

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROALGAL BİYOPROSES OPTİMİZASYONU, MİKROALGAL
EKSTRAKT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Benan İNAN

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Temmuz, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKROALGAL BİYOPROSES OPTİMİZASYONU, MİKROALGAL
EKSTRAKT YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Benan İNAN tarafından hazırlanan tez çalışması 30.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma Gülen İSKENDER, Üye

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Hanzade AÇMA, Üye

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Mikroalgal Biyoproses Optimizasyonu, Mikroalgal Ekstrakt Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Benan İNAN



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2017-3214 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



*Aileme
ve
dostlarıma*

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp yol gösteren, akademik alanda ilerlemem için bana her zaman destek veren ve çalışma azmi aşılayan, çalışma prensibi ve hem bilimsel hem iş disipliniyle örnek olan, yurtiçi ve yurtdışı akademik faaliyetlere katılmamı teşvik edip bilimsel ortamlara katılarak farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, her daim farklı araştırmalara katılma fırsatı sunarak pek çok konuda yetişmemi sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Didem Özçimen'e,

Tez çalışması sürecinde tez izleme komitesi olarak tezime katkıda bulunan Prof Dr. Fatma Gülen İskender ve Doç. Dr. Mehmet Murat Özmen'e, kullanılan ekstraktların ve üretilen partiküllerin hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması konusunda yardımcı olan Doç. Dr. Rabia Çakır Koç ve yüksek lisans öğrencisi Zeynep Karavelioğlu'na, nanopartikül üretiminde laboratuvar imkanlarından faydalanmış olduğum Prof. Dr. Mustafa Tahsin Yılmaz'a

Tez çalışmalarım sürecinde çalışmalarına yardımcı olan ve tezime yaptıkları katkılardan dolayı ekip arkadaşlarım doktora öğrencisi Anıl Tevfik Koçer, Meyrem Vehapi ve Canan Yağmur Karakaş'a,

Farklı illerde ve ülkelerde olsak dahi beraber ilerlediğimiz akademik alanda her daim birbirimize desteklerimizi sürdürdüğümüz, en zor zamanlarımda manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Öğretim Üyesi Sinem Yakarsönmez, Arş. Gör. Belma Nural Yaman, Arş. Gör. Aygöl Zengin, Arş. Gör. Hatice Köse Dunn ve doktora öğrencisi Nilbeste Boncukçu'ya, can dostum Arş. Gör. Elçin Tunçkol'a ve bana her zaman destek veren ve yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

Sağlamış oldukları destekten dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Tübitak bursumu kefil olarak doktora eğitimi almamda katkısı olan Kamil Şenkardeşler ve ailesine, eğitim hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi destek veren, bana yol gösteren, bu ünvanı almamda en çok hakkı olan aileme teşekkür ederim.

Benan İNAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	IX
KISALTMA LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ	XI
TABLO LİSTESİ	XIII
ÖZET	XIV
ABSTRACT	XVI
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Algal Yağlar	2
1.1.2 Mikroalglerin Büyümesi İçin Uygun Faktörler	5
1.1.3 Mikroalg Yetiştirme Sistemleri	9
1.1.4 Fotobiyoreaktörler İçin Önemli Tasarım Faktörleri	11
1.2 Tezin Amacı	13
1.3 Orijinal Katkı	13
2 Enkapsülasyon Yöntemleri	15
2.1 Enkapsülasyon Yöntemleri.....	15
2.2 Elektrospreying ve Elektrospinning Teknolojisi	17
2.2.1 Elektrospinning ve Elektrospreying Yöntemlerinin Temelleri.....	18
2.2.2 Polimer Çözeltilisinin Özellikleri	21
2.2.3 Proses Koşulları.....	25

3 Materyal ve Metot	32
3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Hammaddeler ve Cihazlar	32
3.1.1 Mikroalgler ve Siyanobakteriler.....	32
3.1.2 Makroalg.....	34
3.1.3 Kimyasal Maddeler	35
3.1.4 Kullanılan Cihazlar	36
3.2 Mikroalglerin Yetiştirilmesi	36
3.3 Analitik Ölçümler	39
3.3.1 Optik Yoğunluk Ölçümü, Büyüme Kinetiği ve Ölçek Büyütme	39
3.3.2 Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi	42
3.3.3 Protein Miktarının Belirlenmesi	43
3.3.4 Yağ Miktarı ve Yağ Asitlerinin Belirlenmesi	44
3.3.5 Klorofil- α ve β -Karoten Miktarının Belirlenmesi	45
3.3.6 FTIR Analizi	46
3.3.7 Kısa Analiz.....	46
3.3.8 Mikroalgal Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi ...	47
3.3.9 Mikroalgal Ekstraktların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi....	47
.....	47
3.3.10 XTT Testi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	48
3.4 Makroalglerden Aljinat Eldesi.....	49
3.4.1 Makroalg Örneklerinin Hazırlanması.....	49
3.4.2 Aljinat Ekstraksiyonu	49
3.4.3 Saflaştırma Çalışmaları.....	50
3.5 Elektrospreying Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi	52
3.5.1 Partiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi	54

4 Deneyisel Bulgular ve Sonuçlar	55
4.1 <i>B. braunii</i> Mikroalginin Analiz Sonuçları	55
4.2 <i>M. aeruginosa</i> Siyanobakterisinin Analiz Sonuçları.....	59
4.3 Laboratuvar Ölçekli Fotobiyoreaktörde Gerçekleştirilen Mikroalg Üretimi	62
4.5 Mikroalgal Ekstraktların Gaz Kromatografisi Sonuçları	68
4.6 Mikroalgal Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	70
4.7 Mikroalgal Ekstraktların Antibakteriyel Özelliklerinin Sonuçları	71
4.9 Makroalglerden Aljinat Eldesi Sonuçları.....	73
4.10 Elektrospreying Yöntemi ile Partikül Üretimi Sonuçları	74
4.11 FTIR Analizi Sonuçları.....	78
4.12 Termal Analiz Sonuçları	80
4.13 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	82
4.14 Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi.....	83
4.15 MTT ve XTT Canlılık Testi.....	84
Sonuç ve Öneriler	89
Kaynakça	93
Tezden Üretilmiş Yayınlar	104

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
gr	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
μ l	Mikrolitre
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

BB	<i>Botryococcus braunii</i>
BBL	<i>Botryococcus braunii</i> 'nin lipid içeriği
BBK	<i>Botryococcus braunii</i> 'nin β -karoten içeriği
BBN	<i>Botryococcus braunii</i> ekstraktı yüklü nanopartikül
CO ₂	Karbon dioksit
DHA	Dokosaheksaenoik Asit
EPA	Eikozapentaenoik Asit
MA	<i>Microcystis aeruginosa</i>
MAL	<i>Microcystis aeruginosa</i> 'nın lipid içeriği
MAK	<i>Microcystis aeruginosa</i> 'nın β -karoten içeriği
MAN	<i>Microcystis aeruginosa</i> ekstraktı yüklü nanopartikül
NaAlg	Sodyum Aljinat
OD	Optik Yoğunluk
PDI	Polidispersite İndeksi
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
PVA	Polivinil Alkol
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Elektrospinning işleminin şematik gösterimi	19
Şekil 3. 1	<i>B. braunii</i> mikroalgine ait mikroskop görüntüsü (100x)	33
Şekil 3. 2	<i>M. aeruginosa</i> siyanobakterisine ait mikroskop görüntüsü (100x)	34
Şekil 3. 3	Marmara Denizi kıyılarından toplanmış <i>Ulva lactuca</i> makroalgleri.....	35
Şekil 3. 4	Ticari olarak temin edilen kahverengi makroalg (<i>Sargassum</i> sp.)	35
Şekil 3. 5	20 L fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretim.....	42
Şekil 3. 6	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnekler	43
Şekil 3. 7	Mikroalglerin Soxhlet yöntemi ile ekstraksiyon işlemi	45
Şekil 3. 8	Ekstraksiyon öncesi hazırlanan makroalg örnekleri.....	50
Şekil 3. 9	Ön muamele sonrası supernatantı uzaklaştırılmış makroalg örnekleri	50
Şekil 3. 10	Etanol yolu ile gerçekleştirilen saflaştırma aşaması	51
Şekil 3. 11	Saflaştırma ve kurutma sonrası elde edilen aljinat polimeri.....	51
Şekil 3. 12	Çalışmalarda kullanılan Nano Fiber Elektrospinning cihazı	53
Şekil 3. 13	Elektrospinning cihazının üretim aşamasındaki görüntüsü	53
Şekil 3. 14	Mikroalg yağı için elde edilmiş standart grafiği	54
Şekil 4. 1	<i>B. braunii</i> ve <i>M. aeruginosa</i> mikroalglerinin büyüme eğrileri.....	63
Şekil 4. 2	<i>B. braunii</i> mikroalginin FTIR spektrumu	65
Şekil 4. 3	<i>M. aeruginosa</i> mikroalginin FTIR spektrumu.....	66
Şekil 4. 4	<i>B. braunii</i> yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı	68
Şekil 4. 5	<i>M. aeruginosa</i> yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı	68
Şekil 4. 6	<i>Chlorella protothecoides</i> 'in yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı	69
Şekil 4. 7	Örneklerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi.....	71
Şekil 4. 8	<i>B. braunii</i> mikroalginin ekstraktlarının sırasıyla A) <i>E.coli</i> ATCC 25922, B) <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 ve C) <i>Bacillus cereus</i> RSKK 9637 ATCC 11778 bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin gözlemlenmesi	72

Şekil 4. 9	<i>M. aeruginosa</i> mikroalginin ekstraktlarının sırasıyla A) <i>E.coli</i> ATCC 25922, B) <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 ve C) <i>Bacillus cereus</i> RSKK 9637 ATCC 11778 bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin gözlemlenmesi.....	73
Şekil 4. 10	Elde edilen aljinat ürünü	73
Şekil 4. 11	Kahverengi algden elde edilen (—), yeşil algden elde edilen (—) ve ticari aljinatın (—) FTIR spektrumları.....	74
Şekil 4. 12	a) % 8 PVA-NaAlg nanopartikül b) % 7.5 PVA-NaAlg nanopartikül c) % 7 PVA-NaAlg nanopartikül d) NaAlg e) <i>M. aeruginosa</i> mikroalg yağı..	79
Şekil 4. 13	a) % 8 PVA-NaAlg nanopartikül b) % 7.5 PVA-NaAlg nanopartikül c) % 7 PVA-NaAlg nanopartikül d) NaAlg e) <i>B. braunii</i> mikroalg yağı	79
Şekil 4. 14	a) <i>M. aeruginosa</i> yağı yüklü nanopartikül (%8 PVA) b) <i>B. braunii</i> yağı yüklü nanopartikül (%8 PVA) ve c) yağ içermeyen nanopartiküllerin TGA eğrileri.....	81
Şekil 4. 15	<i>B. braunii</i> ekstraktı yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri a) 50 kX büyütme, b) 20 kX büyütme c)10 kX büyütme	82
Şekil 4. 16	<i>M. aeruginosa</i> ekstraktı yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri a) 50 kX büyütme, b) 20 kX büyütme c)10 kX büyütme	83
Şekil 4. 17	Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	86
Şekil 4. 18	Mikroalgal ekstrakt yüklü nanopartiküllerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	86
Şekil 4. 19	Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın PC-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	87
Şekil 4. 20	Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın SHSY-5Y kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	88
Şekil 4. 21	Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın AGS kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1	Alg yetiştirme sistemlerinin karşılaştırması	11
Tablo 2. 1	Elektrospreying işleminde partiküllerin boyutlarını ve morfolojilerini etkileyen parametreler [40]	29
Tablo 2. 2	Biyoaktif maddelerin elektrosponning ve elektrospreying yöntemi ile enkapsülasyonu çalışmalarına ait örnekler	31
Tablo 3. 1	<i>B. braunii</i> mikroalginde bulunan biyoaktif moleküller ve endüstriyel uygulamaları.....	33
Tablo 3. 2	BG 11 besiyeri içeriği [93]	37
Tablo 3. 3	BG 11 iz elementi solüsyonu içeriği [93].....	38
Tablo 3. 4	Farklı koşullar altında üretilmiş olan mikroalglerin deney parametreleri.....	38
Tablo 3. 5	Standart glukoz konsantrasyon değerleri.....	43
Tablo 3. 6	Modifiye Lowry Yönteminde kullanılan standart ve reaktifler	44
Tablo 4. 1	<i>B. braunii</i> mikroalginin lipid ve β -karoten üretimi tasarım matrisi ve analiz sonuçları	58
Tablo 4. 2	<i>B. braunii</i> mikroalginin lipid ve β -karoten üretimine ait varyans analizi sonuçları.....	59
Tablo 4. 3	<i>M. aeruginosa</i> siyanobakterisine ait lipid ve β -karoten üretimi tasarım matrisi ve analiz sonuçları.....	61
Tablo 4. 4	<i>M. aeruginosa</i> siyanobakterisinin lipid ve β -karoten üretimine ait varyans analizi sonuçları.....	62
Tablo 4. 5	Hesaplanan kinetik değerlerin tablosu.....	63
Tablo 4. 6	Erlen ve fotobiyoreaktörde yetiştirilen mikroalglerin kesme gerilimleri	64
Tablo 4. 7	FTIR spektrumlarından tanımlanan fonksiyonel gruplar	66
Tablo 4. 8	Mikroalg türlerinin kısa analiz sonuçları.....	67
Tablo 4. 9	Farklı makroalg türlerinden elde edilen aljinat verimleri.....	74
Tablo 4. 10	<i>M. aeruginosa</i> yağı kullanılarak farklı koşullarda üretilen partikül çap dağılımının tasarım matrisi ve analiz sonuçları	75
Tablo 4. 11	<i>B. braunii</i> yağı kullanılarak farklı koşullarda üretilen partikül çap dağılımının tasarım matrisi ve analiz sonuçları	76
Tablo 4. 12	Partikül boyutu için istatistiksel değerlendirmenin ANOVA sonuçları.....	77
Tablo 4. 13	Partiküllerin yüklenme verimleri	84

Mikroalgal Biyoproses Optimizasyonu, Mikroalgal Ekstrakt Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Benan İNAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Biyoaktif maddelerin birçoğunun sıcaklık, ışık ve oksijenden kolaylıkla etkilenecek şekilde depolama ve işleme sürecinde kolayca bozulmaları ve lipofilik özellikte olup, sindirim sırasında zayıf adsorpsiyon özellikleri göstermesi, bu maddelerin doğrudan kullanımını sınırlamaktadır. Sağlık alanında nanoteknoloji uygulamalarının en önemli odak noktalarından birisi, çevre koşullarından etkilenen bu biyoaktif maddeleri, nano yapı haline getirerek istenmeyen etkileşimlerden koruyan ve vücuda alım sonrası vücut içerisinde hedef bölgeye salınımını sağlayan bir enkapsülasyon sistemi geliştirmektir. Antimikrobiyal, antioksidan, antifungal özelliklere sahip, omega-3 yağları ve antioksidanlarca zengin mikroalg yağları son yıllarda hem gıda hem de ilaç sektöründe dikkat çeken önemli biyoaktif maddelerdendir. Biyoaktif maddelerce zengin mikroalg yağlarının fiziksel ve kimyasal stabilitesini geliştirmek amacıyla nanoteknolojik yaklaşımlar ile enkapsüle edilmesine yönelik çalışmalar henüz oldukça yeni olup, bu yağların hem gıda

takviyesi hem de farmasötik amaçla uygulanması umut vaat etmektedir. Bu çalışmada *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* türlerinin üretim biyoprosesi ve biyoproses optimizasyonu ile analizleri yapılarak değerli ekstraktları elde edilmiştir. Ardından mikroalgal ekstraktların elektrospreying yöntemi kullanılarak enkapsülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektrospreying yöntemi ile mikroalglerden elde edilen biyoaktif bileşenlerce zengin ekstraktlardan nano yapılar elde edilmiş ve tez çalışması ile elde edilen ürünlerin antikanser etkileri araştırılmıştır. Yapılan tez çalışması sonucunda en yüksek lipid içeriği *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* için sırasıyla %53,80 ve %32,61 olup; 0,1875 g NaNO₃, 22,5°C sıcaklık ve 16 saat aydınlatma koşulları altında elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların gaz kromatografisi analizleri sonucunda palmitik (16:0), oleik (18:1), linoleik (18:2), araşidik asit (20:0) ve eikozapentenoik (EPA) (20:5) asitler gibi değerli biyoaktif bileşenlerin varlığı tespit edilmiştir. Elektrospreying yöntemi ile antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip olan ekstraktlarla yüklü nanopartikül üretimi sonucunda 90 nm boyutunda partikül eldesi sağlanabilmiş, optimizasyon çalışmaları ile en uygun koşulların %8 PVA içerikli aljinat çözeltisi, 0,2 ml/sa akış hızı ve 13 cm kollektör uzaklığı olduğu belirlenmiştir. Tez çalışması ile elde edilen ekstraktlar ve bu ekstraktlarla yüklü nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücrelerine sitotoksik etki göstermediği görülmüş olup, PC-3 prostat kanser hücre hattı, SHSY-5Y nöroblastom (beyin) hücre hattı ve AGS gastrik adenokarsinom (mide) hücre hattı üzerine sitotoksik etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, bu tez çalışmasıyla biyoaktif maddelere sahip olan *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* türlerinin ekstrakt ve ekstratlarıyla üretilmiş nanopartiküllerin özellikle farmasötik ve kozmetik alanlarında değerlendirilebilme potansiyeli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikroalg, biyoproses, enkapsülasyon, nanopartikül, kanser

Microalgal Bioprocess Optimization, Production of Microalgal Extract Loaded Nanoparticles and Investigation of Their Anticancer Effects

Benan İNAN

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Many of the bioactive substances are easily affected by temperature, light and oxygen, and are easily degraded during storage and processing and exhibit poor adsorption properties during digestion, limiting their direct use. One of the most important points of nanotechnology applications in the field of health is to develop an encapsulation system that protects these bioactive substances from environmental influences from unwanted interactions by making them into nanostructures and releases them to the target area within the body after intake. Microalgae are rich in omega-3 oils which have antimicrobial, antioxidant, antifungal properties, and antioxidants that are important bioactive substances that attract attention in both food and pharmaceutical sectors in recent years. Studies to encapsulate bioactive compound-rich microalgae oils with nanotechnological approaches to improve the physical and chemical stability are relatively new, and it is promising to apply these oils for both food supplements and pharmaceutical purposes. In this study, production bioprocess and bioprocess optimization of

Botryococcus braunii and *Microcystis aeruginosa* species were carried out and valuable microalgal extracts were obtained. Then, encapsulation studies of microalgal extracts were performed by using electrospraying method. Nano structures were obtained by evaluating extracts rich in bioactive components obtained from microalgae by using electrospraying method and anticancer effects of products obtained from this study were investigated. The highest lipid contents of *Botryococcus braunii* and *Microcystis aeruginosa* were 53,80% and 32,61% obtained under the conditions of 0.11875 g of NaNO₃, at the temperature of 22.5°C and 16 hours of illumination, respectively. As a result of the gas chromatography analysis of the obtained extracts, the valuable bioactive components such as palmitic (16:0), oleic (18:1), linoleic (18:2), arachidic acid (20:0) and eicosapentenoic (EPA) (20:5) acids were determined. By using electrospraying method, nanoparticles produced with microalgal extracts which have antibacterial and antioxidant properties, were obtained with the size of 90 nm, and the optimum electrospraying conditions were found to be alginate solution with 8% PVA, flow rate of 0.2 ml/h and 13 cm collector distance. The obtained extracts and the nanoparticles loaded with these extracts were found to have no cytotoxic effect on L929 mouse fibroblast cells. In addition to that, they showed cytotoxic effect on PC-3 prostate cancer cell line, SHSY-5Y neuroblastoma (brain) cell line and AGS gastric adenocarcinoma (stomach) cell line. In the light of obtained findings, it was shown that nanoparticles produced with extracts and extracts of *Botryococcus braunii* and *Microcystis aeruginosa* species which have bioactive substances have potential to be evaluated especially in pharmaceutical and cosmetic fields.

Keywords: Microalgae, bioprocess, encapsulation, nanoparticle, cancer

1.1 Literatür Özeti

Gıda ve farmasötik alanlarında nanoteknoloji uygulamalarının odak noktası, nano yapıda biyoaktif bileşenlerin salınım sistemini geliştirmek olup, sadece ürünün stabilitesini geliştiren değil aynı zamanda çevre koşullarından etkilenen biyoaktifleri istenmeyen etkileşimlerden koruyan ve aynı anda ürünün kalitesini düşürmeden, vücut içerisinde ürünün hedef bölgeye salınımını sağlayan bir enkapsülasyon sistemi geliştirmektir. Bu yüzden nanoteknoloji uygulamaları, gıda ve farmasötik alanda kullanılan ürünlerin zenginleştirilmesine ve yeni ürün geliştirilmesine olanak sağlaması açısından umut vaat etmektedir. Bu amaçla, özellikle biyoaktif maddelerce zengin fonksiyonel maddelerin kalitesini, raf ömrünü ve besin değerini geliştirmeye ve üretimine yönelik pek çok ar-ge çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte tüketim alışkanlıklarının doğal hammaddelerden elde edilen maddeler üzerine olması, biyoaktif maddelerin taşınımını sağlayacak maddenin de doğal bir kaynaktan elde edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Özellikle gıda ve farmasötik alanında son yıllarda oldukça rağbet gören bir hammadde olan algler fotosentetik organizmalar olup, çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahip canlılardır. Biyokimyasal yapıları sayesinde, gıda ve medikal amaçlı kullanımın yanı sıra günümüzde kozmetik, yakıt ve atıksu arıtma gibi çevresel uygulamalarda da değerlendirilmeye başlanmıştır. Alglerin ilk kullanımı algal biyokütlenin doğrudan gıda olarak tüketimine dayanmaktadır. Özellikle Güney Asya ülkelerinde, kolaylıkla elde edilen bir kaynak olmasından dolayı algler, insanların en çok tükettiği ürünlerden birisidir. Gıda amacıyla kullanılan algler günümüzde marketlerde tablet, kapsül ve sıvı formlarda satılmaktadır. Bununla birlikte, makarna, şekerleme gibi ürünlere de

katılabilmektedir [1]. Sahip oldukları kimyasal özellikleri ile algler besin takviyesi ve doğal gıda boyası olarak da kullanılabilmektedir. İnsanlar tarafından tüketiminin yanı sıra, algal biyokütle hayvan yemi olarak da değerlendirilmektedir. Günümüzde mevcut algal üretimlerin %30'u algal biyokütlenin hayvan yemi olarak satılmasına yöneliktir [2]. Son yıllarda algler üzerine olan gelişmeler ve bilgi birikimi ile alglerin kullanım alanları ile ilgili yeni perspektifler geliştirilmiştir. Bu kullanım alanlarından birisi de biyoaktif maddelerin gıda, kozmetik ve medikal amaçlarla kullanımıdır. Algler, polisakkaritler (aljinat, karragen, agar, fukoidan ve laminarin), çoklu doymamış yağ asitleri, steroller, proteinler ve peptidler, klorotanninler ve pigmentler (fukoksantin, astaksantin, beta-karoten, klorofiller) gibi biyoaktiviteye sahip çok çeşitli değerli kimyasal maddeler içermektedir. Bu biyoaktif maddeler antibiyotik, antiviral, antikanser, antifungal, antibakteriyal, antiinflamatuvar, hipokolestrolemik, enzim inhibisyonu gibi özellikleri ile kozmetik ve ilaç sektöründe değerlendirilmektedir [3]. Biyoaktif maddeler sıcaklık, pH, nem, ışık vb. parametreler gibi çevre ve saklama koşullarından kolayca etkilenmektedirler. Bu parametreler moleküllerin kimyasal kararlılığı üzerine etki etmektedir. Biyoaktif bileşiklerin bozulmasını engellemek amacıyla moleküller farklı yöntemlerle enkapsüle edilmektedir.

1.1.1 Algal Yağlar

Biyoaktif özelliğe sahip olan algal yağlar, ilaç ve gıda sektöründe değerlendirilen önemli hammaddelerden birisidir. Alglerdeki lipid (yağ ve yağ asidi) bileşimi %1 ile %70 arasında değişmekte ve kuru ağırlık olarak % 90'a kadar ulaşabilmektedir. Algal lipid metabolizması, mineraller, ışık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve bu parametreler ile algal lipid içeriği değişebilmektedir [4]. Şu anda çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) başlıca kaynağı balık yağı olmakla birlikte, gelişen biyoteknoloji ile alglerin ticari olarak değerlendirilmesi ön plana çıkmış ve algler besin takviyesi olarak yeni bir kaynak haline gelmiştir. Alglerin, biyokimyasal bir kaynak olarak balıklarla karşılaştırıldığında birçok avantajları vardır. Alglerin kullanımı ile hoş olmayan koku ve kimyasal kontaminasyon riski azalmakta, üretim ve saflaştırma işlemlerinde kolaylık sağlanmaktadır. Proses işlemi sonrası kalan malzeme doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek

antioksidatif maddeleri içermektedir. Yapılan çalışmalarda deniz alglerinin antioksidan aktivitesi alglerin ekstraktlarındaki yüksek antioksidan etkinliği ile ortaya konulmuştur. Bu maddeler ticari antioksidanlardan olan bütildidroksianisol (BHA), bütildidroksi toluen (BHT) ve α -tokoferol'e eşdeğer özellik göstermektedir. Bu yüzden alglerdeki antioksidanların gıda formülasyonlarında kullanılması önerisi getirilmiştir.

Deniz alglerinin antioksidan aktivitesi klorofiller, karotenoidler, vitaminler, vitamin öncülleri olan α -tokoferol, β -karoten, niyasin, tiyamin ve askorbik asitler, fenolikler, fosfolipidler, terpenoidler, peptidler ile oksidasyon işlemini inhibe eden ya da baskılayan diğer antioksidanlardan belirlenebilmektedir [5].

Linoleik asit, alglerde bulunan 18 karbon zincirine sahip esansiyel bir yağ asididir. Linoleik asit, insan vücudunda γ -linoleik aside dönüştürülür. α ve γ linoleik asitler iki izomerdir. γ -linoleik asit (GLA) 18 C atomuna ve 3 çift bağa sahiptir ve bir ω -6 PUFA'dır. GLA bağışıklığı uyarıcı ve artırıcı faaliyetlere sahiptir. Prostaglandinlerin öncüsü olup, birçok vücut fonksiyonlarını kontrol eden ana hormonların yapısındadır. Klinik çalışmalar, GLA'nın diyetle alınmasının artrite [6], kalp rahatsızlığına [7], obezite [8] ve çinko eksikliğinin [9] tedavisine yardımcı olabileceğini göstermektedir. Alkolizm, manik depresyon, yaşlanma belirtileri ve şizofreni hastalığı da kısmen GLA eksikliğine atfedilmiştir [10].

ω -6 yağları gibi ω -3 yağları da sağlık açısından oldukça yararlıdır ve tedavilerde önemli rol oynamaktadır. Bu yağlar unlu mamuller, süt ürünleri, çeşitli ezmeler ve meyve sularında bulunabildiği gibi sıvı ya da kapsül formunda gıda takviyesi olarak da kullanılabilir. ω -3 yağlarının gıdalardaki uygulamalarında ya da diğer destekleyici durumlarda yağların oksidasyondan ve istenmeyen tat oluşumundan korunması için mikroenkapsülasyon teknikleri kullanılır. Tüketimden sonra mikrokapsüller sindirim kanalından salınmaktadır. Bu şekilde alımda ürünün yan etkisi görülmemektedir [5]. ω -3 yağ asitlerinin önemi miyokardiyal enfarktüs ya da bronşiyal astım gibi hastalıkların önlenmesinde ω -3 ün etkisini gösteren araştırmalar ile 80'lerde ortaya konulmuştur. Oldukça fazla sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda ω -3 PUFA'ların özellikle eikozapentenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asitin (DHA) insan sağlığı üzerindeki etkisini incelenmiştir [8].

Mikroalgler yüksek değerlikli gıda takviyesi sağlamak amacıyla saflaştırılabilen ω -3 yağ asidi içermektedir. Mikroalglerdeki ω -3'ün fonksiyonel kaynakları EPA ve DHA'dır. ω -3 yağ asitleri balık yağlarından elde edilmesine karşın son yıllarda hoş olmayan tat ve kötü oksidatif stabilitesinden dolayı problemler artmış ve daha az tercih edilir hale gelmiştir. Balıkla karşılaştırıldığında mikroalgler ω -3'ü kendileri üretmesinin yanı sıra prosesi basit ve ekonomik kılmaktadır [11].

Uzun zincirli doymamış yağ asitleri, özellikle ω -3 ve ω -6 serilerinden olan eikozapentenoik asit (EPA), dokosaheksaenoik asitin (DHA), ve araşidonik asit (AA) beslenme ve terapi amaçlı kullanımda farmakolojik olarak öneme sahiptir. Bu yağ asitleri romatizma, deri hastalıkları, sindirim kanalındaki mukozadaki iltihaplanmalar gibi kronik iltihaplanmaların tedavilerinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca dolaşım sistemi hastalıklarında, koroner kalp hastalıklarında, artherosclerosis, hipertansiyon, kolesterol ve kanser tedavisinde pozitif etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır.

EPA kalp hastalıklarının tedavisinde ve astım, arthirisis, migren gibi hastalıkların tedavinde klinik amaçlarla kullanılmaktadır. Deniz mikroalglerinin tatlı su mikroalglerine kıyasla daha çok DHA içeriğine sahip olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Deniz mikroalglerinde esas olarak doymuş ya da doymamış yağ asitleri bulunmaktadır. *Schizochytrium mangrove*, deniz mikroalglerinde toplam yağ asitlerinin %33-39'unu ana komponent olarak DHA oluşturmaktadır [11]. DHA özellikle beyin ve gözdeki retinada zengin olarak bulunur, eksikliği beyin gelişiminin ve fonksiyonlarının azalmasına ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarda artışa yol açar. Az miktarda DHA ticari olarak *Schizochytrium*'dan üretilir ve bunlar asıl olarak yetişkin beslenme takviyeleri (peynir, yoğurt, sos, hububat dahil) ve hamile ve emziren kadınlarda gıda olarak kullanılır [12]. Ayrıca kanser, AIDS, kalp hastalıkları gibi hastalıklarla savaşmada, kolesterolü düşürmede, immün sistemi güçlendirmede ve vücudu detoksifiye etmede kullanılmaktadır [11].

Algler, karotenoidler dâhil pek çok ikincil metabolitlerin rezervuarı olarak da görev yapar. Karotenoidler antioksidan, anti-iltihaplanma, anti-viral ve anti-kanser etki olmak üzere çokça biyoaktiviteye sahiptirler. Ayrıca besin olan karotenoidler astım ve atopik dermatitis gibi bazı tip immün hastalıklar için riskleri azaltmaktadır.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda hem β -karotenin hem de α -tokoferolün splenositler (dalakta bulunan beyaz kan hücreleri) arasındaki Th1 hücre aktivitesini arttırdığı görülmüştür. β -karotenin oral yolla alımında IgE ve IgG1'i azaltmaya yönelik etkisi olduğu görülmüş ve histamin seviyesini azaltarak anaflaktik cevabın inhibisyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Ek olarak Th1/Th2 dengesi β -karotenle beslenmiş farelerin dalak hücrelerinde Th1 sitokin (IFN-, IL-12, ve IL-2) üretiminin artması ve Th2 sitokin üretiminin azalması nedeniyle değişmiştir (IL-4, IL-5, IL-6, ve IL-10). Sakai ve çalışma arkadaşları, sıçanların bazofilik lösemi 2H3 hücreleri ve kemik iliğinden türetilmiş mast hücrelerinin antijen kaynaklı degranülasyonu üzerine karotenoidlerin inhibisyon etkisini göstermişlerdir [13]. *H. pluvialis*'den üretilen astaksantin de yüksek değerli bir karotenoiddir ve membran fosfolipidleri ile diğer lipidleri peroksidasyona karşı korur. Astaksantin üreten *H. pulvaris* mikroalgi FDA tarafından besin takviyesi olarak belirlenmiş ve satışı da onaylanmıştır. Bununla birlikte pek çok Avrupa ülkesinde de insanlar tarafından tüketimi için onay alınmıştır. Klinik öncesi araştırmalarda astaksantin tüketiminin antikanser aktivitesi (kolon, mesane, karaciğer), anti inflamatuvar etkisi (astım, ülser gibi hastalıklarda), kardiyovasküler hastalıklarda riski azaltma, ultraviyole ışıktan koruma, sinirsel hastalıklarda riski azaltma (Parkinson ve Alzheimer) gibi pek çok soruna karşı faydalı olduğu iddia edilmiştir [14].

1.1.2 Mikroalglerin Büyümesi İçin Uygun Faktörler

1.1.2.1 Işık

Mikroalgler fotosentetik şekilde büyüdüklerinden, ışık yoğunluğu en önemli limitleyici faktörlerden biri olmuştur. Algal kültür sistemleri yapay ışık, güneş ışığı ya da ikisiyle aydınlatılabilmektedir. Genel olarak aydınlatılmış algal kültür sistemleri büyük aydınlatma yüzey alanları ile birlikte açık gölet (havuz), düz plaka ve yatay/kıvrımlı hava ikmali tübüler ya da eğimli tübüler fotobiyoreaktörleri içerir. Düz plaka fotobiyoreaktörleri, genellikle tübüler fotobiyoreaktörlerden güneş ışığından yararlanma açısından daha verimlidir çünkü daha geniş yüzey alanına sahiptirler. Kapalı sistemleri (tanklar, asılı plastik torba) 50-100 L'ye yükseltmek amacıyla birçok girişimde bulunulmuştur fakat ışık ihtiyacı karşılanamamış, başarılı bir biyokütle gelişimi mümkün olmamıştır. Açık havada

yapılan yetiştirilmede, ışığın en nihai kaynağı güneştir ve kontrol edilemez bu yüzden fotobiyoreaktörler için ışığın optimizasyonu üzerine yapılan çalışmalar yapay aydınlatma ile kapalı alanda gerçekleştirilmektedir. Genellikle laboratuvar ölçekli fotobiyoreaktörler içten ya da dıştan florasan lambalarla ya da diğer ışık dağıtıcılarla aydınlatılmaktadır [15].

