-Squared	-2.1474			
PRESS	6.447E+006	Ad. Pre.	5.056			

CCD model ile oluşturulan optimizasyon çalışmasının 3 boyutlu görüntüsü Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 FBNP reaktör sisteminin CCD model optimizasyon çalışmasının üç boyutlu görüntüsü

Design Expert programı ile gerçekleştirilen CCD model üstünden kriter kısmına minimum ortalama partikül çapı ve flok yapı oluşumunu azaltacak maksimum pH değeri girilerek deneme deseni optimize edilmiştir. Bu koşullar altında optimize değer Tablo 4.9'da belirtilmiştir.

Tablo 4.9 CCD model ile gerçekleştirilen optimizasyon işlemi veri sonuçları

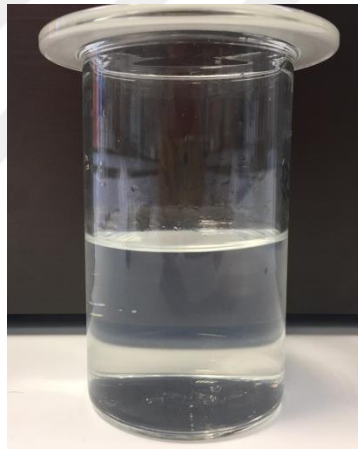
Faktör	İsim	Miktar	Düşük M.	Yüksek M.	Std. Dev.	Kodlama
A	Zaman	22.23	22.33	72.77	0.000	Gerçek
B	pH	8.58	4.42	8.58	0.000	Gerçek
C	rpm	283.88	216.62	353.38	0.000	Gerçek

Tablo 4.8 (devam)

Yanıt	Tahmini	SE Mean	%95Cl düşük	%95Cl yüksek	SE Pred	%95Cl düşük	%95 Cl yüksek
Boyut (nm)	108.282	175.75	-283.30	499.87	340.47	-650.32	866.88

4.9 Optimize Edilerek Sentezlenen Titanyum Nanopartikül Karakterizasyonu

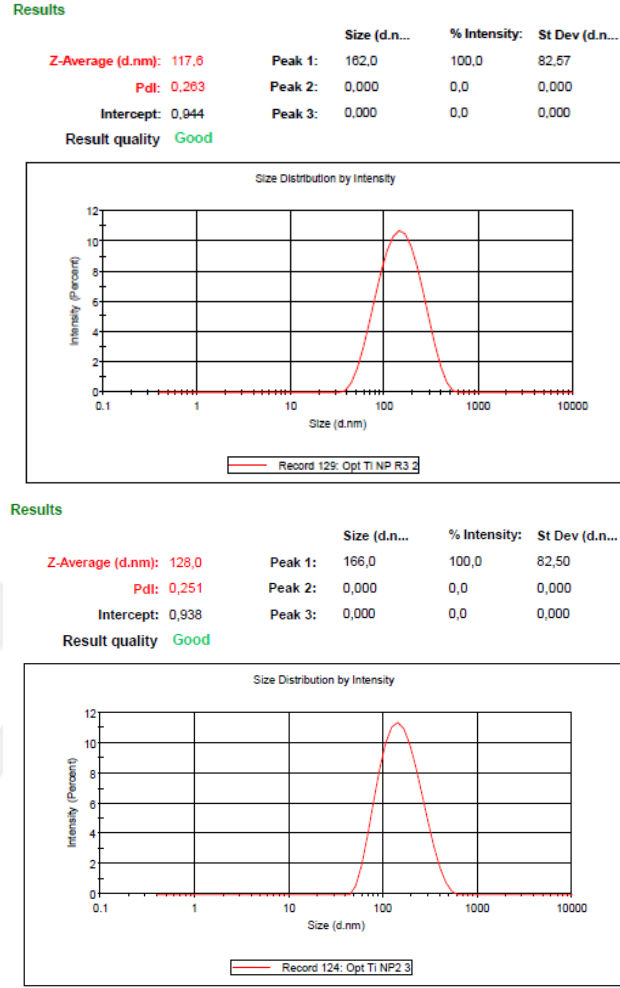
FBNP reaktör sisteminde optimize değer aralığının validasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü üzere inkübasyon sonrasında ortam renginin kırık beyaza dönüşerek bulanıklaşmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bu renk dönüşümü literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Böylelikle hücre dışı metabolitler ile metal iyonlarının indirgenme reaksiyonu gerçekleştiği konusunda hemfikir olunmuştur.



Şekil 4.14 Optimize edilen FBNP reaktörde sentezlenen titanyum nanopartikülünün görüntüsü

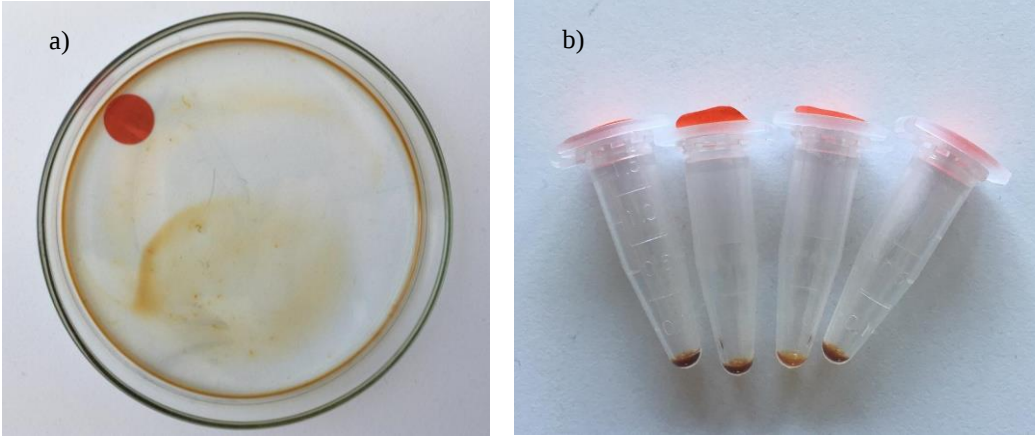
Zeta-Sizer cihazı ile optimize koşullarda sentezlenen partikül ortalama çapları yaklaşık olarak 115-130 nm aralığında hesaplanmıştır (Şekil 4.15). Bu analiz sonucu Design Expert'da verilen tahmini değer aralığı ile benzerlik göstermektedir. Böylelikle optimum ortam koşulunun validasyon işlemi gerçekleşmiştir. Sentezlenen nanopartikül farklı reaktör kaplarında uygun koşullarda sentezlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda aynı koşullarda gerçekleştirilen nanopartikül sentezi ile standart bir üretim metodu kabul edilmiştir. Şekil 4.15 incelendiğinde partiküllerin PDI değerleri yaklaşık 0,26 olarak ölçülmüş ve grafik düzgün bir dağılım göstermiştir. Böylelikle nanopartiküllerin tek yapılı ve homojen bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir.

Nanopartiküller bu optimum koşullar altında her üretim sonunda boyut açısından benzerlik göstermiştir.



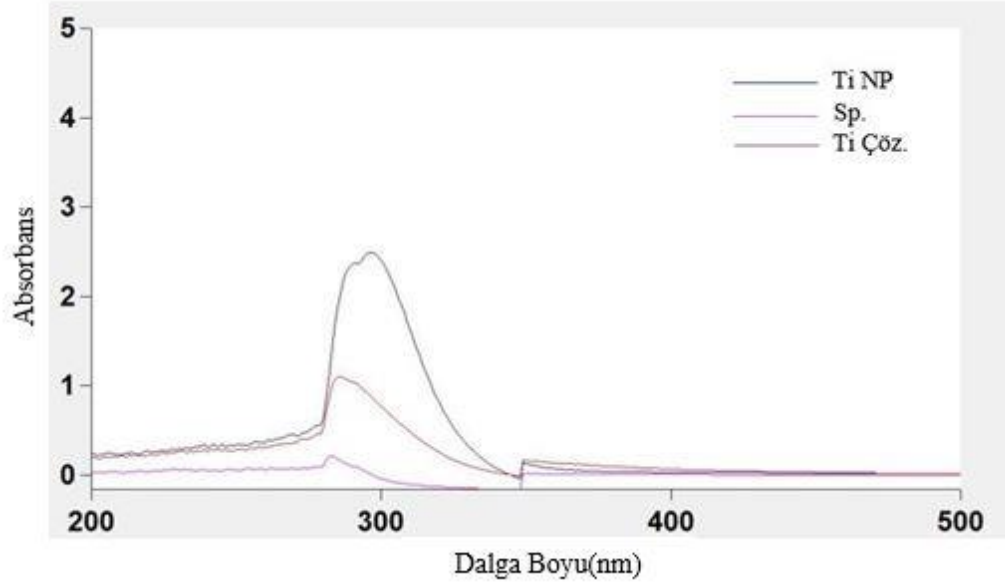
Şekil 4.15 Optimize edilen ve farklı zamanlarda FBNP reaktörde sentezlenen ortalama titanyum partikül çapı

Optimize edilen titanyum nanopartikülleri daha sonra yapılması planlanan karakterizasyon işlemleri için yapılan araştırmalar sonucunda 60°C’de etüv içerisinde cam petrilere ve ependorflarda kurutulmuştur (Bavanilatha et al., 2019) (Şekil 4.16). Kurutulan nanopartiküller karakterizasyon işlemleri öncesinde distile su ile istenilen konsantrasyonda süspanse edilerek kullanılmıştır.



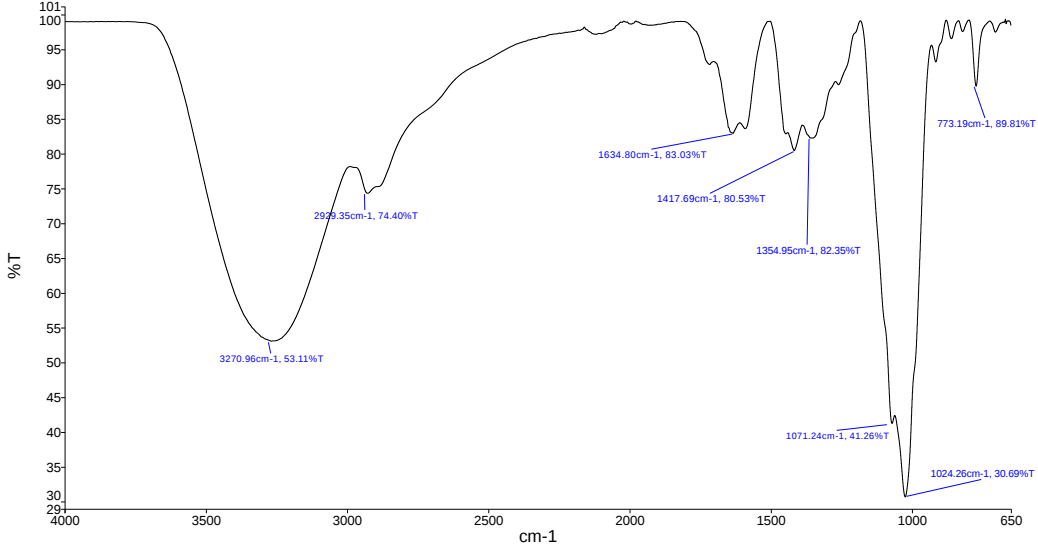
Şekil 4.16 Etüvde cam petri(a) ve ependorflarda(b) kurutulan titanyum nanopartikül görüntüsü

Etüvde kurutulmuş olan titanyum nanopartiküller yapı olarak içerisindeki yoğun şeker konsantrasyonundan dolayı yapışkan ve viskoz toz formunu almıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu öncesinde kurutulan partiküller distile su ile süspanse edilerek işlemler gerçekleştirilmiştir. UV-Vis spektrofotometre cihazı ile partiküllerin yüzey plasmon rezonans bandı 200-500 nm dalga boyu aralığında görüntülenmiştir. Nanopartikül yüzey plasmon rezonans bandının metal çözeltisi ve süpernatant ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Böylelikle ölçülen absorbans değerinin süpernatant veya titanyum metal çözeltisi kaynaklı herhangi bir girişimde olup olmadığı incelenmiştir. Şekil 4.17’de görüldüğü üzere her bir örnek için farklı absorbans değerine sahip ölçümler elde edilmiştir. İlk olarak mikroalgal süpernatant belirlenen dalga boyu aralığında çok düşük absorbans göstermiştir. Titanyum metal çözeltisi, 280 nm’de maksimum absorbans olarak değerine ulaşmıştır. Optimize edilen titanyum nanopartiküller ise 292 ve 300 nm dalga boyunda iki ayrı pik göstermiştir. Maksimum absorbans verdiği dalga boyu 305 nm olarak ölçülmüştür. Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde Rajkumari ve ark., 2019 yılında yaptıkları araştırma sonucunda titanyum dioksit nanopartiküllerin oluşumu gösteren dalga boyunun 217-350 nm arasında, Sankar ve ark., 270-320 nm aralığında pik gördüklerini, Roopan ve ark., 284 nm’de maksimum absorbans elde ettiklerini ve Umaker ve ark., 270-290 nm dalga boyu aralığında maksimum yüzey absorbansı görüldüğünü belirtmişlerdir (Rajkumari et al., 2019; Roopan et al., 2012; Sankar et al., 2015; Umaker et al., 2020).