Fotosentezde başarılı bir yapay ışık kullanmak için, fotonlar dalga boyları ile birlikte 600-700 nm arasında olmalıdır. Soğuk florasan, akkor (parlak), halojen, AllnGap II (643 nm pik dalga boyu ile alüminyum indium gallium fosfat) ve ışık yayan diyotları (LEDleri) içeren yapay ışık kaynaklarının karşılaştırılması yapılmıştır. AllnGap II LEDler ışık kaynakları arasında en verimlisi ve ekonomisi olarak bulunmuştur. 600-700 nm arasındaki kendi ışıklarından %98 daha fazla ışık yaymaktadırlar. Işık şiddeti ihtiyacı hücre yoğunluğuna dayanır. Yüksek hücre yoğunluğu yüksek ışık şiddetine ihtiyaç duyar.

Her mikroalg türü optimal ışık ihtiyacına sahiptir ve bu aşıldığı zaman büyümeleri yavaşlamaktadır. Belli bir değerin üzerinde, ışık şiddeti biyokütle büyüme hızını azaltmaktadır. Bu olgu, fotoinhibisyon olarak da bilinir ve mikroalglerin spesifik büyüme hızı piklerinin olduğu seviyeden daha yüksekteki ışık şiddetlerinde inhibe olduğu zaman meydana gelir. Fotoinhibisyon prosesleri zamana bağlıdır ve ışık stresinden birkaç dakika sonra geri dönüşümsüz olarak yıkım meydana gelir, 10-20 dk sonrada %50 yi aşacak şekilde zarar oluşur. Tübüler fotobiyoreaktörlerde fotoinhibisyon pik radyasyonunun periyodu boyunca meydana gelir ve hücrelerin fotosentetik asiditeleri birkaç saat sonra düzelir. Fotoinhibisyonun ortadan kaldırılması algal biyokütlenin ortalama günlük büyüme hızını arttırmaktadır [15], [16].

1.1.2.2 Karbondioksit

Karbondioksit mikroalgin fotosentetik kültürünün fotosentez sırasında kullanılmak üzere ihtiyaç duyduğu karbon kaynağıdır. Karbon tükendikçe suyun fotolizinden oksijen üretilmekte ve kültür sıvısına salınmaktadır. Algler yüksek karbondioksit konsantrasyonlarında yaşadığından farklı kaynaklardan gelen sera gazları, nitrojen dioksit (NO_2) ve atmosferdeki kirlilikler algler için besin kaynağı olmaktadır. Bu amaçla alg üretim tesisleri prosesi ekonomik kılmak adına fosil yakıtların

yanmasından oluşan egzoz gazları ile beslenebilmektedir. Büyüme için gerekli olan CO₂ miktarı mikroalg türlerine, fotobiyoreaktörlerin tipine göre değişmektedir. Bazı türler çok yüksek CO₂ konsantrasyonlarında yaşayabilmektedir [15], [16].

1.1.2.3 Sıcaklık

Algal büyümeyi etkileyen bir diğer parametre sıcaklıktır. Algler maksimum büyüme için optimal bir sıcaklık değerine ihtiyaç duyar. Bununla birlikte sıcaklık karbon içeren moleküllerin çözünmesinde de önemli rol oynar. Sıcaklık respirasyona ve fotorespirasyona fotosentezden daha çok etki eder. Ancak CO₂ ya da ışık fotosentez için limitleyici faktör iken sıcaklık etkisi önemsizdir. Mikroalg kültürleri için optimal sıcaklık genellikle 20-24°C arasındadır fakat bu kültür mediumunun kompozisyonuna, türlere ve kültür süşuna göre de değişebilmektedir. En genel kültürlenmiş mikroalg türleri 16-27°C arasındaki sıcaklıkları tolere edebilir. 16°C den aşağıdaki sıcaklıklar büyümeyi yavaşlatır, 35°C den yüksek sıcaklıklar da türler için ölümcüldür [15], [16].

1.1.2.4 pH

Mikroalgler büyümeleri için farklı pH değerlerindeki büyüme ortamlarına ihtiyaç duyarlar. Yüksek pH seviyesinde CO₂'nin kullanılabilirliği büyümeyi ve mikroalgin fotosentezini sınırlandırabilmektedir. En çok kültürlenen algal türler için pH aralığı 7 ve 9 arasındadır, optimal aralık ise 8.2-8.7'dir. Uygun pH kimyasal yöntemlerle, kültürün havalandırılmasıyla ve gaz verilmesiyle sağlanabilir. Yüksek yoğunluklu algal kültürlerde karbondioksit eklenmesi artmış pH'ı azaltabilir. Ancak çalışmalarda verimliliği arttırmak için kültüre CO₂ eklenmesi gibi bir olasılık olmasına karşın gereğinden fazla CO₂ eklenmesinin ortam pH değerinin azalmasına yol açması da düşük mikroalgal verimlilik ile sonuçlanır. Yüksek CO₂ konsantrasyonu yüksek biyokütle verimliliğini sağlayabilmesine karşın mikroalg fizyolojisine düşük pH'ın etkisi ve artan kontaminasyon olasılığı da göz ardı edilmemelidir [15].

1.1.2.5 Besiyeri

Mikroalgler sahip oldukları özelliklere göre belirli oranlarda elementlere ihtiyaç duyarlar. Ortamda bulunan azot, fosfor, tuz vb. maddelerin miktarı mikroalgin

yetişmesini ve/veya algal lipid birikimini etkileyen en önemli parametrelerden bir tanesidir. Denizel mikroalgler büyümeleri için tuzlu su ortamlarına ihtiyaç duyarken tatlı su algleri belirli miktarlarda kimyasal bileşikler içeren besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Mikroalglerin besiyerlerinin içerisinde bulunması gereken temel ana maddeler azot, fosfor ve karbonlu bileşiklerdir [16]–[18]. Azot ve fosfat, alg hücrelerinin büyümesi ve metabolizması için gerekli iki önemli makro besindir. Azot, proteinlerin ve nükleik asitlerin oluşumu için temel bir elementtir. ATP gibi temel moleküllerin ayrılmaz bir parçası olan hücrelerdeki enerji taşıyıcısı olan fosfat da azot gibi oldukça önemli bir besin maddesidir. Fosfat ayrıca, tüm canlı hücreler için gerekli makromoleküller olan DNA ve RNA'nın omurgasının bir parçasıdır. Fosfor ayrıca fosfolipidlerin önemli bir bileşenidir. Doğal ortamda alglerin besin açısından sınırlı olması alışılmadık bir durum değildir [18]. Bu temel besin maddelerinin sınırlandırılması, organizmanın metabolik yolunu değiştirmektedir. Örneğin, azot ve fosfor miktarının azlığı, lipid metabolizmasını membran lipid sentezinden nötral lipid depolamaya yönlendirmektedir. Bu da alglerin toplam lipid içeriğini artırır [19].

Azot ve fosfor içerikli bileşiklerin besiyerlerindeki oranlarının değişmesi mikroalgin biyokimyasal içeriğini değiştirmektedir [20]. Widjaja vd. azot stresinin lipid birikimi üzerindeki etkisi üzerine çalışmıştır. Çalışma sonucunda uzun süreli azot stresine maruz kalan mikroalg hücrelerinin içinde daha yüksek miktarda lipid birikimi olduğunu bildirmişlerdir [21]. Ruangsomboon tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, en yüksek biyokütle konsantrasyonunun, en yüksek fosfor konsantrasyonu koşulları altında elde edildiği tespit edilmiştir [22]. Bunlara karşın Xin vd. tarafından yapılan çalışma ile lipid miktarı azot veya fosfor sınırlaması altında en yüksek olduğunda lipid verimliliğinin ise yüksek olmadığı belirtilmiştir [23]. Yeesang ve Cheirsilp ise azot ve tuzluluk etkisinin mikroalgin büyümesi üzerindeki etkisi üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda azot kaynağının yokluğunda, algal biyokütlede bir miktar kayıp olmasına rağmen, dört suşun lipid içeriğinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, azot bakımından zengin durumda, tüm suşlar yüksek tuzlulukta hayatta kalsa da, bazı suşların gelişiminin azaldığı görülmüştür [24], [25].

1.1.3 Mikroalg Yetiştirme Sistemleri

Mikroalglerin yetiştirilmesi göller, havuzlar gibi açık kültür sistemlerinde ve yüksek kontrollü fotobiyoreaktör adı verilen kapalı kültür sistemlerinde yapılabilir. Bir biyoreaktör biyolojik dönüşümün gerçekleştirildiği sistem olarak tanımlanır. Fotobiyoreaktör, içinde fototrofların (mikrobiyal, alg, ya da bitki hücreleri) büyüdüğü ya da fotobiyolojik reaksiyonların gerçekleşmesinde kullanılan reaktörlerdir [11].

1.1.3.1 Açık Havuzlar

Mikroalglerin yetiştirilmesinde kullanılan açık havuzlar değişik şekillerde ve formlarda olup her biri belli avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Araştırma ve endüstride kullanılan havuz tipleri geniş büyük havuzlar, dairesel havuz tankları ve kapalı havuzları içerir. Havuzun bulunduğu bölge, havuz tipinin seçiminin kararlaştırılmasında kritik faktördür. Açık sistemlerdeki kontrol eksikliğinden dolayı havuz yerel iklimin fonksiyonu haline gelir, bu yüzden de bulunduğu bölge yetiştirmedeki başarıya önemli katkı sağlar. Açık havuzlar ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH ve çözünmüş O₂ konsantrasyonunu içeren anahtar büyüme parametreleri tarafından kısıtlanmıştır. Açık havuzlarda görülen bir başka problem de kontaminasyondur. Kontaminasyon, belli koşullar altında büyüeyebilen alg türlerinin büyümesine engel olur [11].

Mikroalglerin yetiştirilme sistemlerinin maliyeti açık ve kapalı yetiştirme sistemleri karşılaştırıldığında önemli bir faktör olarak karşımıza çıkar. Havuzlarda yapım, işletim ve bakım maliyetleri fotobiyoreaktörlerden daha düşüktür ve bu sistemler teknik olarak da daha basittirler [11].

1.1.3.2 Fotobiyoreaktörler

Günümüzde mikroalglerin fotosentetik hücrelerini yetiştirmek için fotobiyoreaktörlerin tasarlanması üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Fotobiyoreaktörler açık sistemlere kıyasla mikroalg büyüme parametreleri için daha iyi bir kontrol sunar. Fotobiyoreaktörlerin kontrollü çevre ortamı daha yüksek mikroalg üretim verimine ulaşılmasına izin verir.

Verimlilik biyoreaktörlerin teknolojisinin başarısının arkasındaki en önemli indikatördür. Mikroalglerin farklı kökenleri ve ve reaktörlerin ölçeklerinden dolayı biyoreaktörlerin verimliliğinin karşılaştırılması çok zordur [11].

Fotobiyoreaktörler başta tübüler ve plaka tipli olmak üzere değişik tasarımlarda olabilirler. Diğer fotobiyoreaktörler ile karşılaştırıldığında; tübüler reaktörler açık alanda kültürleme için daha uygun olarak düşünülmektedir. Saydam borulardan oluşan reaktörün geniş aydınlatma yüzeyi mikroalglerin açık alanda kültürlemeye uygun olup olmamasındaki ana faktördür. Tübüler borular değişik biçimlerde ayarlanabilirler, düzenlemenin uygunluğu ise sistemin spesifikasyonuna dayanmaktadır.

Genel fotobiyoreaktör konfigürasyonları düz hat ve sarmal boruları içermektedir. Fotobiyoreaktörün geometrisi ayrıca önemli olup, tübüler reaktörler dikey, yatay ya da eğik düzlem şeklinde olabilir. Konfigürasyonlar arasındaki önemli farklılıklar, dikey tasarımın daha iyi kütle transferi ve enerji kullanımında azalma sağlaması, yatay tasarımların ise daha ölçeklenebilir olması fakat daha çok alana ihtiyaç duymasıdır.

Tübüler fotobiyoreaktörler üzerinde pek çok çalışma olmasına karşın daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmayı sağlayan dar ışık yolu nedeniyle genel olarak düz-plaka fotobiyoreaktörler tercih edilir. Ek olarak, bu tip reaktörler

- ✓ Düşük enerji tüketimi ve yüksek kütle transfer kapasitesi,
- ✓ Oksijen artışıdaki azalma,
- ✓ Diğer fotobiyoreaktörlerle karşılaştırıldığında ışıksız hacimlerin olmaması,
- ✓ Yüksek fotosentetik etkinliklerinden dolayı daha avantajlıdır.

Uygun reaktör tasarımı maksimum mikroalg biyokütlesini sağlayabilmelidir. Çeşitli düz-plaka fotobiyoreaktör dizaynları cam, kalın transparan PVC malzemelerden yapılmış, V-şeklinde ve eğimlidir. Diğer tasarımların ucuz olması ve kurulumlarının kolay olmasına karşın maksimum ışık geçirgenliği için cam ve PVC tipleri transparan oldukları için daha çok tercih edilmektedir [11].

Tablo 1. 1 Alg yetiştirme sistemlerinin karşılaştırması

Kültür sistemleri	Beklentiler	Kısıtlamalar
Açık havuzlar	Ekonomik, kültürleme sonrası temizlemesi kolay	Kültür koşullarının kontrolünün düşük olması, düşük verimlilik, kontaminasyon
Dikey kolon reaktörler	Yüksek kütle transferi, düşük enerji tüketimi, kolay sterilizasyon	Dar aydınlatmalı yüzey alanı, kayma gerilimi
Düz plaka fotobiyoreaktörler	Geniş aydınlatmalı yüzey alanı, ucuz, temizliği kolay	Kültür sıcaklığının ayarlanmasındaki zorluk, hidrodinamik gerilim
Tübüler fotobiyoreaktörler	Geniş aydınlatma alanı, iyi biyokütle verimliliği, ucuz	Geniş bir alana ihtiyaç duyması, tüp boyunca pH, çözünmüş oksijen ve karbondioksitin azalması

1.1.4 Fotobiyoreaktörler İçin Önemli Tasarım Faktörleri

1.1.4.1 Karıştırma

Fotobiyoreaktörlerde karıştırma, biyokütle verimliliğini artırmaya yönelik yapılan bir işlem olarak bilinir. Karıştırma ışık şiddetinin dağılımını, yeterli miktarda CO₂ transferini sağlamak ve uniform pH'ı sürdürmekte önemli bir rol oynar. Karıştırma, reaktör duvarına hücre yapışmasından kaçınmak için ve alg sedimentasyonunu önlemek için gereklidir. Karıştırma ayrıca tüm hücrelerin eşit bir şekilde ışığa ve besine maruz kalmasını sağlar ve kültür mediumu ile hava arasındaki gaz alışverişini artırır. Hava, mikroalg hücrelerinin karbon kaynağı olarak fotosentez sırasında kullandığı CO₂'i içerir. Oldukça yoğun kültürlerde, kabarcık şeklinde kültür ortamına verilen havanın içerisinde bulunan CO₂ (%0.035 CO₂ içermektedir) algal büyüme için yeterli olmayabilir ve bu nedenle hava kaynağına saf karbondioksit verilerek büyümeye destek yapılabilir. Ayrıca CO₂

ilavesi, CO_2/HCO_3 dengesi nedeniyle suyun pH değişimlerine karşı tampon oluşturur. [15].

Zayıf karıştırma hücrelerin değişik boyutlarda agregatlar halinde topaklanmasına yol açarak reaktör içinde kütle transferini azaltan üç fazlı (katı-sıvı-gaz) bir sistemin oluşmasına neden olur. Ancak tüm alg türleri etkili karıştırma için yüksek hızda karıştırmaya toleranslı değildir. Çünkü mikroalgal hücreler hidrodinamik gerilime karşı hassastırlar. Yüksek karıştırma hızı hücrelerin zarar görmesine sebep olabilir.

Kabarcık kolon ve havayla kaldırmalı reaktörlerde karıştırma eksen dağılım katsayısı, karıştırma zamanı, sirkülasyon zamanı ve Bodenstein sayısı ile karakterize edilebilir. Kabarcık kolonlardaki karıştırmanın analizi havayla kaldırmalı reaktörlerden daha kısa karıştırma zamanına sahip olduklarını göstermiştir. Emme borusu boyunca yükselen kabarcıklar halkasal kısımda daha az bulanık bölge oluşmasını sağlar, ve ışığa daha iyi maruz kalmasına neden olur. Ek olarak havayla kaldırmalı fotobiyoreaktörlerde emme borusunun varlığı daha etkili karıştırmaya sebep olur çünkü içindeki döngü sirkülasyonu sağlar [15].

1.1.4.2 Işık Geçirgenliği

Fotobiyoreaktörleri başarılı bir şekilde ölçeklendirmedeki önemli etkenlerden biri de ışık geçirgenliğidir. Fotobiyoreaktör içindeki aydınlatma biyokütle kompozisyonuna, büyüme hızına ve ürün oluşumuna etki eder. Mikroalgler fotosentez için ışığa ihtiyaç duyarlar. Fotosentetik aktif radyasyon dalgası 400-700 nm arasında değişir, bu da görünür ışığa eşittir. Yoğun kültürlerde ışığın eğimi ışığın zayıflamasından dolayı fotobiyoreaktörün yarıçapı boyunca değişir. Işık yoğunluğunun zayıflaması dalga boyuna, hücre konsantrasyonuna, fotobiyoreaktörün geometrisine ve ışığın penetrasyon mesafesine bağlıdır. Bu nedenle, fotobiyoreaktör içindeki belirli bir noktada ışık yoğunluğu, ışık yolu, hücre konsantrasyonu ve mikroalglerin ışık emilimine bağlıdır [15].

1.1.4.3 Gaz Enjeksiyonu

Kabarcıklar aracılığıyla yapılan CO_2 takviyesi tasarımda düşünölmesi gereken önemli faktörlerdendir. CO_2 enjeksiyonu fotobiyoreaktöre CO_2 'nin yapay bir şekilde verilmesine dayanır. alışmalar karbondioksite zengin havalandırmanın,

mikroalge CO₂ sağladığını, süspansiyonun deoksijenizasyonuna destek olduğunu, döngüyü arttırmak için karıştırma sağlayarak ışık inhibisyonunu limitlediğini göstermiştir. Ancak yüksek havalandırma hızı yüksek maliyete yol açmaktadır, bu yüzden büyük ölçekli mikroalg üretimlerinde bu tavsiye edilmez. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda fotobiyoreaktörde mikroalg üretimi için gerekli olan CO₂ gazı için optimum havalandırma hızı belirlenmiştir. %5 ya da %10 CO₂ (v/v) içeren 0.025-1 vvm (volume of air/medium/zaman) hızındaki hava kütle kültürü için etkin uygun maliyetli olarak bulunmuştur [15].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı, mikroalglerin değerli biyoaktif bileşiklerini içeren ekstraktlarını, etkinliklerini koruyacak ve hücreler tarafından emilimlerini arttıracak nano yapılar haline getirmek ve antikanser etkilerinin araştırılmasıdır. Tez çalışması ile *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* türlerinin biyoaktif madde ürettikleri optimum koşulların belirlenmesi ve alglerden elde edilen ekstraktların karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi, mikroalgal ekstraktların nano yapılar haline getirilip kaplanması için makroalglerden biyopolimer elde edilmesi ve elde edilen biyopolimerlerin karakterizasyonu, elektrospreying tekniği ile mikroalglerden elde edilen biyoaktifçe zengin ekstraktların, makroalglerden elde edilen biyopolimer ile kaplanarak tamamen doğal kaynaklardan algal nano yapıların üretimi gerçekleştirilmiş ve tez çalışması ile elde edilen ürünlerin prostat, beyin ve mide kanser hücre hatları gibi kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir.

1.3 Orijinal Katkı

Literatürde tamamen algal biyokütleden faydalanılarak üretimi gerçekleştirilen nanopartiküllere yönelik bir çalışma bulunmamakta olup, önerilen projede biyoaktif maddece zengin mikroalg yağının yine algal biyokütleden elde edilen biyopolimer ile kaplanarak kullanıma sunulması çalışmanın temel özgünlüğünü oluşturmaktadır. Nano yapıların üretimi aşamasında kullanılacak olan üretim yöntemi ile mikroalglerden elde edilecek olan biyoaktifçe zengin ekstraktların enkapsülasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu bağlamda elde

edilecek veriler ile özgün bir sonuç elde edilmiştir. Bununla birlikte tez çalışması ile elde edilen ürünlerin farklı kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ile elde edilen bulgular literatüre orjinal katkılar sunacaktır. Gerçekleştirilmiş çalışma örnek alınarak, anti-inflamatuar ve immun düzenleyici gibi biyoaktif maddelere sahip olan mikroalglerin gıda, farmasötik ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda değerlendirilebileceği düşünülmektedir.



2.1 Enkapsülasyon Yöntemleri

Enkapsülleme, biyoaktif bileşenlerin korunmasında ve sunulmasında büyük uygulamalara sahip, gelişen bir araştırma alanıdır. Enkapsülasyon, bir etken bileşenin, örneğin biyoaktif molekülün (antioksidanlar, esansiyel yağ asitleri, vitaminler) ya da canlı hücrelerin (probiyotikler vb.) bir duvar malzemesi (karbonhidrat polimer, protein, lipitler) içine hapsedilmesi işlemidir. Enkapsülasyon sadece biyomolekülün stabilitesini, biyoyararlanımını ve kontrollü salınım özelliklerini iyileştirmede değil, aynı zamanda bileşiğin istenmeyen koku ve tadını maskeleyerek yardımcı olur. Enkapsülasyon işlemi için kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır. Emülsiyon, yüksek basınçlı homojenleştirme, ultrasonik yöntem ve süperkritik yöntem enkapsülasyon çalışmalarında en çok uygulanan metotlardandır. Klasik yöntemlerden olan emülsiyonun tekli ve çoklu olmak üzere farklı yaklaşımları bulunmaktadır.

Tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon/evaporasyon yönteminde suda çözünmeyen etkin madde ve polimer için ortak olan çözücü seçilir ve her ikisi de ortak organik çözücüde çözündürülür. Yüzey aktif madde içeren sulu ortama karıştırılarak nanopartiküller üretilir. Doğal (hyalüronik asit, aljinat, kitin ve kitosan gibi) ve sentetik polimerler (polilaktik asit, poligliserolik asit, polikaprolakton gibi) veya bunların kombinasyonları kullanılarak bu taşıyıcılar hazırlanabilmektedir. Globüller halinde dağılan damlacıkların oluşturduğu faza, dispers faz ya da iç faz; damlacıkların içinde dağıldığı dispersiyon ortamına da sürekli faz ya da dış faz adı verilir. Peptid ya da protein gibi hidrofilik moleküllerin yüklü olduğu nanopartiküllerin üretiminde ise en yaygın olarak ikili emülsiyon (w/o/w=su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi (homojenizasyon ya da ultrasonikasyon destekli) kullanılmaktadır. Çoklu emülsiyonlar ise basit yağ/su ve su/yağ tipi emülsiyonlardan daha komplike olan aynı anda her iki emülsiyon tipini

bir arada bulunduran sistemlerdir. Su/yağ/su (w/o/w) ve yağ/su/yağ (o/w/o) olmak üzere iki tipi vardır. Bu yöntemde ilk olarak etkin maddenin sulu çözeltisi polimer içeren organik faz içerisinde dağıtılır. Elde edilen w/o emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen w/o/w emülsiyonu, etkin madde çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturur ve çözücü difüzyon ya da evaporasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra, etkin maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu oluşturulur. Bu süspansiyon santrifüjlenerek nanopartiküller elde edilir, su ile yıkama yapıldıktan sonra kurutulan nanopartiküller liyofilize olarak kurutulur ve kullanılmak üzere dondurulur [26], [27].

Yüksek basınçlı homojenleştirme, katı lipid nanopartikül/ nanolipid taşıyıcı üretiminde kolaylıkla uygulanabilen ve ölçeklenebilir bir tekniktir. Bu teknik için sıcak ve soğuk olmak üzere iki yaklaşım mevcuttur. Sıcak homojenleştirme yönteminde ise öncelikle erimiş lipid ve aktif bileşen dispersiyonu ön emülsiyon elde etmek için sulu yüzey aktif madde fazıyla bir karıştırıcı ile karıştırılır. Bu işlem, lipidin erime noktasının 5-10° C üzerindeki sıcaklıkta gerçekleştirilir. Ardından, bu ön emülsiyon, homojenleştiriciden gönderilir ve alt mikron boyutları ve polidispersite elde etmek için birkaç döngü boyunca tekrarlanır. Bu işlemde elde edilen emülsiyon hızla soğutulur ve sıvı damlacıkları kristalleştirilerek lipid matrisli partiküller üretilir. Termal olarak kararsız parçacıkların üretimi için soğuk basınç homojenizasyonu kullanılmaktadır. Soğuk homojenleştirme de benzer basamaklara sahiptir. Proses, erimiş lipid ve aktif bileşen dağılımını soğutmakla başlar. Bir ön dispersiyon, surfaktanın soğuk sulu çözeltisinin dispersiyonu ile oluşturulur. Büyük partiküller yüksek basınçlı homojenleştirici ile katı lipid nanopartiküllere ayrılır. Bu aşamada, sıcak prosesle karşılaştırıldığında daha fazla döngü gerekmektedir, çünkü soğuk homojenleştirme ile üretilen parçacıklar daha serttir ve kırılması çok zordur [28].

Ultrason, 16 kHz'in üzerindeki frekanslara sahip ses dalgalarına verilen addır. Ultrasonikasyonun birincil mekanizması, ultrasondan etkilenen kabarcıkların oluşumu ve çöküşüne neden olan akustik kaviteasyona dayanmaktadır. Geniş aktif frekans bölgesi, bu tekniğin önemli bir avantajıdır. Frekansı ayarlayarak, partikül

büyüklüğü, yüzey pürüzlülüğü ve yapısı düzenlenebilir [29]. Yöntemde ilk olarak erimiş lipid ve sıcak surfaktan madde çözeltisinden oluşan ön emülsiyon karışımı hazırlanır, ardından lipid fazı kavitasyon yoluyla daha küçük mikro damlacıklara ayrıştırılır. Bu mikroemülsiyonu soğuttuktan sonra, katı parçacıklar elde edilir.

Bir maddenin belirli sıvı ve gaz fazlarının bulunmadığı, sıcaklık ve basınç değerleri kritik nokta olarak adlandırılır. Kritik noktasının üstündeki herhangi bir madde, süperkritik akışkan (SCF) olarak adlandırılır. CO₂ güvenli, ucuz, inert ve kritik noktası düşük olduğundan, bu yöntemde kullanılan bir süper kritik sıvıdır. SCF için birkaç yaklaşım bulunmaktadır. SCF, bir çözünen, çözücü veya antisolvent olarak kullanılabilir [29]. Süperkritik çözeltinin hızlı genleşmesi (RESS) ve süperkritik anti-çözücü yöntemi (SAS) en çok kullanılan yöntemlerdir. RESS yönteminde, etkin madde ve polimer süperkritik çözücüde yüksek basınçta çözündürülürken, SAS yönteminde ilaç molekülleri organik çözücüde çözündürüldükten sonra süperkritik sıvı (genellikle süperkritik CO₂) ile temasta bırakılır. Organik fazın süperkritik çözücüde hızlı çözünmesinin ardından nanopartiküller elde edilir [30].

Elektrospinning ve elektrospreying yöntemi, mikro ve nano çaplara sahip bir dizi liflerin/partiküllerin üretiminin gerçekleştirildiği, hızlı, uygun maliyetli, güvenilir ve pratik bir yöntemdir [7], [8]. Bu yöntemin temeli, gerilim kaynağına bağlı bir iğneden mikro ve nano boyutlarda çok küçük çap büyüklüğüne sahip fiberlerin veya partiküllerin elektrostatik kuvvet yardımı ile dışarı çekilmesine dayanmaktadır. Nano yapıları oluşturacak malzemelerden oluşan çözelti iğneye doğru bir şırınga ile beslenmektedir ve akış hızı bir pompa yardımı ile kontrol edilmektedir. Oluşan yapıların morfolojisi ve çapı, çözeltinin akış hızı ve viskozitesi, uygulanan voltaj ve atış uzaklığına bağlı olarak birçok parametre tarafından değişmektedir [9].

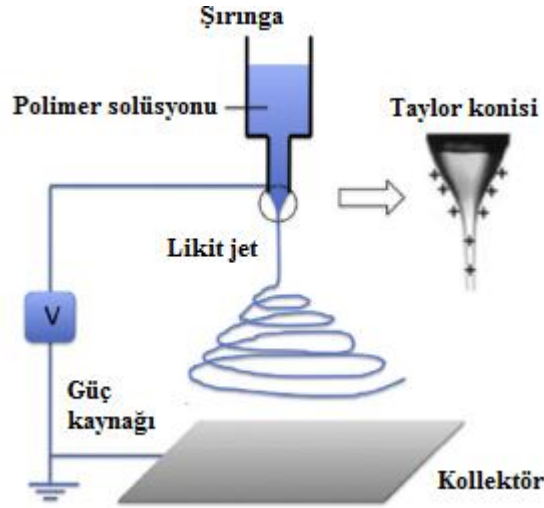
2.2 Elektrospreying ve Elektrospinning Teknolojisi

Elektrospreying , nano/mikropartiküller, fiberler ve ince filmler halinde farmasötik ve biyomedikal malzemelerin imalatı için kullanılan çok yönlü bir teknolojidir [31]. Gıda endüstrisinde elektrospinning/elektrospreying ile üretilmiş partikül ve fiberlerin kullanımına duyulan ilginin artması gıda bileşenleri, enzimler ve gıda endüstrisi ile ilgili diğer aktif bileşiklerin kapsüllenmesi üzerine çalışmaları arttırmıştır. Biyobozunurluk ve biyoyuumluluk gibi biyopolimerlerin fiziksel ve

kimyasal özellikleri ile antibakteriyel aktivite gibi özellikleri, özellikle kapsülleme ve salım sistemlerinde, bu ürünler için büyük bir talep yaratmıştır [32]. Bu tür kompozitlerin önerilen spesifik uygulamaları, aktif ambalajlama veya tüketim için besin aktivitesinin korunması üzerinedir [33]. Elektrospunlenmiş ya da elektrosprey yöntemiyle üretilmiş gıda malzemesinin bir başka faydası, meydana gelen ürünün dokularda veya ağızdaki hissinin geliştirilmesidir [34]. Kapsülleme yoluyla aktif bileşiklerin korunması, gıda ve ilaç teknolojisi uygulamasında en çok araştırılan alandır [35]. Aktif bileşiklerin fiberlere/partiküllere kapsüllenmesi, genellikle aktif bileşiklerin polimer çözeltisine karıştırılması ve elektrospunleme/elektrospreyleme ile elde edilir. Gıda ile ilgili ürünlerin üretimi için toksik çözücülerin kullanılmasından kaçınmak için, kullanılan çoğu polimer su veya etanolde çözülür. Son yıllarda, yağlar ve karotenoidler gibi lipofilik biyoaktif bileşenler, sağlığa faydaları nedeniyle küresel çapta büyük ilgi görmektedir. Bununla birlikte, yüksek miktarda omega-3 yağ asidi içeren yağlar oksidasyona karşı oldukça hassastır; omega-3 yağ asitlerinin oksidasyonu, peroksit oluşumuna ve son olarak da bazıları tat vermeyen ve sonuçta omega-3 yağ asitlerinin besin değerini düşüren uçucu bileşiklere yol açar. Bu nedenle, lipofilik biyoaktif bileşenlerin yenilebilir bir biçimde kapsüllenmesi ve bunların gıda sistemlerine veya besin takviyelerine dahil edilmeleri, gıda ve ilaç endüstrisi tarafından yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [33], [36]–[38].

2.2.1 Elektrospinning ve Elektrospreying Yöntemlerinin Temelleri

Elektrospunleme, asılı halde olan polimer çözeltisi damlacığının elektrostatik güçler kullanılarak ince bir fiber şeklinde, topraklanmış bir toplayıcıda biriktirilmesi işlemidir [39]. Bu proseste sıvı fazdaki polimer, iğne ucundan, bir şırınga pompası tarafından sabit bir hızda veya bir başlık tankından sabit bir basınçta ekstrüde edilir ve uçta bir damlacık oluşur. Küçük bir hacimde polimer sıvısının bir elektrik alanına maruz kalması durumunda, damlacık, Taylor konisi olarak bilinen bir yapıya dönüşerek, en yakın en düşük potansiyel noktaya doğru uzanır. Elektrik alanı elektrik kuvvetlerinin damlacıkların Taylor konisinin ucundan yüzey gerilimini aştığı kritik bir değere ulaştığında, yüklü bir sıvı akımı veya sıvı polimer jeti atılır (Şekil 2.1) [40].



Şekil 2. 1 Elektrospinning işleminin şematik gösterimi

Jet daha sonra, uçtan toplayıcıya geçişi sırasında "cırpma dengesizliği" (daha genişleyen bir helezon olarak tanımlanır) vasıtasıyla uzatılır. Jet ayrıca zayıflamasına katkıda bulunabileceği düşünülen sürüklenme kuvvetlerine de tabidir. Elektrostatik kuvvet, sürüklenme kuvveti, yerçekimi, kolombik itme kuvveti, yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetlerin hepsi yüklü jet üzerinde etki eder [41]. Polimer jetinin inceltilmesi, çözücü buharlaşana kadar devam eder ve topraklanmış toplayıcı üzerinde sürekli fiberler biriktirilir [38].

Yüklü iplik, atıldığı uçtan toplayıcıya doğru elektrostatik kuvvetle atıldığında, çevresindeki hava ile etkileşiminin bir sonucu olarak yüksek hızlı jet üzerine sürüklenme kuvveti uygulanır. Damlacıkların genişlemesi, kolombik kuvvete, inceltme ise yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetlere bağlanır. Elektrik alanının varlığı, süreçte gözlenen elektrostatik ve kolombik itme kuvvetlerini doğrudan etkiler. Elektrik alanı, yüklü damlacıkların küre şeklinden küre benzeri bir yapıya dönüşmesine yol açar ve elektrospreylemeden (sıvı atomizasyon) elektrospinleme işlemine geçişi etkiler [38].

Elektrospreying (elektrohidrodinamik püskürtme), elektrik alanı vasıtasıyla mikro ve/veya nano boyutta partikül üretimi işlemidir. Bu işlemde, yüksek potansiyelde tutulan kılcal bir nozülde/iğneden akan sıvı, bir jet veya iş mili biçiminde uzamasına neden olan bir elektriksel alana tabi tutulur. Jet, temel olarak elektriksel

kuvvet nedeniyle damlacıklara dönüşür. Elektrospreylemede, sıvı atomizasyonu için elektrik alandan başka hiçbir mekanik enerji gerekmez. Partiküllerin boyutu, nozüle uygulanan itme hızı ve voltajı ayarlayarak bir dereceye kadar kolayca kontrol edilebilir. Elektrospreylemenin, geleneksel mekanik püskürtme sistemlerine göre bazı avantajları vardır:

1. Partiküllerin, geleneksel mekanik yöntemlerle elde edilenlerden daha küçük boyutları vardır ve 1 μm 'den küçük olabilirler.
2. Partiküllerin boyut dağılımı genellikle düşük standart sapma ile dardır.
3. Yüklü partiküller, uzayda kendi kendine dağılır, bu da partikül aglomerasyonunun ve pıhtılaşmanın olmamasına neden olur.
4. Yüklü partiküllerin hareketi elektrik alanlarıyla kolayca (sapma veya odaklanma dahil) kontrol edilebilir.
5. Bir nesnede yüklü spreyin birikme verimliliği, yüklü olmayan partiküllerden çok daha yüksektir [42]–[48].

Kardeş teknolojiler olarak düşünülen elektrospinleme ve elektrospreyleme (elektrohidrodinamik püskürtme) arasındaki farklılık, polimer çözeltisinin konsantrasyonundaki değişkenlikle en kolay kontrol edilen hammaddenin moleküler kohezyon derecesi olup bu da polimer konsantrasyonundaki değişiklik ile ayarlanabilmektedir [49].

Çözelti konsantrasyonu ya da sıvıdaki moleküler zincir dolaşımı yüksek olduğunda, Taylor konisinden gelen jet stabilize edilir ve bir mikro veya nanofiber üretir. Çözelti konsantrasyonu düşükse, jet dengesizleşir ve bu nedenle ince küresel cisimler ve mikro parçacıklar oluşur [44]. Yukarıda da bahsedildiği gibi bu yüksek oranda yüklü partiküller, elektrostatik itme nedeniyle uzayda kendi kendine yayılır, böylece damlacık birikmesi ve pıhtılaşması önlenir. Partiküllerin boyut dağılımı düşük standart sapma ile genellikle dardır, ve partiküllerin geleneksel mekanik yöntemlerle temin edilebilecek boyuttan daha küçüktür ve 1 μm 'den daha küçük olarak oluşabilirler [42]. Partiküllerin elektrostatik kuvvet ile bozulması, Rayleigh tarafından uzun zaman önce 1882'de gözlenmiştir. Çözücünün buharlaşması damlacıkların büzülmesine ve katılaşmasına neden olarak topraklanmış kollektörde katı polimerik parçacıkların oluşmasına neden olur. Elektrodinamik kuvvetler

kullanılarak gerçekleştirilen bu prosesin, ilaç dağıtım sistemleri, gıdalar üzerinde film kaplama, çikolata işleme, aktif bileşik içeren katı lipid nanoparçacıklarının hazırlanması, nutrasötiklerin stabilizasyonu ve özellikle biyoaktif ve probiyotiklerin kapsüllemesi için kullanılma potansiyeli bulunmaktadır [38], [46].

Elektrospinnig ile üretilen fiberler veya elektrospreyle elde edilmiş partiküller içinde enkapsüle edilen biyoaktif bileşiklerin gelişmiş stabilite ve işlevselliğe sahip olduğu ve fonksiyonel gıdalarda içerik olarak kullanılabileceği çalışmalar tarafından ortaya konulmuştur [38].

2.2.2 Polimer Çözeltisinin Özellikleri

Fiber çapı ve morfolojisini etkileyen ana parametrelerden biri polimer çözeltisidir. Fiber çapı ve ayrı ayrı fiberlar boyunca boncuk oluşumu eğilimi yüzey gerilimi ve çözeltinin vizkozitesi ile ilgilidir. Çözelti özellikleri, polimer konsantrasyonu, polimerin moleküler ağırlığı, yüzey gerilimi ve çözelti iletkenliğine göre değişiklik göstermektedir.

2.2.2.1 Polimer Konsantrasyonu, Moleküler Ağırlık ve Fiber Morfolojisi

Genel bir eğilim olarak, sentetik polimerlerin çözünürlüğü moleküler ağırlık azaldıkça artar. Bununla birlikte, viskozite, kuvvet, esneklik ve moleküler zincir dolaşma derecesi gibi diğer önemli fiziksel özellikler moleküler ağırlıkla artar [50]. Elektrospreying partiküllerinin pürüzsüz veya pürüzlü yüzey morfolojisi doğrudan polimer zinciri başına dolaşma sayısına bağlıdır. Fazla sayıda dolaşma, polimerik çözeltinin viskozitesini artırarak elektrospinnig işleminde olduğu gibi lif oluşumuna yol açacaktır. Öte yandan, daha yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin elektrospreyingleri, düşük dozajlarda bile zincir dolaşmaları daha kolay gerçekleştiği için düşük çözünen konsantrasyonunu gerektirir. Genel bir kural olarak, ılımlı sayıda zincir dolaşmalarına yardımcı olan organik çözücülerde düşük çözünen konsantrasyonlarında yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin elektrospreylenmesi daha kolaydır [31], [48].

Elektrospinnig sırasında fiber oluşumunu kolaylaştırmak için belirli bir minimum polimer konsantrasyonu gereklidir. Bu kritik değerin altında, voltaj uygulaması, esas olarak Rayleigh kararsızlığı nedeniyle (kılcal dalga ayrılması) elektrospreying

ve boncuk oluşumu ile sonuçlanır. Polimer konsantrasyonu arttıkça, bir boncuk ve fiber karışımı elde edilir. Polimer konsantrasyonundaki herhangi bir başka artış, sürekli bir fiberin oluşmasına neden olur. Bununla birlikte, polimer konsantrasyonu üst sınırın ötesinde arttırılamaz, çünkü yaygın olarak bildirilmemesine rağmen, elde edilen yüksek çözelti viskozitesi, sürekli elektrospinlemeyi engeller [50]. Gupta, Elkins, Long ve Wilkes (2005), seyreltik çözeltilerin elektrospinlenmesinin moleküler zincirler arasında yetersiz örtüşme nedeniyle polimer damlacıklarının oluşmasına yol açtığını ileri sürmüştür. Konsantrasyon arttıkça, polimer damlacıkları ve bazı boncuklu fiberler gözlenmiştir [51].

Tan, Inai, Kotaki ve Ramakrishna (2005), elektrospinleme işlemi ile ultra ince fiberlerin üretimini etkileyen faktörleri sistematik olarak incelemiştir. Ana parametreler iki gruba ayrılmıştır. Birincisi, iğne ucundan beslenen polimer kütlesini (örneğin, polimer konsantrasyonu, uygulanan voltaj ve hacim besleme hızı) ve ikincisi, elektrospinleme sırasında elektrik kuvvetini etkileyen parametrelerdir (örneğin, çözücülerin elektriksel iletkenliği) [52].

Polimer konsantrasyonunun, molekül ağırlığının ve çözeltinin elektriksel iletkenliğinin, fiberlerin morfolojisinin belirlenmesinde temel bir rol oynadığı belirtilmiştir. Daha küçük çaplı polimer fiberleri, yüksek elektriksel iletkenliğe ve düşük konsantrasyona sahip polimerler kullanılarak spinlenebilirler. Bir çözeltinin elektriksel iletkenliği bir jet üzerindeki yük yoğunluğunu yansıtır, bu da bir elektrik kuvvetiyle jetin uzama seviyesini etkiler. Bu nedenle, aynı uygulanan gerilim ve spinleme mesafesi altında, daha yüksek bir elektrik iletkenliğine sahip bir çözelti, eksen boyunca daha yüksek uzamaya sahip jet oluşumu ve dolayısıyla daha küçük çaplı fiber oluşumuna neden olur [52], [53].

Demir, Yilgor, Yilgor ve Erman (2002) viskozite, çözelti konsantrasyonu ve sıcaklığın hem elektrospinning işlemini hem de elde edilen fiber özelliklerini etkileyen çözelti özellikleri arasında baskın faktörler olduğunu göstermiştir. Fiberlerin morfolojisinin viskozite, konsantrasyon ve sıcaklık ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Düşük konsantrasyonlu çözeltiler boncuklu fiber oluşumuna doğru ilerlerken, artan konsantrasyon kıvrımlı, dalgalı ve düz fiber yapıların oluşumunu desteklemektedir [54]. T. Lin, Wang, Wang ve Wang (2005),

polimer konsantrasyonundaki ve çözelti viskozitesindeki değişikliklerin doğrudan birbirine bağlı olduğunu göstermiştir. Seyreltik polimer çözeltilerinin elektrospinlenmesinde boncuklar veya tanecikler oluşturan bir yapı üretilmiş ve en seyreltik polimer çözeltilerinden ise hiç fiber üretilmemiştir [55].

Lim, Tan ve Ng (2008), seyreltik çözeltilerin viskozitesinin azalmasından dolayı, polimer zincirlerinin daha fazla hareketliliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Seyreltik çözeltilerden daha küçük çaplarla üretilen fiberlerin daha yüksek bir moleküler yönelim, kristallik, sertlik ve mukavemet derecesine sahip oldukları ancak düşük süneklik gösterdikleri bulunmuştur [56].

Zong vd. (2002) ayrıca polimer konsantrasyonunun veya polimer çözeltisinin viskozitesinin, fiber morfolojisini kontrol etmek için en etkili değişkenlerden biri olduğunu vurgulamıştır. Boncuk çaplarının arttığı ve çözeltinin viskozitesi arttıkça boncuklar arasındaki ortalama mesafenin arttığı bulunmuştur. Üniform fiberlerin daha yüksek polimer konsantrasyonunda ve daha düşük elektrik alan kuvvetinde elde edilebileceği sonucuna varmışlardır [57].

Aljinat, selüloz ve kitosan gibi bir dizi doğal polimer ve polikaprolakton (PCL), poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polistiren (PS) gibi sentetik polimerler elektrosprey yöntemi ile nano yapılar üretmek için değerlendirilen polimerlerdir. Polimerlerin elektrospreying prosesinde, nano ve mikropartiküllerin katılaşması, polimerin çözeltilerden dışarı difüze olması ve çözücünün buharlaşması ile eş zamanlı gerçekleşir [31], [40].

2.2.2.2 Çözücülerin Etkisi

Fiberlerin morfolojisi, büyük ölçüde çözücünün fiziksel ve elektriksel özelliklerinden etkilenir. Tipik bir spinning çözeltisi, ağırlıkça % 80-90 çözücü ve ağırlıkça % 10-20 polimerden oluşmaktadır, bu nedenle elektrospinleme için çözücülerin seçimi ve bunların fiber morfolojisi üzerindeki etkileri, son yıllarda ana araştırma alanlarından biri olmuştur. Wannatong vd. hem fiberlerin yoğunluğunun hem de boncukların varlığının solvent seçiminden etkilenebileceğini göstermiştir [58]. Uyar ve Besenbacher (2008), toplanan fiberlerin kuruluşundaki farklılıkların, solventin yoğunluğuna ve kaynama noktasına bağlı olabileceğini belirtmiştir [59]. Toplanan fiberlerin kuruluşu, çözücünün yoğunluğu ve kaynama noktası azaldıkça

artmıştır. Solvent tipi ayrıca fiber morfolojisini de etkileyebilir. Q. Yang vd. (2004), diklorometan (MC), etanol, N, N, dimetilformamid (DMF) ve bunların karışık çözücülerinin, elektrospinning işlemi sırasında ultra-ince üniform poli (vinil pirolidon) (PVP) fiberlerinin oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Toplanan fiber morfolojilerinde, büyük farklılıklar olduğu bildirilmiştir [38], [60].

Başarılı bir elektrospinning işlemi için kritik olan başka bir deneysel değişken olan çözücü özellikleri yukarıda da bahsedildiği gibi, dielektrik sabiti, buhar basıncı, çok çeşitli çözücünün karışabilirliği ve viskozitesi gibi çözücü özelliklerine odaklanır. Elektrospinning işleminde genel olarak, orta derecede buhar basıncına veya uçucu davranışa sahip bir çözücü sistem, çözücünün damlacıkların iğne ucundan toplayıcıya uçuşu sırasında buharlaşacağı şekilde seçilir. Çözücü düşük buhar basıncına sahip olduğunda, toplayıcı plakadaki elektrospinning damlacıkları agregat oluşturmak için yüklenirken, aşırı yüksek buhar basıncına sahip çözücüler, sistemde istenmeyen parçacık morfolojisine yol açar ve parçacıkların ince damlacıklara ayrılmasından önce buharlaşır. Çözücü viskozitesi, elektrospinning partiküllerinin pürüzsüz yüzey morfolojisine sahip üretilmesi için bir başka önemli parametredir. Eğer çözücü oldukça uçucu ve/veya viskoz ise, çözücü partiküllerin toplayıcıya doğru uçuşu sırasında buharlaşırken, polimerin yüzeyden parçacık çekirdeğine doğru yayılmasını engeller. Rekabet eden polimer yüzey difüzyonu ve çözücü buharlaşma olgusu, Peclet numarası ile temsil edilir [48]. Yüzey gerilimi, partiküllerin boyutunu ve morfolojisini belirleyebilen ve polimer konsantrasyonu ve çözelti viskozitesi ile yakından ilişkili bir başka faktördür. Polimer konsantrasyonunda artışla birlikte, hem viskozite hem de yüzey gerilimi artar, bu da yüzey gerilimini aşmak ve çözeltiyi ince damlacıklara bölmek için büyük bir voltaj uygulanmasını gerektirir. Küresel partikül üretimi için düşük viskoziteli seyreltik bir polimer çözeltisi önerilir [48]. Küçük boyutlu parçacıkların üretimi için bir başka önemli parametre çözücü iletkenliği veya dielektrik sabitidir. Damlacık boyutunu çözücünün dielektrik sabiti ile ilişkilendiren ölçeklendirme yasalarına göre, daha küçük boyutlu parçacıkların imalatı için daha yüksek iletkenliğe sahip bir çözücü sistemi gereklidir [61]. Yukarıda bahsedilen çözücü parametrelerinin tümü, partiküllerin morfolojisini ve boyutunu belirler. Daha da önemlisi, ilaç salınımlarında çözücü seçimi, polimerik bir taşıyıcıda ve salma kinetiğinde ilaç kapsüllemesi için

kritik öneme sahiptir. Hem ilaç hem de taşıyıcı tek bir çözücü içinde çözüldüğü zaman, tek eksenli elektrospreying ile ilaç kapsüllemesi mümkündür [31].

2.2.3 Proses Koşulları

Elektrospinleme/elektrospreyleme işlemini etkileyen diğer önemli parametreler voltaj, iğneden kollektöre olan mesafe, hacimsel besleme hızı, iğne çapı ve ayrıca sıcaklık, nem ve atmosferik basınç olarak sıralanabilir.

2.2.3.1 Voltaj

Elektrospinleme işleminde polimer çözeltisine yüksek gerilim uygulanması, nozül ile kollektör arasındaki elektrik alan kuvvetini ve dolayısıyla çekme kuvvetini kontrol eder. Solüsyona elektrik verildikten sonra harici elektrik alanı, solüsyondaki elektrostatik kuvvet, solüsyonun yüzey gerilimini aştığında elektrospinleme işlemini başlatır. Çözeltinin besleme hızına bağlı olarak, kararlı bir Taylor konisinin oluşması için yüksek bir voltaj gerekli olabilmektedir. Yüzey gerilimi ve elektrik kuvveti arasındaki denge, iğne ucundaki polimer çözeltisinin ilk koni şeklinin belirlenmesinde kritik rol oynar [57]. Voltajı arttıkça, tekli jetin uzunluğu hafifçe düşme eğilimindedir ve Taylor konisinin tepe açısı artar. Uygulanan voltaj daha yüksekse, polimerin daha fazla miktarda şarj olması, jetin daha fazla hızlanmasına neden olur ve iğnenin ucundan daha fazla miktarda çözelti çekilir. Bu, daha küçük ve daha az kararlı bir Taylor konisine neden olabilir [62].

Viskozite arttıkça, jeti zayıflatmak ve fiberler oluşturmak için ve hem yüzey gerilimi hem de viskoelastik kuvvetin üstesinden gelmek için daha fazla kuvvet gerekmektedir. Genel olarak, daha yüksek bir elektrostatik kuvvetin ve damlacıkların daha fazla ayrılabilirliğinin, uygulanan yüksek voltajın sonucu olduğu kabul edilir; bu durum fiberlerin ortalama çaplarında bir düşüşe yol açar [38].

Lin vd. (2008) uygulanan voltajın ve toplayıcıya olan mesafenin elde edilen fiber çapı üzerindeki etkisini açıklamıştır. Ortalama fiber çapının, uygulanan voltajdaki ilk artıştan sonra minimum bir değere ulaştığını ve ardından uygulanan voltaj arttıkça daha büyük hale geldiğini belirtmişlerdir [63]. Bu eğilim, voltaj arttıkça fiber oluşturmak için kullanılabilen daha kısa deformasyon süresine bağlanmıştır. Bu, elektrospinleme sırasında sıklıkla “uçuş süresi” olarak adlandırılır [61].

2.2.3.2 Akış Hızı

Polimer çözeltisinin akış hızı, elektrospinning sırasında iğne ucunda mevcut çözelti miktarını belirler. Belirli bir elektrik alanındaki akış hızındaki herhangi bir değişikliğin, fiber morfolojisini büyük ölçüde etkilemesi beklenen bir durumdur. İğne ucunda askıda bırakılan damlacık büyük olduğunda ve yüksek bir besleme hızı olduğunda, fiber toplanmadan önce uzaklaştırılacak büyük bir çözücü hacmi vardır ve jetin geçiş halindeki hızı, çözücü buharlaşma zamanının sınırlı olduğunu gösterir. Bu durum, toplanan fiberler arasında büyük boncuklara ve kaynaşmış bağlantılara neden olabilir [57]. Düşük akış hızları solvent buharlaşması için daha fazla zaman sağlar, böylece boncuk oluşumu azaltılabilir. Fiberlerdeki ortalama gözenek boyutunun, polimer akış hızı arttıkça arttığı da gözlenmiştir [38].

2.2.3.3 İğne Çapı

Spinning olarak bir iğne kullanan elektrospinning sistemleri durumunda, iğnenin iç çapı veya pipet deliği işlemi etkileyebilmektedir. İğne çapı arttıkça, iğnenin ucunda tıkanma meydana gelebilir. Bu, yüzey gerilimi etkilerinin bir sonucudur. İğne çapını azaltarak damlacık yarıçapının düşürülmesi, damlacıkların yüzey gerilimini artırır. Elektrostatik alan kuvvetinin sabit olduğu varsayıldığında, jetin başlangıçtaki ivmelenmesi artan polimer yüzey gerilimi ile azalır ve dolayısıyla ortalama hız düşer. Etkili bir şekilde, bu durum, iğne ucundan toplayıcıya jet uçuş zamanının arttığı anlamına gelir. Bu, çözücü buharlaşma, jet zayıflaması ve ayrılma süresini artırır. Sonuç olarak, küçük çaplı bir iğne kullanılarak daha küçük çaplı ve daha dar boyut dağılımlı fiberler elde edilebilir. Bununla birlikte, deliğin çapı çok küçükse, çözeltinin yüzey gerilimine bağlı olarak polimer damlasının oluşturulması zor olabilir [64].

2.2.3.4 Toplayıcı Plaka (Kollektör) Uzaklığı

Polimer jetinin uzaması, Taylor konisinin olduğu iğne ucu ile toplayıcı arasında gerçekleşir. Beklenebileceği gibi, mesafenin jet uçuş süresi ve elektrostatik alan şiddeti üzerinde doğrudan bir etkisi vardır. Fiberin yetersiz şekilde kurutulması, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki yetersiz mesafe ile ilişkilendirilir. Mesafenin artırılması, boncuk oluşumunu ve ortalama fiber çapını azaltma eğiliminde olan daha uzun uçuş süreleri ve çözücü buharlaşma süreleri ile sonuçlanır [38]. Bununla

birlikte, sabit bir voltajda, mesafedeki bir artış elektrostatik alan kuvvetinin azalmasına ve jet yarılmasının ve zayıflamasının azalmasına katkıda bulunur. Bu nedenle, mesafe sıfırdan arttıkça, ortalama fiber çapı mesafe daha da artmadan önce minimum bir değere ulaşmaktadır [63]. Mesafeyi düşürmenin etkisinin, voltajın arttırılması ile fiber morfolojisi ve fiber çapı üzerinde benzer bir etkiye sahip olduğu iddia edilebilir. Ying, Zhidong, Qiang ve Zhicheng (2006), ortam neminin düşük olması durumunda, mesafenin artırılmasının, daha uzun mesafelerde daha fazla çözücü buharlaştıkça, fiber çapında bir azalmaya yol açabileceğini bildirmiştir. Tersine, ortam nemi yüksek olduğunda, artan mesafe buharlaşma hızını arttırmaz, ancak sadece alan gücünü azaltır. Topraklanmış toplayıcı için seçilen malzeme tipi, elektrospindleme işlemi sırasında oluşan yüzey yükü derecesini etkiler [65].

Bununla birlikte partiküllerin toplanma yöntemi partiküllerin son halini ve morfolojisini etkileyebilir. Genel olarak, elektrospreying yöntemi ile üretilen partiküller bir alüminyum folyo veya herhangi bir metalik topraklı kollektör üzerinde toplanır. Bu durumda, parçacıklar toplanır veya birbirine yapışır ve ince filmler oluşturur. Partikülleri dağıtmak için, parçacıklar bazen etanol veya su-etanol karışımı veya diğer sulu tamponlar gibi bir çözücü sistemde toplanır [31], [48], [61].

2.2.3.5 Ortam Koşulları

Ortam parametrelerinin, özellikle nem ve sıcaklığın, fiber/partikül morfolojisini ve elektrospindleme/elektrospreyleme işleminin verimliliğini etkilediği düşünülmektedir. Bunun nedeni, solvent buharlaşması ile sıcaklık arasında ve ayrıca solventin iletkenliği ile sıcaklık arasında doğrudan bir ilişki bulunmasıdır. Her ikisi de polimer çözeltisinin elektrospinlenebilirlik kabiliyetini etkileyebilmektedir. Ayrıca, polimer çözeltisinin polimer viskozitesi ve yüzey gerilimi de sıcaklıktan etkilenmektedir [38]. De Vrieze vd. (2009) fiberlerin ortalama fiber çapının nemden etkilendiğini ancak eğilimlerin genelleştirilemediğini göstermiştir [66]. Elektrospinlenmiş selüloz asetat fiberlerinde, nemin artmasıyla çapta bir artış gözlenirken, poli (vinilpirrolidon) için çapta bir azalma olmuştur. Artan nemin gözenek çapını ve fiberlerde gözenek büyüklüğü dağılımını etkileyebileceği de öne sürülmüştür. Demir vd. (2002), fiber çaplarının sıcaklıkla tekdüzeliklerinde farklılıklar olduğunu bildirmiştir [54].

Elektrospreying işlemini etkileyen parametrelerin etkileri göz önüne alınarak parameter etkileri ve bu parametrelerin hangi sorunlara yol açabildiği Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Algal biyoaktif maddelerin enkapsülasyonu, diğer kaynaklardan elde edilen biyoaktif maddelerin enkapsülasyonuna kıyasla nispeten yeni bir yaklaşımdır. Tablo 2.2’de farklı proseslerle ve farklı materyallerle gerçekleştirilen algal biyoaktif maddelerin enkapsülasyonuna yönelik çalışmalar verilmiştir. *Sargassum sp.*, *Haematococcus pluvialis*, *Phormidium valderianum* ve ticari algal yağlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda dondurup kurutma, spreyci kurutma, emülsiyon, süperkritik yöntem gibi metotlar kullanılmıştır [67]–[72].

Tablo 2. 1 Elektrospreying işleminde partiküllerin boyutlarını ve morfolojilerini etkileyen parametreler [40]

Parametreler	Etki	Sorun
Akış hızı	-Daha yüksek akış hızları artan partikül büyüklüğü ve porozite ile ilişkilendirilir. -Çok düşük akış hızları parçacık yüzeyinde daha fazla deformasyonla ilişkilendirilir.	-Gönderilen sıvının yetersiz akış hızı, damlacıkların konik şeklini muhafaza edememesine neden olabilir, lif ya da parçacıklarda hatalara yol açabilir.
Toplayıcı plaka uzaklığı	-Mesafenin arttırılması, elektrospreyle partiküllerin çapının azalmasına ve boncuk oluşum eğiliminde bir artışa neden olabilir.	-Yetersiz çalışma mesafesi, solvent uygun şekilde buharlaşmadığından fiber/toz birikmesine neden olabilir.
Voltaj	-Alan kuvvetinin arttırılması partikül boyutunu önemli ölçüde azaltır. -Uygulanan hatalı voltaj nedeniyle boncuklu liflerin boyutunda artış olabilir.	-Yetersiz voltaj, sıvının yüzey gerilimini aşması için yeterli değildir.
Polimer konsantrasyonu	-Polimer konsantrasyonu arttıkça partikül çapı artmaya devam eder.	-Artan konsantrasyon, sıvının viskozitesinde ve yüzey geriliminde artışa ve iğne ucunda dengesiz jet oluşumuna neden olur.
Polimer türü	-Daha büyük partiküllerin molekül ağırlığı daha yüksek olan polimerlerle oluşması daha olasıdır.	-Moleküler ağırlık arttıkça, polimerin viskozitesi de artar.
Çözücü özellikleri	-Daha yüksek yüzey gerilimi, daha büyük çaplara sahip liflerin/	-Çok düşük buharlaşma ve daha

	parçacıkların oluşumuna yol açabilirken, daha düşük yüzey gerilimi, daha yüksek püskürtme olasılıkları ile artan kararsızlığa neden olur. -Yetersiz uçuculuk, şerit benzeri liflerin oluşumuna veya liflerin füzyonuna yol açar ve çok yüksek uçuculuk, yüzey morfolojisi ve porozitesinin yanlış olmasına yol açan liflerin ve partiküllerin çapının artmasına neden olur. -Solventin karışabilirliği lif ve partiküllerde kusurlara yol açabilir. -Çözücünün düşük iletkenliği, daha büyük çaplı parçacıkların oluşumuna yol açabilir.	yüksek çözücü tutma, artan fiber çaplarına yol açarken, çok yüksek buharlaşma oranları hatalı yüzey morfolojisi ve gözenekliliğe neden olmaktadır. -Birincil çözeltiye ikincil çözücünün eklenmesi, sadece gerekli olan voltajı değiştirmez, aynı zamanda buharlaşma hızını da etkiler. -Düşük iletkenlik kararlı damlacık dağılımı için yetersizdir.
Nem	-Haznenin nemindeki artış, fiber yüzeyinde dairesel şekilli gözeneklerin oluşmasıyla gözeneklerin yoğunluğunun ve derinliğinin artmasına neden olur; genellikle nem ile gözeneklerin derinliği artar.	-
Sıcaklık	-Sıcaklıktaki artış, elektrospreying/elektrospinning için tercih edilebilir bir parametredir.	-Sıcaklık moleküler mobilitayı arttırarak iletkenliği arttırır, viskoziteyi ve yüzey gerilimini azaltır.

Tablo 2. 2 Biyoaktif maddelerin elektrospinning ve elektrospreying yöntemi ile enkapsülasyonu çalışmalarına ait örnekler

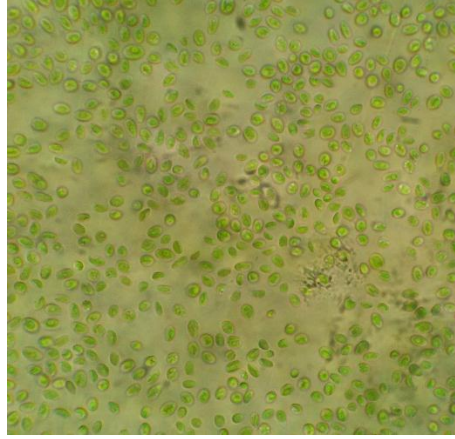
Enkapsüle edilmiş içerik	Duvar materyali	Boyut aralığı	Amaç	Kaynaklar
β-karoten	Zein prolamin	1,140 nm	UV ışınlarına karşı stabiliteyi arttırmak	[73]
β-karoten yüklü Nanolipozomlar	PVA, PEO	407.9 $\pm$ 138.6 nm (PVA), 379.7 $\pm$ 118.8 nm (PEO)	UV ışınlarına karşı stabiliteyi arttırmak	[74]
ω-3 yağ asitleri bakımından zengin balık yağı	Zein	190-500 nm	Balık yağının oksidatif stabilitesini arttırmak	[75]
Gallik asit	Zein	327-387 nm	Termal kararlılığı ve antioksidan aktiviteyi saptamak	[76]
α-linolenik asit	Jelatin, WPC ve soya proteini izolatu	Nano, sub ikro ve mikrokapsüller elde edildi	Termal maruziyet altında oksidatif stabiliteyi arttırmak	[77]
β-karoten	WPC	<100 nm	Fotoksite karşı β -karoten içeren WPC kapsüllerinin stabilitesini arttırmak	[78]
DHA	Zein	500-700 nm	Kararlılığı artırma	[79]
Folik asit	WPC ve ticari dayanıklı nişasta	Nano, submikro ve mikrokapsüller elde edildi	Farklı koşullar altında folik asit stabilitesini arttırmak	[80]

3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Hammaddeler ve Cihazlar

3.1.1 Mikroalgler ve Siyanobakteriler

Deneysel çalışmada incelenmek üzere Göttingen Üniversitesi SAG kültür koleksiyonundan (Almanya) temin edilen *Botryococcus braunii* (30.81) mikroalgi ve *Microcystis aeruginosa* (1450-1) siyanobakterisi seçilmiştir. Ayrıca Soley Biyoteknoloji Enstitüsü'nden (ABD) temin edilen *Chlorella protothecoides* türünden elde edilen mikroalg yağı kullanılmıştır.

Botryococcus braunii, 6-11 µm çaplarında, yeşil algler grubunun tek hücreli, yavaş büyüyen fotosentetik mikroalgi olup büyük miktarda biyokütle, yağ, karbonhidrat ve diğer biyoaktif molekülleri üretmektedir [81]. *B. braunii* tatlı sularda, hafif tuzlu göllerde, su depolarında ve havuzlarda yaygın olarak bulunmaktadır. *B. braunii* bazı kültür koşullarında daha fazla hidrokarbon biriktirmektedir. Bu hidrokarbonlar özelliklerine göre A-sınıfı n-alkadienler (C25-C31), B-sınıfı öz karbonlar (C30-C37) ve L-sınıfı tetraterpendir (C40). Yüksek lipid içeriğine sahip *B. braunii*, sterol, triasetilgliserol ve yağ asitlerini sentezlemektedir. Hidrokarbonların dışında, *B. braunii* ekzopolisakkarit ve karotenoid gibi biyoaktif molekülleri üretmektedir (Tablo 3.1) [82]–[84]. Şekil 3.1'de *B. braunii* mikroalgine ait mikroskop görüntüsü verilmiştir.



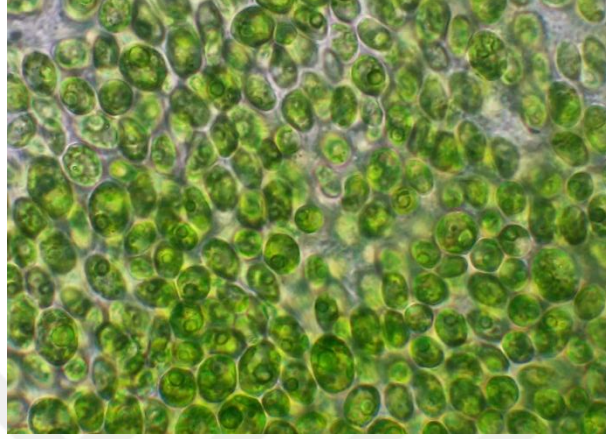
Şekil 3. 1 *B. braunii* mikroalgine ait mikroskop görüntüsü (100x)

Tablo 3. 1 *B. braunii* mikroalginde bulunan biyoaktif moleküller ve endüstriyel uygulamaları

Biyoaktif moleküller	Endüstriyel Uygulamaları
Hidrokarbonlar	Yakıt, elektrik, doğal gaz, sıvı yakıt, dizel
Alkanlar	Polimerler, ilaçlar, kozmetik ürünler, deterjanlar
Yağ asitleri	Nutrasötik, farnasötik uygulamalar, genomik çalışmalar
Ekzopolisakkaritler	Gıda, boya, tekstil, kaplama, stabilizatör, kalınlaştırıcı
Karotenoidler	Antioksidant özellikler, antikanser aktiviteler, nutrasötik ve farmasötik uygulamalar

Microcystis aeruginosa, tek hücreli, planktonik bir tatlısu siyanobakterisidir. Şekil 3.2’de de görülebileceği gibi hücre içindeki gaz veziküllerinin varlığı, hücrelerin su üzerinde kalabilmesini sağlamaktadır. Böylece durgun sularda koloniler su yüzeyinde birikebilir ve algal çoğalma gerçekleşir [85]. *M. aeruginosa*’nın hücre boyutları 2.61- 5.40 µm çaplarında değişmektedir. *M. aeruginosa* ışığa bağlı ve

aerobik bir siyanobakteri olmakla birlikte, belirli periyotlarda karanlık ve anaerobik şartlarda yaşayabilir [86]. *M. aeruginosa* microcystin gibi nörotoksin maddeleri üretebilmektedir. Bununla birlikte ekstraktları antimikrobiyal, antifungal, sitotoksik ve immun-baskılayıcı özellik gösteren biyoaktif maddeler içermektedir [87].