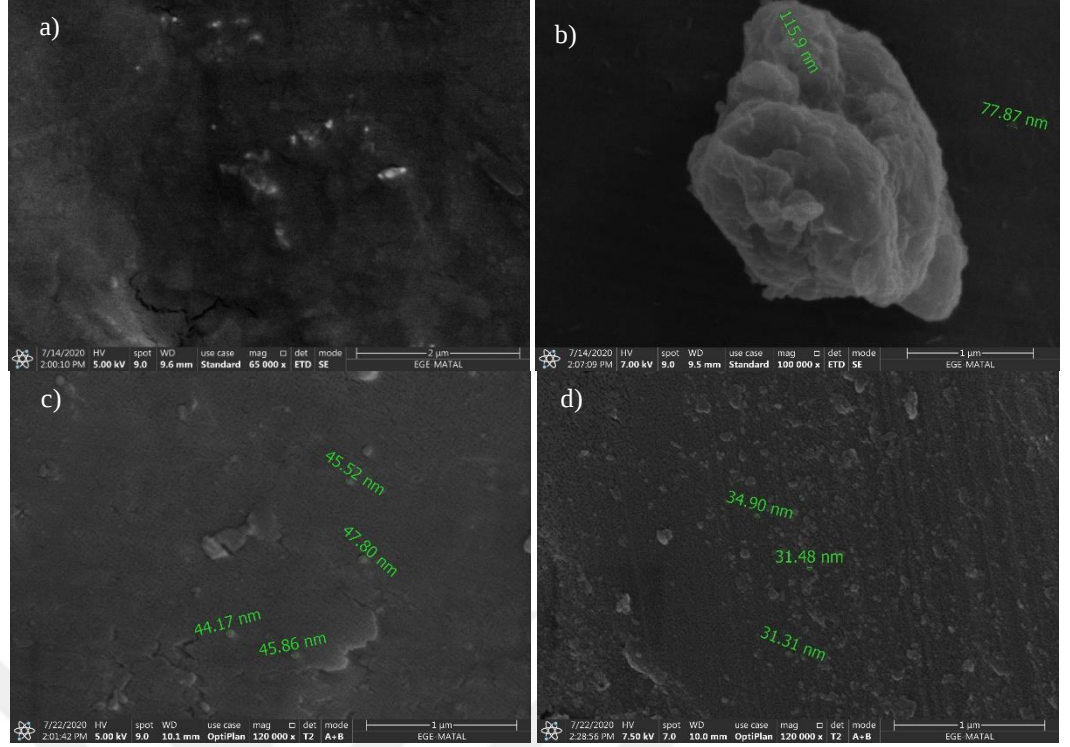
Şekil 4.17 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin UV-Vis Spektrofotometre Ölçümü

Kuru haldeki titanyum nanopartiküllerin FTIR analizi Şekil 4.18’de verilmiştir. FTIR cihazı ile $650-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında taraması yapılmıştır. Grafikler incelediğinde belirgin pikler 3270 , 2929 , 1634 , 1417 , 1354 , 1071 , 1024 ve 773 cm^{-1} bant aralıklarında görülmüştür. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda 2925 cm^{-1} bandı O-H bağları, 2914 cm^{-1} bandı C-H bağı, 1387 cm^{-1} bandı C-H alkil grubu ve 1047 cm^{-1} bandı C=C bağına sahip tipik aromatik bandı gerinmelerinden dolayı oluşmaktadır (Thakur et al., 2019; Srinivasan et al., 2019; Rao et al., 2019). Abisharani ve ark., 2019 yılında *Cucurbita Pepo* tohum metabolitlerinden sentezlediği titanyum dioksit nanopartiküllerinin FTIR analizi incelendiğinde $500-700\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen bantların Ti-O ve Ti-O-Ti bağlarına ve 652 cm^{-1} ait pikin sentezlenen partiküllere ait olduğunu bildirmiştir (Abisharani et al., 2019). Yapılan çalışmalar sonrası optimize edilen titanyum nanopartiküllerine ait grafiğik incelendiğinde $650-1000\text{ cm}^{-1}$ bant aralıklarında görülen belirgin üç düşük piklerin metal oksijen titreşim gerinmelerinden dolayı Ti-O-Ti bağlarına ait olduğu söylenebilir.



Şekil 4.18 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin FTIR Görüntülemesi

Şekil 4.19 incelendiğinde optimum koşullarda sentezlenen titanyum nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerini içermektedir. Titanyum nanopartiküllerin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile 65000x ve 100000x büyütme aralığında görüntülenmiştir. Görüntülere bakıldığında TiNP'lerin morfolojileri küresel ve oval olarak belirlenmiştir. Partiküllerin boyutları incelendiğinde 70- 120 nm aralığında dağılım göstermektedir. Elde edilen bu veriler, zeta sizer cihazında analiz edilen ortalama partikül çapı ile kıyaslandığında benzer boyutlara sahip partiküller elde edildiğini göstermiştir. Görüntülerde aynı zamanda partiküller belirli bölgelerde dağılım göstermiş olsa da floklaşmadan dolayı agregatlar halinde yapılar gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19 Optimize edilen titanyum nanopartiküllerinin SEM Görüntüsü a) 65000 x büyütme b) 100000x büyütme c) 120000x büyütme ve d) 120000x büyütme

4.10 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Analizi

Bu analiz optimize edilen titanyum nanopartiküllerin antibakteriyal duyarlılık testi olan mikro dilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu mikro plakalarda gerçekleştirilmiştir. Titanyum nanopartiküllerin stok konsantrasyonu 10 mg/ml olarak belirlenmiştir. Her kuyucuk üzerine bakteri süspansiyonu ve besin ortamı ilave edildikten sonra toplam hacim 200 µl olmuştur. Böylelikle ilk kuyucukta 20 µl olarak eklenen nanopartiküllerin son konsantrasyonu 10 kat seyrelerek 1 mg/ml'ye düşmüştür. Aynı durum pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin için geçerli olup son konsantrasyonu 1 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Analiz sırasında test mikroorganizmaları olarak kullanılan *S. aureus* ve *E. coli* cam tüplerde bir gece boyunca 37°C'de aktivasyonu sağlanmıştır. Aktive olmuş mikroorganizmalarının kültür bulanıklığı 0.5 McFarland standartına ile karşılaştırılması Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20 MIC deneyinde aktive edilen test mikroorganizmaları ve 0.5 MacFarland standartı görüntüsü

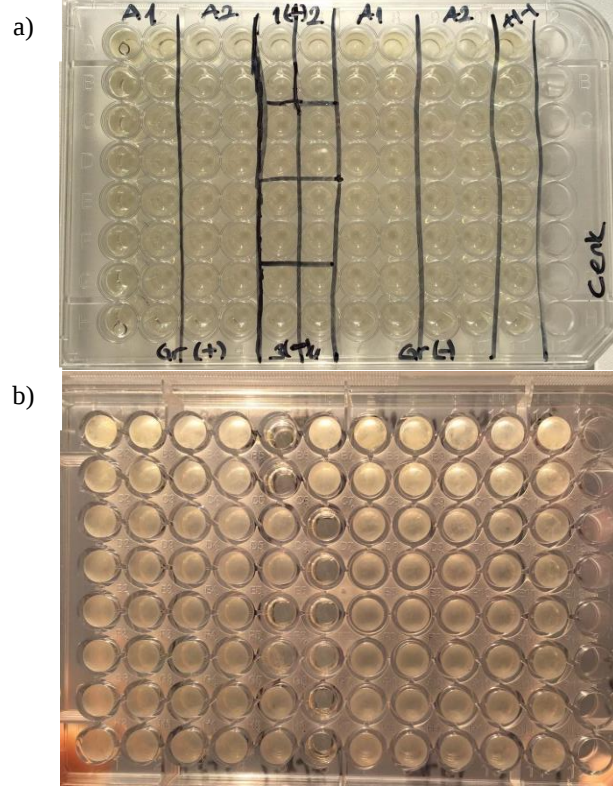
Kuyucuklardaki titanyum nanopartikül ve gentamisin antibiyotiğinin son durumdaki konsantrasyonları Tablo 4.10’da gösterilmektedir.

Tablo 4.10 Kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki (200 µl) konsantrasyonları

	<i>S. aureus</i> Ti NP		Kontrol Grupları üst (+) / alt (-)		<i>E. coli</i> Ti NP	
1	1mg/mL	1mg/mL	Sadece B. O	B. O+M.O	1mg/mL	1mg/mL
2	500µg/mL	500µg/mL	Sadece B. O	B. O+M.O	500µg/mL	500µg/mL
3	250µg/mL	250µg/mL	B. O+Sp+ M.O	Antibiyotik+ M.O	250µg/mL	250µg/mL
4	125µg/mL	125µg/mL	B. O+Sp+ M.O	Antibiyotik+ M.O	125µg/mL	125µg/mL
5	62,5µg/mL	62,5µg/mL	Sadece B. O	B. O+M.O	62,5µg/mL	62,5µg/mL
6	31,25µg/mL	31,25µg/mL	Sadece B. O	B. O+M.O	31,25µg/mL	31,25µg/mL
7	15,625µg/mL	15,625µg/mL	B. O+Sp+ M.O	Antibiyotik+ M.O	15,625µg/mL	15,625µg/mL
8	7,81255µg/mL	7,81255µg/mL	B. O+Sp+ M.O	Antibiyotik+ M.O	7,81255µg/mL	7,81255µg/mL

MİK tayini için bakteri ekimi yapılan mikropalakalar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikropalakanın görüntüsü Şekil 4.21’de verilmiştir. *S. aureus*’un inokule edildiği nanopartikül içeren kuyucukların hepsinde üreme gözlemlenmiştir. Titanyum nanopartikülü 1000-7,8125 µg/ml

konsantrasyon aralığında *S. aureus*'a karşı etkili olmamıştır. Sadece besin ortamı (B.O) içeren kuyucuklarda üreme gerçekleşmemesi ortam ile alakalı herhangi bir kontaminasyon olmadığı göstermektedir. Antibiyotik ile gerçekleştirilen tüm kuyucuklarda bulanıklık gözlemlenmesi yine herhangi bir kontaminasyon olmadığını desteklemektedir. Sadece besin ortamı ve mikroorganizma içeren alt kuyucuklara bakteri ekimi unutulduğu için bulanıklık gözlemlenmemiştir. *E. coli*'nin inokule edildiği nanopartikül içeren kuyucukların tümünde benzer şekilde bulanıklık gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak titanyum nanopartiküllerinin *E. coli* ve *S. aureus* için MİK ve MBK değeri $>1\text{mg/ml}$ olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bu deneme sonunda üretilen nanopartiküllerin antibakteriyal etkisi gözlemlenmemiştir. Thakur ve ark., 2019 yılında bitki ekstraktları ile sentezledikleri TiO_2 NP 'nin *E. coli* için $10.42\text{ }\mu\text{g/ml}$ ve *S. aureus* $20.83\text{ }\mu\text{g/ml}$ analizi sonucunda MIC değeri elde etmiştir. Diğer bir çalışma olan Hassan ve ark., 2019 yılındaki bir çalışmada iki farklı bitki ekstraktları aracılığıyla sentezledikleri TiO_2 NP antibakteriyal etkilerini incelediklerinde 12.5 ve $6.25\text{ }\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda hem *E. coli* hem de *S. aureus* için herhangi bir antibakteriyal etki gözlemlenmemiştir (Thakur et al., 2019; Hassan et al., 2019).

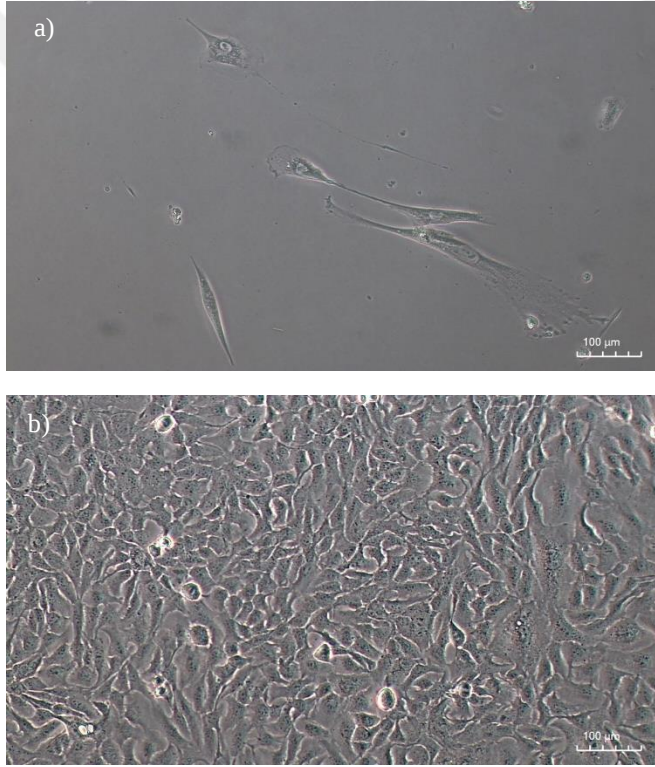


Şekil 4.21 MIC tayini inkübasyon öncesi(a) ve sonrası(b) mikrolakaların görüntüleri

4.11 Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları

4.11.1 Hücre kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında *HaCaT* ve *Detroit 551* hücre hatlarının stokları oluşturulmuş ve iki günde bir olacak şekilde gerekli bakımları yapılmıştır. Şekil 4.22’de ilgili hücrelerin mikroskopik görüntüleri verilmiştir ve ATCC ile kıyaslandığında morfolojik olarak benzer hücresel yapılar sahip olduğu, hücrelerin herhangi bir konraminasyon kaynağından arı gayet sağlıklı bir şekilde üredikleri görülmüştür. *HaCaT* hücrelerinin ikilenme süresi, *Detroit 551* hücrelerine göre daha hızlı gerçekleştiği için iki günden daha kısa bir sürede pasajlanarak kültür ortamları değiştirilmiştir.