Şekil 3. 2 *M. aeruginosa* siyanobakterisine ait mikroskop görüntüsü (100x)

Chlorella protothecoides farklı kültür koşullarında fotototropik veya heterotrofik olarak büyüeyebilen bir mikroalgdir. Soley Biyoteknoloji Enstitüsü'nde heterotrofik olarak yani asetat, glikoz veya karbon kaynağı olarak organik bileşikler eklenen kültür ortamında *C. protothecoides* mikroalginin yetiştirilmesi ile, yüksek biyokütle ve lipid içeriği elde edilmektedir [88]. *C. protothecoides* biyoteknolojik ve biyoyakıt çalışmalarında kullanılmakla beraber su ürünleri yemleri, insan gıdası takviyeleri ve farmasötikler gibi birçok ürünün önemli bir kaynağı haline gelmiştir [89].

3.1.2 Makroalg

Deneyisel çalışmada alg hammaddesi olarak *Ulva lactuca* türü yeşil makroalgler (Şekil 3.3) ve ticari olarak temin edilen kahverengi makroalgler (Şekil 3.4) kullanılmıştır. *Ulva lactuca*, *Ulva* cinsine ait yeşil makroalglerden birisidir. Yenilebilir olmakla birlikte deniz marulu olarak da bilinmektedir. Taş ya da diğer maddelere tutunarak büyürler ancak tutundukları yerden kolayca ayrılıp dalgalı bir ortamda da büyümelerini sürdürürler. *Ulva lactuca*'nın toplam karbonhidrat içeriği biyokütlenin %55-60'ını oluşturmaktadır [90]–[92]. Ancak makroalglerin yapısal bileşimleri mevsimsel olarak değişebilmektedir. Yapılan analizler sonucunda

toplam karbonhidrat miktarı *Ulva* türü için kuru ağırlığın %63'üne, kahverengi makroalg için ise %65'ine denk gelmektedir.



Şekil 3. 3 Marmara Denizi kıyılarından toplanmış *Ulva lactuca* makroalgleri



Şekil 3. 4 Ticari olarak temin edilen kahverengi makroalg (*Sargassum sp.*)

3.1.3 Kimyasal Maddeler

Deneyssel çalışmada mikroalglerin yetiştirilmesi için BG-11 besiyeri kullanılmıştır. BG-11 besiyeri için NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sitrik Asit, Amonyum ferrik sitrat, Na_2EDTA , Na_2CO_3 ve iz elementler için H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ kimyasalları kullanılmıştır. Karbonhidrat tayini için fenol, H_2SO_4 ve D-Glikoz, protein analizi için NaOH , Na_2CO_3 , K-Na-tartarat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Folin-Ciocalteau ve BSA standart çözeltisi kullanılmıştır. Mikroalglerin ekstraksiyonu aşamasında etanol, aseton ve dimetil sülfoksit kullanılmıştır. Aljinat ekstraksiyonunda kullanılmak üzere %37'lik HCl , Na_2CO_3 , CaCl_2 ve etanol kullanılmıştır. Enkapsülasyon çalışmalarında ise polivinil alkol,

Tween 20 ve sodyum aljinat kullanılmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Cihazlar

Mikroalglerin yetiştirilmesi aşamasında Wisd Laboratory Instrument marka çalkalayıcı Kerman marka inkübatör, alglerin kurutulması aşamasında TEST marka etüv, absorbands tayinleri için PG Instruments T60 model UV spektrofotometre, yağ asitlerinin belirlenmesi için YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Hammaddelerin termogravimetrik analizleri, termogravimetrik analizör (TA Instrument, SDT Q600) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ham maddelerin fonksiyonel grupları FTIR ekipmanı (Bruker, Alpha) ile belirlenmiştir. Elektrospreying çalışmaları laboratuvar ölçekli elektrospreying/elektrospreying cihazında (Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Nano Fiber Electrospreying Unit model No:HO-NFES-0434) gerçekleştirilmiştir.

3.2 Mikroalglerin Yetiştirilmesi

B. braunii mikroalgi ve *M. aeruginosa* siyanobakterisinin üretimi için BG-11 besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri tatlı su mavi yeşil algleri için genel bir ortamdır. Prosedüre uygun olarak 829 ml saf suya tablolardaki bileşikler ilave edilip, 1 M NaOH ve HCl ile pH değeri 7.1' e optimize edilmiştir (Tablo 3.2 ve 3.3). Katı ortam için de 15 g/l agar ilave edilmiştir [93]. Hazırlanan besiyerleri 1 atm 121°C'de 15 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiş, ardından petri kaplarına dökülerek ekim için hazır hale getirilmiştir. Ekimi yapılan mikroalgler 15-20 gün süresi içerisinde büyümeye bırakılmıştır.

Mikroalg yetiştirme deneyleri Box-Behnken istatistiksel modeline göre gerçekleştirilmiştir. pH, sıcaklık, ışık, azot kaynağı, tuzluluk ve iz elementler gibi mikroalglerin gelişimini etkileyen pek çok çevresel ve kimyasal etken bulunmaktadır. Mikroalglerin lipid içeriğini en çok etkileyen parametreler ise sıcaklık, azot stresi ve ışıktır [18], [19]. Bu sebeple Box-Behnken modeline göre 3 faktörlü (azot miktarı, sıcaklık ve aydınlanma süresi) deney tasarımı kullanılmıştır. Deney dizaynında 500 ml'lik besiyerleri için azot miktarı 0.1875, 0.75 ve 1,3125 g aralığında; sıcaklık 15°C, 22,5°C ve 30°C ve aydınlanma süresi, 12:12, 14:10 ve 16:8

sa aralığında değiştirilmiştir (Tablo 3.4). Gerçekleştirilen deneyler ikişer kez tekrarlanmıştır.

Deneyler sonucunda belirlenen optimum koşullara göre çalışmanın ileriki aşamalarında kullanılmak üzere daha fazla mikroalg biyokütlesi eldesi için mikroalgler %10 aşılama ile laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde yetiştirilmeye devam edilmiştir.

Tablo 3. 2 BG 11 besiyeri içeriği [93]

mL	Stok solüsyonu	g/1000 H₂O
100	NaNO ₃	15.0
10	K ₂ HPO ₄	4.0
10	MgSO ₄ 7H ₂ O	7.5
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	3.6
10	Sitrik Asit	0.6
10	Amonyum ferrik sitrat	0.6
10	Na ₂ EDTA	0.1
10	NA ₂ CO ₃	2.0
1	İz elementi solüsyonu	-

Tablo 3. 3 BG 11 iz elementi solüsyonu içeriği [93]

İz elementi solüsyonu	
Bileşik	Miktar (g)
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.0494

Tablo 3. 4 Farklı koşullar altında üretilmiş olan mikroalglerin deney parametreleri

Değişkenler	Faktörler	Seviye		
	X	Düşük(-1)	Orta(0)	Yüksek(+1)
NaNO₃ miktarı (gr)	X ₁	0.1875	0.75	1,3125
Sıcaklık (°C)	X ₂	15	22,5	30
Aydınlatma döngüsü (sa)	X ₃	12:12	14:10	16:8

3.3 Analitik Ölçümler

3.3.1 Optik Yoğunluk Ölçümü, Büyüme Kinetiği ve Ölçek Büyütme

Optimum üretim koşulları belirlenen mikroalglerin laboratuvar ölçekli üretimleri boyunca optik yoğunluklarının ve büyüme hızları ile ölüm sabitlerinin belirlenmesinde yapılan spektrofotometrik ölçümler PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak 680 nm’de absorbansları alınarak gerçekleştirilmiştir.

Biyoteknolojik endüstriyel uygulamalarının artması ile mikrobiyal büyüme, ürün oluşumu ve substrat tüketimi için çeşitli kinetik modeller üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Kinetik modelleme prosesin kontrolünü sağlaması, proses maliyetini düşürmesi ve ürün kalitesini arttırması açısından üretim proseslerinde önemli bir adımı oluşturmaktadır. Bu nedenle çalışmanın kinetik açıdan değerlendirilmesi için aşağıda belirtilen kinetik model denklemleri kullanılmıştır.

Mikroorganizma büyüme hızı aşağıdaki formül ile ifade edilir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1)$$

Burada;

t: Zaman (saat)

μ : Spesifik gelişme hızı (saat^{-1})

X : Biyokütle miktarı (g/L)’dır.

Biyokütlenin zamana bağlı değişimi,

logaritmik fazda, $dX/dt = \mu X$ (3.2)

durgun fazda, $dX/dt = 0$ (3.3)

ve ölüm fazında, $dX/dt = -kX$ (3.4)

şeklindedir.

Bu eşitliklerde:

k= Spesifik ölüm hızı sabiti (saat^{-1}) ve

X= Toplam biyokütle miktarı (g/L)'dir.

Fotobiyoreaktörlerin tasarımı ve çalışma koşulları, mikroalg biyoaktif bileşikleri elde etmek amacıyla uygun maliyetli mikroalg üretimi için oldukça önemli kriterlerdir. Akışkan özellikleri, sıvı ve gaz hızı ve biyoreaktörün geometrisi ve tipi, bir fotobiyoreaktörde kütle transfer hızlarını etkileyen önemli parametrelerdir. Kütle transferine bağlı olarak, mikroalg kültürünün üretkenliği olumsuz yönde etkilenebilir. Bu sebeple bazı hidrodinamik karakteristiklerin ve kütle transfer katsayılarının belirlenmesi ve laboratuvar ölçekli fotobiyoreaktörlerde mikroalg yetiştirilmesinde fotobiyoreaktörün karıştırma veya havalandırma etkisinden doğacak olan kesme geriliminin etkisinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Mikroalg hücreleri kesme gerilimine karşı duyarlıdır. Mikroalgler Eddy (Girdap) büyüklüğünün hücre büyüklüğüne yaklaştığı türbülanslı kayma alanlarına maruz kaldıklarında, mikroalg hücreleri kendilerine zarar verebilecek bir dönme hareketine maruz kalabilirler. Bununla birlikte aşırı kesme gerilimi altında artan hücre ölümü gözlenebilir. Çalışmada optimum koşullarda büyük çaplı üretilecek olan mikroalgler öncelikle, 500 ml erlenmayerlere ekilip, daha sonra kültür, çalışma hacminin 14 L olduğu 20 L'lik fotobiyoreaktöre transfer edilmiştir (Şekil 3.5). Fotobiyoreaktör sürekli kabarcıklanma sağlayan bir hava pompası ile havalandırılmıştır ve hesaplanan gaz hızı 3.71 m/s'dir. Aşağıda verilen eşitlikler doğrultusunda kesme gerilimi ve kütle transferi karakteristikleri incelenmiştir [94], [95].

$$\lambda = \left(\frac{\mu_L}{\rho_L} \right)^{\frac{3}{4}} \varepsilon^{\frac{-1}{4}} \quad (3.5)$$

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho_L V_L} = \frac{1.94 n^3 d_s^4}{V_L^{2/3} Re^{0.2}} \quad (3.6)$$

$$Re = \frac{\rho_L n d_s^2}{\mu_L} \quad (3.7)$$

$$\tau_t = 0.0676 \left(\frac{d_p}{\lambda} \right)^2 (\rho_L \mu_L \varepsilon)^{0.5} \quad (3.8)$$

$$\gamma = \frac{\tau_t}{\mu_L} \quad (3.9)$$

λ : türbülanslı girdap uzunluğu ölçeği

ϵ : Enerji tüketim oranı

μ : süspansiyonun viskozitesi

ρ : süspansiyonun yoğunluğu

P: kütle birimi başına güç girişi

n: dönme hızı,

d_s : şişe çapı

d_p : hücre çapı

V_L : sıvı hacmi

Re: Reynolds numarası

τ : ortalama kayma gerilmesi

γ : kayma oranı

Gaz hold up (ϵ), hacimsel genleşme yöntemiyle hesaplanmıştır:

$$\epsilon = \frac{H_G - H_L}{H_L} \quad (3.10)$$

buradaki H_L ve H_G , fotobiyoreaktördeki sırasıyla sıvı ve gaz + sıvı yüksekliğidir.

$$\ln \left(\frac{C^* - C_0}{C^* - C} \right) = k_L a (t - t_0) \quad (3.11)$$

Aşağıdaki eşitlik kullanılarak grafiğin eğiminden $k_L a$ değeri hesaplanmaktadır. C^* çözülmüş oksijen (DO) doyumluk konsantrasyonu, C_0 t_0 'daki DO konsantrasyonu C ise t zamanında DO konsantrasyonuna karşılık gelmektedir. Çözülmüş oksijen konsantrasyonları Hach Lange marka multimetrenin çözülmüş oksijen probu ile belirlenmiştir.



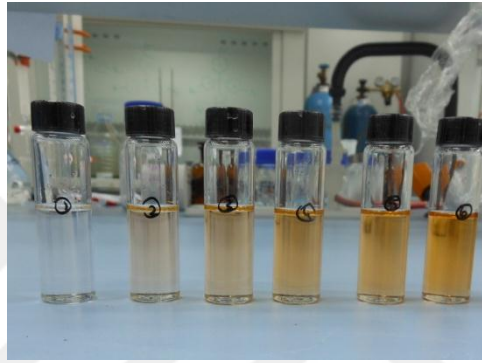
Şekil 3. 5 20 L fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretim

3.3.2 Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Mikroalglerin toplam karbonhidrat içeriği fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Fenol reaktifi %80 (w/w) olacak şekilde 20 g distile suya 80 g fenol eklenmesi ile hazırlanmıştır. Analiz için standart olarak glikoz kullanılmıştır. Standart eğrisini oluşturmak için tüplerin içerisinde Tablo 3.5'te verilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış glikoz çözeltilerine 0.05 ml fenol reaktifi eklenmiş ardından 5 ml H_2SO_4 ilave edilmiştir (Şekil 3.6) [96]. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen tüplerden alınan örneklerin PG Instruments T60 model UV spektrofotometrede 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen verilerle standart eğri grafiği oluşturularak mikroalglerin içindeki toplam karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır.

Tablo 3. 5 Standart glukoz konsantrasyon değerleri

	μg glukoz/ml					
	0	10	20	30	40	50
Glukoz stok çözeltisi (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Saf su (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0



Şekil 3. 6 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnekler

3.3.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarlarını belirlemek amacıyla Modifiye Lowry Yöntemi kullanılmıştır. Deneyde belirtilen miktarlarda standart BSA çözeltisinden, cam deney tüplerine konulup, distile su ve 1 N’lik NaOH çözeltisinden ilave edildiğinde, 70-140 mg protein/L aralığında standartlar elde edilmiştir. Kültürlerden alınan örneklere 1 N NaOH ilave edilip 5 dakika 100°C’lik su banyosunda bekletilmiş hemen ardından tüpler soğuk su banyosuna alınarak soğutulmuştur. Reaktif C ve D ilave edilip hızlıca vorteks ile karıştırılmış, 30 dakika oda sıcaklığında yapılan inkübasyon sonunda 750 nm’de absorbansları spektrofotometre ile okunmuştur. Tablo 3.6’da kullanılan standartlar ve reaktiflerin miktarları verilmiştir.

Protein analizinde kullanılan reaktif ve özeltiler:

- Reaktif A: %5’lik Na_2CO_3

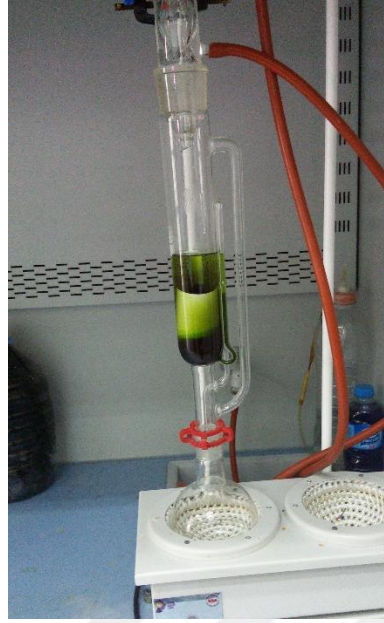
- Reaktif B: %1'lik K-Na-tartarat içerisinde %0,5'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (her zaman taze hazırlanarak, reaktifler ayrı ayrı çözülmüştür)
- Reaktif C: 50 mL Reaktif A + 2 mL Reaktif B
- Reaktif D: 1 N Folin-Ciocalteau (2 N Folin reaktifi 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır)
- NaOH (1 N)
- BSA (Bovine Serum Albumin) Standart Çözeltisi

Tablo 3. 6 Modifiye Lowry Yönteminde kullanılan standart ve reaktifler

ml	Kör	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Örnek
Standart BSA çözeltisi	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	-
Distile su	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	-
1 N NaOH	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Reaktif C	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Reaktif C	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

3.3.4 Yağ Miktarı ve Yağ Asitlerinin Belirlenmesi

Mikroalg örnekleri ezilerek toz haline getirilmiş ve çözücü olarak etanol kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır (Şekil 3.7). Bunun için numuneler %100'lük etanol çözücüsüyle (MERCK marka), 3 saat süreyle ekstraksiyona işlemine tabi tutulmuştur, ekstraksiyon işlemi toplamda 3 kere gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt etanolün uçması için evaporatörde vakum altında 78°C'de buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağ tartılarak miktarı tayin edilmiştir. Ekstrakt herhangi bir oksidasyon ihtimaline karşı kapalı ve karanlık ortamda saklanmıştır.



Şekil 3. 7 Mikroalglerin Soxhlet yöntemi ile ekstraksiyon işlemi

Mikroalg yağının içeriğinin belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Analizler YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi cihazında gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisi cihazı alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m ZB-FFAP kolonu içermektedir. Kolon sıcaklık programı 50°C ile başlayıp, 15°C/dk hızla 175°C'ye, ardından 5°C/dk hızla 230°C'ye çıkmaktadır. Enjektör sıcaklığı 230°C olup, akış hızı 1.8 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 280°C'de tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı kullanılmıştır. Metil heptadekonat (C17:0) iç standart olarak kullanılmış ve örnekler metil heptadekonat ve n-heptan ile karıştırılarak gaz kromatografisi için hazır hale getirilmiştir [17].

3.3.5 Klorofil- α ve β -Karoten Miktarının Belirlenmesi

Bir antioksidan olan β -karoten, zararlı serbest radikallerin fazlasını bertaraf edebilme özelliğine sahip yağda çözünen bir biyoaktif maddedir [97]. Yapılan çalışmalarda β -karoten takviyesinin tümör hücrelerini öldürme ve tümör nekroz faktörün akyuvar hücreleri tarafından salınımını arttırdığı bilinmektedir [98]. Bununla birlikte alınan β -karoten takviyesinin kanser oluşumunu engellemenin yanı sıra kardiyovasküler hastalıkları da önlediği bazı çalışmalarda belirtilmiştir [99]. Kim vd. tarafından yapılan bir çalışmada da β -karotenin otonom sinir sistemi tümörüne karşı kemoterapötik ajan olarak etki gösterdiği bildirilmiştir [100].

Önemli bir biyoaktif olan β -karoten ve klorofil a miktarlarını belirlemek amacıyla aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

5 ml örnek tüplere alınarak, santrifüjde çöktürme işlemi yapılmış, ardından üzerinde kalan fazla su dökülmüştür. Üzerine 5 ml aseton ile muamele edildikten sonra, ultrasonik banyoya konularak 5 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Elde edilen örnek, 50-60 °C suyun içerisinde 5 dakika süre ile bekletilmiş, ardından vortex yardımıyla 15 saniye karıştırma işlemi yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt tekrar santrifüj ile ayrılmıştır. Santrifüjden çıkan örneklerin üzerinde kalan sıvı, spektrofotometrede 666 nm ve 475 nm dalga boyunda okunmuş, aşağıda verilen formül ile klorofil- α ve β -karoten miktarı tespit edilmiştir [101], [102].

$$\text{Klorofil } \alpha \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 13,9 A_{666} \quad (3.12)$$

A 666 666 nm okunan absorbans (soğurma) değeri

$$\text{Karoten (}\mu\text{g/ml)} = 4,5 A_{475} \quad (3.13)$$

A 475 475 nm okunan absorbans değeri

3.3.6 FTIR Analizi

Mikroalg türlerinin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi ve enkapsülasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla, Thermoscientific Marka Nicolet 6700 model FTIR cihazı kullanılmış ve numunelerin 600-4000 cm^{-1} aralığında içerdiği fonksiyonel grupların adsorbans değerleri belirlenmiştir.

3.3.7 Kısa Analiz

Bu analiz ile numunelerin nem içeriği, uçucu madde içeriği, sabit karbon içeriği ve kül miktarı ASTM standartlarına göre belirlenmiştir. Analizleri yapılacak hammaddelerin etüvde kurutulup desikatörde bekletildikten sonra kısa analizleri TA Instrument marka SDT Q600 model termogravimetrik analiz cihazında gerçekleştirilecektir. Analizin prosedürü aşağıdaki gibidir:

- 1. Adım** : 0 – 5. Dk (5 dk) 110 °C'a 20 °C/dk hızla azot ortamında ısıtma
- 2. Adım** : 5 – 35. Dk (30 dk) 110 °C da azot ortamında bekleme
- 3. Adım** : 35 – 48. Dk (13 dk) 600 °C'a 40 °C/dk hızla azot ortamında ısıtma
- 4. Adım** : 48 – 55. Dk (7 dk) 600 °C da azot ortamında bekleme
- 5. Adım** : 55. dakikada hava ortamına geçiş
- 6. Adım** : 55 – 90. Dk (35 dk) 600 °C da hava ortamında bekleme

Bu deneyde 2. adım sonunda nem miktarı; 4. adım sonunda uçucu madde miktarı; 6. adım sonunda ise kül miktarı bulunmaktadır. Sabit karbon içeriği ise:

$$\% \text{ Sabit karbon} = 100 - (\text{Uçucu madde yüzdesi} + \text{kül yüzdesi}) \quad (3.14)$$

bağıntısıyla hesaplanmaktadır.

3.3.8 Mikroalgal Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Algal ekstraktların toplam antioksidan aktivitesi 1, 1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Brand-Williams ve ark. (1995) metoduna göre çalışılmıştır [103]. Metod ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımındaki absorbansın düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

DPPH radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$\text{DPPH Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.15)$$

A₀: Kontrolün absorbans değeri

A₁:Örnek veya standardın absorbans değeri

3.3.9 Mikroalgal Ekstraktların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

Mikroalg ekstraktların antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerine karşı tespit edilmiştir. 6 mm çapındaki disklere alg ekstraktları 30µl/petri ve 40µl/petri dozlarında otomatik pipet ile disk kağıtlarına emdirilmiştir. Bakteriler için nutrient agar besiyeri yüzeyine

eküvasyonla yayılan bakteri süspansiyonlarına alg ekstraktları emdirilmiş diskler yerleştirilip 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrasında disklerde oluşan inhibisyon zonları okunmuştur. Çalışmada *E.coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Bacillus cereus* RSKK 9637 ATCC 11778 bakterileri kullanılmıştır.

Nutrient Agar (NA) besiyerinde 37 °C'de 1 gece inkübe edilen bakteri suşlarından tek koloni alınarak 5 ml Nutrient Broth'a aşılanmıştır ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilen kültürler antibakteriyel etkinin tespit edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bakteri suşlarının saflaştırılıp çoğaltılmasında ve antibakteriyel etkinin belirlenmesinde Nutrient Agar (NA) kullanılmıştır.

3.3.10 XTT Testi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

XTT yöntemi, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. Renk oluşumu sonucunda artan absorbans değeri, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. XTT testi ile ek ajanlara veya hücre yıkama prosedürlerine ihtiyaç olmaması, yöntemin düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilecek duyarlılığa sahip olması, XTT yönteminin en önemli avantajlarından [104].

Çalışmada farklı hücre hatlarına 3 yağın farklı konsantrasyonları uygulanarak (3,5-2500 µg/ml aralığında) meydana getirdiği 24. saatlik sitotoksik etki değerlendirilmiştir.

Sitotoksisite deneylerinde L929, PC-3, SHSY-5Y ve AGS hücre hatları kullanılmıştır. Sıvı azotta saklanan hücreler 37°C'de çözündürülmüş ve 5 ml DMEM-F12 besiyeri (%10 FBS, 5 µg/ml penisilin-streptomisin ile desteklenmiş) içeren tüpe aktarılmıştır. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pelletteki hücreler Tripan mavisi ile boyanarak hemositometrik olarak sayılmıştır. Daha sonra besiyeri ile süspanse edilerek, steril 25T hücre kültür flasklarına aktarılmıştır. Flaska aktarılan hücreler 37°C'de % 5'lik karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler %80-90 konfluent olduğunda pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısaca, Tripsin-EDTA eklenen hücreler, etüvde 5 dakika bekletilmiş ve hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskobik olarak tespit edildikten sonra besiyeri ile süspanse edilmiştir. Santrifüj

sonrası Tripsin-EDTA uzaklaştırılmış ve hücre pelletinde sayım gerçekleştirilerek, hücreler sitotoksikite testinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

25T 'lik flasklara ekilen ve çoğalan hücrelerin tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden ayrılmasını takiben sayım yapılmış ve 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışması ve çoğalması için 24 saat inkübe edilmiş ve mikroskopik olarak incelendikten sonra sitotoksik etkinliği incelenecek yağlar farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir (n=3).

Yağ örnekleri hücrelere eklenmeden önce 0,45 µm'lik filtreden süzülerek steril edilip ve dilüsyonlar DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Madde eklenen 24 saat 37 °C'de %5'lik karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakılmış, daha sonra XTT testi uygulanmıştır. Kuyucuklardaki yağ içeren besiyerleri aspire edilerek, 100 µL 0.5 mg/mL 2,3-Bis- (2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid (XTT) çözeltisi (7.5 µg/mL Fenazin metosülfat ile) kuyucuklara ilave edilmiştir. Pleytler, 37 °C'de 4 saat daha inkübe edilmiş ve optik yoğunluk, çoklu plaka okuyucu ile 450 nm'de absorbansı ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.4 Makroalglerden Aljinat Eldesi

3.4.1 Makroalg Örneklerinin Hazırlanması

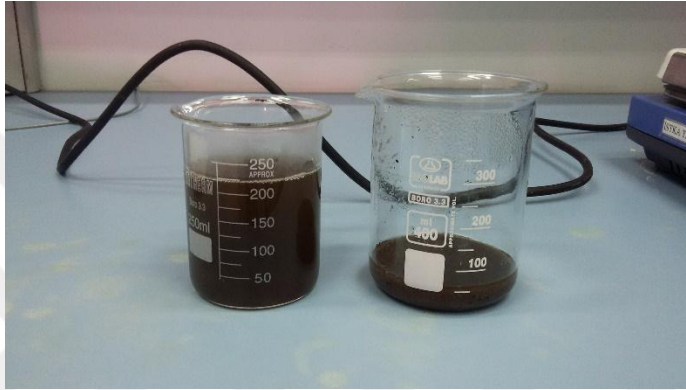
Makroalgler kum, kabuklu deniz canlıları ve diğer materyaller gibi safsızlıklardan arındırılmak için su ile yıkanmıştır. Yıkanmış algler daha sonra etüvde 70 °C'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutmanın ardından bir öğütücüden geçirilerek daha küçük boyutlar haline getirilmiştir.

3.4.2 Aljinat Ekstraksiyonu

Kuru makroalg örnekleri (10 g) 400 ml distile su ile nemlendirilmiş, ardından pH 4'e gelene kadar 0,1 N HCl çözeltisi eklenip, yüksek hızda karıştırılmıştır. Bu karıştırma oda sıcaklığında 15 dk süresince devam etmiş, elde edilen süpernatant uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.8-3.9). Bu ön muamele her seferinde 40, 25 ve 20 ml HCl eklenerek üç kez tekrarlanmıştır. Ardından makroalg örnekleri 250 ml, 1 N Na₂CO₃ solüsyonu ile (pH 11,5) iki saat boyunca 60°C'de karıştırılarak sodyum aljinat solüsyonu elde edilmiştir [105].



Şekil 3. 8 Ekstraksiyon öncesi hazırlanan makroalg örnekleri



Şekil 3. 9 Ön muamele sonrası supernatantı uzaklaştırılmış makroalg örnekleri

3.4.3 Saflaştırma Çalışmaları

Etanol, HCl ve CaCl_2 yolu olarak üç farklı saflaştırma işlemi, yukarıdaki işlem sırasında elde edilen sodyum aljinatın saflaştırılması amacıyla incelenmiştir.

Etanol yolunda, ekstraksiyon sonucu elde edilen sodyum aljinat çözeltisi 1:1 oranında olacak şekilde etanol ile karıştırılmış (Şekil 3.10), ardından çözünmeyen polimer etanol ile yıkanarak kurutulmuştur (Şekil 3.11) [105].

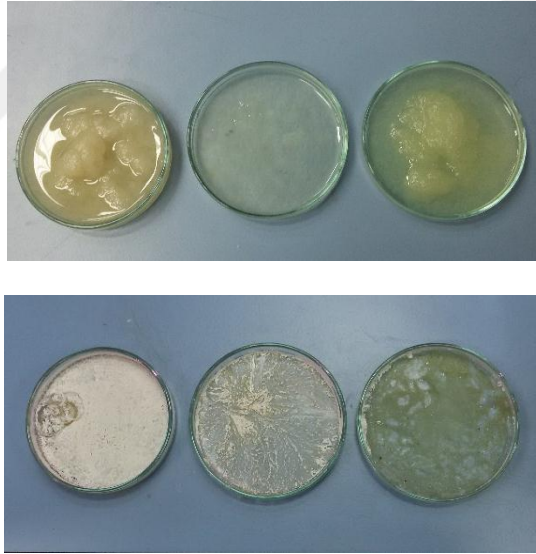
HCl yöntemi, ekstrakte edilmiş sodyum aljinat ve 250 ml, 1 N HCl bir saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır (pH 2). Çöken aljinik asit 100 ml distile su ve 150 ml 1 N Na_2CO_3 eklenerek ayrılmıştır. Çözelti bir saat oda sıcaklığında karıştırılarak çözünür formda sodyum aljinat elde edilmiştir. Ardından 1:1 hacimde etanol eklenerek etanol yöntemindeki yıkama ve kurutma aşamaları gerçekleştirilmiştir.

CaCl_2 yolunda, sodyum aljinatın sulu çözeltisi 1 M CaCl_2 (200 ml) ile çöktürülmüş, ve kalsiyum aljinat distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 150 ml distile su ve 1 N HCl

eklenip pH 2'ye getirilerek 3,5 sa boyunca karıştırılmıştır. Çözünmeyen materyal (aljinik asit) ayrılıp, 1,5 L, 0,05 N HCl ile yıkanmıştır.



Şekil 3. 10 Etanol yolu ile gerçekleştirilen saflaştırma aşaması



Şekil 3. 11 Saflaştırma ve kurutma sonrası elde edilen aljinat polimeri

3.5 Elektrospreying Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi

Elektrospreying yöntemi ile nanopartikül üretimi aşamasında ön çalışmalar *C. protothecoides* yağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %7 ve %8 PVA solüsyonları ile hazırlanan örneklerin nanopartikül çaplarının PVA konsantrasyonu arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu ön çalışma sonucuna bağlı olarak farklı PVA konsantrasyonlarının, elektrospraying işleminde karışımın şırıngadan atım hızının ve şırınga ile toplayıcı plaka arasındaki mesafenin nanopartikül çapının boyutuna olan etkisi incelenmiştir.

Çalışmada elektrospreying tekniği ile nanopartikül elde etmek için PVA ve sodyum aljinat çözeltisi stokları hazırlanmıştır: PVA çözeltisi %7, %7,5 %8 (%w/v)'lik konsantrasyonlarda olacak şekilde 5000 rpm 90°C'de 3-3,5 saat tamamen çözülene kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Aljinat çözeltisi %2 (w/v) oranında distile suda manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Çözeltiler soğumaya bırakıldıktan sonra iki çözeltiden 80:20 (%v/v) oranında hacimce alınarak karıştırılmıştır. Ardından %1 (w/v) alg yağı ve %1 (w/v) Tween 20 eklenerek 15 dk daha karıştırılarak tamamen homojen kremsi bir çözelti elde edilmiştir, sonrasında çözelti elektrospreying cihazına beslenmiştir.

Elektrospreying yöntemi ile nanopartikül üretimi için PVA konsantrasyonu, besleme hızı ve şırınga ile toplayıcı plaka arasındaki uzaklık gibi partikül boyutuna etki eden parametreler istatistiksel olarak Box-Behnken deneysel tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Deneysel parametreler ve seviyeleri aşağıdaki gibi verilmiştir:

X₁: Polimer konsantrasyonu: %8 (Üst seviye), %7.5 (Merkez seviye), %7 (Alt seviye)

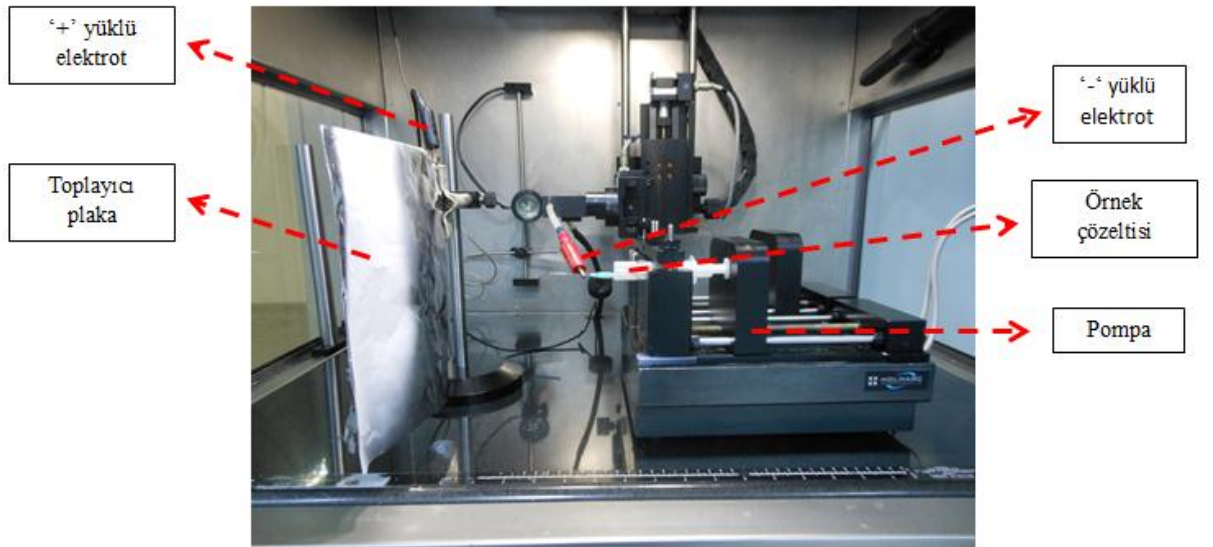
X₂: Akış hızı (ml/sa): 0.3 (Üst seviye), 0.25 (Merkez seviye), 0.2 (Alt seviye)

X₃: Uzaklık (cm): 14 (Üst seviye), 13 (Merkez seviye), 12 (Alt seviye)

Nanopartikül elde etmek amacıyla laboratuvar ölçekli Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Nano Fiber Electrospinning Unit model no:HO-NFES-0434 elektrospinnig cihazı kullanılmıştır. Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de elektrospinning cihazının fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 3. 12 Çalışmalarda kullanılan Nano Fiber Elektrospinning cihazı



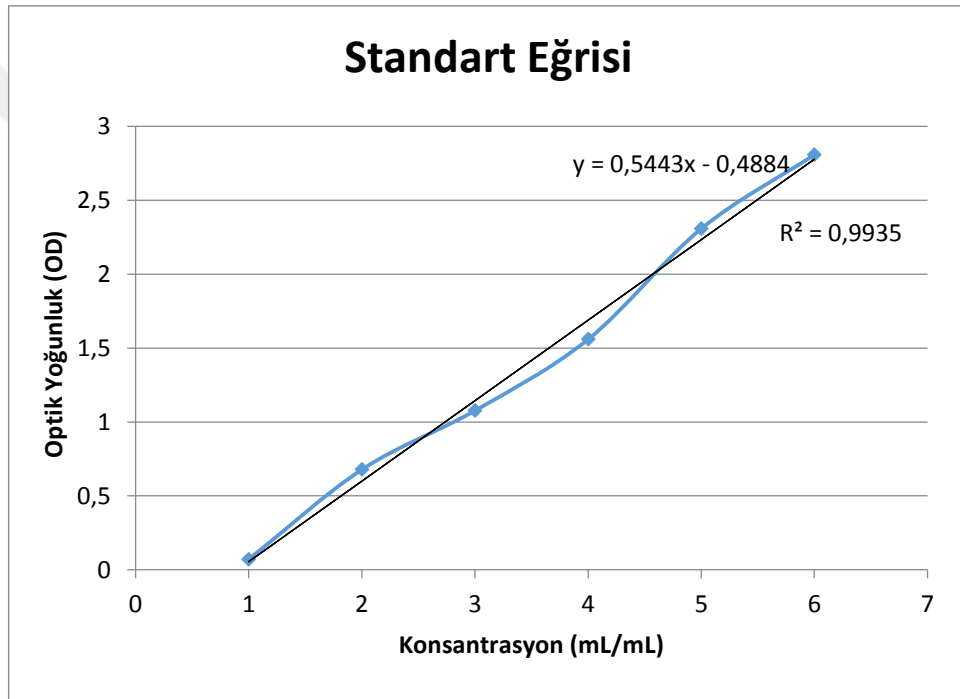
Şekil 3. 13 Elektrospinning cihazının üretim aşamasındaki görüntüsü

Deneyde öncelikle toplayıcı plakanın üzeri alüminyum folyo ile kaplanmış ve eksi uçlu elektrot plakaya tutturulmuştur. Enjektöre doldurulan polimer çözeltisi-esansiyel yağ karışımı pompa kısmına yerleştirilmiş ve elektrotun diğer ucu metal şırınga ucuna takılmıştır. Böylelikle zıt yüklü elektrotlarla bir elektriksel çekim alanı oluşturulmuştur (Şekil 3.13). Üretimi yapılan nanopartiküllerin yapısal, termal ve morfolojik testleri yapılmış ve enkapsülasyon verimleri belirlenmiştir.

Karakterizasyon testlerinin ardından nanopartiküller hücre canlılık testine tabi tutulmuştur.

3.5.1 Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi

Bu yöntemle kapsüller içindeki yağ miktarı OD değeri olarak ölçülür ve formül yardımıyla standart eğrisinden (Şekil 3.14) faydalanılarak kapsüllenebilen yağ yüzdesi bulunur. Her bir üretim için: 0,2 mg partikül tartılır ve üzerine 4 ml kloroform eklenir. Kloroformlu örnekler su banyosunda 40°C'de 5-6 saat bekledikten sonra 8000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısımları 270 nm'de UV Spektrofotometresinde ölçülür.



Şekil 3. 14 Mikroalg yağı için elde edilmiş standart grafiği

Kapsüllerin enkapsülenme verimi aşağıdaki eşitliğine göre belirlenir.

$$EE(\%) = \frac{W_{\text{toplama yağ}} - W_{\text{serbest yağ}}}{W_{\text{toplama yağ}}} \times 100 \quad (3.15)$$

4.1 *B. braunii* Mikroalginin Analiz Sonuçları

B. braunii (BB) mikroalgine ait analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *B. braunii* mikroalgi için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y_{BBL} = 49,00 - 3,87 \cdot X_1 - 0,62 \cdot X_2 + 2,00 \cdot X_3 \quad (4.1)$$

Elde edilen denkleme göre *B. braunii* için azot miktarının (X_1) artışının ve sıcaklığın (X_2) artışının lipid miktarını (Y_{BBL}) azalttığı gözlemlenmiş ve en etkili parametrenin azot stresi olduğu görülmüştür. Aydınlanma döngüsünün (X_3) ise pozitif yönde bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı $R^2=0,9644$ olarak bulunmuştur. R^2 ’nin bire yakınlığı ile lineer bir denklem elde edilmiştir.

Nutrient miktarı, mikroalgların büyümesi ve çoğalması ve lipid ve yağ asidi kompozisyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Besinler sınırlı olduğunda çevresel stres durumu, sürekli azalan bir hücre bölünme oranına neden olur. Buna karşın, bazı alg türlerinde fotosentez için yeterli ışık ve CO₂ bulunması koşuluyla, yağ asitlerinin aktif biyosentezi devam eder. Algal büyüme yavaşladığında ve yeni membran bileşiklerinin sentezi için ihtiyaç kalmadığında, hücreler bunun yerine yağ asitlerini triaçilgliserole yönlendirerek biriktirme işlemi yapar. Bu şartlar altında, triaçilgliserol üretimi koruyucu bir mekanizma olarak işlev görür. Normal büyüme koşulları altında, fotosentez tarafından üretilen ATP ve NADPH, biyokütle üretilerek tüketilir, ADP ve NADP⁺ sonunda fotosentezde alıcı moleküller olarak tekrar kullanılabilir hale gelir. Nutrient eksikliği nedeniyle hücre büyümesi ve çoğalması azalırsa, fotosentez için ana elektron alıcısı havuzu olan NADP⁺ tükenabilir. Fotosentez, çoğunlukla ışık tarafından kontrol edildiğinden, bu bazı durumlarda hücre bileşenleri için zararlı olabilecek potansiyel bir duruma yol açabilir. NADPH, yağ asidi biyosentezinde tüketilir, bu nedenle, artan yağ asidi üretimi (sırayla

triacilgliserollerde depolanır), büyüme sınırlayıcı koşullar altında NADP⁺ havuzunu doldurur. Azot alglerde lipit metabolizmasını etkileyen en kritik besin maddesidir [106]. Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi, mikroalglerde de azot yoksunluğu önemli metabolik değişikliklere neden olur. Ortamdaki azot eksikliğinde metabolizma genellikle proteosentezden azot içermeyen triacilgliseritler ve nişasta gibi depo bileşiklerin sentezine yönelir. Nişasta sentezi, lipid sentezi ile ortak öncülleri paylaşır, bu nedenle besin kısıtlaması altında bazı alg türleri veya suşlar, nişasta biyosentetik yolunu inhibe edebilir ve fotosentetik karbon akışını lipit biyosentezine yönlendirebilir. Bu, hücrede aşırı lipid üretimine yol açar ve alternatif bir karbon ve enerji rezervi oluşturulur [107].

Çeşitli mikroalglerin sayısız türünde veya suşunda, azot eksikliğine cevap olarak lipidlerin, özellikle triacilgliserollerin birikimine yönelik genel bir eğilim gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, azot miktarının azaltılmasının *B. braunii* mikroalginin lipid içeriği üzerine olan etkisinin pozitif yönde olduğu görülmektedir. Zhila vd. tarafından yapılan çalışmalarda, bu etki *B. braunii* üzerinde incelenmiş ve azot miktarı azaldıkça lipid içeriğinde artış olduğu belirtilmiştir. Çalışmalarında *B. braunii* mikroalginin yetiştirilmesinde sunulan çalışmaya benzer bir şekilde 4 katlı azot stresi uygulanmış ve azot miktarı arttıkça lipid içeriğinde bir düşüş meydana gelmiştir. En yüksek lipid içeriğine ise en düşük azot miktarına sahip olan besiyerinde ulaşılmıştır [108], [109]. Ruangsomboon tarafından yapılan bir başka çalışmada da bu etki doğrulanmış, bununla birlikte aydınlatma döngüsünün de *B. braunii* mikroalginin lipid içeriğine olan etkisi incelenmiştir. 12:12, 14:10, 16:8 ve 24:0 aydınlatma döngülerinin lipid içeriğine olan etkisi incelendiğinde en iyi sonuçlara 16:8 ışık döngüsünde ulaşıldığı görülmüştür [22].

Sıcaklık değişimi ile en sık gözlenen değişikliklerden biri, lipid membrandaki yağ asitlerinin doymamışlık seviyesindeki değişiktir. Düşük sıcaklıklar hücre zarındaki akışkanlığı azaltır. Hücreler akışkanlığı arttırmak için doymamış yağ asitlerinin seviyelerini arttırarak bu durumu tolere edebilir. Ancak bu durum membranları serbest radikallerin zarar görmesine daha duyarlı hale getirir. Daha yüksek akışkanlık ile birlikte, artan seviyelerde doymamış yağ asitleri, hücresel

zarların (özellikle tiyloid zarın) stabilitesini arttırma eğilimindedir. Bu da fotosentetik mekanizmayı düşük sıcaklıklarda foto inhibisyondan korur [18]. Ortam sıcaklığının etkisi, sıcaklık arttıkça lipid üretimini inhibe etmeye yöneliktir. Li ve Quin tarafından yapılan çalışmada 20, 25 ve 30°C sıcaklıkları altında *B. braunii* mikroalginin lipid içeriğindeki değişimi incelenmiş ve 20°C'den 25°C'ye çıkıldığında lipid içeriğinde artış, 25°C'den 30°C'ye çıkıldığında ise lipid içeriğinde azalma görülmüştür [110]. Elde edilen bulguların literatürde yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Farklı aydınlanma süreleri içerisinde klorofil- α üretim miktarları incelendiğinde artan aydınlanma süresi ile klorofil- α miktarının arttığı görülmüştür. Azalan azot miktarı gelişen mikroalgin klorofil- α sentezini yavaşlattığı, artan azot kaynağı ise klorofil- α sentezini hızlandırdığı görülmüştür. Azot stresindeki azalış β -karoten miktarında artışa, sıcaklık ise pozitif yönde yani sıcaklık arttıkça β -karoten miktarında artışa yol açmaktadır. Bunun sebebi olarak, artan sıcaklığın aktif oksijen radikallerinin oluşumunu indüklemesi ve bu durumun karoten üretimi ile sonuçlanması olarak gösterilmektedir [111]. Azot limitasyonunun da mikroalgal hücrelerde karoten oluşumunu indüklediği bildirilmiştir [112].

B. braunii mikroalginin β -karoten içeriği (Y_{BBK}) için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y_{BBK} = 6,00 - 0,75 \cdot X_1 + 1,13 \cdot X_2 + 0,63 \cdot X_3 \quad (4.2)$$

Elde edilen denkleme göre *B. braunii* mikroalginin β -karoten içeriği için en etkili parametrenin sıcaklık olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısı ise $R^2=0,97$ olarak bulunmuştur. Tablo 4.2'de *B. braunii* mikroalginin lipid ve β -karoten üretimine ait varyans analizi sonuçları verilmektedir. Varyans sonuçları incelendiğinde p değerinin 0.05'den küçük olduğu yani gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Düşük bir olasılık değeri, regresyon modeli için çok yüksek bir başarıya işaret etmektedir. Modelin uygunluğu belirleme katsayısı (R^2) ile kontrol edilmiştir. Deney ve tahmin edilen değerler arasında daha iyi bir korelasyon görmek için R^2 değeri 1'e yakın olmalıdır. Çalışmada bulunan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.97$

değeri, toplam varyasyonun sadece yaklaşık % 3'ünün model tarafından açıklanmadığını göstermektedir.

Tablo 4. 1 *B. braunii* mikroalginin lipid ve β -karoten üretimi tasarım matrisi ve analiz sonuçları

Parametreler			Analiz sonuçları				
Azot stresi (X ₁)	Sıcaklık (X ₂)	Aydınlatma döngüsü (X ₃)	Lipid (Y _{BBL}) (%)	β -karoten (Y _{BBK}) (µg/ml)	Karbon hidrat (%)	Protein (%)	Klorofil-α (µg/ml)
0	-1	-1	39,60	4,60	26,32	22,62	17,02
1	0	1	45,20	5,67	26,64	22,51	10,99
-1	1	0	42,10	8,38	21,13	27,81	8,19
-1	0	-1	50,20	5,63	13,26	34,36	5,53
1	-1	0	33,80	4,09	23,29	12,10	6,99
1	0	-1	41,10	4,03	28,01	16,84	21,99
1	1	0	29,70	4,41	12,33	27,28	5,55
-1	0	1	53,80	6,72	18,54	41,20	18,00
0	-1	1	43,70	6,59	10,13	39,21	8,06
0	0	0	39,30	6,93	17,82	35,86	6,88
0	1	-1	35,90	7,11	22,59	32,84	19,99
0	1	1	40,20	8,14	20,32	34,47	5,55
-1	-1	0	34,90	4,26	20,56	24,96	9,99

Tablo 4. 2 *B. braunii* mikroalginin lipid ve β -karoten üretimine ait varyans analizi sonuçları

	<i>Varyansın kaynağı</i>	<i>Serbestlik derecesi</i>	<i>Kareler toplamı</i>	<i>Kareler ortalaması</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Lipid	Regresyon modeli	9	494,06	54,90	9,02	0,03
	Hata	3	18,25	6,08		
	Toplam	12	512,31			
β-karoten	Regresyon modeli	9	26,48	2,94	11,77	0,03
	Hata	3	0,75	0,25		
	Toplam	12	27,23			

4.2 *M. aeruginosa* Siyanobakterisinin Analiz Sonuçları

M. aeruginosa (MA) siyanobakterisine ait analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *M. aeruginosa* siyanobakterisi için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y_{MAL} = 19,00 - 3,87 \cdot X_1 - 0,12 \cdot X_2 + 1,75 \cdot X_3 \quad (4.3)$$

Elde edilen denkleme göre *M. aeruginosa* için azot miktarının artışının ve sıcaklığın artışının lipid miktarını “ $Y_{3(MAL)}$ ” azalttığı gözlemlenmiş ve *B. braunii* mikroalginde olduğu gibi en etkili parametrenin azot stresi olduğu görülmüştür. Aydınlanma döngüsünün de yine benzer bir şekilde pozitif yönde bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı $R^2=0,9658$ olarak bulunmuştur.

Da Rós vd. yaptıkları çalışmada besiyerine farklı oranlarda azot ilave ederek, azot parametresinin *M. aeruginosa* siyanobakterisinin lipid içeriğine olan etkisini incelemiştir. Yaptıkları çalışma sonucunda 0,17 gr’lık azot ilavesinin üzerindeki

besiyerlerinde yetiştirilen *M. aeruginosa*'nın lipid içeriğinde azalma gözlenmiştir [113]. Bohnenberger ve Crossetti tarafından yapılan çalışmada ise sıcaklığın ve besin solüsyonunun *Monoraphidium contortum*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus quadricauda* ve *Microcystis aeruginosa* türleri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmada azot miktarındaki düşüşün *M. aeruginosa* ve diğer türlerin lipid içeriğinde artışa yol açtığı belirtilmiştir. Ayrıca 13°C, 25°C ve 37°C sıcaklıkları altında gerçekleştirilen deneyler sonucunda lipid üretimi için en uygun sıcaklığın 25°C olduğu görülmüş, artan sıcaklık ile lipid içeriğinde azalma meydana geldiği ifade edilmiştir [114]. *M. aeruginosa* siyanobakterisinin β -karoten içeriği (Y_{MAK}) için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir. Elde edilen denkleme göre *M. aeruginosa* siyanobakterisinin β -karoten içeriği için en etkili parametrenin sıcaklık olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısı ise $R^2=0,8922$ olarak bulunmuştur.

$$Y_{MAK} = 4,92 - 1,25 \cdot X_1 + 2,00 \cdot X_2 + 0,25 \cdot X_3 \quad (4.4)$$

Tablo 4. 3 *M. aeruginosa* siyanobakterisine ait lipid ve β -karoten üretimi tasarım matrisi ve analiz sonuçları

Parametreler			Analiz sonuçları				
Azot stresi (X_1)	Sıcaklık (X_2)	Aydınlatma döngüsü (X_3)	<i>Lipid</i> (Y_{MAL}) (%)	<i>β-karoten</i> (Y_{MAK}) ($\mu\text{g/ml}$)	Karbon hidrat (%)	Protein (%)	Klorofil- α ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	-1	19,06	3,32	18,80	46,84	16,98
0	1	1	18,85	8,24	18,51	36,70	9,26
0	0	0	19,06	4,93	22,76	48,92	8,22
-1	1	0	20,38	9,12	21,67	34,40	6,01
-1	0	1	32,61	6,47	22,66	33,36	7,21
1	0	1	22,15	4,87	10,53	58,33	22,87
-1	0	-1	28,39	5,02	11,06	25,66	5,31
1	1	0	9,26	4,89	12,61	28,25	17,32
0	-1	-1	17,65	3,75	19,06	20,40	7,65
0	1	-1	14,32	8,32	12,31	27,07	6,23
1	-1	0	12,57	3,29	16,51	23,88	17,92
-1	-1	0	13,21	4,61	16,56	23,88	5,17
0	-1	1	20,48	3,49	14,85	44,25	8,68

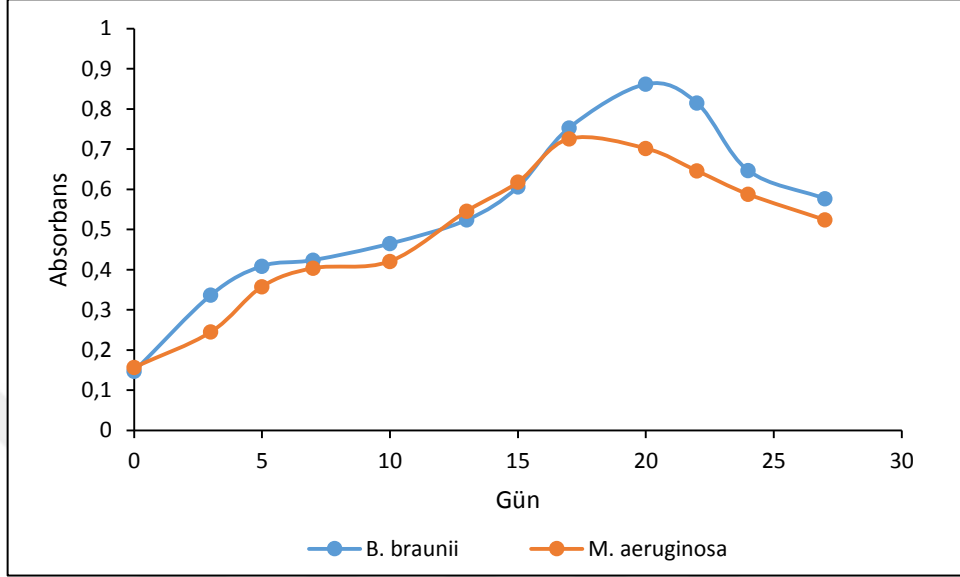
Tablo 4. 4 *M. aeruginosa* siyanobakterisinin lipid ve β -karoten üretimine ait varyans analizi sonuçları

	<i>Varyansın kaynağı</i>	<i>Serbestlik derecesi</i>	<i>Kareler toplamı</i>	<i>Kareler ortalaması</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Lipid	Regresyon modeli	9	458,52	50,95	9,41	0,03
	Hata	3	16,25	5,42		
	Toplam	12	474,77			
β-karoten	Regresyon modeli	6	49	8,17	8,27	0,01
	Hata	6	5,92	0,99		
	Toplam	12	54,92			

4.3 Laboratuvar Ölçekli Fotobiyoreaktörde Gerçekleştirilen Mikroalg Üretimi

Optimum koşullara göre çalışmanın ileriki aşamalarında kullanılmak üzere daha fazla mikroalg biyokütlesi eldesi için mikroalgler %10 aşılama ile laboratuvar ölçekli fotobiyoreaktörde yetiştirilmiştir. Fotobiyoreaktörde üretim boyunca mikroalglerin büyüme grafikleri aşağıda verilmiştir. Her iki mikroalg türüne ait büyüme verileri kullanılarak ayrı ayrı kinetik hesaplamalar yapılmıştır. Monod eşitlikleri kullanılarak çizilen grafiklerin eğim değerlerinden mikroalglerin spesifik büyüme hızları (μ) ve ölüm hızı sabitleri (k_d) hesaplanmıştır. Hesaplanan μ değerlerinden yararlanarak t_d (ikilenme zamanı) bulunmuştur. Kullanılan mikroalg türlerinin büyüme eğrileri incelendiğinde büyüme ve ölüm fazları belirgin bir şekilde görülmektedir. Kültürlerin önceden ortama adaptasyonları küçük ölçeklerde sağlandığından dolayı grafikte adaptasyon fazı görülmemektedir. Kültürlerden *B. braunii* türü 20. güne kadar büyümeye devam etmiş daha sonra ölüm fazına geçmiştir, ancak *M. aeruginosa* türü 17. günden sonra büyüme

ortamında çoğalması için yeterli düzeyde substrat kaynağı olmadığından dolayı ölüm fazına geçmiştir. Kültürlerin kinetik verileri hesaplandığında spesifik büyüme hızları, ölüm hızı sabitleri ve ikilenme sürelerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 1 *B. braunii* ve *M. aeruginosa* mikroalglerinin büyüme eğrileri

Tablo 4. 5 Hesaplanan kinetik değerlerin tablosu

	<i>B. braunii</i>	<i>M. aeruginosa</i>
Spesifik büyüme hızı (μ) (gün^{-1})	0,11	0,11
Ölüm hızı sabiti (k_d) (gün^{-1})	0,08	0,05
İkilenme süresi (t_d) (gün)	6,3	6,3

Fotobiyoreaktörde üretimi yapılan mikroalglerin havalandırma sonucunda meydana gelen kesme gerilimlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan hesaplamalar tablo 4.6'da verilmiştir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda türbülent ortam gözlemlenmiş ve erlenlerdeki *B. braunii* kültürlerinin ortalama kayma gerilmesi $0,087 \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Buna karşın, fotobiyoreaktördeki üretimlerde ortalama kayma gerilmesi $24,85 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır [115]. Hesaplamalara göre girdap büyüklüğünün mikroalg hücrelerine göre daha büyük olduğu,

hücrelerin reaktör içerisindeki türbülans etkilenmediği ve yüksek kayma hızlarına adapte olduğu görülmüştür. Benzer bir şekilde *M. aeruginosa* kültürlerinin erlendeki ve fotobiyoreaktördeki üretimi sırasında girdap büyüklüğünün siyanobakterinin hücrelerine göre daha büyük olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Camacho vd. tarafından yapılan çalışmada mikroalglerin farklı karıştırma hızlarındaki kayma gerilimleri incelenmiş ve atalet kuvvetlerin kayma gerilimi ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Bu çalışmada da olduğu gibi Reynolds sayısı arttıkça girdap büyüklüğünün boyutunda düşme ve kayma geriliminde artış gözlemlenmiştir [94].

Tablo 4. 6 Erlen ve fotobiyoreaktörde yetiştirilen mikroalglerin kesme gerilimleri

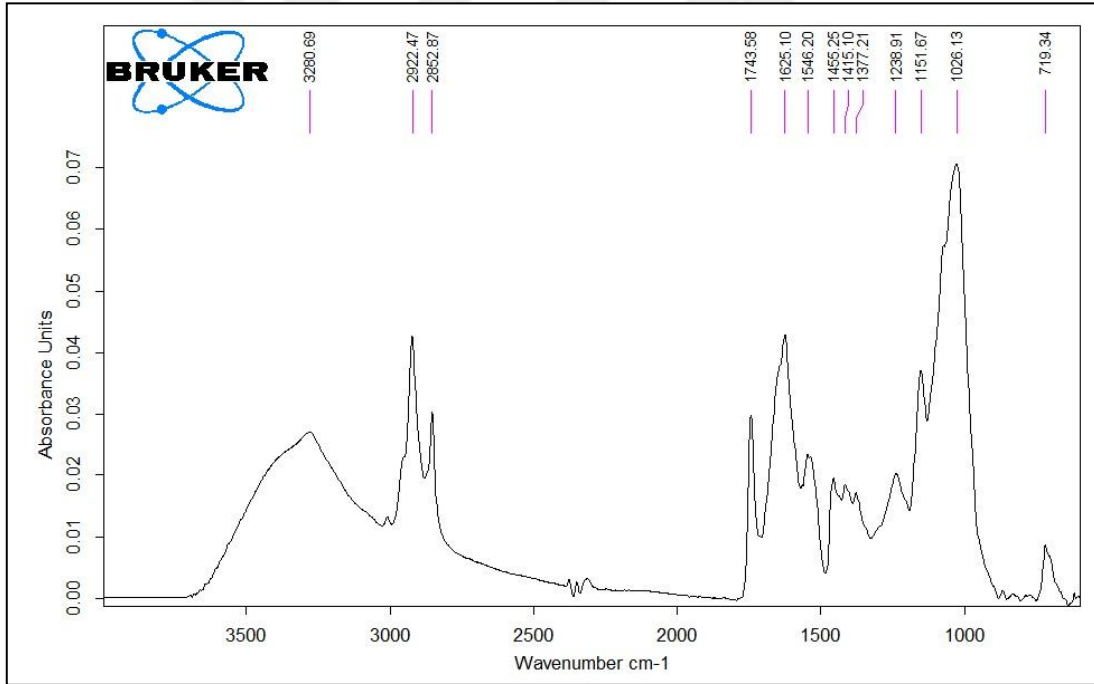
	ε (mWkg ⁻¹)	τ (mNm ⁻²)	γ (s ⁻¹)	λ (μm)	Re
<i>B. braunii</i> (erlen)	63	0,0313	0,087	72,2	16916
<i>B. braunii</i> (reaktör)	1572	28,68	24,85	37,2	471652
<i>M. aeruginosa</i> (erlen)	92	0,055	0,045	61,8	32580
<i>M. aeruginosa</i> (reaktör)	493	34,2	30,1	34	493827

Çalışmada iki kültürün fotobiyoreaktörde üretimi esnasında havanın gönderilme hızı ayarlanarak gas hold-up'ın 0,01-0,02 arasında değiştiği bulunmuştur. Hacimsel kütle transfer katsayısı, gaz hızının artması ile 0,06-0,08 dk⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin düşük olması durumunda, mikroalglerin fotobiyoreaktörün tabanında birikme eğiliminde olduğu görülmüştür. Uygun bir havalandırma hızı ile elde edilen biyokütle verimliliği yaklaşık 1 g L⁻¹ artmıştır. Yayınlanan çalışmalarla karşılaştırıldığında, gaz transferi ve biyokütle verimliliği arasındaki ilişkinin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür [95], [116].

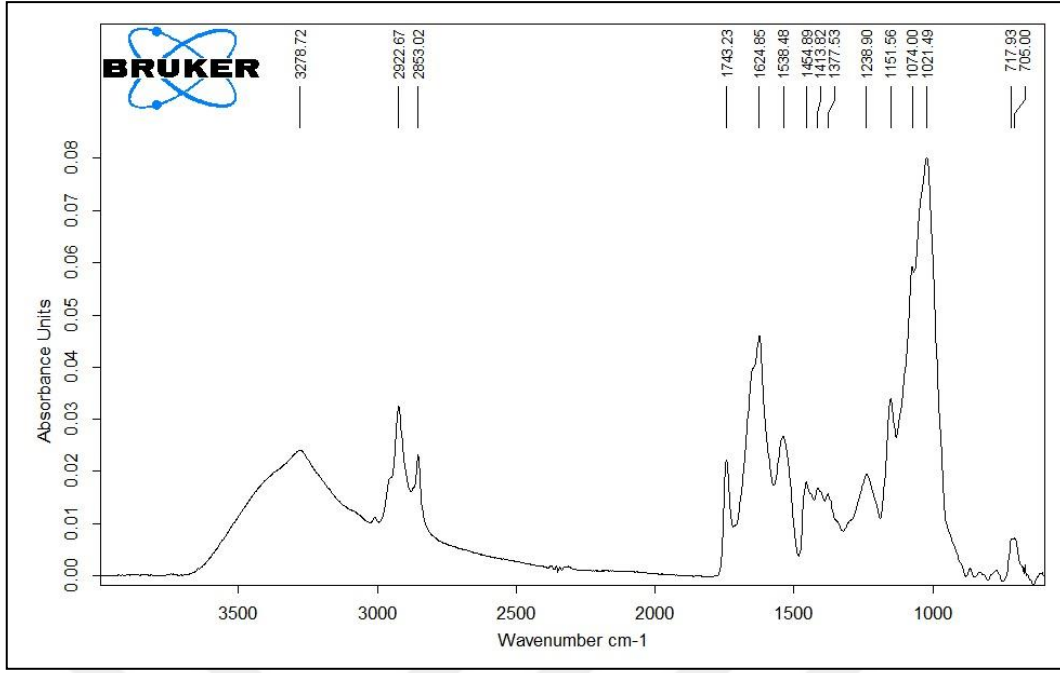
4.4 FTIR ve Kısa Analiz Sonuçları

B. braunii ve *M. aeruginosa* mikroalglerinin FTIR spektrumu için Bruker Marka FTIR cihazı kullanılmış ve numunelerin 600-4000 cm^{-1} aralığında içerdiği fonksiyonel grupların absorbans değerleri belirlenmiş ve spektrumlar sırasıyla Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. Tablo 4.6'da ise spektrumlardan tanımlanan fonksiyonel gruplar verilmiştir.

1743 cm^{-1} bandı (C=O) lipidler ve yağ asitlerinin varlığını işaret etmekte ve ester grupları ile ilgili olup, 2922 cm^{-1} 'deki CH gerilmesi ve 1743 cm^{-1} 'deki ester karbonil grubun C=O gerilmesi lipid piklerini göstermektedir. 1151 cm^{-1} 'deki C-O-C gerilmeleri ise mikroalgin yapısındaki polisakkaritlerin gerilmelerini ifade etmektedir. Türlerdeki protein 1546 cm^{-1} 'de çıkan pik ile karakterize edilmektedir. Bu band amid komplekslerindeki C=O gerilmesi ve N-H eğilmesinden kaynaklıdır [117], [118].