Şekil 4.22 a) *Detroit 551* hücrelerinin, b) *HaCaT* hücrelerinin 10X büyütmedeki ters faz ışık mikroskop görüntüleri (bar çizgisi 100 µm)

4.11.2 MTT testine dayalı sitotoksite denemeleri

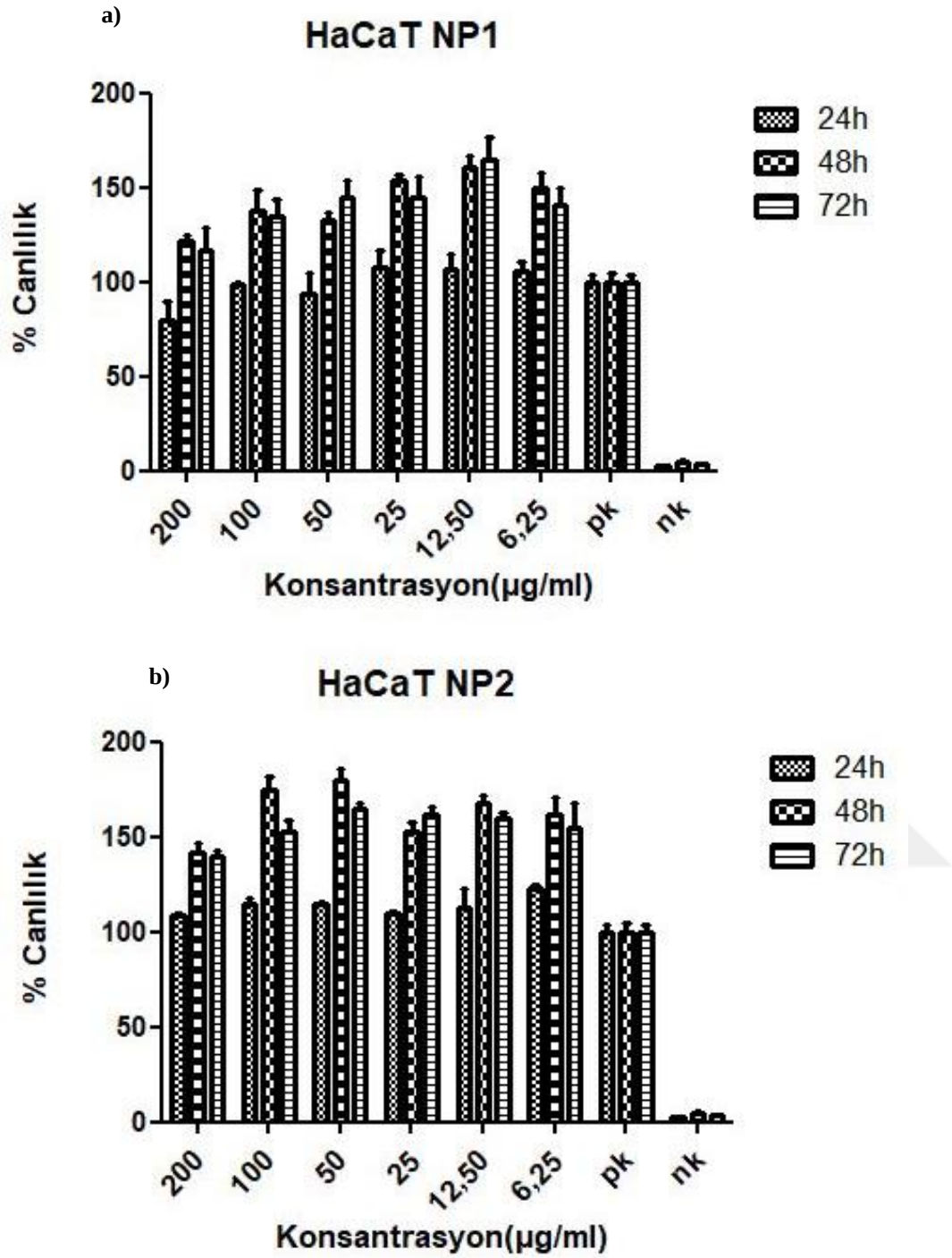
Optimum koşullarda sentezlenen titanyum dioksit nanopartiküllerinin MTT analizi, üretim sonunda 10000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatant kısmın (NP1) 60°C’de kurutularak ve numunenin 60 °C’de direk

kurutma sonrası (NP2) elde edilen kuru örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. MTT analizinin genel görüntüsü Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

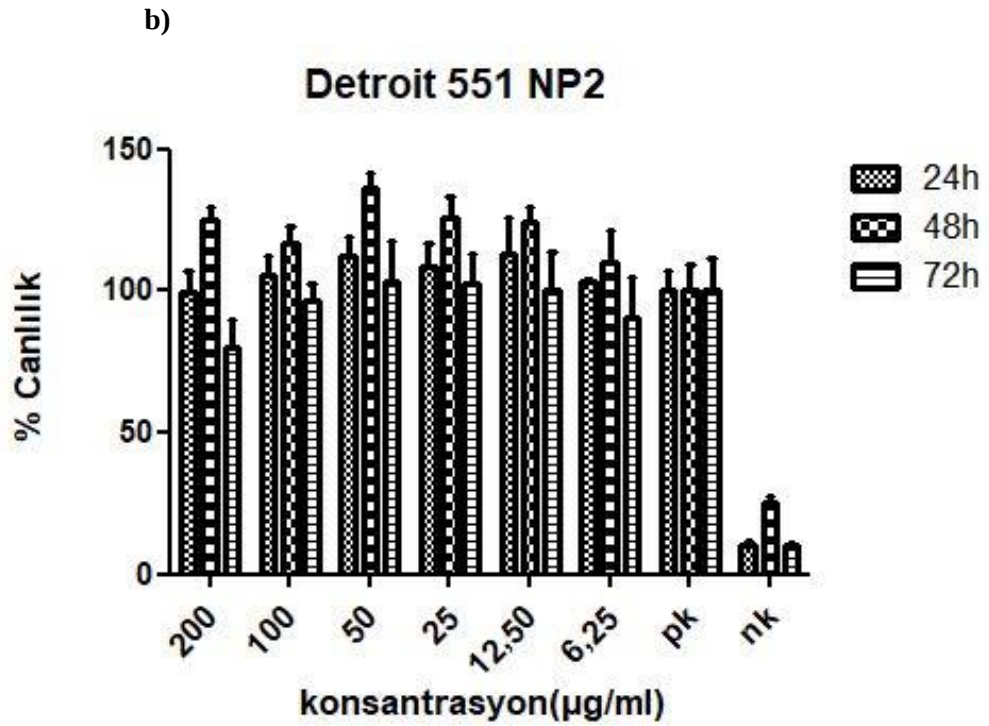
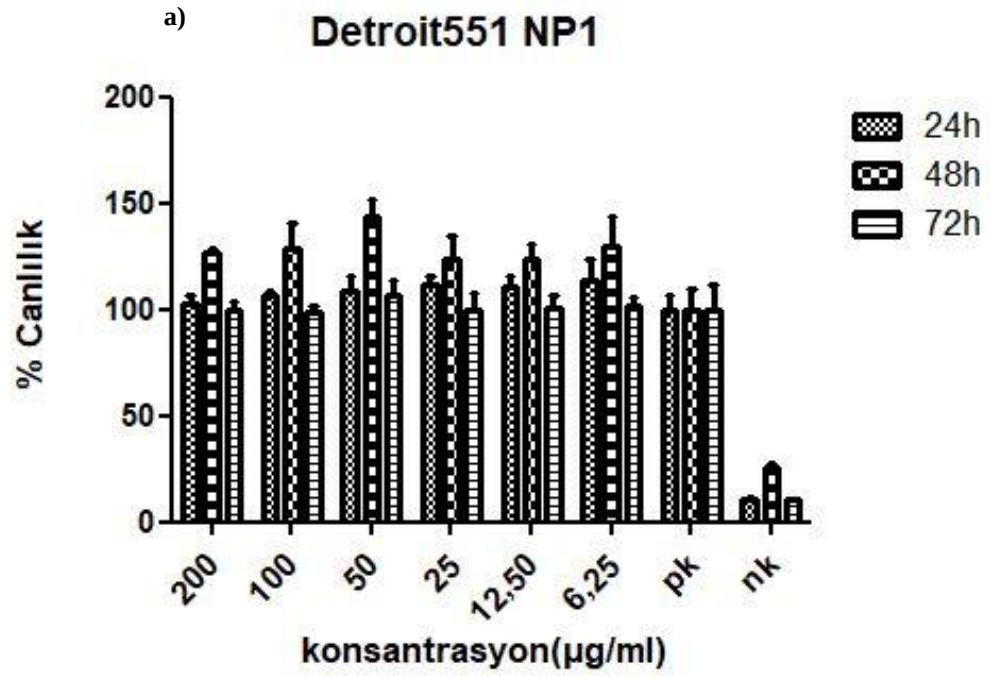
Tablo 4.11 MTT analizi sırasında kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki konsantrasyonları

<i>HaCaT</i>		<i>Detroit 551</i>	
NP-1 (3 tekrarlı)	NP-2 (3 tekrarlı)	NP-1 (3 tekrarlı)	NP-2 (3 tekrarlı)
200µg/ml	200µg/ml	200µg/ml	200µg/ml
100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml
50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml
25µg/ml	25µg/ml	25µg/ml	25µg/ml
12,5µg/ml	12,5µg/ml	12,5µg/ml	12,5µg/ml
6,25µg/ml	6,25µg/ml	6,25µg/ml	6,25µg/ml
Pozitif/ Negatif Kontrol	Pozitif/ Negatif Kontrol	Pozitif/ Negatif Kontrol	Pozitif/ Negatif Kontrol
Kör	Kör	Kör	Kör

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi adına bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. saatlerde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda, spektrofotometrede okunan absorbans değerleri ile pozitif kontrol grubuna bağlı hesaplanan % canlılık ve standart sapma değerleri ile, Graphad Prism 7.0 programında konsantrasyon aralıklarına karşı % canlılık grafikleri oluşturulmuştur. *HaCaT* hücrelerinden elde edilen veriler Şekil 4.23’te, *Detroit 551* hücrelerinden elde edilen veriler ise Şekil 4.24’te gösterilmiştir.



Şekil 4.23 a) Direk kurutma ve b) Santrifüj sonrası supernatant kurutma sonrası nanopartiküllerinin *HaCaT* hücreleri üzerinden denenen 24, 48 ve 72. Saatlerdeki MTT testi sonucu hazırlanan % canlılık grafikleri



Şekil 4.24 a) Direk kurutma ve b) Santrifüj sonrası supernatant kurutma sonrası nanopartiküllerinin *Detroit 551* hücreleri üzerinden denenen 24, 48 ve 72. Saatlerdeki MTT testi sonucu hazırlanan % canlılık grafikleri

Şekil 4.23.a incelendiğinde santrifüj sonrası süpernatant kısmı kurutulan nanopartiküllerin (NP1) 24. saatteki tüm konsantrasyonlarının *HaCaT* hücrelerinde %70 canlılık üzerinde seyrettiği için herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir. Bu duruma rağmen 50 µg/mL ve altındaki seyreltik konsantrasyonlarının sitotoksik etki göstermediği, %100 canlılık ve üzerinde seyrettiği için de hücre proliferasyonu açısından biyoaktif özellikte olabileceği belirlenmiştir.

Şekil 4.23.b incelendiğinde direk kurutma sonrasında elde edilen nanopartiküllerin (NP2) tüm konsantrasyonlarının *HaCaT* hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72. saatte %100 ve canlılık üzerinde seyrettiği gözlemlenmiştir. Böylelikle tüm konsantrasyonların sitotoksik etkisinin olmadığı ve biyoaktif özellikte olabileceği saptanmıştır.

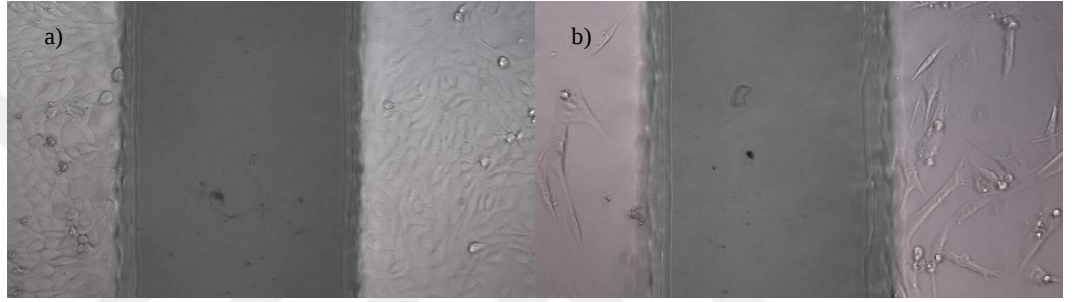
Şekil 4.24.a incelendiğinde direk kurutma sonrasında elde edilen nanopartiküllerin tüm konsantrasyonlarının *Detroit 551* hücreleri üzerinde %100 ve üzeri canlılık gösterdiği ve hücre proliferasyonu arttığı için biyoaktif özeliğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Aynı zamanda *HaCaT* hücrelerine uygulanan NP1'nin 50µg/mL konsantrasyonu, 48. saatte en yüksek % hücre canlılığını göstermiştir.

Şekil 4.24.b incelendiğinde ise santrifüj sonrası süpernatant kısmı kurutulan nanopartiküllerin 200 µg/mL konsantrasyonunun 72. saatte *Detroit 551* hücrelerinde az da olsa sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Daha seyreltik konsantrasyonlar incelendiğinde hiçbir zaman diliminde sitotoksik etkinin ve %100 canlılık ve üzerinde seyrettiği için de biyoaktif özellikte olabileceği saptanmıştır.

Tüm MTT sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde NP1 ve NP2'nin *Detroit 551* ve *HaCaT* hücreleri üzerinde benzer sonuçlar göstererek toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Tüm koşullar incelendiğinde hücre proliferasyonunu artıcı etki gösteren en yüksek % canlılık oranı 50 µg/mL konsantrasyonu göstermiştir. Üretim sonunda direk kurutularak ve santrifüjlenerek elde edilen süpernatant kısmın kurutulması ile elde edilen nanopartiküller, birbirine yakın % canlılık göstermiş olmasına rağmen hücre proliferasyonu artıcı etki direk kurutma ile daha yüksek oranlarda gözlemlenmiştir.