Şekil 4. 2 *B. braunii* mikroalginin FTIR spektrumu



Şekil 4. 3 *M. aeruginosa* mikroalginin FTIR spektrumu

Tablo 4. 7 FTIR spektrumlarından tanımlanan fonksiyonel gruplar

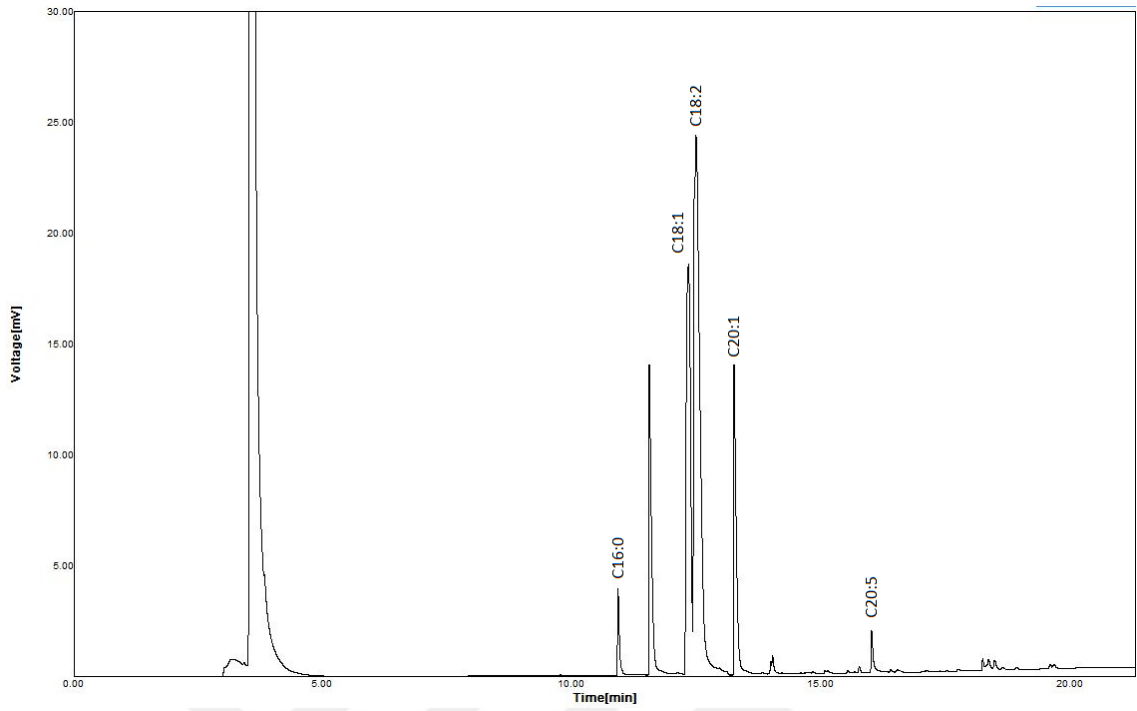
Dalga sayısı(cm^{-1})	Fonksiyonel gruplar
3280	NH gerilmesi
2922	CH gerilmesi
2852	CH gerilmesi
1743	C=O gerilmesi
1625	Aromatik C-C halka gerilmesi
1546	NO ₂ gerilmesi
1455	CH ₃ deformasyonu
1415	C-H metil gerilmesi
1377	CH ₃ deformasyonu
1239	C-O-C gerilmesi
1151	C-O-C gerilmesi
1026	C-O-C gerilmesi

Tablo 4. 8 Mikroalg türlerinin kısa analiz sonuçları

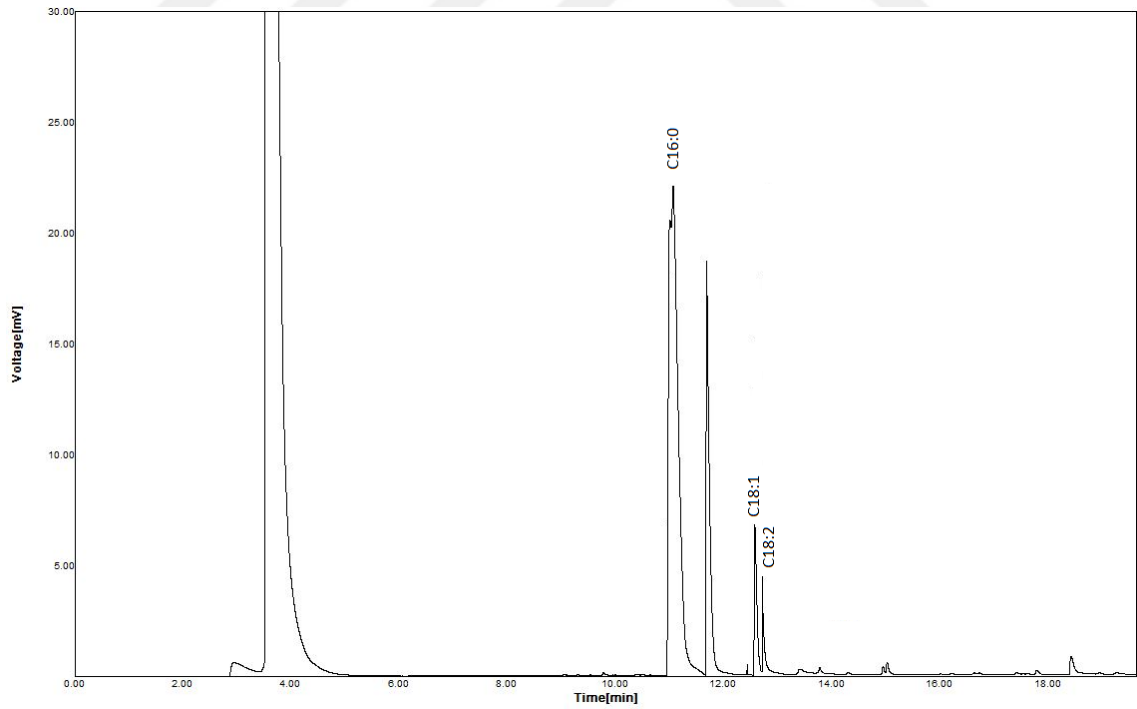
	<i>B. braunii</i>	<i>M. aeruginosa</i>
Nem (%)	7,22	5,71
Uçucu madde (%)	69,74	84,79
Sabit Karbon (%)	17,07	6,20
Kül (%)	5,99	3,32

Termogravimetrik analiz ile gerçekleştirilen kısa analizler sonucunda üretimi yapılan mikroalglerin nem, uçucu madde, sabit karbon ve kül içerikleri Tablo 4.7’de verilmiştir. *B. braunii* mikroalgine ait kısa analiz sonuçları incelendiğinde benzer sonuçların alındığı görülmektedir. Ali vd. yaptıkları çalışmada *B. braunii*’nin pirolizinin kinetik analizini incelemişler ve analizler sonucunda sırasıyla nem, uçucu madde, sabit karbon ve kül içeriklerini %3.5, %76.1, %17.9 ve %2.4 olarak bulmuşlardır [119], [120]. Kanda vd. siyanobakteriler üzerine yaptıkları çalışmada ise kül, uçucu madde ve sabit karbon içeriklerini sırasıyla %7, %81.4 ve %11.6 olarak bulmuşlardır [121].

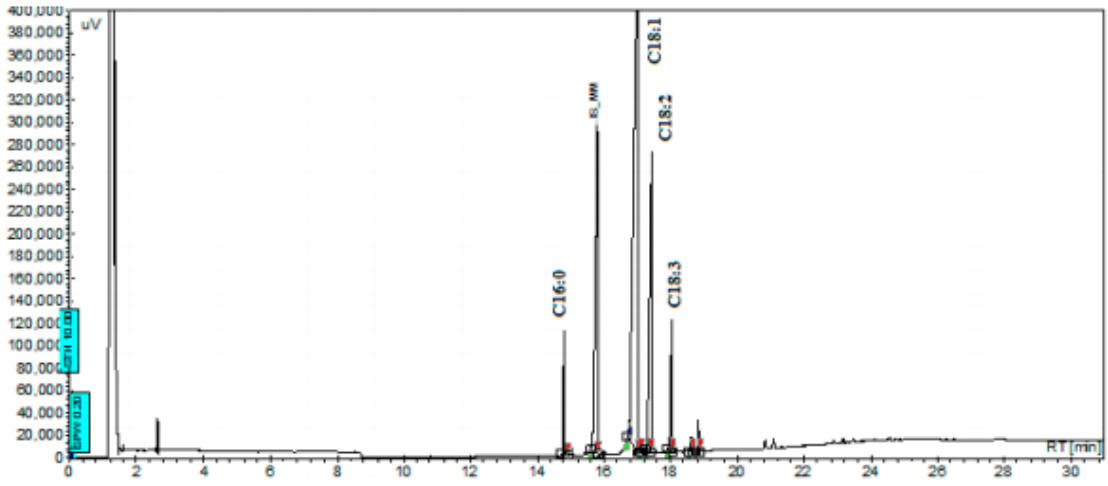
4.5 Mikroalgal Ekstraktların Gaz Kromatografisi Sonuçları



Şekil 4. 4 *B. braunii* yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı



Şekil 4. 5 *M. aeruginosa* yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı



Şekil 4. 6 *Chlorella protothecoides*'in yağı için 9:1 metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşulları altında hazırlanan örneklerin metil esterlerinin kromatogramı

Gaz kromatografisi analizleri sonucunda alınan kromatogramlar incelendiğinde *Botryococcus braunii* yağının içeriğinde palmitik (16:0), oleik (18:1), linoleik (18:2), araşidik asit (20:0) ve eicosapentaenoic (EPA) (20:5) asitlerin varlığı görülmektedir. Diğer yağ asitleri eser miktarlarda bulunduğu sonuclarda değerlendirilememiştir. Elde edilen kromatograma göre en yüksek yağ asidi içeriği linoleik asit olarak görülmüştür. Bu analiz ile *Botryococcus braunii*'nin biyoaktif değere sahip olan ve faydalı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğu görülmüştür. Ranga Rao vd. tarafından yapılan çalışmada da *B. braunii* alginde C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C22:0, C22:1 ve C24:0 yağ asitleri bulunmuştur [122].

M. aeruginosa yağ asidi metil esteri incelendiğinde ise palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) yağ asitleri belirlenmiştir. Elde edilen kromatograma göre en yüksek yağ asidi içeriği palmitik asit olarak görülmüştür. Literatür çalışmaları incelendiğinde bu türe ait yapılan analizlerde de benzer yağ asitlerinin tespit edildiği görülmüştür [123], [124]. Hayakawa vd. tarafından yapılan çalışmada ise bu yağ asitlerinin yanısıra linolenik asitlerin (18:3) de varlığına rastlanmıştır [125]. Sharathchandra ve Rajashekhar tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise palmitik asit (16:0), stearik asit (18:0), linoleik (18:2), linolenik (18:3) ve aykosanoik asit (20:0) varlığına rastlanmıştır [126]. Literatür çalışmalarında gözlemlenen farklı yağ asitlerinin varlığı, mikroalg ve siyanobakteri türlerinin izole

edildiği ve yetiştirildiği koşullar ile alakalı olmakta olup, çok miktarda bulunan ve bu çalışmada tespit edilen yağ asitlerinin varlığı sonuçların literatürle uyumlu olduğunun göstergesidir.

M. aeruginosa'ya benzer şekilde *C. protothecoides* yağının içeriğinde de palmitik (16:0), oleik (18:1), linoleik (18:2) asitlerin varlığı görülmektedir. Diğer yağ asitleri eser miktarlarda bulunduğundan sonuçlarda değerlendirilmemiştir. Elde edilen kromatograma göre en yüksek yağ asidi içeriği linoleik asit olarak görülmüştür. Bu analizlere göre yukarıda gaz kromatografisi analizleri verilen mikroalg türlerinin biyoaktif değere sahip oldukları ve faydalı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin oldukları görülmüştür [17].

4.6 Mikroalgal Ekstraktların Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Algal ekstraktların toplam antioksidan aktivitesi 1, 1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde mikroalgal ekstraktların antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Çalışmada standart ve mikroalg ekstraktları için 30 dk, 1 sa ve 1,5 sa'lık aralıklarla ölçümler alınmıştır.

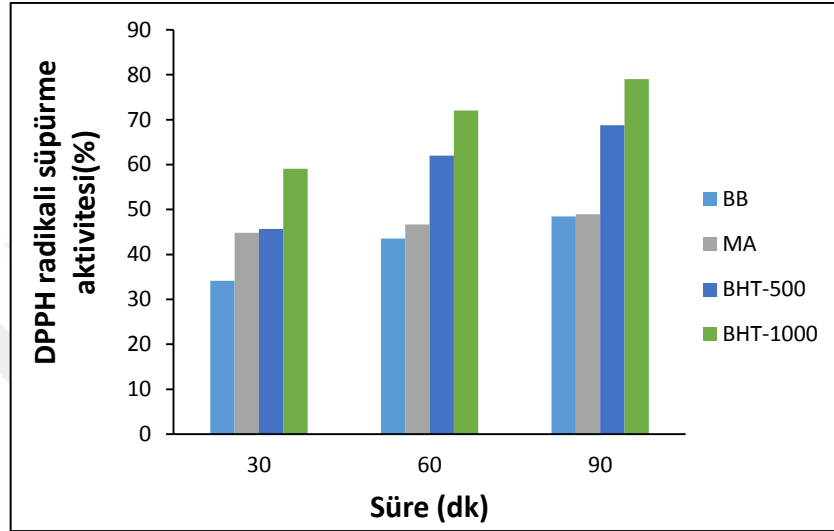
Mikroalg ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesi tayin edilirken, standart olarak kullanılan BHT'ye göre aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır. BHT standardı 500 ve 1000 µg/mL olarak hazırlanmıştır.

Şekilde ekstraktların DPPH. radikali giderme aktivitesine ait % inhibisyon-konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Yüzde (%) inhibisyon değeri ne kadar yüksekse antioksidan aktivite de o kadar yüksek kabul edilmiştir.

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan bir radikaldir. DPPH çözeltisi koyu mor renklidir ve 517 nm'de absorbansı ölçülmektedir. Ortama antioksidan ilave edilmesi halinde DPPH çözeltisinin renginde değişim meydana gelir. Ortamda antioksidan maddenin bulunması halinde absorbansta düşüş ve mor renkten sarıya doğru dönüş gözlemlenir. Bu durum ortamda DPPH radikalının konsantrasyonunun azaldığını

gösterir. Sonuç olarak, absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikali giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir.

Yapılan deneyler sonucunda Şekil 4.7’de görüldüğü üzere *B. braunii* ve *M. aeruginosa* türlerinin ekstraktlarının antioksidan özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu türlerden *M. aeruginosa*’nın antioksidan özelliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

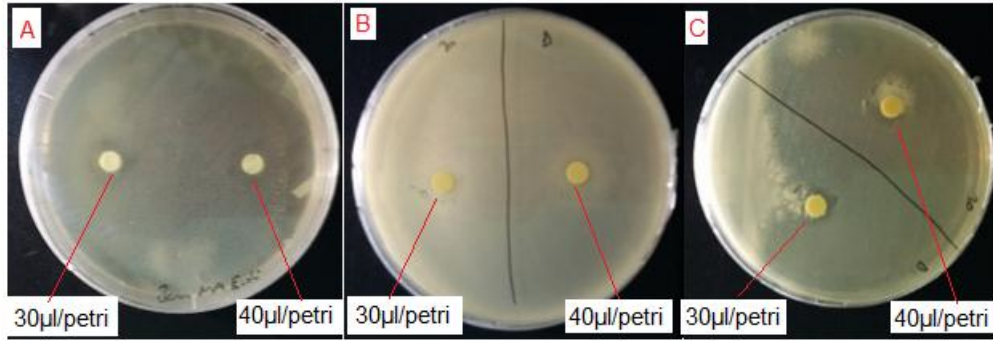


Şekil 4. 7 Örneklerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi

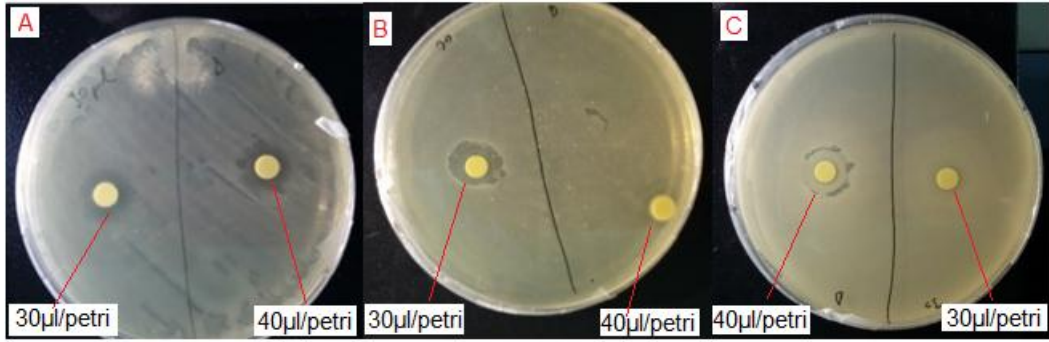
4.7 Mikroalg Ekstraktların Antibakteriyel Özelliklerinin Sonuçları

Mikroalg ekstraktlarının antibakteriyel etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak sırasıyla *E.coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Bacillus cereus* RSKK 9637 ATCC 11778 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerine karşı tespit edilmiştir. 6 mm çapındaki disklerle 30µl/petri ve 40µl/petri dozlarında otomatik pipet ile emdirilen alg ekstraktları içerikli disklerde 24 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında oluşan inhibisyonlar incelendiğinde kullanılan mikroalg türlerinin ekstraktlarının bu bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.8-4.9). Ranga Rao vd. tarafından yapılan çalışmada *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, ve *Botryococcus braunii* mikroalglerinin ekstraktlarının *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

fecalis ve *Yersinia enterocolitica* bakterilerine karşı antibakteriyel özellikleri incelenmiş ve *B. braunii* mikroalginin ekstraktlarının bu bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği rapor edilmiştir [127]. Madhumati vd. *Oscillatoria latevirns*, *Phormidium corium*, *Lyngbya martensiana*, *Chroococcus minor* ve *Microcystis aeruginosa* siyanobakterilerinin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutants*, *Escherichia coli*, *Micrococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı olan antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bütün türlerin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutants* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte *Oscillatoria latevirens*, *Chroococcus minor* ve *Microcystitis aeruginosa* türlerinin *Candida albicans* üzerine antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir [128]. Vehapi vd. tarafından da *C. protothecoides* türünün kullanılan bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği bildirilmiştir [129]. Mundt vd. ve Özdemir vd. mikroalglerin bazı patojenik organizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin, yağ asitleri ve hidroksil doymamış yağ asitleri, glikolipid ve fenolik bileşikleri nedeniyle olabileceğini bildirmiştir [130], [131].



Şekil 4. 8 *B.braunii* mikroalginin ekstraktlarının sırasıyla A) *E.coli* ATCC 25922, B) *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve C) *Bacillus cereus* RSKK 9637 ATCC 11778 bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin gözlemlenmesi



Şekil 4. 9 *M. aeruginosa* mikroalginin ekstraktlarının sırasıyla A) *E.coli* ATCC 25922, B) *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve C) *Bacillus cereus* RSKK 9637 ATCC 11778 bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin gözlemlenmesi

4.9 Makroalglerden Aljinat Eldesi Sonuçları

Farklı makroalg türlerinden elde edilen aljinat verimleri Tablo 4.8’de verilmektedir. Elde edilen verimler incelendiğinde en verimli saflaştırma yolunun en az adım içeren etanol ile saflaştırma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, asit muamelelerinin polimer zincirini degrade etmesi sonucunda esas olarak asit ortamında polisakkaritlerin bağlarının düşük stabilitesini yansıtmaktadır. Verimler incelendiğinde etanol ile doğrudan polimer çöktürme işleminin en iyi verimi sağladığı görülmüştür. Şekil 4.10’da elde edilen aljinat ürünün görüntüsü verilmektedir.



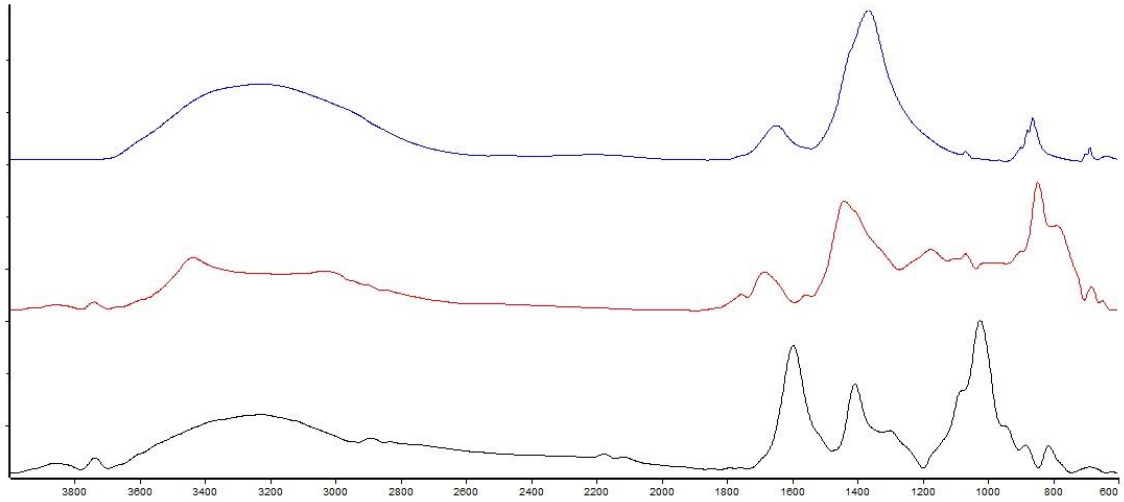
Şekil 4. 10 Elde edilen aljinat ürünü

İki farklı makroalg türünden elde edilen sodyum aljinatın FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.11) hidroksil, eter ve karboksilik fonksiyonel gruplara ait önemli bandlar görülmektedir. O-H bağlarına ait gerilme titreşimleri 3000-3600 cm⁻¹’de belirlenmiş, 1649-1460 cm⁻¹ görülen bandların da karboksilat tuz

iyonlarının asimetrik ve simetrik titreşim gerilmeleri olduğu anlaşılmıştır. 1107 ve 935 cm⁻¹'deki bantlar, piranosil halkanın C-O gerilme titreşimine ve C-C-H ve C-O-H deformasyonunun katkıları ile C-O gerilmesine dayandırılmaktadır. FTIR sonuçları literatürdeki aljinat karakteristik özellikleriyle uyumlu bulunmuştur [132]–[134].

Tablo 4. 9 Farklı makroalg türlerinden elde edilen aljinat verimleri

Makroalg türü	Ekstraksiyon verimi (% wt.)		
	Etanol yolu	HCl yolu	CaCl ₂ yolu
Kahverengi makroalg	32	22	18
<i>Ulva lactuca</i>	17	14	12



Şekil 4. 11 Kahverengi algden elde edilen (—), yeşil algden elde edilen (—) ve ticari aljinatın (—) FTIR spektrumları

4.10 Elektrospreying Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi Sonuçları

B. braunii ve *M. aeruginosa* mikroalglerinin ekstrakte edilmiş yağları kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışma sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.9-4.10'da verilmiştir. Deneysel değişkenlerin nanopartikül boyutu üzerindeki etkilerini anlamak için regresyon denklemleri elde edilmiştir. Tasarım matrisini ve ana

etkileri incelemek için varyans analizi (ANOVA) tekniği kullanılmış ve aşağıdaki regresyon denklemleri elde edilmiştir.

Tablo 4. 10 *M. aeruginosa* yağı kullanılarak farklı koşullarda üretilen partikül çap dağılımının tasarım matrisi ve analiz sonuçları

	Parametreler			Analiz sonuçları	
Deney no	Polimer konsantrasyonu (X ₁)	Akış hızı (X ₂)	Uzaklık (X ₃)	Partikül çapı (Y _{MAN})	PDI
1	-1	-1	0	268,1	0,472
2	1	-1	0	90,34	0,449
3	-1	1	0	271,3	0,481
4	1	1	0	136,2	0,624
5	-1	0	-1	289,3	0,594
6	1	0	-1	216,6	0,508
7	-1	0	1	308,7	0,644
8	1	0	1	105,7	0,485
9	0	-1	-1	220,7	0,679
10	0	1	-1	281,2	0,672
11	0	-1	1	269,7	0,658
12	0	1	1	242,9	0,644
13	0	0	0	255,3	0,668

Tablo 4. 11 *B. braunii* yağı kullanılarak farklı koşullarda üretilen partikül çap dağılımının tasarım matrisi ve analiz sonuçları

	Parametreler			Analiz sonuçları	
Deney no	Polimer konsantrasyonu (X ₁)	Akış hızı (X ₂)	Uzaklık (X ₃)	Partikül çapı (Y _{BBN})	PDI
1	-1	-1	0	295.5	0,449
2	1	-1	0	278.3	0,459
3	-1	1	0	371.9	0,462
4	1	1	0	197.7	0,324
5	-1	0	-1	424.6	0,474
6	1	0	-1	463.2	0,415
7	-1	0	1	354.2	0,522
8	1	0	1	348.9	0,395
9	0	-1	-1	395.9	0,499
10	0	1	-1	324.8	0,672
11	0	-1	1	235.1	0,624
12	0	1	1	312.3	0,532
13	0	0	0	288.5	0,655

$$Y_{MAN} = 255.30 - 73.57 X_1 + 10.35 X_2 - 10.10 X_3 + 10.67 X_1 X_2 - 32.58 X_1 X_3 - 21.82 X_2 X_3 \quad (4.5)$$

$$Y_{BBN} = 324.80 - 76.13 X_1 + 20.26 X_2 - 4.96 X_3 + 14.40 X_1 X_2 - 23.00 X_1 X_3 - 35.57 X_2 X_3 \quad (4.6)$$

Elde edilen regresyon denklemlerinin korelasyon katsayıları sırasıyla $R^2=0.97$ ve $R^2=0.96$ olarak bulunmuştur. Eşitlik 4.5 ve 4.6 incelendiğinde partikül boyutu (Y_{MAN} ve Y_{BBN}) üzerine en fazla etkisi olan parametrenin polimer konsantrasyonu (X_1) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte polimer konsantrasyonunun partikül boyutu ile ters orantılı olduğu yani, polimer konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunda azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Polimer konsantrasyonunun yanısıra şırınga ve toplayıcı plaka arasındaki mesafenin de (X_3) partikül boyutunu ters yönde etkilediği görülmüştür. Akış hızının (X_2) etkisi partikül boyutu ile doğru orantılı olup, akış hızı arttıkça partikül boyutlarında artış meydana gelmiştir. Ayrıca, parametrelerin interaktif etkilerinin de oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

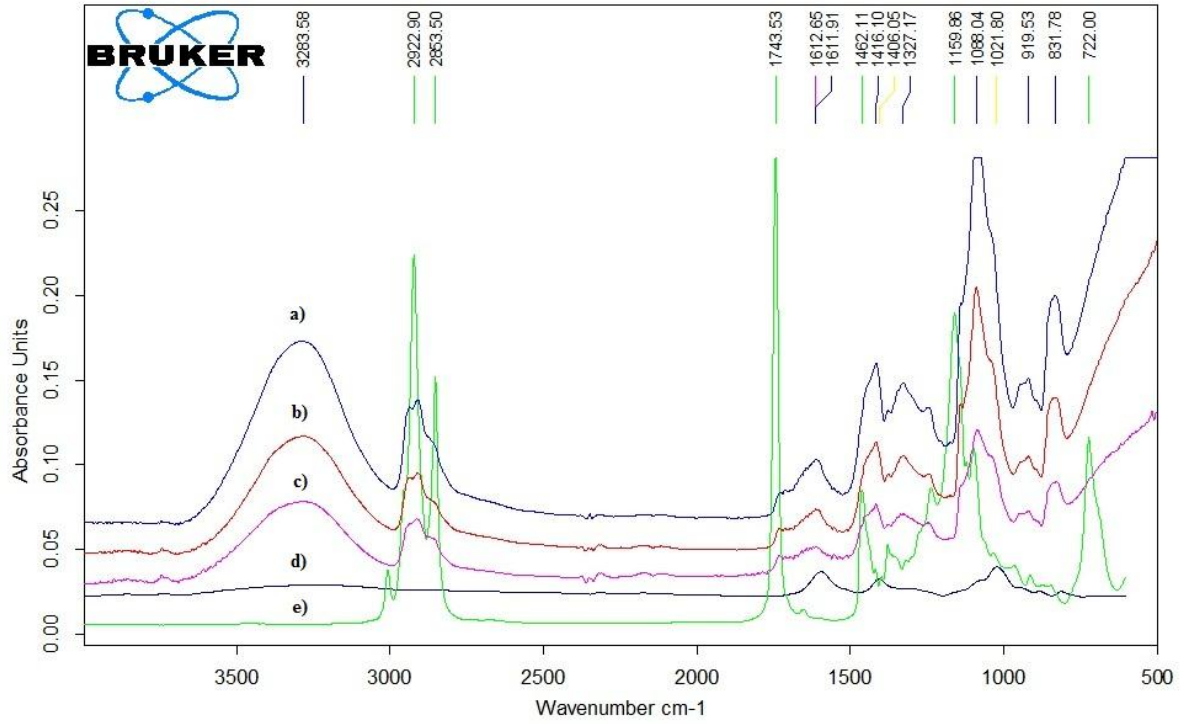
Model denklemin ANOVA parametreleri Tablo 4.11’de verilmiştir. Oldukça düşük bir olasılık değeri, regresyon modeli için çok yüksek bir başarıya işaret etmektedir. Modelin uygunluğu belirleme katsayısı (R^2) ile kontrol edilmiştir. Deney ve tahmin edilen değerler arasında daha iyi bir korelasyon görmek için R değeri 1’e yakın olmalıdır. Çalışmada bulunan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.97$ ve $R^2 = 0.96$ değeri, toplam varyasyonun sadece yaklaşık % 3 ve %4’ünün model tarafından açıklanmadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçların literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmüştür [70], [135]–[138].

Tablo 4. 12 Partikül boyutu için istatistiksel değerlendirmenin ANOVA sonuçları

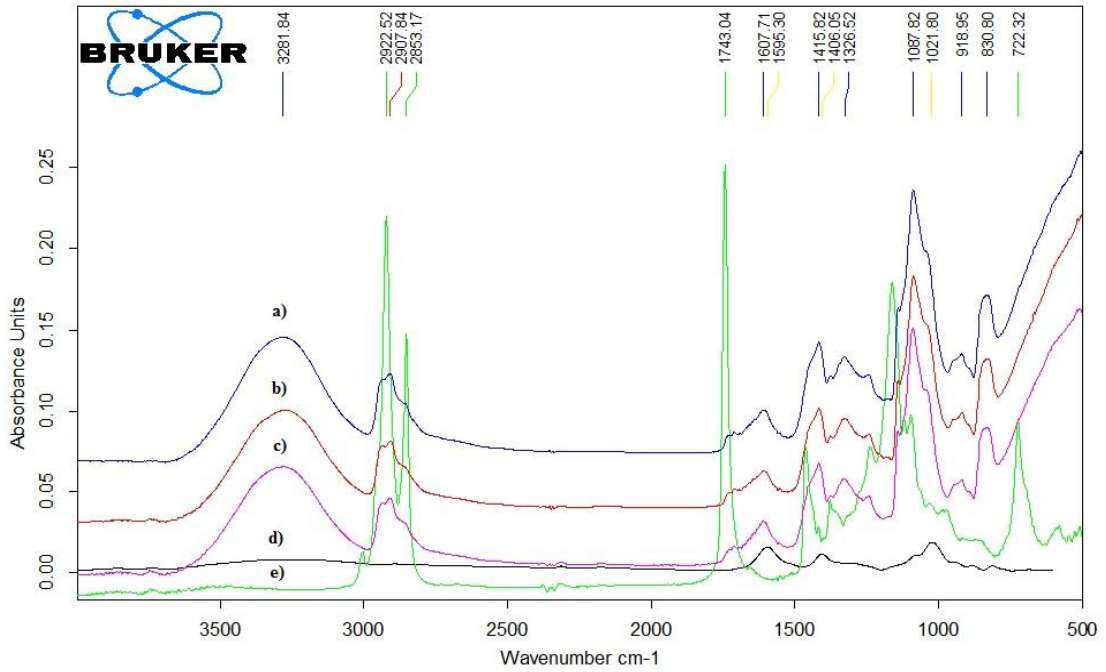
	<i>Varyansın kaynağı</i>	<i>Serbestlik derecesi</i>	<i>Kareler toplamı</i>	<i>Kareler ortalaması</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>M. aeruginosa</i>	Regresyon modeli	9	60294,99	6699,44	13,33	0,0281
	Hata	3	1507,70	502,57		
	Toplam	12	61802,69			
<i>B. braunii</i>	Regresyon modeli	9	64118,58	7124,29	10,43	0,0396
	Hata	3	2049,05	683,02		
	Toplam	12	66167,63			

4.11 FTIR Analizi Sonuçları

Şekil 4.12-4.13’de verilen FTIR spektrumlarına göre, hidroksil, eter ve karboksilik fonksiyonel grupların bandları gözlenmiştir. 3283 cm^{-1} ’de -OH gerilme bandı meydana gelmiş ve 2922-2853 cm^{-1} ’de görülen bantlarda CH antisimetrik ve simetrik gerilme olduğu görülmüştür. 1743 cm^{-1} ve 1159 cm^{-1} ’de oluşan pikler ise, örneğin içeriğindeki yağın varlığını göstermektedir. 1021 cm^{-1} ve 831 cm^{-1} ’de C-O gerilme ve CH düzlem deformasyonu vardır. 1462 cm^{-1} ’de çıkan pik karboksilat tuz iyonlarının asimetrik ve simetrik titreşimsel gerilmeleri olarak ortaya çıkmıştır. Spektrumlarda görülebileceği gibi, mikroalgal yağ yüklü nanopartiküllerin ve mikroalgal yağın pikleri 2922, 2853, 1743 ve 1462 cm^{-1} ’de çakışmıştır. Bu çakışma, üretilen nanopartiküllerdeki yağın varlığını göstermektedir. Literatürde farklı yağlar ve polimerlerle yapılan çalışmalarda da kullanılan yağın ve yağ içeren nano yapıların FTIR spektrumları incelendiğinde piklerde çakışmalar gözlemlenmiştir. Moghaddam vd. tarafından n-nonadekan içeren kalsiyum aljinat nanokapsüllerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimi yapılan nano kapsüllerin ve yağın FTIR spektrumu incelendiğinde bu çalışmadaki piklere benzer şekilde 2920 ve 2850 cm^{-1} ’de çakışmalar gözlemlenmiş ve nonadekanın kapsüller içerisine başarıyla enkapsüle olduğunu göstermiştir [139]. Gao vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada da silikon yağının polikaprolakton kapsülleri içerisindeki varlığı FTIR analizleri ile gözlemlenmiştir [136].