4.11.3 Yara iyileşmesine modeline bağlı biyoaktivite testi sonuçları

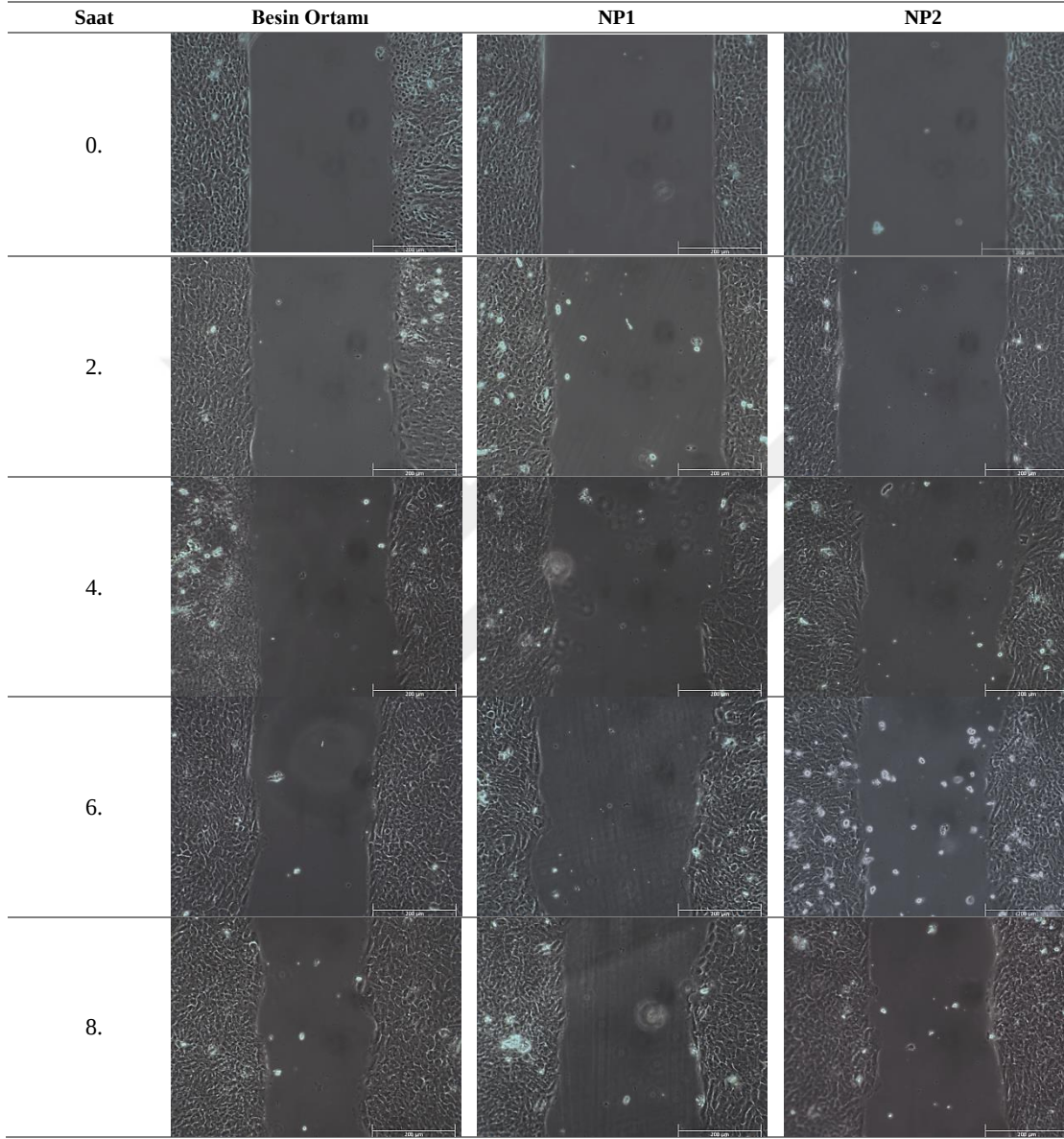
Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı şekilde *HaCaT* ve *Detroit 551* hücrelerinde gerçekleştirilen yara modelinde, hücre migrasyonunu ve yara iyileşmesini arttırmak amacıyla MTT analizi ile elde edilen veriler ışığında proliferasyon arttırıcı biyoaktif özelliği belirlenen titanyum dioksit nanopartiküllerinin en yüksek etki gösterdiği 50 µg/ml konsantrasyonu her iki hücreye uygulanmıştır. Yara modeli için kullanılan silikon kuyucuklardaki hücrelerin görüntüleri Şekil 4.25'te verilmiştir. *Detroit 551* hücrelerinin ikilenme süresi, *HaCaT* hücrelerine göre daha yavaş gerçekleştiği için yara iyileşmesi modelinde yüzeyi tamamen kaplaması için geçen süre daha uzun sürmüştür.



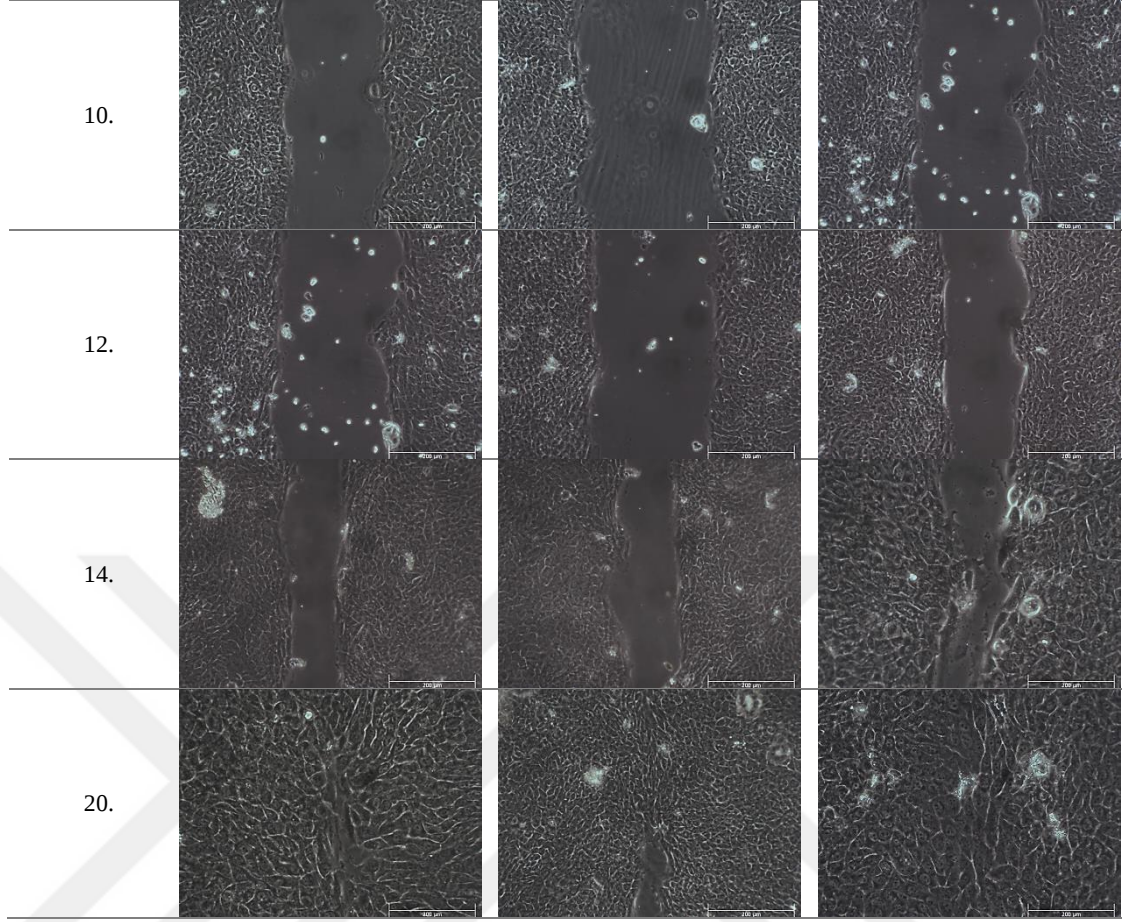
Şekil 4.25 a) *HaCaT* hücrelerinin, b) *Detroit 551* hücrelerinin yara modeli kuyucuklardaki 10X büyütmedeki ters faz ışık mikroskopisi görüntüleri

Tablo 4.12 incelendiğinde *HaCaT* hücrelerinde oluşturulan yara modelinin besin ortamı kontrolündeki NP1 ve NP2 örneklerinin uygulamasında tahminen 16 ve 18. saatte kuyucuğun tamamen kapandığı, 20. Saatte tamamen sıkı bir hücre yoğunluğuna ulaşıldığı saptanmıştır. 10. saat görüntüleri incelendiğinde ise NP2 etken maddesi uygulanan grupta hücre migrasyonunun daha fazla olduğu ve ilerleyen saatlerde kapanan yaradaki hücre sıklığının da daha fazla olduğu gözlenmiştir. NP1 etken maddesi ise hücre migrasyonu 12. saat sonunda artış göstermiştir. Her iki yara iyileşmesi testi sonuçları beraber incelendiğinde ise kontrol grubuna kıyasla NP2 etken maddesinin daha yüksek biyoaktif özellikte olduğu ve bölüm 4.11.2'de gösterilen MTT testi sonuçlarını desteklediği saptanmıştır.

Tablo 4.12 *HaCaT* hücrelerinin yara modeli sonrası besin kontrolünde santrifüj sonrası süpernant (NP1)ve direk kurutma (NP2) sonrası elde edilen nanopartiküllerin uygulanma sonucu belli aralıklarla, 20x büyütmedeki ters faz ışık mikroskopi görüntüleri(bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)

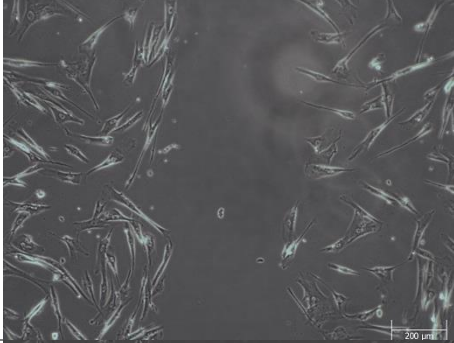
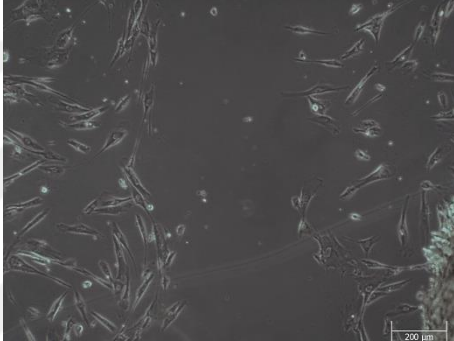
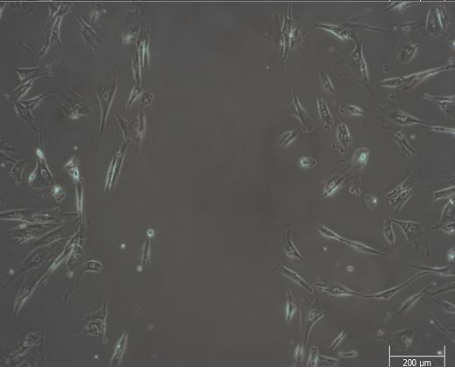
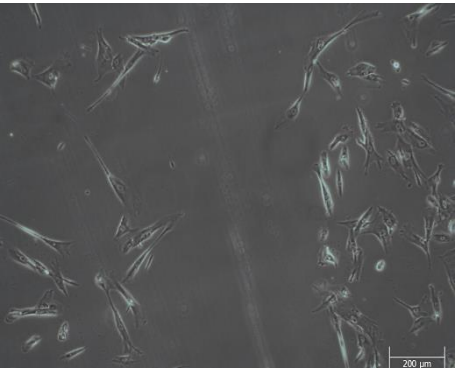
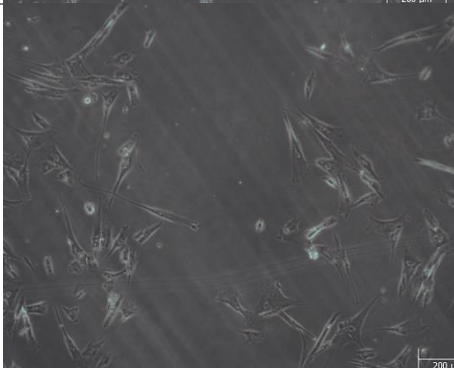


Tablo 4.12 (devam)

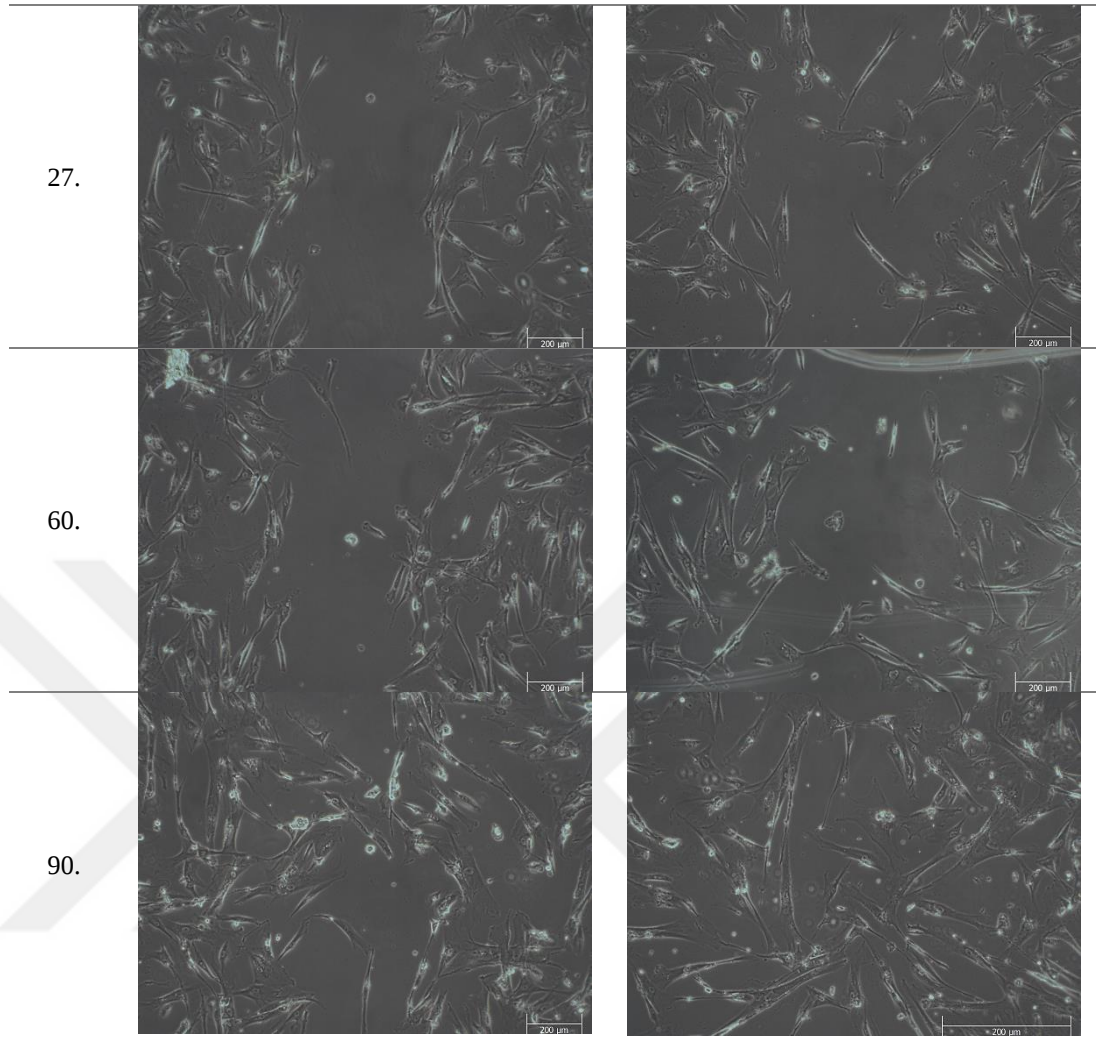


Detroit 551 hücre hattının daha yavaş ikilenme süresi göstermesinden dolayı hem MTT analizi hem de *HaCaT* hücreleri ile gerçekleştirilen yara modeli sonucunda hücre proliferasyonu artırıcı etki gösteren NP2 örneğinin yara iyileştirme modelinde denenmesine karar verilmiştir. Tablo 4.13 incelendiğinde *Detroit 551* hücrelerinde oluşturulan yara modelinin besin ortamı kontrolündeki NP2 örneklerinin uygulamasında tahminen 80. saat civarlarında kuyucuğun tamamen kapandığı, 90. Saatte tamamen yoğun bir hücre yoğunluğuna ulaşıldığı saptanmıştır. 27. saat görüntüleri incelendiğinde ise NP2 etken maddesi uygulanan grupta hücre migrasyonunun daha fazla olduğu ve ilerleyen saatlerde kapanan yaradaki hücre sıklığının da daha fazla olduğu gözlenmiştir. Her iki yara iyileşmesi testi sonuçları beraber incelendiğinde ise kontrol grubuna kıyasla NP2 etken maddesinin daha yüksek biyoaktif özellikte olduğu ve bölüm 4.11.2’de gösterilen MTT testi sonuçlarını desteklediği saptanmıştır.

Tablo 4.13 *Detroit 551* hücrelerinin yara modeli sonrası besin kontrolünde direk kurutma (NP2) sonrası elde edilen nanopartiküllerin uygulanma sonucu belli aralıklarla, 10x büyütmedeki ters faz ışık mikroskopi görüntüleri(bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)

Saat	Besin Ortamı	NP2
0.		
6.		
9.		
18.		

Tablo 4.13 devam



4.11.4 FITC-TiO₂ nanopartiküllerin hücresel alımı

Hücresel alım analizinde kullanılan 12-gözlü pleyte ekimi gerçekleştirilen farklı konsantrasyonlardaki FITC-TiO₂ nanopartiküllerinin genel görüntüsü Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14 Hücresel alım analizi sırasında kuyucuklardaki nanopartiküllerin son durumdaki konsantrasyonları

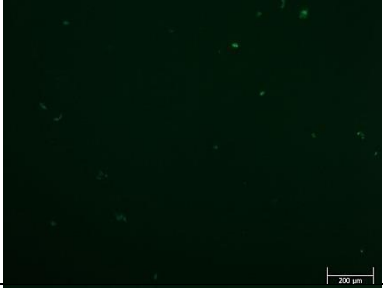
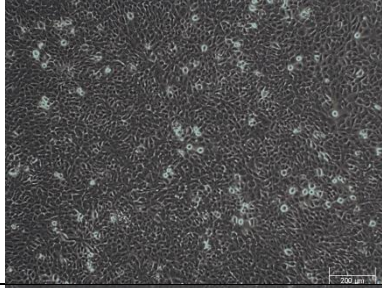
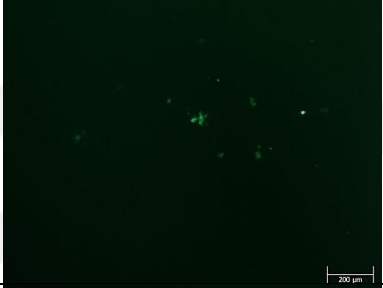
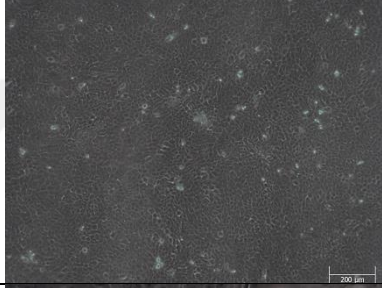
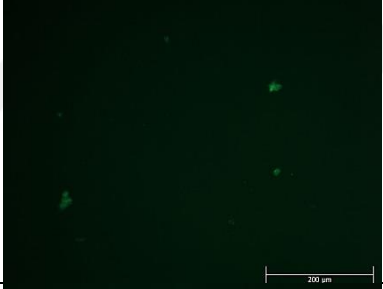
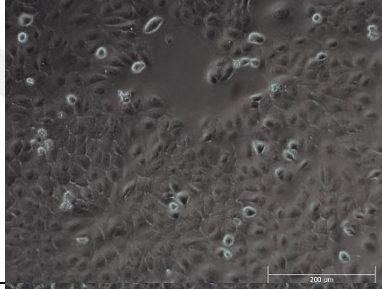
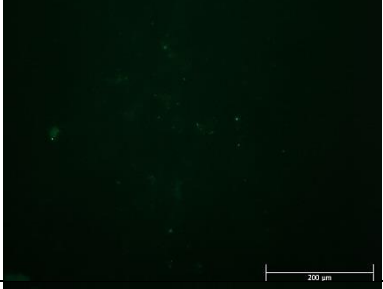
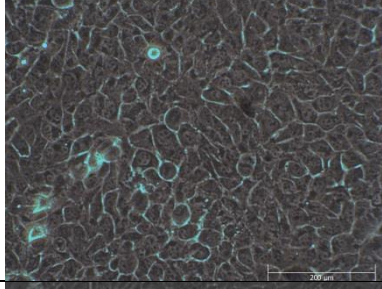
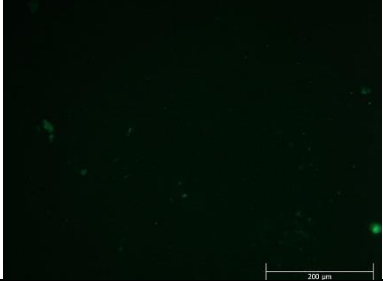
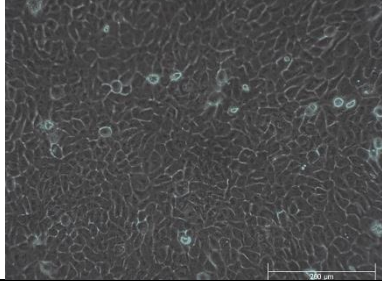
NP1		NP2	
25µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
100 µg/ml	Kontrol	100 µg/ml	Kontrol

Nanopartiküller sahip oldukları küçük boyutları sayesinde hücre membranlarından kolay bir şekilde geçmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin, hayvan hücrelerinde nasıl ve ne kadar sürede hücre içine alındığı konusunda gerçekleştirilen çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir (Jochums et al., 2017).

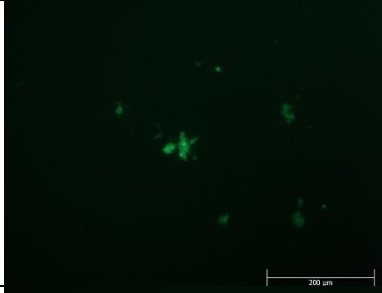
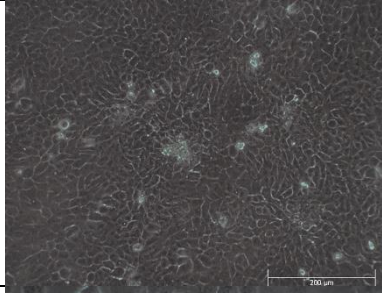
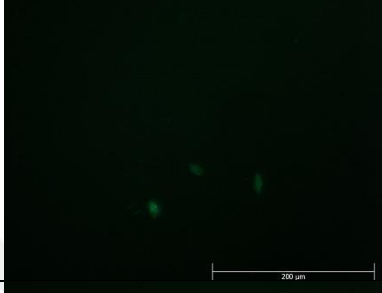
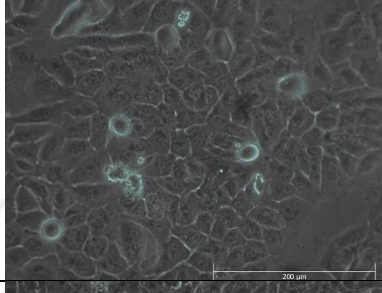
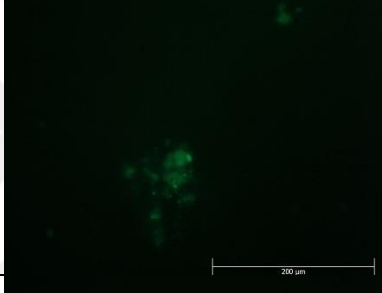
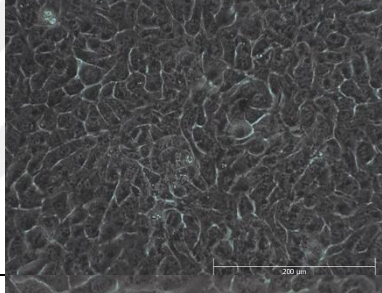
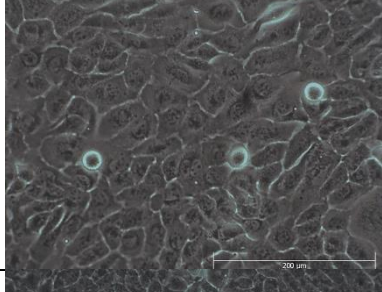
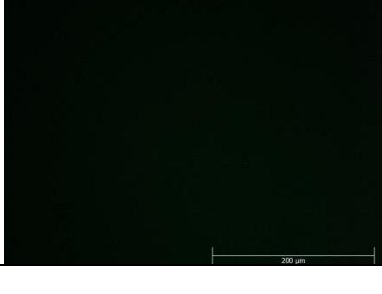
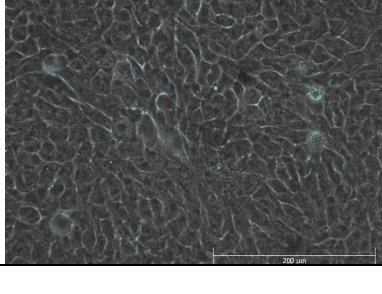
Bu tez çalışmasında floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen NP1 ve NP2 titanyum dioksit nanopartiküllerinin floresan mikroskobu altında incelenen görüntüleri Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da belirtilmiştir. FITC'ın, TiO_2 nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olması ile işaretleme işlemi gerçekleştirilmiştir. FITC- TiO_2 nanopartikülleri, floresan mikroskobu altında yeşil renkte ışıma göstererek belirlenmiştir. TiO_2 nanopartiküllerinin yüzeyine bağlanamayan FITC molekülleri daha karanlık ve koyu yeşil renkte ışıma göstermiştir. Bu analiz sırasında hücreler 24. ve 48. saatte görüntüleri alınmıştır. Hücreler 24. saatte daha az ve parlak olmayan ışıma göstermişlerdir. Genel olarak tüm konsantrasyonlarda 48. saatte hücresel alım daha fazla gerçekleştiği gözlemlenmiştir. 50 ve 100 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında TiO_2 belirli bölgelerde floklaşmadan dolayı agregatlar halinde yapılar gözlemlenmiştir. Farklı mikroskopik büyütme oranlarında incelenen nanopartiküllerin, floresan ve ters ışık faz mikroskobu görüntüleri karşılaştırıldığında hücre içine ve hücre membranında adsorbe olduğu gözlemlenmiştir. Masoudi ve ark., 2018 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada titanyum dioksit nanopartiküllerinin kanser hücreleri denemeleri sonucunda hücre içi 24. saatte hızlı bir şekilde alındığı ve daha önceki saatlerde iyi bir ışıma görülmediğini belirtmiştir (Masoudi et al., 2018). Bir diğer çalışmada Horie ve ark., 2016 yılında TEM mikroskobu ile *HaCaT* hücrelerine uyguladığı farklı TiO_2 nanopartiküllerinin hücresel alımının gerçekleştiğini ve agregatlar halinde sitozol içerisinde yer aldığını görüntüleyerek belirtmişlerdir (Horie et al., 2016).

Bu sonuçlar doğrultusunda TiO_2 nanoparçacıklarının *HaCaT* hücreleri tarafından kolayca hücre içine alındığı ve zamana bağlı olarak alımın daha çok arttığını belirtilmiştir.

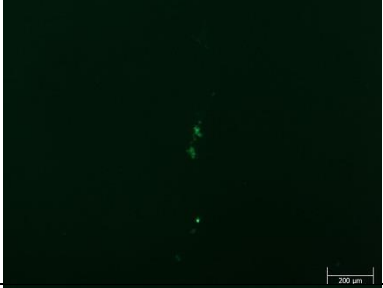
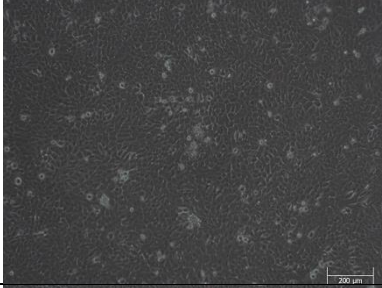
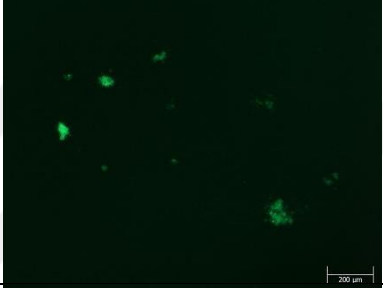
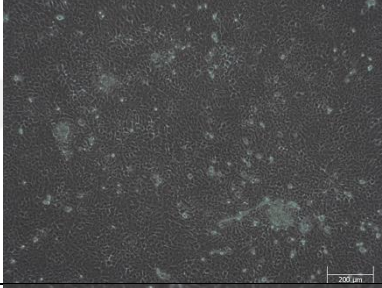
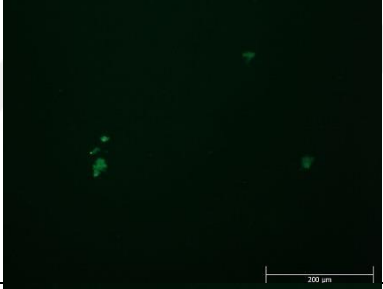
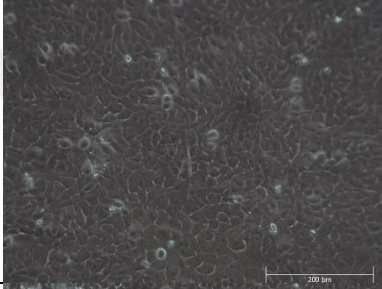
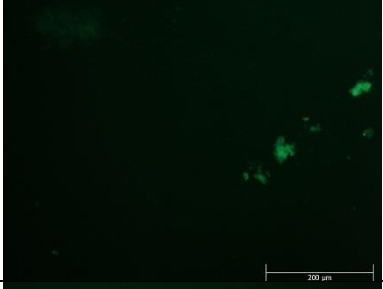
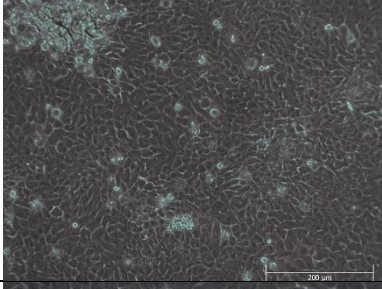
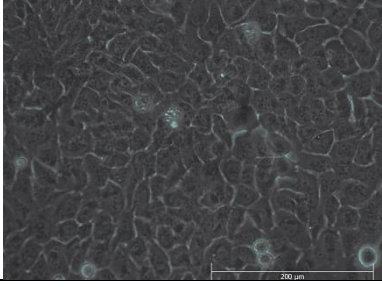
Tablo 4.15 Santrifüj sonrası süpernatantın kurutularak elde edilen farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin(NP1) hücresel alım sonucu elde edilen farklı büyütmelerdeki floresan mikroskobu görüntüleri (bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)