Şekil 4. 12 a) % 8 PVA-NaAlg nanopartikül b) % 7.5 PVA-NaAlg nanopartikül c) % 7 PVA-NaAlg nanopartikül d) NaAlg e) *M. aeruginosa* mikroalg yağı

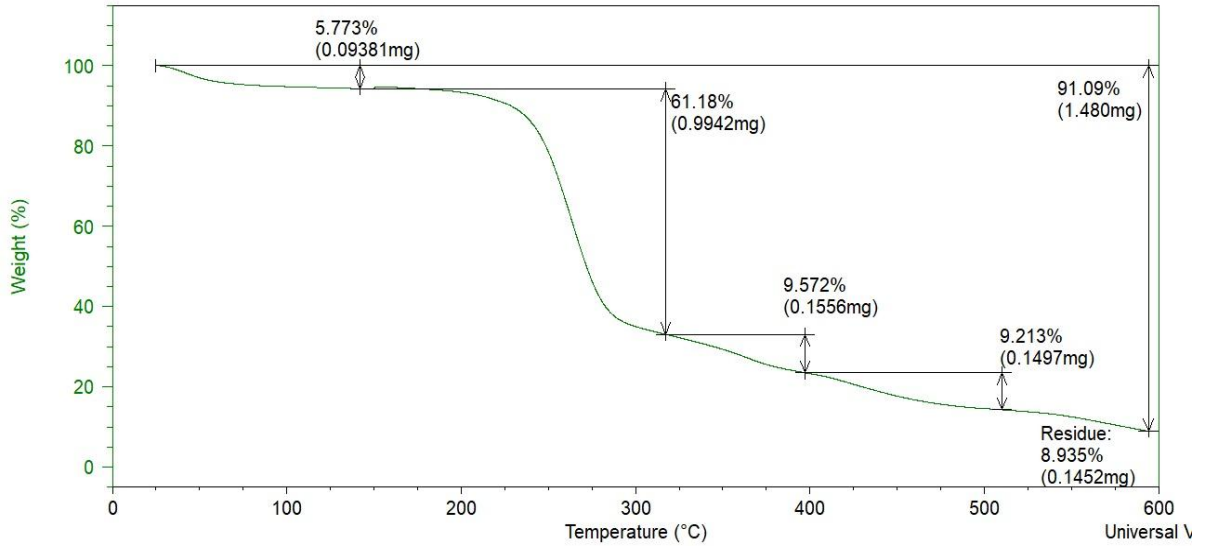


Şekil 4. 13 a) % 8 PVA-NaAlg nanopartikül b) % 7.5 PVA-NaAlg nanopartikül c) % 7 PVA-NaAlg nanopartikül d) NaAlg e) *B. braunii* mikroalg yağı

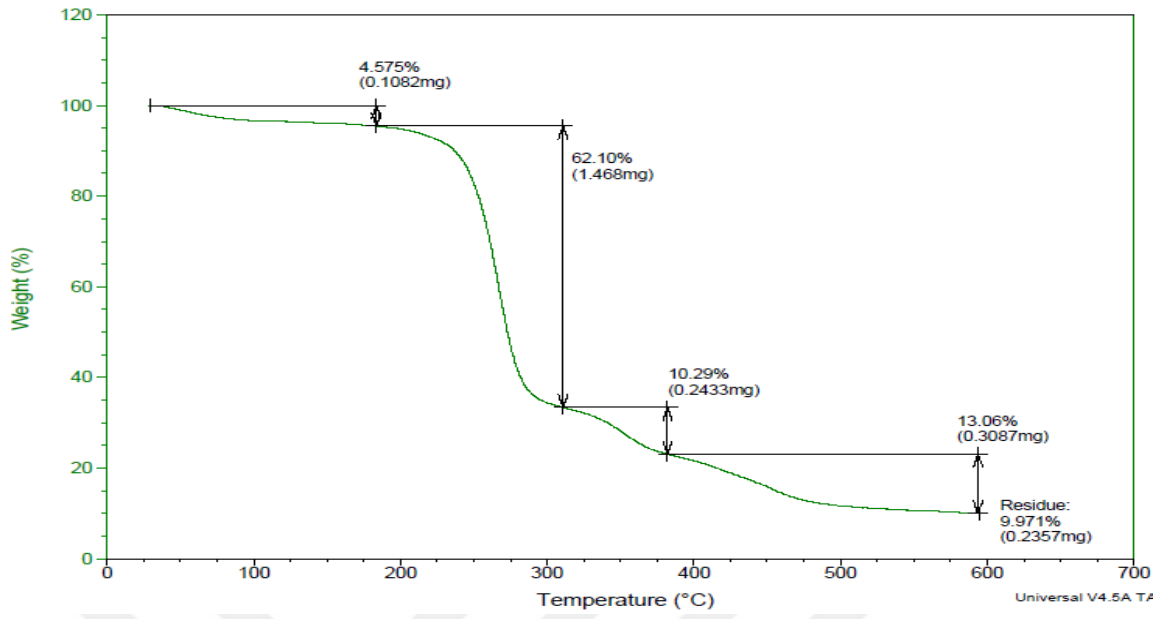
4.12 Termal Analiz Sonuçları

Üretimi yapılan örneklerin termal analiz sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir. Nanopartiküllerin degradasyonu 100°C civarında nem çıkışı ile başlamıştır. Yapılan TGA analizlerinden örneklerin nem içeriği % 5.77 ve % 4,75 olarak bulunmuştur. Mikroalgal yağ yüklü nanopartiküller, 225°C'nin üzerinde bir sıcaklıkta yavaşça bozunmaya başlamıştır. Hem yağ içermeyen partiküller hem de yağ yüklü nanopartikül için %9 ile %8 arasında bir kalıntı bulunmuştur. TGA eğrisi incelendiğinde nem çıkışından sonra, nanopartiküllerin iki adımda bozunmaya uğradığı görülmektedir. İlk olarak 225 ile 275°C sıcaklık aralığında % 61-62'lik bir ağırlık kaybı, ikinci adımda ise 275 ile 600°C sıcaklık aralığında % 18-23'lik bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir. 225 ile 275°C arasındaki sıcaklıktaki bozunma PVA'nın termal bozunmasından kaynaklanmış olup, 275-510°C'deki degradasyon ise PVA'nın yan ürün oluşumuna bağlıdır. Holland ve Hay'in yapmış olduğu çalışmaya göre, termal bozunma, eritilmiş durumda aldehit ve alken son gruplarının meydana gelmesine yol açabilir ve bu da yeniden düzenlenerek vinil esterin oluşumuna neden olabilmektedir [140],[141].

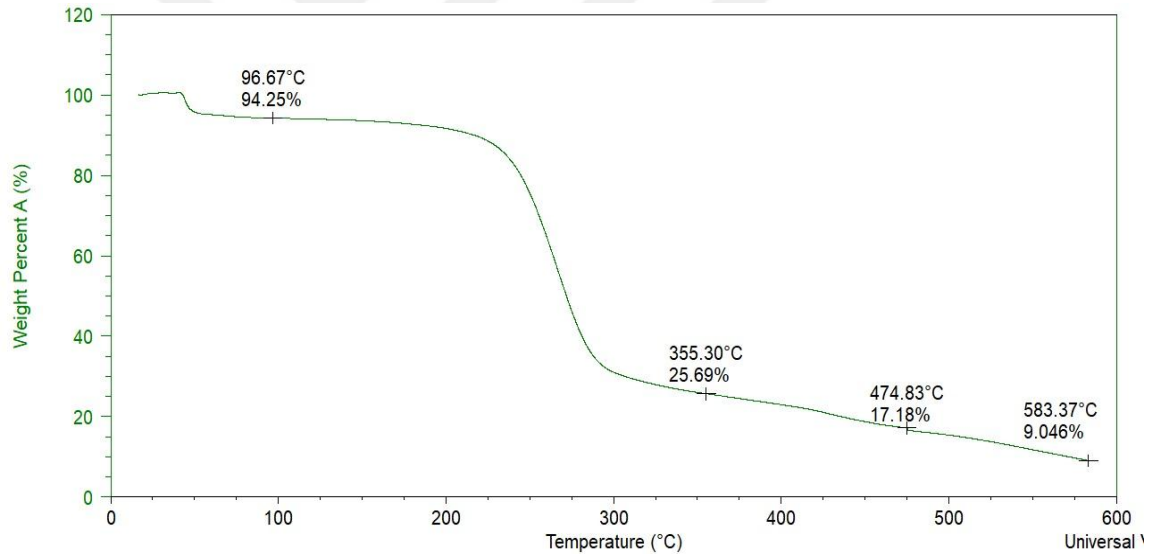
a)



b)



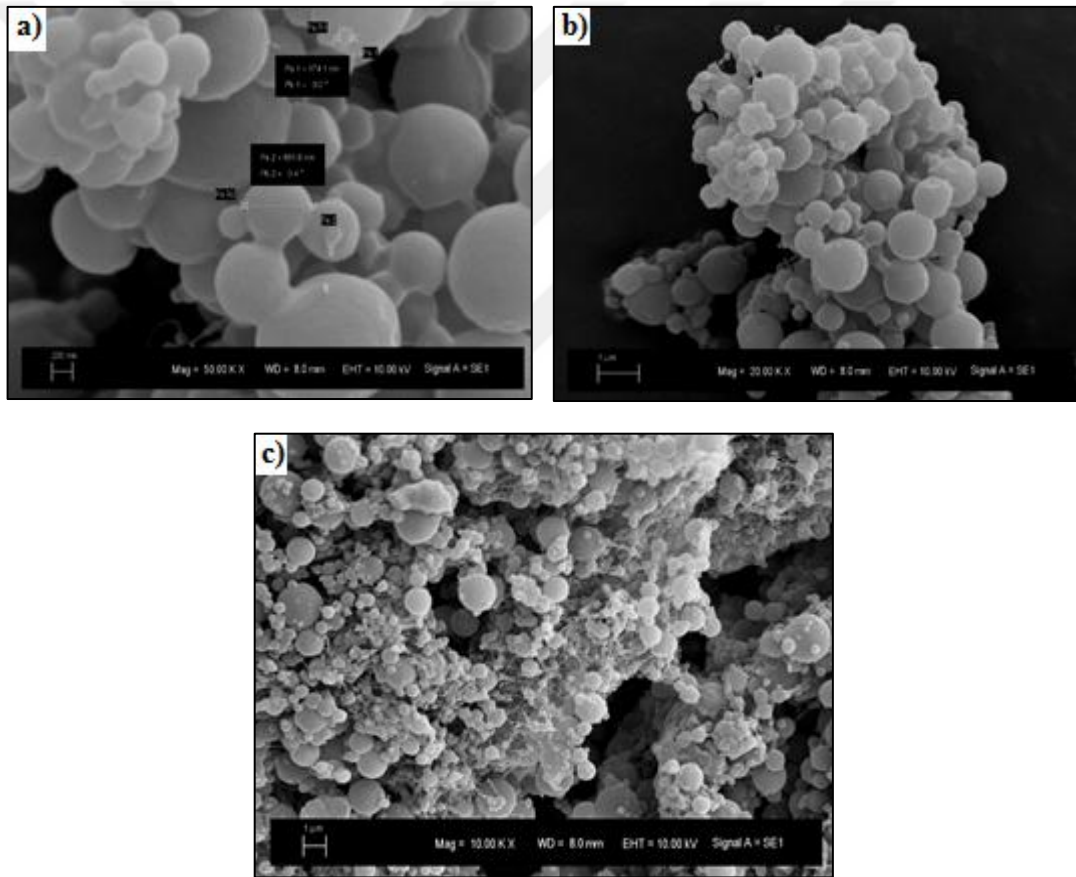
c)



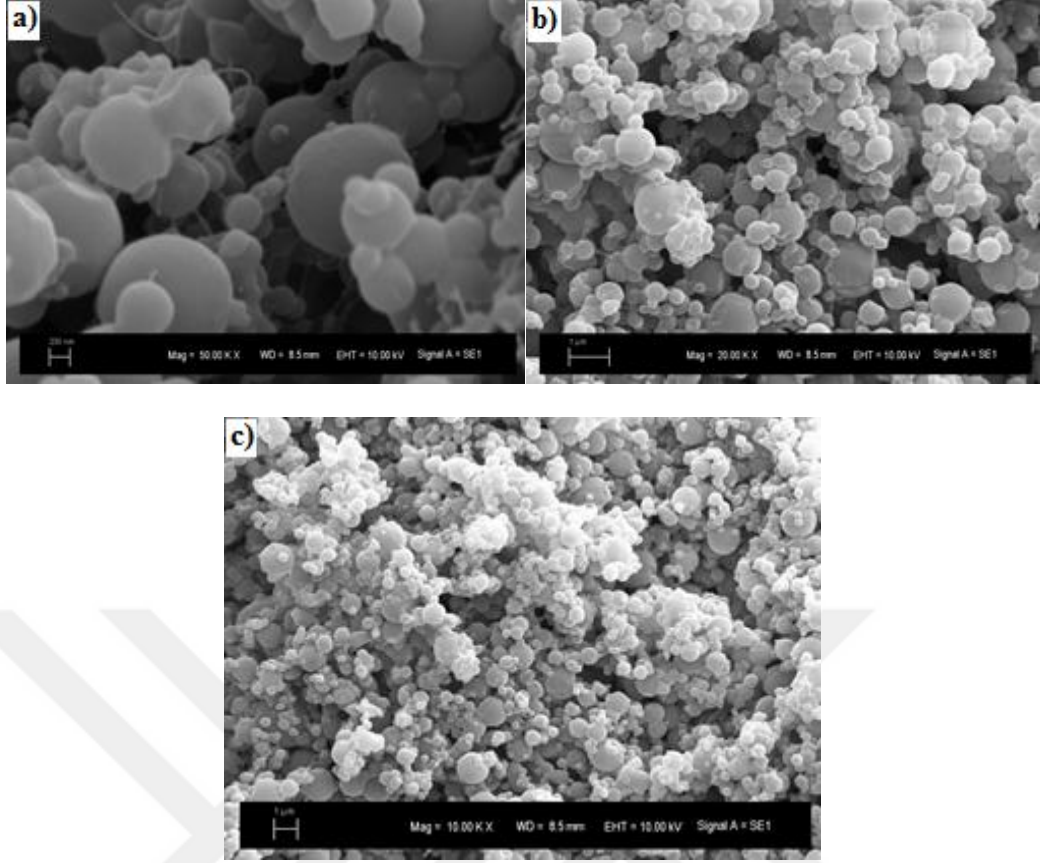
Şekil 4. 14 a) *M. aeruginosa* yağı yüklü nanopartikül (%8 PVA) b) *B. braunii* yağı yüklü nanopartikül (%8 PVA) ve c) yağ içermeyen nanopartiküllerin TGA eğrileri

4.13 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

Elektrospreying yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ölçümleri YTÜ Merkez Laboratuvar bünyesinde bulunan Zeiss EVO LS 10 SEM cihazı ile 20-50.00 kX büyütme ile çekilmiştir. Alınan SEM sonuçları ile üretimi gerçekleştirilen partiküller Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da görülmektedir. SEM analizi sonucunda üretimi yapılmış partiküllerin küresel şekilde olduğu görülmüştür. Analiz ile birlikte 100-600 nm boyutlarında partiküller tespit edilmiştir. Zeta-sizer ile yapılan boyut ölçümü analiz sonuçları da SEM analizi sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4. 15 *B. braunii* ekstraktı yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri a) 50 kX büyütme, b) 20 kX büyütme c) 10 kX büyütme



Şekil 4. 16 *M. aeruginosa* ekstraktı yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri a) 50 kX büyütme, b) 20 kX büyütme c) 10 kX büyütme

4.14 Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi

Tablo 4.12 mikroalg yağı içeren nanopartiküllerin enkapsülasyon verimliliklerini göstermektedir. Nanopartiküllerin kapsülleme verimlilik değerleri %50 ile %77 arasında değişmiştir. Bu değişimin nedeni, mikroalg yağının aljinata kapsüllenme sınırlamalarına bağlanabilir. Kataria vd. tarafından yapılan çalışmada siprofloksasin yüklü aljinat/PVA nanofiberlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Elektrosinleme, nanoskopik ölçekte polimer çözeltisinin yerinde katılaşmasına yol açtığından, ilacın doğada uçucu olmaması koşuluyla % 100 ilaç tutma etkinliği sağlar. İlaç tutma etkinliği yaptıkları çalışmada %98 olarak bulunmuştur. Arthanari vd. tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada da gatifloksasin yüklü aljinat/PVA nanofiberlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da ilacın yüklenme kapasitesi %95 olarak bulunmuştur. Bu yüksek tutma kapasitesi yazarlar tarafından ilacın polimer çözeltisindeki çözünürlüğüne dayalı olmasına bağlanmıştır [142], [143]. Bu durum göz önüne alındığında mikroalg ekstraktların aljinat/PVA

çözeltisine karışma oranına bağlı olarak enkapsülasyon verimlerinde değişimler gözlenmiştir. Buna karşın yine de bu çalışmada belirlenen verimlilik değerleri yüksektir; bu da elektrospreying tekniği ile kapsülleme işleminin oldukça verimli olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 4. 13 Partiküllerin yüklenme verimleri

Örnek	EE-MA	EE-BB	EE-CP
%8 PVA içerikli NaAlg	%54	%52	%77
%7,5 PVA içerikli NaAlg	%50	%49	%72
%7 PVA içerikli NaAlg	%49	%44	%66

4.15 MTT ve XTT Canlılık Testi

Tez çalışmasında öncelikle ön çalışma olarak kullanılan *C. protothecoides* yağı ve bu yağ kullanılarak üretimi yapılan partiküllerin canlılık testleri yapılmıştır. Daha sonar üretim optimizasyonu yapılarak elde edilen değerli biyoaktif maddelerce zengin *M. aeruginosa* ve *B. braunii* mikroaglerinin ekstraktları ve ekstraktların enkapsülasyonu sonrası elde edilen nanopartiküllerin farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir.

Ön deneylerde insan endotel hücreleri (HUVEC'ler) ve insan kolon karsinoma hücre hatları (HCT116) kullanılmıştır. Deneyler, verileri doğrulamak amacıyla üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları, örneklerin hücre kültürleri üzerine uygulanmasından sonra MTT testi ile elde edilen OD değerlerin, kontrol grubu OD değerlerine oranı (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiş ve her grubun kendi kontrol grubunun hücre canlılık oranlarının %100 olduğu kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır [144].

Mosmann'ın çalışmasına göre, deney materyali uygulandıktan sonraki hücre canlılığı oranına göre sitotoksik etkiyi aşağıdaki skala ile derecelendirmiştir [145]:

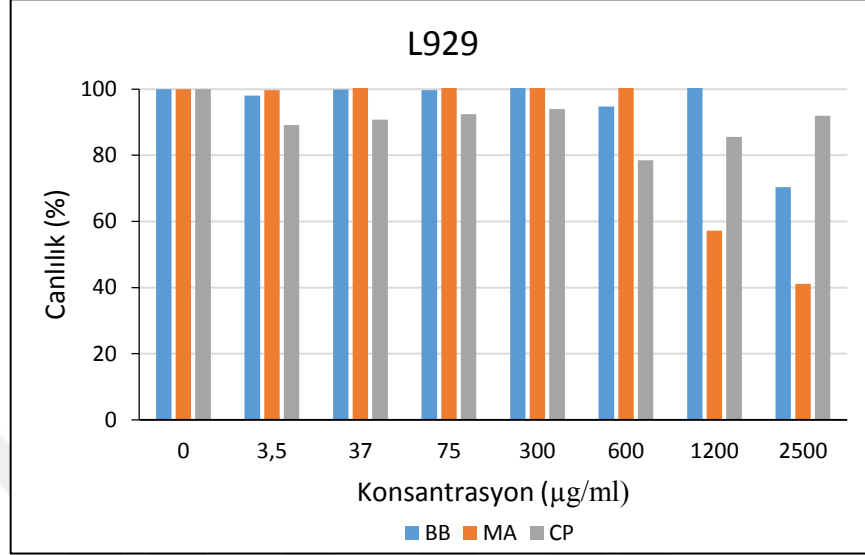
- %90 ve üzeri hücre canlılığı varlığı → sitotoksik değil
- %60-90 arası hücre canlılığı varlığı → hafif derecede sitotoksik
- %30-59 arası hücre canlılığı varlığı → orta derecede sitotoksik

- %30 ve altı hücre canlılığı varlığı → şiddetli derecede sitotoksik

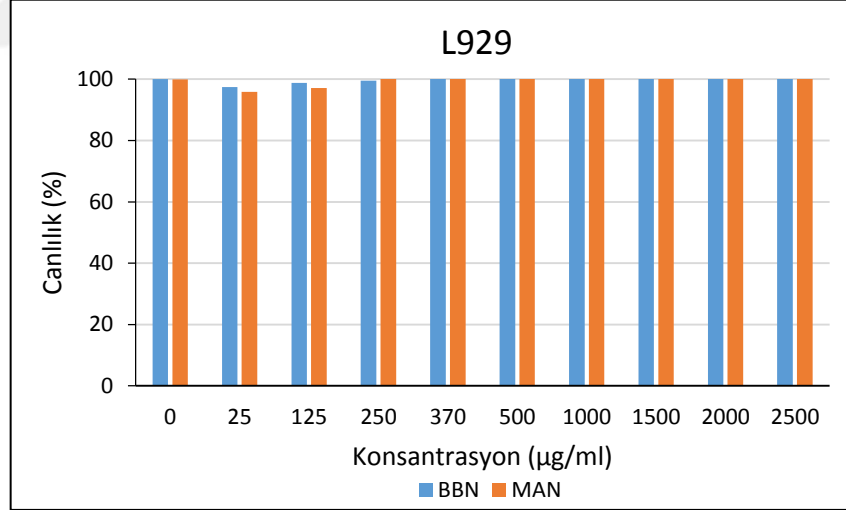
İlk olarak, ticari olarak temin edilmiş *C.protothecoides* yağı ve nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi kanserli olmayan bir hücre hattı olan HUVEC hücre hattında ve L929 hücre hattında test edilmiştir. Bu hücre hatlarında parçacıklar ve mikroalg yağı sitotoksik etki göstermemiştir. Kanser hücresi hattında ise *C. protothecoides* yağı içeren nanopartiküller düşük konsantrasyonlarda çok az sitotoksik etki göstermiş, konsantrasyon arttıkça etkide artış gözlenmiştir [144].

Gerçekleştirilen ön deneylerin ardından farklı algal ekstraktlar ve nanopartiküllerin sitotoksik etkisi L929 fare fibroblast, PC-3 prostat kanser hücre hattı, SHSY-5Y nöroblastom (beyin) hücre hattı ve AGS gastrik adenokarsinom (mide) hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Değerli biyoaktif madde içeriğince zengin mikroalg üretimi için optimizasyon çalışması yapılarak, lipid üretimi açısından en optimum koşul belirlenmiş (0,1875 g NaNO₃, 22,5°C sıcaklık ve 16 saat aydınlatma) ve bu koşullarda üretimi yapılan *B. braunii* ve *M. aeruginosa* türlerinin ekstraktlarının ve ticari olarak temin edilmiş *C. protothecoides* yağının ve mikroalgal ekstrakt yüklü nanopartiküllerin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 4.17 ve 4.18’de sunulmuştur. Şekillerde görüldüğü üzere ekstraktların (BB, MA ve CP) ve nanopartiküllerin (BBN ve MAN) L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi görülmemiştir. Bu da ekstraktların ve mikroalgal ekstrakt yüklü nanopartiküllerin normal hücreler üzerine toksik etki etmediğini ortaya koymaktadır. Sitotoksik etki sadece ekstrakt konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu durumda gözlenmiştir. Literatürde bu türlerin ekstraktlarının sitotoksik etkisinin incelenmesine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Literatürde farklı algal türler üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde ise algal ekstraktlarının fare fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkisi olmadığı görülmektedir. Chu vd. tarafından yapılan çalışmada *Spirulina* ekstraktlarının fare fibroblast hücreleri (3T3) üzerine sitotoksik etki yaratmadığı, bununla birlikte *Spirulina*’nın ekstraktının serbest radikallerden dolayı gelişen apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir etkisi olduğunu göstermiştir [146]. Namkoong vd. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Eisenia bicyclis* alginden elde edilen ekstraktların sitotoksik etkisi RBL-2H3 sıçan mast hücre hattı, HaCaT insan keratinosit hücre hattı ve

NIH3T3 fare fibroblast hücre hattı üzerinde denenmiştir. Çalışma sonucunda ekstraktların HaCaT ve NIH3T3 hücreleri üzerinde toksik etkisi bulunmadığı görülmüş, belirli bir konsantrasyona kadar da RBL-2H3 hücrelerine toksik etki yaratmadığı gözlemlenmiştir [147].



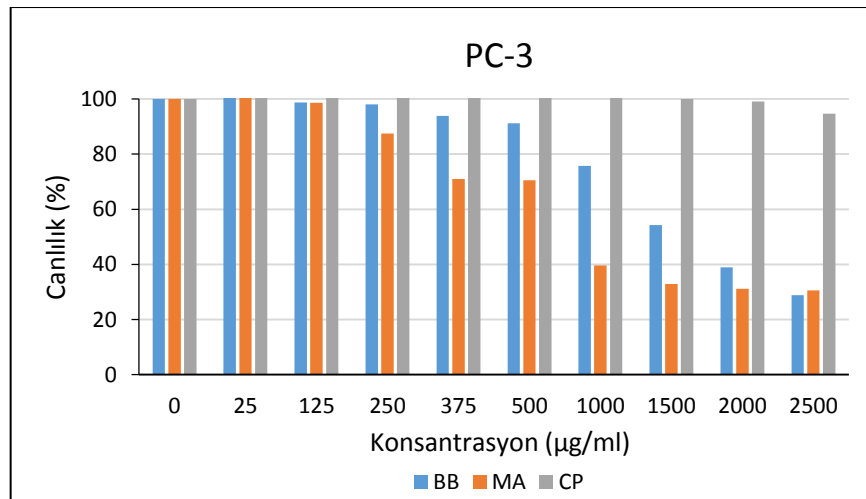
Şekil 4. 17 Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi



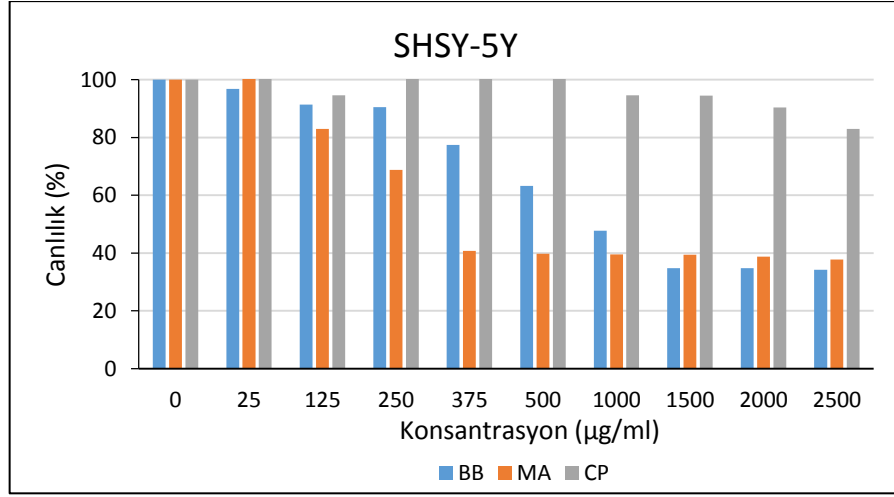
Şekil 4. 18 Mikroalgal ekstrakt yüklü nanopartiküllerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Mikroalgal ekstraktların PC-3, SHSY-5Y ve AGS kanser hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkileri Şekil 4.19-4.21’de verilmiştir. Optimizasyon çalışması sonrası ekstrakte edilerek elde edilen *B. braunii* ve *M. aeruginosa* ekstraktlarının kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin, daha önceden ticari olarak temin edilmiş

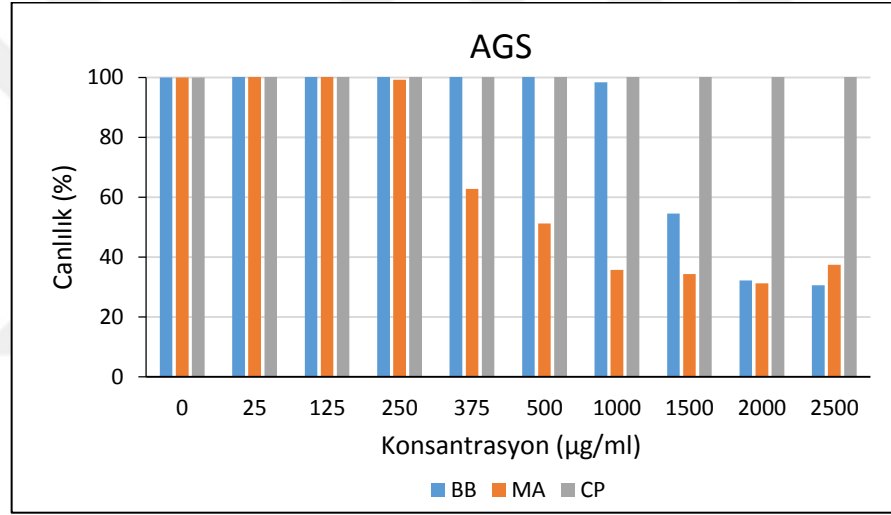
Chlorella protothecoides yağının kanser hücreleri üzerine olan etkisine kıyasla belirgin bir şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlardan daha önceden ticari olarak temin edilen mikroalgal yağın biyoaktif özelliğini kaybettiği, ancak yeni ekstrakte edilmiş mikroalgal ekstraktların oldukça etkili olduğu görülmektedir. Mikroalgal ekstraktların *Chlorella protothecoides* yağına kıyasla kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri %30 ve daha fazla olup; mikroalgal ekstraktlardan *M. aeruginosa*'nın etkisi de *B. braunii*'ye kıyasla daha fazladır. Kanser hücre hatlarına olan sitotoksik etkileri de karşılaştırıldığında mikroalgal ekstraktların sırasıyla en çok PC-3, daha sonra AGS ve SHSY-5Y hücre hatlarını etkilediği belirlenmiştir. Tannoury, M.Y. ve ark. (2017), Sanjeewa, K.K.A. ve ark. (2016), Atasever-Arslan, B. ve ark. (2016), Zhu, X. (2012), Borges, O. ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmalarda da alglerin çeşitli kanser türlerine karşı sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir [148]–[152]. Mikroalgal ekstraktla yüklü nanopartiküllerin kanser hücre hatları üzerindeki etkisi incelendiğinde ise 24 saat sonunda nanopartiküllerin L929 ve kanser hücreleri üzerine çok fazla sitotoksik etki yaratmadığı görülmüştür. Bu sonuçtan nanopartikül yapısında kullanılan polimerlerin biyouyumlu olduğu ve FTIR ve TGA sonuçları ile de mikroalgal ekstrakt enkapsülasyonu tespit edilmiş olan nanopartiküllerden 24 saat süresince bir sızıntı olmadığı yani nanopartikül yapısının sağlamlığı ve hemen salıma geçmeyerek aşamalı bir salım gerçekleştireceği ortaya konulmuştur.



Şekil 4. 19 Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın PC-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi



Şekil 4. 20 Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın SHSY-5Y kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi



Şekil 4. 21 Mikroalgal ekstraktların ve ticari olarak temin edilmiş yağın AGS kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Sonuç ve Öneriler

Botryococcus braunii ve *Microcystis aeruginosa* türlerinin biyoaktif madde ürettikleri optimum koşulların belirlenmesi ve alglerden elde edilen ekstraktların karakterizasyonunun gerçekleştirildiği, mikroalg ekstraktların nano yapılar haline getirilip kaplanması için makroalglerden biyopolimer elde edilmesi, elektrospreying tekniği ile mikroalglerden elde edilen biyoaktifçe zengin ekstraktlar ile yüklü nanopartiküllerin üretildiği ve bu çalışma ile elde edilen mikroalg ekstrakt ve nanopartiküllerin prostat, beyin ve mide kanser hücre hatları gibi kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiği bu tez çalışmasının genel sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

- Mikroalg ve siyanobakteri ile yapılan üretim optimizasyonu çalışmasında azot miktarı, aydınlanma süresi ve sıcaklık parametrelerinin etkisi istatistiksel olarak incelenmiş olup, azot miktarının artışının ve sıcaklığın artışının lipid miktarını azalttığı gözlemlenmiş ve en etkili parametrenin azot stresi olduğu görülmüştür. Aydınlanma döngüsünün ise pozitif yönde bir etkisi olduğu belirlenmiştir.
- Yapılan tez çalışması sonucunda en yüksek lipid içeriği *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* için sırasıyla %53,80 ve %32,61 olup; 0,1875 g NaNO₃, 22,5°C sıcaklık ve 16 saat aydınlatma koşulları altında elde edilmiştir.
- 27 gün boyunca fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* için spesifik büyüme hızı (μ), ölüm hızı sabiti (k_d) ve ikilenme süresi (t_d) sırasıyla 0,11 gün⁻¹, 0,08 gün⁻¹ ve 6,3 gün ile 0,11 gün⁻¹, 0,05 gün⁻¹ ve 6,3 gün olarak hesaplanmıştır.
- Erlenlerdeki *B. braunii* kültürlerinin ortalama kayma gerilmesi 0,087 s⁻¹ iken; fotobiyoreaktördeki üretimlerde ortalama kayma gerilmesi 24,85 s⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Aynı koşullarda *M. aeruginosa* kültürlerinin ortalama kayma gerilmesi 0,045 s⁻¹ iken; fotobiyoreaktördeki üretimlerde ortalama kayma gerilmesi 30,1 s⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalara göre girdap büyüklüğünün mikroalg hücrelerine göre daha büyük olduğu, hücrelerin reaktör içerisindeki türbülans etkilenmediği ve yüksek kayma hızlarına adapte olduğu görülmüştür.

- Üretimi yapılan türlerin FTIR analizleri sonucu 1743 cm⁻¹ bandında (C=O) lipidler ve yağ asitlerinin varlığını ve ester grupları, 2922 cm⁻¹'deki CH gerilmesi ve 1743 cm⁻¹'deki ester karbonil grubun C=O gerilmesi lipid piklerini, 1151 cm⁻¹'deki C-O-C gerilmeleri ise mikroalgin yapısındaki polisakkaritleri ve 1546 cm⁻¹'de çıkan pik türlerin yapısındaki proteinlerin varlığını göstermektedir.
- Mikroalg türlerinin kısa analizleri sonucunda nem, uçucu madde, sabit karbon ve kül içerikleri *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* için sırasıyla %7,22, %69,74, %17,07 ve %5,99 ile %5,71, %84,79, %6,20 ve %3,32 olarak bulunmuştur.
- Gaz kromatografisi analizleri sonucunda alınan kromatogramlar incelendiğinde *Botryococcus braunii* yağının içeriğinde palmitik (16:0), oleik (18:1), linoleik (18:2), araşidik asit (20:0) ve eicosapentaenoic acid (EPA) (20:5) asitlerin varlığı görülmektedir. *M. aeruginosa* yağ asidi metil esteri incelendiğinde ise palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) yağ asitleri belirlenmiştir. *M. aeruginosa*'ya benzer bir şekilde *C. protothecoides* yağının içeriğinde de palmitik (16:0), oleik (18:1), linoleik (18:2) asitlerin varlığı görülmektedir.
- Mikroalg ve siyanobakteri ekstraktlarının antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte *E.coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ve *Bacillus cereus* RSKK 9637 ATCC 11778 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği gözlemlenmiştir.
- Makroalglerden aljinat eldesi çalışmasında farklı saflaştırma metotları denenmiş ve elde edilen verimler incelendiğinde en verimli saflaştırma yolunun en az adım içeren etanol ile saflaştırma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, asit muamelelerinin polimer zincirini degrade etmesi sonucunda esas olarak asit ortamında polisakkaritlerin bağlarının düşük stabilitesini yansıtmaktadır.
- Elektrospreyleme yöntemi ile üretilen partiküllerin boyut analizi ölçümlerine göre regresyon analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarında üretim parametrelerinin etkileri beklenen değerlerde etki etmiştir.