NP Kons.	Büyütme/Süre	Floresan Mikroskobu	Işık Mikroskobu
25µg/ml NP1	10x/ 24h		
	10x/ 48h		
25µg/ml NP1	20x/ 24h		
	20x/ 48h		
50µg/ml NP1	20x/ 24h		

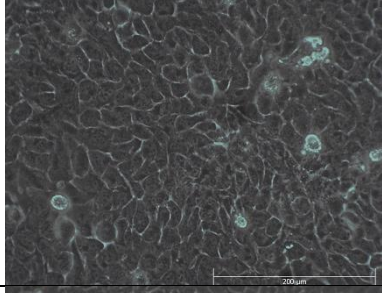
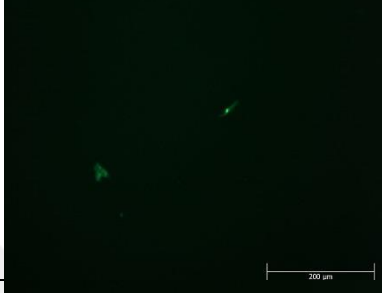
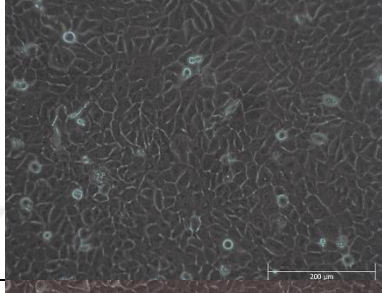
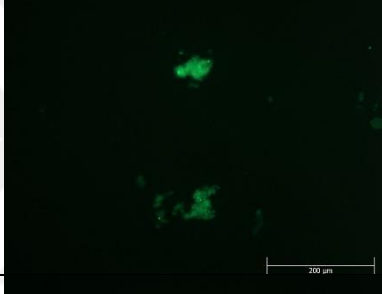
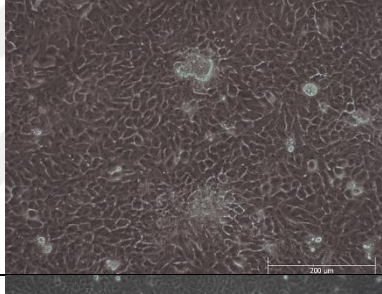
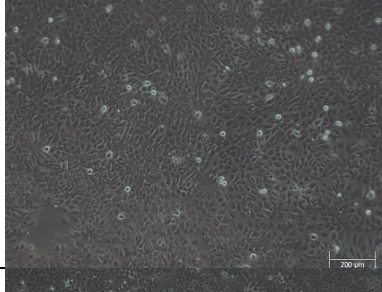
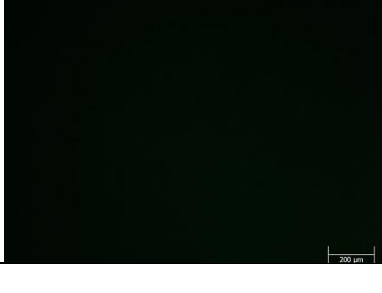
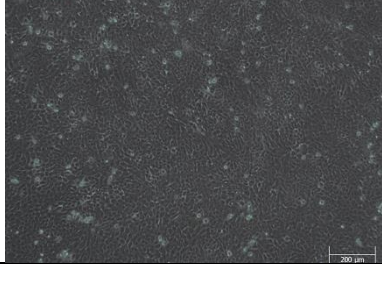
Tablo 4.15 devam

NP Kons.	Büyütme/Süre	Floresan Mikroskobu	Işık Mikroskobu
50µg/ml NP1	20x/ 48h		
100µg/ml NP1	40x/ 24h		
	40x/ 48h		
Kontrol	40x/ 24h		
	40x/ 48h		

Tablo 4.16 Direk kurutma sonrası elde edilen farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin(NP2) hücresel alım sonucu elde edilen farklı büyütme/ sürelerdeki floresan mikroskobu görüntüleri (bar çizgisi 200µm, Zeiss, AXIO, Vert. A1, Almanya)

NP Kons.	Büyütme/Süre	Floresan Mikroskobu	Işık Mikroskobu
25µg/ml NP2	10x/ 24h		
	10x/ 48h		
50µg/ml NP2	20x/ 24h		
	20x/ 48h		
50µg/ml NP2	40x/ 24h		

Tablo 4.16 devam

NP Kons.	Büyütme/Süre	Floresan Mikroskobu	Işık Mikroskobu
50µg/ml NP2	40x/ 48h		
100µg/ml NP2	20x/ 24h		
	20x/ 48h		
Kontrol	10x/ 24h		
	10x/ 48h		

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışması kapsamında, *Galdieria sulphuraria* mikroalgi kullanılarak nanoteknoloji çalışmalarından sıklıkla kullanılan metalik titanyum dioksit ve gümüş nanopartiküllerin yeşil sentez yöntemi gerçekleştirilmiştir.
- Mikroalglerin hücre içi ve hücre dışı sahip olduğu biyolojik olarak aktif metabolitlerinin, metal indirgeyici ajanlar ve stabil kalmasına yardımcı ajanlar olarak kullanılması nanopartikül sentezleme potansiyeli açısından incelenmesine ilham kaynağı olmuştur.
- Biyolojik nanopartikül sentezi ile ilgili literatür araştırması sonucunda optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmemiş olup genelde tek metal türü ve konsantrasyonu belirlenerek çalışmalar sonuçlandırılmıştır.
- Tezin ön optimizasyon çalışmasında öncelikle erlen boyutunda metal konsantrasyonu ve hacimce metal: süpernatant ve metal: biyokütle oranı ile nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Karakterizasyon analizleri doğrultusunda uygun koşullarda en düşük nanopartikül ortalama partikül çapı, titanyum: süpernatant hacimsel oranı(v/v) 7,8 ve titanyum (IV) bis(amonyum laktato) dihidroksit konsantrasyonu 3,4 mM olarak belirlenmiştir.
- Daha büyük hacimde ve kontrollü nanopartikül sentezlenmesi için FBNP reaktör sistemi kullanılmıştır ve partiküllerin morfolojik özelliklerini etkileyen karıştırma hızı, inkübasyon süresi ve ortam pH'ı parametreleri incelenmiştir.
- FBNP reaktör sisteminde 150 ml'lik çalışma hacminde gerçekleştirilen optimizasyon denemeleri doğrultusunda 8,5 pH değerinde 285 rpm karıştırma hızında ve 22 dakikalık inkübasyon süresinde sonunda ortalama 120 nm çapında küresel nanopartiküller üretilmiştir.
- Yapılan karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda uygun titanyum dioksit nanopartiküllerinin sentezinin gerçekleştirildiği doğrulanmıştır.
- Optimum üretim koşullarda sentezlenen titanyum dioksit nanopartiküllerinin kozmetik alanında kullanım potansiyelinin incelenmesi için hayvan hücre temelli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
- MTT analiz sonuçları değerlendirildiğinde *HaCaT* ve *Detroit 551* hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği ve hücre proliferasyonunu artırıcı biyoaktif etki gösterdiği belirlenmiştir.
- Bu sonuçlar doğrultusunda en yüksek proliferasyon etkiyi gösteren 50 µg/ml konsantrasyonundaki titanyum dioksit nanopartiküllerinin yara iyileşmesi modelinde hücre migrasyonu, gerçekleştirilen MTT analiz sonuçlarını desteklediği belirtilmiştir.

- Bu analizlere ek olarak *HaCaT* hücre hatları ile floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen nanopartiküllerinin hücre içerisine alımının gerçekleştiği floresan mikroskobu ile ispatlanmıştır.
- Bu tez sonuçları değerlendirildiğinde düşük pH ve yüksek inkübasyon sıcaklığında kültivasyonu gerçekleştirilen *Galdieria sulphuraria*'nın hücre içinde ve hücre dışında bulunan metabolitleri indirgen ajanlar olarak nanopartikül sentezinde yer almıştır.
- Hücre dışı titanyum dioksit nanopartikül sentezinin ölçek büyütme işleminin kolaylığı ve hücre içi yöntemle göre ayırma saflaştırma prosesinin kolaylığından dolayı üretim açısından önemli avantajlar sağlamaktadır.
- Hayvan hücre kültüründe deri hücre hatları ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda optimum koşullarda sentezlenen nanopartiküllerin hücre proliferasyonu artırıcı etki göstererek biyoaktif özelliği belirtilmiştir.
- Kimyasal ve fiziksel yöntemler ile üretilen titanyum dioksit nanopartikülleri yerine özellikle biyouyumlu ve çevre dostu olacak şekilde sentezlenen biyojenik nanopartiküllerin yapılan denemeler sonucunda kozmetik sektöründe kullanılma potansiyelinin tercih edilebilir olabileceği ispatlanmıştır.
- Nanopartiküllerin stabilizasyonu genellikle üretim sonrasında yaşanan problemlerden bir tanesidir. Bu sorunun çözümü olarak kaplayıcı bir ajan olarak kitosan kullanılarak bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilebilir.
- Aynı zamanda literatür doğrultusunda kül fırınında daha yüksek sıcaklarda kurutma işlemi gibi ayırma saflaştırma basamakları genişletilerek daha saf titanyum dioksit nanopartikülleri izole edilmesi ve uzun süreler muhafaza edilmesi sağlanabilir.
- Nanopartiküllerin sentezi sonucunda gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarına XPS, TEM, XRD, AFM gibi teknikler ile detaylandırılarak indirgenme reaksiyonlarının gerçekleştiğinin ispatı açısından daha sonraki çalışmalara eklenebilir.
- Kozmetik sektöründe titanyum dioksit nanopartikülleri aynı zamanda fotokatalitik özelliği ile zararlı UV ışınlarına karşı koruyucu etki gösterdiği için güneş koruyucu kremlerde kullanılmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda, deri hücre hatları üzerine uygun UV dalga boyunda ışınlar gönderilerek gerçekleştirebilecek bu denemeler ile UV koruyucu etkisinin olup olmadığı belirlenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abisharani, J., M., Devikala, S., Dinesh Kumar, R., Arthanareeswari, M. Kamaraj, P.,** 2019, Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using *Cucurbita pepo* seeds extract, Materials Today: Proceedings, 14, 302-307pp
- Ali Z., A., Yahya, R., Sekaran, S., D., Puteh, R.,** 2016, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Apple Extract and Its Antibacterial Properties, Advances in Materials Science and Engineering, 1, 1-16pp
- Alsamhary, K., I.,** 2020, Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their antibacterial activity, Saudi Journal of Biological Sciences,
- Alshora, D., H., Ibrahim, M., A., Alanazi, F., K.,** 2016, Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility, Surface Chemistry of Nanobiomaterials: Applications of Nanobiomaterials, 163-191pp
- Arabi, N., Kianvash, A., Hajalilou, A., Abozari-Lotf, E., Abbasi-Chianeh, V.,** 2020, A facile and green synthetic approach toward fabrication of Alcea- and Thyme-stabilized TiO₂ nanoparticles for photocatalytic applications, Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 2132-2141pp
- Arya, A., Mishra, V., 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
- Asghari, F., Jahanshiri, Z., Imani, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M.,** 2016, Antifungal nanomaterials: Synthesis, properties, and applications, Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials, 343-383pp
- Asnaashari, S., Delazar, A., Asgharian, P., Lotfipour, F., Moghaddam, S., B., Afshar, F., H.,** 2017, In vitro bioactivity and phytochemical screening of extracts from
- Avrupa Parlamentosu ve Konseyi,** 2013, “Ban on animal testing”
https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en, Erişim Tarihi: (9.7.2020)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Babu, M., M., G., Gunsekaran, P.,** 2009, Production and structural characterization of crystalline silver nanoparticles from *Bacillus cereus* isolate, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 74, 191-195pp
- Bai, R., G., Sabouni, R., Hussein, G.,** 2018, Green nanotechnology-A road map to safer nanomaterials, Applications of Nanomaterials: Advances and Key Technologies, 133-159pp
- Bakry, R., Vallant, R., M., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Szabo, Z., Huck, C., W., Bonn, G., K.,** 2007, Medicinal applications of fullerenes, International Journal of Nanomedicine, 2(4), 639-649pp
- Ball, A., S., Patil, S., Soni, S.,** 2019, Introduction into nanotechnology and microbiology, Methods in Microbiology, 46, 1-18pp
- Bavanilatha, M., Yoshitha, L., Nivedhitha, S., Sahithya, S.,** 2019, Bioactive studies of TiO₂ nanoparticles synthesized using *Glycyrrhiza glabra*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19, 101131pp
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F.,** 2020, The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine, Molecules, 25(1), 1-15pp
- Behravan, M., Panahi, A., H., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R., Mirzapour, A.,** 2019, Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity, International Journal of Biological Macromolecules, 124, 148-154pp
- Bhushan, B.,** 2010, Springer Handbook of Nanotechnology, Introduction of Nanotechnology, 1-13pp
- Brayner, R., Coradin, T., Beaunier, P., Grenèche, J., M., Djediat, C., Yéprémian, C., Couté, A., Fiévet, F.,** 2012, Intracellular biosynthesis of superparamagnetic 2-lines ferri-hydrate nanoparticles using *Euglena gracilis* microalgae, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 93, 20-23pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Calipinar, H., Ulas, D.,** 2019, Development of Nanotechnology in the World and Nanotechnology Standards in Turkey, *Procedia Computer Science*, 158, 1011-1018
- Cartaxo, A.,** 2018, Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area, *International Journal of Nanomedicine*, 1-8pp
- Castro, E., Garcia, A., H., Zavala, G., Echegoyen, L.,** 2017, Fullerenes in biology and medicine, *Journal of Materials Chemistry B*, 5(32), 6523-6535pp
- Cha, C., Shin, S., R., Annabi, N., Dokmeci, M., R., Khademhosseini, A.,** 2013, Carbon-based nanomaterials: Multifunctional materials for biomedical engineering,
- Chavali, M., S., Nikolova, M., P.,** 2019, Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology, *SN Applied Sciences*, 1(6), 1-30pp
- Chokkareddy, R., Redhi, G., G.,** 2018, Green synthesis of metal nanoparticles and its reaction mechanisms, *The Macabresque: Human Violation and Hate in Genocide, Mass Atrocity and Enemy-Making*, 113-139pp
- Chowdhury, S., Basu, A., Kundu, S.,** 2014, Green Synthesis of Protein Capped Silver Nanoparticles From Phytopathogenic Fungus *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid With Antimicrobial Properties Against Multidrug-Resistant Bacteria, *Nanoscale Res Lett.*, 6;9(1):365
- Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J., C., Al Khulaifi, M., M., AL-Shwaiman, H., A., Elgorban, A., M., Syed, A., Kim, H., J.,** 2020, Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), 706-712pp
- Dahoumane, S., A., Mechouet, M., Alvarez, F., J., Agathos, S., N., Jeffryes, C.,** 2016, Microalgae: An outstanding tool in nanotechnology, *Revista Bionatura*, 1(4), 196-201pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deljou, A., Goudarzi, S.,** 2016, Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using Thermophilic *Bacillus Sp. AZ1* and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria, Iranian Journal of Biotechnology, 14(2), 25-32pp
- Devatha, C., P., Thalla, A., K.,** 2018, Green Synthesis of Nanomaterials, Synthesis of Inorganic Nanomaterials, 169–184
- Dhand, C., Dwivedi, N., Loh, X., J., Jie Ying, A., N., Verma, N., K., Beuerman, R., W. Lakshminarayanan, R., Ramakrishna, S.,** 2015, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive overview, 5(127), 105003-105037pp
- Dowling, A., Clift, R., Grobert, N., Hutton, D., Oliver, R., O’neill, O., Pethica, J., Pidgeon, N., Porritt, J., Ryan, J.,** 2004, Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, London The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report, 46, 1-76pp
- Duan, H., Wang, D., Li, Y.,** 2015, Green chemistry for nanoparticle synthesis, Chemical Society Reviews, 44(16), 5778-5792pp
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,** 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356.
- Ealias, A., M., Saravanakumar, M., P.,** 2017, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 263, 3pp
- Elsharawy, K., Dobarra, M., A., El-Gammal, H., Hyder, A.,** 2020, Chitosan coating does not prevent the effect of the transfer of green silvernanoparticles biosynthesized by *Streptomyces malachitus* into fetuses via theplacenta, Reproductive Biology, 20, 97-105pp
- Fakruddin, M., Hossain, Z., Afroz, H.,** 2012, Prospects and applications of nanobiotechnology: A medical perspective, Journal of Nanobiotechnology, 10, 1-8pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fernandez-Garcia, M., Rodriguez, J.,** 2009, Metal Oxide Nanoparticles, Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 3-60pp
- Gatto, F., Bardi, G.,** 2016, Antifungal nanomaterials: Synthesis, properties, and applications, Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials, 343-383pp
- Gautam, P., K., Singh, A., Misra, K., Sahoo, A., K., Samanta, S., K.,** 2019, Synthesis and applications of biogenic nanomaterials in drinking and wastewater treatment, Journal of Environmental Management, 231, 734-748pp
- Govindaraju, K. Kiruthiga, V., Kumar, V., G., Singaravelu, G.,** 2009, Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum wightii* grevilli and their Antibacterial effects, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 9(9), 5497-5501pp
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M., A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., Pollio, A.,** 2013, Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*, Food and Function, 4(1), 144-152pp
- Guilger-Casagrande, M., Lima, R.,** 2019, Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 1-16pp
- Handoko, C., T., Huda, A., Bustan, M., D., Yudono, B., Gulo, F.,** 2017, Green Synthesis Of Silver Nanoparticle And Its Antibacterial Activity, Rasayan J. Chem., 10(4), 1137-1144pp
- Hasan, S.,** 2015, A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types, Research Journal of Recent Sciences, 4, 1-3pp
- Hassan, H., Omoniyi, K., Okibe, F., Nuhu, A., Echioba, E.,** 2019, Evaluation of Antibacterial Potential of Biosynthesized Plant Leave Extract Mediated Titanium Oxide Nanoparticles using Hypheae Thiebeace and Anannos Seneglensis, Journal Application Sci. Enviroment Manage, 23(10), 1795-1804pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hirooka, S., Miyagishima, S.,** 2016, Cultivation of acidophilic algae *Galdieria sulphuraria* and *pseudochlorella* sp. YKT1 in media derived from acidic hot springs, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-11pp
- Horie, M., Sugino, S., Kato, H., Tabei, Y., Nakamura, A., Yoshida, Y.,** 2016, Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photocytotoxicity? Cellular uptake of TiO₂ nanoparticles is important in their photocytotoxicity, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26:4, 284-294 pp
- Hulla, J., E., Sahu, S., C., Hayes, A., W.,** 2015, Nanotechnology: History and future, *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318-1321pp
- Jacob, J., M., Ravindran, R., Narayanan, M., Samuel, S., M., Pugazhendhi, A., Kumar, G.,** 2020, Microalgae: A prospective low cost green alternative for nanoparticle synthesis, *Current Opinion in Environmental Science and Health*
- Jamkhande, P., G., Ghule, N., W., Bamer, A., H., Kalaskar, M., G.,** 2019, Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174pp
- Jebril, S., Khanfir Ben Jenana, R., Dridi, C.,** 2020, Green synthesis of silver nanoparticles using *Melia azedarach* leaf extract and their antifungal activities: In vitro and in vivo, *Materials Chemistry and Physics*, 248, 122898pp
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y., S., Dufresne, A., Danquah, M., K.,** 2018, Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050-1074pp
- Jena, J., Pradhan, N., Prasad, B., Behari, L.,** 2013, Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Microalga *Chlorococcum Humicola*, *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(1), 1-8pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jewett, M., C., Patolsky, F.,** 2013, Nanobiotechnology: synthetic biology meets materials science, *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 551-554pp
- Jochums, A., Friehs, E., Sambale, F., Lavrentieva, A., Bahnemann, D., Scheper, T.,** 2017, Revelation of different nanoparticle-uptake behavior in two standard cell lines *NIH/3T3* and *A549* by flow cytometry and time-lapse imaging, *Toxics*, 5(3), 1-12pp
- Kalimuthu, K., Cha, B., S., Kim, S., Park, K., S.,** 2020, Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Microchemical Journal*, 152, 104296pp
- Kalpana, V., N., Devi Rajeswari, V.,** 2018, A Review on Green Synthesis, Biomedical Applications, and Toxicity Studies of ZnO NPs, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1, 3569758pp
- Kargozar, S., Mozafari, M.,** 2018, ScienceDirect Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big, *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15492-15500pp
- Keijok, W., J., Pereira, R., H., A., Alvarez, L., A., C., Prado, A., R., Silva, A., R., Ribeiro, J., Oliveira, J., P., Guimarães, M., C., C.,** 2019, Controlled biosynthesis of gold nanoparticles with *Coffea arabica* using factorial design, *Scientific Reports*, 9(1), 1-10pp
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I.,** 2019, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931pp
- Khandanlou, R., Murthy, V., Wang, H.,** 2020, Gold nanoparticle-assisted enhancement in bioactive properties of Australian native plant extracts, *Tasmanian lanceolata* and *Backhousia citriodora*, *Materials Science and Engineering C*, 112, 110922pp
- Khandel, P., Kumar Shahi, S.,** 2016, Microbes mediated synthesis of metal nanoparticles: current status and future prospects, *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1), 1-24pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khanna, P., Kaur, A., Goyal, D.,** 2019, Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications, *Journal of Microbiological Methods*, 163, 105656
- Khanna, P., Kaur, A., Goyal, D.,** 2019, Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications, *Journal of Microbiological Methods*, 163, 105656pp
- Kharissova, O., V., Kharisov, B., I., González, C., M., O., Méndez, Y., P., López, I.,** 2019, Greener synthesis of chemical compounds and materials, *Royal Society Open Science*, 6, 191378pp
- Köse, Ö., Erkekoğlu, P., Sabuncuoğlu, S., Koçer-Gümüşel, B.,** 2017, Kozmetik Ürünlerin Göz İritasyon Potansiyellerinin Değerlendirilmesinde Geleneksel ve Alternatif Yöntemler. *The Marmara Pharmaceutical Journal*, 21-2: 190-201.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V.,** 2017, Sustainable Delivery Systems Through Green Nanotechnology, *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*, 17-32pp
- Kumar, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., Kuila, A.,** 2018, Metallic Nanoparticle: A Review, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(2), 3765-3775
- Leon, L., Chung, E., L., Rinaldi, C.,** 2020, Chapter 1 - A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications, *Nanoparticles for Biomedical Applications*, 1-4pp
- Li, G., He, D., Qian, Y., Guan, B., Gao, S., Cui, Y., Yokoyama, K., Wang, L.,** 2012, Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *aspergillus terreus*, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 466-476
- Lin, J., Chen, X., Huang, P.,** 2016, Graphene-Based Nanomaterials for Bioimaging Graphical abstract HHS Public Access, *Adv Drug Deliv Rev*, 105, 242-254pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lopez, G., Yate, C., Ramos, F., A., Cala, M., P., Restrepo S., Baena S.,** 2019, Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Lipids From Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic Cultivation of *Galdieria Sp.* Strain USBA-GBX-832, Scientific Reports, 25;9(1):10791
- Lopez-Lorente, Á., Valcárcel, M.,** 2014, Analytical Nanoscience and Nanotechnology, Comprehensive Analytical Chemistry, 3, 35pp
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J.,** 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275
- Lu, Y., Ozcan, S.,** 2015, Green nanomaterials: On track for a sustainable future, Nano Today, 10(4), 417-420
- Maiti, D., Tong, X., Mou, X., Yang, K.,** 2019, Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study, 9, 1-16pp
- Malik, P., Shankar, R., Malik, V., Sharma, N., Mukherjee, T., K.,** 2014, Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis, Journal of Nanoparticles, 1-14pp
- Manik, U., P., Nande, A., Raut, S., Dhoble, S., J.,** 2020, Green synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extraction of *Artocarpus heterophyllus* and *Azadirachta indica*, Results in Materials, 10008pp
- Martinez-Garcia, M., Stuart, M., C., A., Van der Maarel, M., J., E., C.,** 2016, Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens, International Journal of Biological Macromolecules, 89, 12-18pp
- Masoudi, M., Mashreghi, M., Goharshadi, E., Meshkini, A.,** 2018, Multifunctional fluorescent titania nanoparticles: green preparation and applications as antibacterial and cancer theranostic agents, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 46, 248-259pp
- Maurya, I., C., Singh, S., Senapati, S., Srivastava P., Bahadur, L.,** 2019, Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using *Bixam orellana* seed extract and its application for solar cells, Solar Energy, 194, 952-958pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Menon, S., S., Rajeshkumar S., Venkat K.,** 2017, A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications, *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 516-527pp
- Mitragotri, S., Stayton, P.,** 2014, Organic nanoparticles for drug delivery and imaging, *MRS Bulletin*, 39(3), 219-223
- Modeste, V., Brient, A., Thirion-Delalande, C., Forster, R., Aguenou, C., Griffiths, H., Cagnac, O.,** 2019, Safety evaluation of *Galdieria* high-protein microalgal biomass, *Toxicology Research and Application*, 3, 1-13pp
- Morais, M.G. de, Martins, V.G., Steffens, D., Pranke, P. and da Costa, J.A.V.,** 2014, Biological applications of nanobiotechnology, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 1007-1017pp
- Mourdikoudis, S., Pallares, R., M., Thanh, N., J., K.,** 2018, Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, 10, 12871pp
- Murdock, R., C., Stolle, L., B., Schrand, A., M., Schlager, J., J., Hussain, S., M.,** 2008, Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique, *Toxicological Sciences*, 101(2), 239–253pp
- Nadaroglu, H., Alayli, A., Nadaroğlu, H., Alayli Güngör, A., İnce, S.,** 2017, Synthesis of Nanoparticles by Green Synthesis Method, *International Journal of Innovative Research and Reviews*, 1(1), 6-9pp
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., Issaabadi, Z.,** 2019, Green Nanotechnology, *Interface Science and Technology*, 28, 145-198
- Ochekpe, N., A., Olorunfemi, P., O., Ndidi, C.,** 2009, Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications, 8, 265-274pp
- Oesterhelt, C., Schmälzlin, E., Schmitt, J., M., Lokstein, H.,** 2007, Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Plant Journal*, 51(3), 500-511pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Otari, S., V., Patil, R., M., Ghosh, S., J., Thorat, N., D., Pawar, S., H.,** 2015, Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1175-1180pp
- Ovais, M., Khalil, A., T., Ayaz, M., Ahmad, I., Nethi, S., K., Mukherjee, S.,** 2018, Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: A mechanistic approach, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 1-20pp
- Owaid, M.,** 2019, Green synthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus* (oyster mushroom) and their bioactivity: Review, 12, 100256pp
- Oza, G., Pandey, S., Mewada, A., Kalita, G., Sharon, M., Phata, J., Ambernath, W.,** 2012, Facile biosynthesis of gold nanoparticles exploiting optimum pH and temperature of fresh water algae *Chlorella pyrenoidusa*, *Library*, 3(3), 1405-1412pp
- Öztürk, B., Y.,** 2019, Intracellular and extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus sp.*: Their antibacterial and antifungal effects, *Caryologia*, 72(1), 29-43pp
- Öztürk, B., Y., Gürsu, B., Y., Dağ, İ.,** 2020, Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*, *Process Biochemistry*, 89, 208-219pp
- Pandey, P., Dahiya, M.,** 2016, A Brief Review on Inorganic Nanoparticles, *Journal of Critical Reviews*, 3(3), 18-26pp
- Parial, D., Patra, H., K., Dasgupta, A., K., R., Pal, R.,** 2012, Screening of different algae for green synthesis of gold nanoparticles, *European Journal of Phycology*, 47(1), 22-29pp
- Patel, V., Berthold, D., Puranik, P., Gantar, M.,** 2015, Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity, *Biotechnology Reports*, 5(1), 112-119pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patel, V., Berthold, D., Puranik, P., Gantar, M.,** 2015, Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity, *Biotechnology Reports*, 5(1), 112-119pp
- Patil, M., P., Kang, M., Niyonizigiye, I., Singh, A., Kim, J., O., Seo, Y., B., Kim, G., D.,** 2019, Extracellular synthesis of gold nanoparticles using the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis* BC74171T and evaluation of their antioxidant activity and antiproliferative effect on normal and cancer cell lines, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110455pp
- Patil, M., P., Kim, G., D.,** 2018, Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 487-495pp
- Paul, W., Sharma, C., P.,** 2019, Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery, *Biointegration of Medical Implant Materials*, 333-373pp
- Pereira, T., M., Polez, V., L., P., Sousa, M., H., Silva, L., P.,** 2020, Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus*(Vell.) Mattos, *Colloid and Interface Science Communications*, 34, 100224pp
- Rafie, H., M., El-Rafie, M., H., Zahran, M., K.,** 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae, *Carbohydrate Polymers*, 96, 403– 410
- Rahman, A., Kumar, S., Nawaz, T.,** 2020, Biosynthesis of Nanomaterials Using Algae, *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 2, 265-279pp
- Rahman, D., Y., Sarian, F., D., Van der Maarel, M., J., E., C.,** 2020, Biomass and phycocyanin content of heterotrophic *Galdieria sulphuraria* 074G under maltodextrin and granular starches–feeding conditions, *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 51-57pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajkumari, J., Magdalane, C., M., Siddhardha, B., Madhavan, J., Ramalingam, G., Al-Dhabi, N., A., Arasu, M., V., Ghilan, A., K., M., Duraipandiayan, V., Kaviyarasu, K.,** 2019, Synthesis of titanium oxide nanoparticles using Aloe barbadensis mill and evaluation of its antibiofilm potential against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 201(5), 111667
- Ramzan, H., Yousaf, Z.,** 2018, Green fabrication of metallic nanoparticles, *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*, 137-183pp
- Rao, T., N., Riyazuddin, B., P., Ahmad, N., Khan, R., A., Hassan, I., Shahzad, S., A., Husain, F. M.,** 2019, Green synthesis and structural classification of *Acacia nilotica* mediated-silver doped titanium oxide (Ag/TiO₂) spherical nanoparticles: Assessment of its antimicrobial and anticancer activity, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1385-1391pp
- Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S., L.,** 2003, Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 125(46):13940-13941pp
- Requicha, A., A., G., Meltzer, S., Arce, F., P., Terán, Makaliwe, J., H., Sikén, H., Hsieh, S., Lewis, D., Koel, B., E., Thompson, M., E.,** 2001, Manipulation of nanoscale components with the AFM: Principles and applications *Manipulation of Nanoscale Components with the AFM : Principles and Applications*, *Proceedings of the IEEE Conference on Nanotechnology*, 6, 81-86pp
- Romero, G., Moya, S., E.,** 2012, Synthesis of organic nanoparticles, *Frontiers of Nanoscience*, 4, 115-141pp
- Roopan, S., M., Bharathi, A., Prabhakarn, A., Abdul Rahuman, A., Velayutham, K., Rajakumar, G., Padmaja, R., D., Lekshmi, M., Madhumitha, G.,** 2012, Efficient phyto-synthesis and structural characterization of rutile TiO₂ nanoparticles using *Annona squamosa* peel extract, *Spectrochimica Acta- Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98, 86-90pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sadhasivam, S., Vinayagam, V., Balasubramaniyan, M.,** 2020, Recent advancement in biogenic synthesis of iron nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1217, 128372pp
- Sajid, M., Plotka-Wasyłka, J.,** 2020, Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences, *Microchemical Journal*, 154, 5-7pp
- Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S.,** 2016, Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Bioresource Technology*, 200, 861-866pp
- Sana, S., S., Dogiparthi, L., K.,** 2018, Green synthesis of silver nanoparticles using *Givotia moluccana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity, *Materials Letters*, 226, 47-51pp
- Sankar, R., Rizwana, K., Shivashangari, K., S., Ravikumar, V.,** 2015, Ultra-rapid photocatalytic activity of *Azadirachta indica* engineered colloidal titanium dioxide nanoparticles, *Applied Nanoscience*, 5(6), 731-736pp
- Santhoskumar, T., Rahuman, A., A., Jayaseelan, C., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Kirthi, A., V., Velayutham, K., Thomas, J., Venkatesan, J., Kim, S.,** 2014 Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(12), 968-976pp
- Sarian, F., D., Rahman, D., Y., Schepers, O., Van Der Maarel, M., J., E., C.,** 2016, Effects of oxygen limitation on the biosynthesis of photo pigments in the red microalgae *Galdieria sulphuraria* strain 074g, *Plos one*, 11(2), 1-10pp
- Senapati, S., Syed, A., Moez, S., Kumar, A., Ahmad, A.,** 2012, Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*, *Materials Letters*, 79, 116-118p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sengani, M., Gremezescu, A., M., Rajeswari, V., D.,** 2017, Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis–Aprospective review on drug delivery aspect, *OpenNano*, 2, 37-46pp
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S., K., Poinern, G., E., J.,** 2015, Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities, *Materials (Basel)*, 29;8(11):7278-7308
- Shamaila, S., Sajjad, A., K., L., Ryma, N., A., Farooqi, S., A., Jabeen, N., Majeed, S., Farooq, I.,** 2016, Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes, *Applied Materials Today*, 5, 150-199pp
- Shankar, P., D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V., S., Arvindnarayan, S., Kumar, G.,** 2016, A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications, *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 28-44pp
- Sharma, A., Sharma S., Sharma, K., Chetri, S., P., K., Vashishtha, A., Singh, P., Kumar, R., Rathi, B., Agrawal, V.,** 2016, Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review, *J Appl Phycol*, 28, 1759-1774p
- Sharma, D., Kanchi, S., Bisetty, K.,** 2019, Biogenic synthesis of nanoparticles: A review, *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3576-3600pp
- Shavandi, A., Saeedi, P., Ali, M., A., Jalalvandi, E.,** 2019, Green synthesis of polysaccharide-based inorganic nanoparticles and biomedical aspects, *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*, 267-304pp
- Siddiqi, K., S., Husen, A.,** 2016, Fabrication of Metal Nanoparticles from Fungi and Metal Salts: Scope and Application, *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 1-15pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, A., K., Tiwari, R., Singh, V., K., Singh, P., Khadim, S., R., Singh, U., Srivastava, V., Hasan, S., H., Asthana, R., K.,** 2019, Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and *in vitro* anticancer activity on breast cancer cell line, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 51, 164-176pp
- Soleimani, M., Pirkoochi, M., H.,** 2017, Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Chlorella vulgaris* and Evaluation of the Antibacterial Efficacy Against *Staphylococcus aureus*, Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 9(3), 120-125pp
- Subhapriya, S. and Gomathipriya, P.,** 2018, Green Synthesis of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* Extract and its Antimicrobial Properties, Microbial Pathogenesis, 116:215-220pp.
- Srinivasan, M., Venkatesan, M., Arumugam V., Natesan, G., Saravanan, N., Murugesan, S., Ramachandran, S., Ayyasamy, R., Pugazhendhi, A.,** 2019, Green synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) using *Sesbania grandiflora* and evaluation of toxicity in zebrafish embryos, Process Chemistry, 80, 197-202pp
- Syed, F., A., Assal, M., E., Khan, M., Al-Warthan, A., Siddiqui, M., R., H., Liz-Marzán, L., M.,** 2015, Biogenic synthesis of metallic nanoparticles and prospects toward green chemistry, Dalton Transactions, 44(21), 9709-9717pp
- Tarafdar, J., C., Raliya, R., Saran, R., Choudhary, K.,** 2014, Biosynthesis and Characterization of Nanoparticles, Journal of Advancement in Medical and Life Sciences, 1-4 pp
- Teleanu, D., Chircov, C., Grumezescu, A., Volceanov, A., Teleanu, R.,** 2018, Impact of Nanoparticles on Brain Health: An Up to Date Overview, Journal of Clinical Medicine, 7(12), 490
- Testa, C., Zammataro, A., Pappalardo, A., Trusso Sfrazzetto, G.,** 2019, Catalysis with carbon nanoparticles, RSC Advances, 9(47), 27659-27664pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thakkar, K., N., Mhatre, S., S., Parikh, R., Y.,** 2010, Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 257-262
- Thakur, B., K., Kumar, A., Kumar, D.,** 2019, Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity, *South African Journal of Botany*, 124, 223-227pp
- Titus, D., Samuel, E., J., J., Roopan, S., M.,** 2019, Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, 2019, 303-319pp
- Umekar, M., S., Chaudhary, R., G., Bhusari, G., S., Mondal, A., Potbhare, A., K., Sami, M.,** 2020, Phytoreduced graphene oxide-titanium dioxide nanocomposites using *Moringa oleifera* stick extract, *Materials Today: Proceedings*
- Vaid, P., Raizada, P., Saini, A., K., Saini, R., V.,** 2020, Biogenic silver, gold and copper nanoparticles- A sustainable green chemistry approach for cancer therapy, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 16, 100247pp
- Velayutham, K., Rahuman, A., A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S., Jayaseelan, C., Bagavan, A., Bagavan, A., Kirthi, A., V., Kamaraj, C., Zahir, A., A., Elango, G.,** 2012, Evaluation of *Catharanthus roseus* leaf extract-mediated biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles against *Hippobosca maculata* and *Bovicola ovis*, *Parasitology Research*, 111, 2329-2337pp
- Velusamy, P., Kumar, G., V., Jeyanthi, V., Das, J., Pachaiappan, R.,** 2016, Bio-inspired green nanoparticles: Synthesis, mechanism, and antibacterial application, *Toxicological Research*, 32(2), 95-102pp
- Verma, A., Gautam, S. Bansal, K., Prabhakar, N., Rosenholm, J.,** 2019, Green Nanotechnology: Advancement in Phytoformulation Research, *Medicines*, 6(1), 39pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vítová, M., Goecke, F., Sigler, K., Řezanka, T.,** 2016, Lipidomic analysis of the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* in response to changes in pH, *Algal Research*, 13, 218-226pp
- Yan, Q., Gozin, M., Zhao, F., Cohen, A., Pang, S.,** 2016, Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials, *Nanoscale*, 8(9), 4799-4851pp
- Yugay, Y., A., Usoltseva, R., V., Silantev, V., E., Egorova, A., E., Karabtsov, A., A., Kumeiko, V., V., Ermakova, S., P., Bulgakov, V., P., Shkryl, Y., N.,** 2020, Synthesis of bioactive silver nanoparticles using alginate, fucoidan and laminaran from brown algae as a reducing and stabilizing agent, *Carbohydrate Polymers*, 245, 116547pp
- Zaytseva, O., Neumann, G.,** 2016, Carbon nanomaterials: Production, impact on plant development, agricultural and environmental applications, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-26pp
- Zikalala, N., Matshetshe, K., Parani, S., Oluwafemi, O., S.,** 2018, Biosynthesis protocols for colloidal metal oxide nanoparticles, *Nano-Structures and Nano-Objects*, 16, 288-299pp

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin başından sonuna kadar geçen sürede bilgi ve tecrübeleri ile her konuda beni destekleyen ve yardımcı olan başta Prof. Dr. Murat ELİBOL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında deneyimleri ve yardımlarını esirgemeyen Pelin Sağlam METİNER, Tuğçe MUTAF, Gülizar ÇALIŞKAN, Esra İLHAN AYIŞIĞI, Zeliha DEMİREL, Ayşe KÖSE, Çağla YARKENT ve Ceren GÜRLEK başta olmak üzere Mikroalgal Proses Laboratuvarına teşekkür ediyorum.

Bu yoğun ve zorlu süreçte her daim destekleri ile beni cesaretlendiren başta annem Arzu AĞBA, babam Fatih AĞBA ve ikizim Osman Mert AĞBA olmak üzere canım aileme, biyoloji ile olan yakın bağımda katkısı olan Tuğçe AĞBA SEVENCAN'a, bu süreci eğlenceli hale getirerek manevi destekleriyle yanımda olan İpek TEKAKAN, Gamze Nur ASPAR, Ezgi GİRĞİÇ, Gizem Demirkol, Ali Kaan AKGÜN, Beyza EFE ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Son olarak, proje olarak içinde yer aldığım ve tezimin yürütülmesinde burs ve malzeme olanakları sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu'na ve Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

04/09/2020

İmzası

Hasan Cenk AĞBA



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı	Hasan Cenk AĞBA
Mesleği	Biyomühendis
E-Posta Adresi	hasanagba10@gmail.com.tr
Telefon (Cep)	0533 051 64 32

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi	25.04.1995
Medeni Durumu	Bekâr
Sürücü Belgesi	B Sınıfı

EĞİTİM BİLGİLERİ

2018/Halen, Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Konusu: Mikroalglerden Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL

2017, Erasmus+, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia

2013/2018, Lisans, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

Not Ortalaması: 2.91/4.00

Tez Konusu: Hayvan Hücre Hatlarının Kozmetik Ürünleri Sitotoksikite ve Biyoaktivite Testlerinde Kullanımları

ARAŞTIRMA İLGİ ALANI

*Hayvan Hücre kültürü biyoreaktörleri,

*Nanoteknolojik taşıyıcı adjuvan sistemi geliştirme,

*Ölçek büyütme stratejisi, üretim, ayırma saflaştırma- alt akım işlemleri,

*Sitotoksikite ve biyouyumluluk testleri,

*Nanoteknoloji,

*Mikrobiyoloji,

*Endüstriyel biyoteknoloji,

AKADEMİK ve MESLEKİ DENEYİMLER

***Lisans bitirme zorunlu stajı**; Universidade de Aveiro, Microbiome and Drug Resistance (2017)

*Lisansın ilk yılından itibaren **gönüllü** olarak; Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalıştım. (2016-2017)

KATILIM ve SERTİFİKALAR

*Sözlü sunum, Institute of Chemistry, University of Duisburg-Essen, CeNIDE (Center for Nanointegration Duisburg Essen), Essen, Almanya, Christoph Rehbock, Şubat 2020

*Cell Death: Degeneration and Regeneration, Istanbul, Turkey, 03-05 Ekim 2019

* İyi Laboratuvar Eğitimi (GLP), İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi (GMP), Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi (ISO 9001:2015), Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Genel Yeterliliği Eğitimi (ISO 17025:2017), İzmir, 08-09 Aralık 2019

*Biopharmaceutical Production an Interactive Workshop- You Ask Experts Answers, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Turkey, 03-04 Ekim 2018

*'2. Uluslararası Aşı Bilimi Kongresi & ISV Destekli DNA Aşısı Çalıştayı (2018)

*'7. International Bioengineering Congress (BEC 2015)', 19-21 November 2015, İzmir, Turkey.

*'12. Biyomühendislik günleri' Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye, 15-16 Mayıs (2015).

*'11. Biyomühendislik günleri'. Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye, 16 Mart (2014).

PROJE

117M052, Mikroalglerden Biyojenik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi, Optimizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, 1001- Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, MAG- Mühendislik Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2019- 01.03.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.09.2017- 01.03.2020

REFERANSLAR

*Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Öğretim Üyesi, Tel; 0535 419 23 90, E-mail: sultangulce@gmail.com

*Prof. Dr. Murat ELİBOL, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Öğretim Üyesi, Tel; 0533 779 33 66, E-mail: elibol.murat@gmail.com