PVA:NaAlg partiküllerin üretiminde etkili olan parametreler içinde en etkin parametrenin PVA konsantrasyonu olduğu ve konsantrasyon artışının partikül çapını azalttığı görülmektedir.

- Elektrospreying işleminde polimer konsantrasyonu arttıkça konik jet uzaması artar ve kesintisiz uzun lifler üretilmeye başlanır. Bu nedenle polimer konsantrasyonu nanopartikül üretimi için çok önemli bir parametredir. İstenen partikül boyutu ve verimi için optimum konsantrasyon %8 PVA konsantrasyonu 0,2 ml/saat akış hızı ve 13 cm toplayıcı mesafesi parametrelerinde yapılan partiküller ile elde edilmiştir.
- Elektrospreying işleminde en küçük nanopartikül boyutu 90 nm ile *M. aeruginosa* ekstraktı ile yüklü nanopartikül olarak %8 PVA konsantrasyonu 0,2 ml/saat akış hızı ve 13 cm toplayıcı mesafesi koşulları altında elde edilmiştir. *B. braunii* ekstraktı yüklü nanopartikül üretiminde ise en küçük nanopartikül boyutu aynı koşullar altında 197,7 nm olarak bulunmuştur.
- Elektrospreying tekniği ile üretilen partiküllerin termogravimetrik analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucu partiküllere yüklenen yağlar 200°C'ye kadar olan sıcaklıklarda bozunma göstermiş, NaAlg ise 250°C'de bozunma göstermiştir.
- Elektrospreying tekniği ile üretilen partiküllerin FT-IR spektroskopisiyle yağ yüklenme işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğine yüklü partiküller ile serbest mikroalg yağının pikleri karşılaştırılarak bakılmıştır. Mikroalgal yağ yüklü nanopartiküllerin ve mikroalgal yağın pikleri 2922, 2853, 1743 ve 1462 cm⁻¹'de çıkmıştır. Bu çıkışma, üretilen nanopartiküllerdeki yağın varlığını göstermiştir.
- Nanopartiküllerin SEM görüntüleri SEM cihazı ile 20-50 kX büyütme ile çekilmiştir. SEM analizi sonucunda üretimi yapılmış partiküllerin küresel şekilde olduğu görülmüştür. SEM analizi ile birlikte 100-600 nm boyutlarında partiküller tespit edilmiştir.
- Nanopartiküllerin enkapsülasyon verimlilikleri incelendiğinde verimlilik değerleri %50 ile %77 arasında bulunmuştur. Bu değişimin sebebinin ekstraktın polimer çözeltisindeki çözünürlüğü ile alakalı olup, literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir.

- Tez çalışmasında biyoaktif maddelerce zengin mikroalgal lipid içeriğini arttırmak amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları sonrası optimum koşullar belirlenmiş ve biyoaktifçe zengin *B. braunii* ve *M. aeruginosa* türleri üretilmiştir. Bu koşullarda üretilen mikroalglerin ekstraktları ticari olarak daha önceden temin edilmiş *C. protothecoides* yağı ile karşılaştırılmıştır.
- Tez çalışması ile elde edilen ekstraktlar ve bu ekstraktlarla yüklü nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücrelerine sitotoksik etki göstermediği görülmüş olup, PC-3 prostat kanser hücre hattı, SHSY-5Y nöroblastom (beyin) hücre hattı ve AGS gastrik adenokarsinom (mide) hücre hattı üzerine sitotoksik etkide bulunduğu tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda ekstrakt yüklü nanopartiküllerden kısıtlı bir miktarda salım gerçekleşmiş bu da partiküllerin yapısının sağlamlığını ve yavaş yavaş salıma geçtiğini göstermiştir.
- Mikroalgal ekstraktların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi karşılaştırıldığında ekstraktlardan *M. aeruginosa*'nın daha etkili olduğu ve mikroalgal ekstraktların sırasıyla en çok PC-3, AGS ve SHSY-5Y hücre hatlarına etki ettiği tespit edilmiştir.
- Tez çalışması ile üretilen ekstraktlar ile ticari olarak temin edilen yağın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde önceden alınan yağın biyoaktif özelliğini kaybettiği ve bu tez çalışması ile üretilen ekstraktlara nazaran kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki yaratmadığı görülmüştür. Biyoaktif özelliğe sahip diğer yağlar gibi mikroalgal yağların da özelliğini kaybedebildiğini ve oksidasyondan koruma ve adsorpsiyon özelliğini geliştirme açısından enkapsülasyon işleminin önemini ortaya koymaktadır.
- Elde edilen bulgular doğrultusunda, bu tez çalışmasıyla biyoaktif maddelere sahip olan *Botryococcus braunii* ve *Microcystis aeruginosa* türlerinin ekstraktlarının ve ekstraktların enkapsülasyonu ile üretilmiş nanopartiküllerin özellikle farmasötik ve kozmetik alanlarında değerlendirilebilme potansiyeli olduğu gösterilmiştir.

- [1] K. Yamaguchi, "Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review," *J. Appl. Phycol.*, vol. 8, no. 6, pp. 487–502, 1996.
- [2] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, "Commercial applications of microalgae," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.
- [3] H. Dominguez, *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Elsevier, 2013.
- [4] Z.-Y. Wen and F. Chen, "Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae," *Biotechnol. Adv.*, vol. 21, no. 4, pp. 273–294, 2003.
- [5] F. Shahidi, "Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 9, pp. 376–387, 2009.
- [6] P. B. Kernoff, A. Willis, K. J. Stone, J. A. Davies, and G. P. McNicol, "Antithrombotic potential of dihomo-gamma-linolenic acid in man," *Br Med J*, vol. 2, no. 6100, pp. 1441–1444, 1977.
- [7] K. S. Vaddadi and D. F. Horrobin, "Weight loss produced by evening primrose oil administration in normal and schizophrenic individuals," *IRCS J Med Sci*, vol. 7, p. 52, 1979.
- [8] Y. S. Huang, S. C. Cunnane, D. F. Horrobin, and J. Davignon, "Most biological effects of zinc deficiency corrected by γ -linolenic acid (18: 3 ω 6) but not by linoleic acid (18: 2 ω 6)," *Atherosclerosis*, vol. 41, no. 2–3, pp. 193–207, 1982.
- [9] D. F. Horrobin, "The possible roles of prostaglandin E1 and of essential fatty acids in mania, depression and alcoholism," *Prog. Lipid Res.*, vol. 20, pp. 539–541, 1981.
- [10] L. L. Smith, "Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 47–61, 1991.
- [11] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde, and M. K. Danquah, "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 1037–1047, 2010.
- [12] J. L. Harwood and I. A. Guschina, "The versatility of algae and their lipid metabolism," *Biochimie*, vol. 91, no. 6, pp. 679–684, 2009.
- [13] S. Sakai, T. Sugawara, K. Matsubara, and T. Hirata, "Inhibitory effect of carotenoids on the degranulation of mast cells via suppression of antigen-induced aggregation of high affinity IgE receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 41, pp. 28172–28179, 2009.
- [14] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, 2010.

- [15] J. P. Bitog *et al.*, "Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review," *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 76, no. 2, pp. 131–147, 2011.
- [16] D. Özçimen, M. Ö. Gülyurt, and B. İnan, "Algal Biorefinery for Biodiesel Production," *Biodiesel - Feed. Prod. Appl.*, p. 34, 2012.
- [17] M. Ö. Gülyurt, D. Özçimen, and B. İnan, "Biodiesel production from *Chlorella protothecoides* oil by microwave-assisted transesterification," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 4, 2016.
- [18] A. Juneja, R. Ceballos, and G. Murthy, "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review," *Energies*, vol. 6, no. 9, pp. 4607–4638, 2013.
- [19] Q. Hu, "Environmental effects on cell composition," *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, vol. 1. Wiley Online Library, pp. 83–93, 2004.
- [20] P. H. Moisander, E. McClinton, and H. W. Paerl, "Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria," *Microb. Ecol.*, vol. 43, no. 4, pp. 432–442, 2002.
- [21] A. Widjaja, C.-C. Chien, and Y.-H. Ju, "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 40, no. 1, pp. 13–20, 2009.
- [22] S. Ruangsomboon, "Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2," *Bioresour. Technol.*, vol. 109, pp. 261–265, 2012.
- [23] L. Xin, H. Hong-Ying, G. Ke, and S. Ying-Xue, "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5494–5500, 2010.
- [24] C. Yeesang and B. Cheirsilp, "Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 3, pp. 3034–3040, 2011.
- [25] Q. Lin and J. Lin, "Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 2, pp. 1615–1621, 2011.
- [26] Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allémann, "Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 233, no. 1–2, pp. 239–252, 2002.
- [27] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, and Y. Kawashima, "Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles," *Powder Technol.*, vol. 107, no. 1–2, pp. 137–143, 2000.
- [28] R. Parhi and P. Suresh, "Production of solid lipid nanoparticles-drug loading

- and release mechanism," *J Chem Pharm Res*, vol. 2, no. 1, pp. 211–227, 2010.
- [29] M. J. Cocero, Á. Martín, F. Mattea, and S. Varona, "Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 47, no. 3, pp. 546–555, 2009.
 - [30] A. J. Thote and R. B. Gupta, "Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 85–90, 2005.
 - [31] S. K. Boda, X. Li, and J. Xie, "Electrospraying an enabling technology for pharmaceutical and biomedical applications: A review," *J. Aerosol Sci.*, vol. 125, no. April, pp. 164–181, 2018.
 - [32] M. Fathi, Á. Martín, and D. J. McClements, "Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 39, no. 1, pp. 18–39, 2014.
 - [33] J. A. Bhushani, "Electrospinning and electrospraying techniques : Potential food based applications," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 38, no. 1, pp. 21–33, 2014.
 - [34] M. Nieuwland *et al.*, "Reprint of 'food-grade electrospinning of proteins,'" *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 24, pp. 138–144, 2014.
 - [35] S. Alborzi, L. T. Lim, and Y. Kakuda, "Electrospinning of sodium alginate-pectin ultrafine fibers," *J. Food Sci.*, vol. 75, no. 1, 2010.
 - [36] C. G. Drosou, M. K. Krokida, and C. G. Biliaderis, "Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications," *Dry. Technol.*, vol. 35, no. 2, pp. 139–162, 2017.
 - [37] C. Jacobsen, P. J. García-Moreno, A. C. Mendes, R. V. Mateiu, and I. S. Chronakis, "Use of Electrohydrodynamic Processing for Encapsulation of Sensitive Bioactive Compounds and Applications in Food," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 9, no. 1, pp. 525–549, 2018.
 - [38] B. Ghorani and N. Tucker, "Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology," *Food Hydrocoll.*, vol. 51, pp. 227–240, 2015.
 - [39] A. Frenot and I. S. Chronakis, "Polymer nanofibers assembled by electrospinning," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 8, no. 1, pp. 64–75, 2003.
 - [40] A. Pawar, S. Thakkar, and M. Misra, "A bird's eye view of nanoparticles prepared by electrospraying: advancements in drug delivery field," *Journal of Controlled Release*, vol. 286, no. July, pp. 179–200, 2018.
 - [41] B. Ding, C. Li, Y. Miyauchi, O. Kuwaki, and S. Shiratori, "Formation of novel 2D polymer nanowebs via electrospinning," *Nanotechnology*, vol. 17, no. 15, pp. 3685–3691, 2006.
 - [42] A. Jaworek, "Micro-and nanoparticle production by electrospraying," *Powder*

Technol., vol. 176, no. 1, pp. 18–35, 2007.

- [43] J. Rosell-llompart, J. Grifoll, and I. G. Loscertales, “Electrosprays in the cone-jet mode : From Taylor cone formation to spray development,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 125, no. November 2017, pp. 2–31, 2018.
- [44] A. Jaworek and A. T. Sobczyk, “Electrospraying route to nanotechnology: An overview,” *J. Electrostat.*, vol. 66, no. 3–4, pp. 197–219, 2008.
- [45] J. Wang, J. A. Jansen, and F. Yang, “Electrospraying: Possibilities and Challenges of Engineering Carriers for Biomedical Applications — A Mini Review,” vol. 7, no. April, pp. 1–9, 2019.
- [46] A. Jaworek, “Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification : A brief review,” vol. 2048, 2008.
- [47] A. Sosnik, “Production of drug-loaded polymeric nanoparticles by electrospraying technology,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 9, pp. 2200–2217, 2014.
- [48] D. N. Nguyen, C. Clasen, and G. Van den Mooter, “Pharmaceutical Applications of Electrospraying,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 9, pp. 2601–2620, 2016.
- [49] S. Chakraborty, I. C. Liao, A. Adler, and K. W. Leong, “Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 12, pp. 1043–1054, 2009.
- [50] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, and G. E. Wnek, “Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit,” *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 10, pp. 3372–3384, 2005.
- [51] P. Gupta, C. Elkins, T. Long, and G. Wilkes, “Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships ...,” *Polymer*. 2005.
- [52] S.-H. Tan, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, “Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process,” *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 16, pp. 6128–6134, 2005.
- [53] N. Bock, T. R. Dargaville, and M. A. Woodruff, “Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: state of the art,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 11, pp. 1510–1551, 2012.
- [54] M. M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, and B. Erman, “Electrospinning of polyurethane fibers,” *Polymer (Guildf)*, vol. 43, no. 11, pp. 3303–3309, 2002.
- [55] T. Lin, H. Wang, H. Wang, and X. Wang, “The charge effect of cationic surfactants on the elimination of fibre beads in the electrospinning of polystyrene,” *Nanotechnology*, vol. 15, no. 9, pp. 1375–1381, 2004.
- [56] C. T. Lim, E. P. S. Tan, and S. Y. Ng, “Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 92, no. 14, 2008.
- [57] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, “Structure and process

- relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer (Guildf)*, vol. 43, no. 16, pp. 4403–4412, 2002.
- [58] L. Wannatong, A. Sirivat, and P. Supaphol, "Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene," *Polym. Int.*, vol. 53, no. 11, pp. 1851–1859, 2004.
 - [59] T. Uyar and F. Besenbacher, "Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity," *Polymer (Guildf)*, vol. 49, no. 24, pp. 5336–5343, 2008.
 - [60] Q. Yang *et al.*, "Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 42, no. 20, pp. 3721–3726, 2004.
 - [61] N. Bock, T. R. Dargaville, and M. A. Woodruff, "Progress in Polymer Science Electrospinning of polymers with therapeutic molecules : State of the art," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 11, pp. 1510–1551, 2012.
 - [62] T. Mazoochi and V. Jabbari, "Chitosan nanofibrous scaffold fabricated via electrospinning: The effect of processing parameters on the nanofiber morphology," *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, vol. 16, no. 5, pp. 277–289, 2011.
 - [63] Y. Lin *et al.*, "Preparation of poly (ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 107, no. 2, pp. 909–917, 2008.
 - [64] H. Zhuo, J. Hu, and S. Chen, "Electrospun polyurethane nanofibres having shape memory effect," *Mater. Lett.*, vol. 62, no. 14, pp. 2074–2076, 2008.
 - [65] Y. Yang, Z. Jia, Q. Li, and Z. Guan, "Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide solution," in *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2006, vol. 13, no. 3, pp. 580–584.
 - [66] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, and K. De Clerck, "The effect of temperature and humidity on electrospinning," *J. Mater. Sci.*, vol. 44, no. 5, pp. 1357–1362, 2009.
 - [67] R. Indrawati, H. Sukowijoyo, R. D. E. Wijayanti, and L. Limantara, "Encapsulation of brown seaweed pigment by freeze drying: characterization and its stability during storage," *Procedia Chem.*, vol. 14, pp. 353–360, 2015.
 - [68] F. R. S. Machado Jr *et al.*, "Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*," *J. Biotechnol.*, vol. 218, pp. 108–114, 2016.
 - [69] X. Wang and X. Zhang, "Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*," *Biotechnol. Prog.*, vol. 29, no. 3, pp. 681–687, 2013.
 - [70] J. Wang *et al.*, "Preparation and characterization of novel lipid carriers containing microalgae oil for food applications," *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 2, pp. E169–E177, 2014.
 - [71] J. J. Gallaher, R. Hollender, D. G. Peterson, R. F. Roberts, and J. N. Coupland, "Effect of composition and antioxidants on the oxidative stability of fluid milk

- supplemented with an algae oil emulsion," *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 4, pp. 333–341, 2005.
- [72] D. Chatterjee, P. Bhattacharjee, G. G. Satpati, and R. Pal, "Spray dried extract of *Phormidium valderianum* as a promising source of natural antioxidant," *Int. J. food Sci.*, vol. 2014, 2014.
 - [73] A. López-Rubio and J. M. Lagaron, "Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 13, pp. 200–206, 2012.
 - [74] A. Fernandez, S. Torres-Giner, and J. M. Lagaron, "Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine," *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 5, pp. 1427–1432, 2009.
 - [75] Y. P. Neo *et al.*, "Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system," *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 1013–1021, 2013.
 - [76] K. Moomand and L.-T. Lim, "Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres," *Food Res. Int.*, vol. 62, pp. 523–532, 2014.
 - [77] S. Torres-Giner, A. Martinez-Abad, M. J. Ocio, and J. M. Lagaron, "Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamine," *J. Food Sci.*, vol. 75, no. 6, pp. N69–N79, 2010.
 - [78] L. G. Gómez-Mascaraque and A. López-Rubio, "Protein-based emulsion electrosprayed micro-and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 465, pp. 259–270, 2016.
 - [79] R. H. de Freitas Zômpero, A. López-Rubio, S. C. de Pinho, J. M. Lagaron, and L. G. de la Torre, "Hybrid encapsulation structures based on β -carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 134, pp. 475–482, 2015.
 - [80] R. Pérez-Masiá, R. López-Nicolás, M. J. Periago, G. Ros, J. M. Lagaron, and A. López-Rubio, "Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications," *Food Chem.*, vol. 168, pp. 124–133, 2015.
 - [81] P. Metzger and C. Largeau, "Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 66, no. 5, pp. 486–496, 2005.
 - [82] A. Banerjee, R. Sharma, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 245–279, 2002.
 - [83] D. K. Barupal, T. Kind, S. L. Kothari, D. Y. Lee, and O. Fiehn, "Hydrocarbon phenotyping of algal species using pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry," *BMC Biotechnol.*, vol. 10, no. 1, p. 40, 2010.
 - [84] M. T. Wong *et al.*, "Towards a metagenomic understanding on enhanced biomethane production from waste activated sludge after pH 10

- pretreatment," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, no. 1, p. 38, 2013.
- [85] A. Mlouka, K. Comte, A.-M. Castets, C. Bouchier, and N. T. de Marsac, "The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 8, pp. 2355–2365, 2004.
 - [86] X. L. Shi, F. X. Kong, Y. Yu, and Z. Yang, "Survival of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* under dark anaerobic conditions," *Mar. Freshw. Res.*, vol. 58, no. 7, pp. 634–639, 2007.
 - [87] P. Jaiswal, P. K. Singh, and R. Prasanna, "Cyanobacterial bioactive molecules—an overview of their toxic properties," *Can. J. Microbiol.*, vol. 54, no. 9, pp. 701–717, 2008.
 - [88] Q. Y. Wu, S. Yin, G. Y. Sheng, and J. . Fu, "New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae," *Sci. China (B)*, vol. 37, pp. 326–335, 1994.
 - [89] H. Xu, X. Miao, and Q. Wu, "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters," *J. Biotechnol.*, vol. 126, no. 4, pp. 499–507, 2006.
 - [90] L. Nikolaisen *et al.*, "Energy Production from Marine Biomass (*Ulva lactuca*)," 2011.
 - [91] J. Ortiz *et al.*, "Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 98–104, 2006.
 - [92] L. Chevolot, B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, S. Collic-Jouault, and S. Kraan, "Algal Polysaccharides , Novel Applications and Outlook," *Carbohydrates*, vol. 330, no. 4, pp. 1–45, 2012.
 - [93] A. Sukatar, *Alg kültürü yöntemleri*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 2002.
 - [94] F. García Camacho, J. J. Gallardo Rodríguez, A. Sánchez Mirón, M. C. Cerón García, E. H. Belarbi, and E. Molina Grima, "Determination of shear stress thresholds in toxic dinoflagellates cultured in shaken flasks. Implications in bioprocess engineering," *Process Biochem.*, vol. 42, no. 11, pp. 1506–1515, 2007.
 - [95] A. Pirouzi, M. Nosrati, S. A. Shojaosadati, and S. Shakhesi, "Improvement of mixing time, mass transfer, and power consumption in an external loop airlift photobioreactor for microalgae cultures," *Biochem. Eng. J.*, vol. 87, pp. 25–32, 2014.
 - [96] S. S. Nielsen, *Food analysis*. Springer, 2010.
 - [97] P. Greenwald, D. Anderson, S. A. Nelson, and P. R. Taylor, "Clinical trials of vitamin and mineral supplements for cancer prevention," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, no. 1, p. 314S–317S, 2007.
 - [98] A. Bendich, "Micronutrients in women's health and immune function," *Nutrition*, vol. 17, no. 10, pp. 858–867, 2001.

- [99] Y. S. Kim *et al.*, " β -Carotene inhibits neuroblastoma cell invasion and metastasis in vitro and in vivo by decreasing level of hypoxia-inducible factor-1 α ," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 25, no. 6, pp. 655–664, 2014.
- [100] J. K. Kim, "An update on the potential health benefits of carotenes," *EXCLI Journal*, vol. 15, pp. 1–4, 2015.
- [101] M. D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez De La Ossa, L. M. Lubián, and O. Montero, "Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*," *J. Food Eng.*, 2005.
- [102] N. Zou and A. Richmond, "Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp (Eustigmatophyceae)," *J. Appl. Phycol.*, 2000.
- [103] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [104] N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, and A. L. Glasebrook, "An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT," *J. Immunol. Methods*, vol. 142, no. 2, pp. 257–265, 1991.
- [105] C. G. Gomez, M. V. Pérez Lambrecht, J. E. Lozano, M. Rinaudo, and M. A. Villar, "Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*)," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 44, no. 4, pp. 365–371, 2009.
- [106] K. K. Sharma, H. Schuhmann, and P. M. Schenk, "High lipid induction in microalgae for biodiesel production," *Energies*, vol. 5, no. 5, pp. 1532–1553, 2012.
- [107] G. Procházková, I. Brányiková, V. Zachleder, and T. Brányik, "Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 3, pp. 1359–1377, 2014.
- [108] N. O. Zhila, G. S. Kalacheva, and T. G. Volova, "Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252," *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 311–319, 2005.
- [109] N. O. Zhila, G. S. Kalacheva, and T. G. Volova, "Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 17, no. 4, pp. 309–315, 2005.
- [110] Y. Li and J. G. Qin, "Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains," *J. Appl. Phycol.*, vol. 17, no. 6, pp. 551–556, 2005.
- [111] B. H. Liu and Y. K. Lee, "Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp," *J. Appl. Phycol.*, vol. 12, no. 3–5, pp. 301–307, 2000.
- [112] M. Zhekisheva, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, A. Zarka, and Z. Cohen, "Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters," *J. Phycol.*, vol. 38, no. 2, pp. 325–331, 2002.

- [113] P. C. M. Da Rós, C. S. P. Silva, M. E. Silva-Stenico, M. F. Fiore, and H. F. De Castro, "Microcystis aeruginosa lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route," in *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, vol. 84, pp. 177–182.
- [114] J. E. Bohnenberger and L. O. Crossetti, "Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 86, no. 3, pp. 1239–1248, 2014.
- [115] B. İnan, A. T. Kocer, and D. Özcimen, "Determination of shear rate for scale-up of *B. braunii* production," *J. Biotechnol.*, vol. 280, p. S43, 2018.
- [116] R. Reyna-Velarde, E. Cristiani-Urbina, D. J. Hernández-Melchor, F. Thalasso, and R. O. Cañizares-Villanueva, "Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 49, no. 1, pp. 97–103, 2010.
- [117] Dilek (Yalcin) Duygu, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833," *AFRICAN J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 16, 2012.
- [118] A. P. Dean, D. C. Sigee, B. Estrada, and J. K. Pittman, "Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 12, pp. 4499–4507, 2010.
- [119] I. Ali, S. R. Naqvi, and A. Bahadar, "Kinetic analysis of *Botryococcus braunii* pyrolysis using model-free and model fitting methods," *Fuel*, vol. 214, no. November 2017, pp. 369–380, 2018.
- [120] Y. Q. Liu, L. R. X. Lim, J. Wang, R. Yan, and A. Mahakhant, "Investigation on pyrolysis of microalgae *botryococcus braunii* and *Hapalosiphon* sp.," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, no. 31, pp. 10320–10326, 2012.
- [121] H. Kanda, P. Li, T. Ikehara, and M. Yasumoto-Hirose, "Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties," *Fuel*, vol. 95, pp. 88–92, 2012.
- [122] A. R. Rao, C. Dayananda, R. Sarada, T. R. Shamala, and G. A. Ravishankar, "Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 3, pp. 560–564, 2007.
- [123] D. Yang *et al.*, "Fatty acid biomarkers to verify cyanobacteria feeding abilities of herbivorous consumers," *J. Freshw. Ecol.*, vol. 31, no. 1, pp. 77–91, 2016.
- [124] J. B. Aboim *et al.*, "Determination of biodiesel properties based on a fatty acid profile of eight Amazon cyanobacterial strains grown in two different culture media," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 111, pp. 109751–109758, 2016.
- [125] K. Hayakawa *et al.*, "Fatty acid composition as an indicator of physiological condition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*," *Limnology*, vol. 3, no. 1, pp. 29–35, 2002.
- [126] K. Sharathchandra and M. Rajashekhar, "Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria," vol. 2, no. 2, pp. 83–97, 2011.

- [127] A. R. Rao, A. H. Reddy, and S. M. Aradhya, "Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts," *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, vol. 4, no. 3, pp. 809–819, 2010.
- [128] V. Madhumathi, P. Deepa, S. Jeyachandran, C. Manoharan, and S. Vijayakumar, "Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake," *Int. J. ...*, vol. 2, no. 3, pp. 213–216, 2011.
- [129] M. Vehapi, A. Yilmaz, and D. Özcimen, "Investigation of antibacterial and antioxidant activities of various algae species," *J. Biotechnol.*, vol. 280, p. S80, 2018.
- [130] S. Mundt, S. Kreitlow, and R. Jansen, "Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051," *J. Appl. Phycol.*, vol. 15, no. 2–3, pp. 263–267, 2003.
- [131] G. Ozdemir, N. Ulku Karabay, M. C. Dalay, and B. Pazarbasi, "Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*," *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, vol. 18, no. 9, pp. 754–757, 2004.
- [132] D. Leal, B. Matsuhira, M. Rossi, and F. Caruso, "FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds," *Carbohydr. Res.*, vol. 343, no. 2, pp. 308–316, 2008.
- [133] H. Daemi and M. Barikani, "Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles," *Sci. Iran.*, vol. 19, no. 6, pp. 2023–2028, 2012.
- [134] G. Lawrie *et al.*, "Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 8, pp. 2533–2541, 2007.
- [135] M. S. Islam and M. R. Karim, "Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 366, no. 1–3, pp. 135–140, 2010.
- [136] Y. Gao, D. Zhao, M. W. Chang, Z. Ahmad, and J. S. Li, "Optimising the shell thickness-to-radius ratio for the fabrication of oil-encapsulated polymeric microspheres," *Chem. Eng. J.*, vol. 284, pp. 963–971, 2016.
- [137] Y. H. Lee, F. Mei, M. Y. Bai, S. Zhao, and D. R. Chen, "Release profile characteristics of biodegradable-polymer-coated drug particles fabricated by dual-capillary electrospray," *J. Control. Release*, vol. 145, no. 1, pp. 58–65, 2010.
- [138] N. Eghbalifam, M. Frounchi, and S. Dadbin, "Antibacterial silver nanoparticles in polyvinyl alcohol/sodium alginate blend produced by gamma irradiation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 170–176, 2015.
- [139] M. K. Moghaddam, S. M. Mortazavi, and T. Khayamian, "Preparation of calcium alginate microcapsules containing n-nonadecane by a melt coaxial electrospray method," *J. Electrostat.*, vol. 73, pp. 56–64, 2015.
- [140] W. N. Omwoyo *et al.*, "Preparation, characterization, and optimization of

- primaquine-loaded solid lipid nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 3865–3874, 2014.
- [141] B. J. Holland and J. N. Hay, "The thermal degradation of poly(vinyl alcohol)," *Polymer (Guildf)*, vol. 42, no. 16, pp. 6775–6783, 2001.
- [142] K. Kataria, A. Gupta, G. Rath, R. B. Mathur, and S. R. Dhakate, "In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch," *Int. J. Pharm.*, vol. 469, no. 1, pp. 102–110, 2014.
- [143] S. Arthanari *et al.*, "Preparation and characterization of gatifloxacin-loaded alginate/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 847–852, 2016.
- [144] C. Y. Karakaş, H. T. Şahin, B. İnan, D. Özçimen, and Y. Ö. Erginer, "In-vitro cytotoxic activity of microalgal extracts loaded nano-micro particles produced via electrospraying and microemulsion methods," *Biotechnol. Prog.*, no. May, p. e2876, 2019.
- [145] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [146] W. L. Chu, Y. W. Lim, A. K. Radhakrishnan, and P. E. Lim, "Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals Apoptotic assay," pp. 1–6, 2015.
- [147] S. NamKoong, H.-M. Joo, S.-A. Jang, Y.-J. Kim, T.-S. Kim, and E.-H. Sohn, "Suppressive Effects of Fucoxanthin on Degranulation in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 Cells," *Korean J. Plant Resour.*, vol. 25, no. 3, pp. 339–345, 2012.
- [148] M. Y. Tannoury, A. M. Saab, J. M. Elia, N. N. Harb, H. Y. Makhoul, and M. Diab-Assaf, "In vitro cytotoxic activity of *Laurencia papillosa*, marine red algae from the Lebanese coast," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 2017, p. 7, 2017.
- [149] K. K. A. Sanjeewa *et al.*, "Anti-inflammatory and anti-cancer activities of sterol rich fraction of cultured marine microalga *Nannochloropsis oculata*," *Algae*, vol. 31, no. 3, pp. 277–287, 2016.
- [150] B. Atasever-Arslan *et al.*, "Screening of new antileukemic agents from essential oils of algae extracts and computational modeling of their interactions with intracellular signaling nodes," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 83, pp. 120–131, 2016.
- [151] X. Zhu *et al.*, "Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery," *Mol. Vis.*, vol. 18, p. 1973, 2012.
- [152] O. Borges *et al.*, "Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination," *J. Control. Release*, vol. 114, no. 3, pp. 348–358, 2006.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: benaninan@gmail.com

Makaleler

1.M. Ö. Gülyurt, D. Özçimen, B. İnan, "Biodiesel production from *Chlorella protothecoides* oil by microwave-assisted transesterification". International journal of molecular sciences, 17(4), 579/2016-SCI-E

2.C. Y. Karakaş, H. T. Şahin, B. İnan, D. Özçimen, Y. Ö. Erginer. "In-vitro cytotoxic activity of microalgal extracts loaded nano-micro particles produced via electrospraying and microemulsion methods". Biotechnology progress/2019-SCI

Konferans Bildirileri

1.B. İnan and D. Özçimen. "Fabrication of *M. aeruginosa* Oil Loaded Nanoparticles by Electrospraying" 16th Euro Fed Lipid Congress, Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World, Belfast-UK, 16-19 September 2018 (Oral presentation)

2.B. İnan, A. T. Koçer, D. Özçimen. "Determination of shear rate for scale-up of *B. braunii* production", European Biotechnology Congress, Athena-Greece, 26-28 April 2018.

3.B. İnan and D. Özçimen. "Optimization of Cultivation Conditions and Media Composition for High Lipid Productivity of *M. aeruginosa*", 15th Euro Fed Lipid Congress, Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World, Uppsala-Sweden, 27-30 August 2017

4. B. İnan and D. Özçimen. "Innovative Approach to Encapsulation of Microalgal Oils for Enriched Products", 15th Euro Fed Lipid Congress, Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World, Uppsala-Sweden, 27-30 August 2017

5. B. İnan and D. Özçimen. "Statistical Analysis of the Parameters Affecting the Amount of Bioactive Substances of *B. Braunii* Microalgae", 108th AOCS Annual Meeting & Expo, Orlando-USA, April 30-May 3 2017

6. B. İnan and D. Özçimen. "Biyoaktifce Zengin Algal Yağların Nanoteknolojik Yöntemle Gıda ve Farmasötik Alanında Değerlendirilmesi", V. ULUSAL NANOTEKNOLOJİ KONGRESİ, 9-10 Mart 2017/İstanbul-Türkiye

Projeler

1. Mikroalgal biyoaktif maddelerin farklı enkapsülasyon yöntemleri ile ilaç taşınımında değerlendirilmesi, YTÜ DOP, 2017-2019, No: FDK-2017-3214, Bütçe: 18.425,56 TL, Görevi: Araştırmacı

Ödüller ve Burslar

1. TÜBİTAK BİDEB BURSUSU (2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı)