





**BİYOLOJİK YOLLAR İLE SENTEZLENEN  
ORGANİK/İNORGANİK NANOPARTİKÜLLERİN  
BİYOAKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE TEDAVİ  
AMAÇLI KULLANIMLARI**

**DETERMINATION OF BIOACTIVITIES OF  
ORGANIC/INORGANIC NANOPARTICLES  
SYNTHESIZED BY BIOLOGICAL PATHWAY THEIR  
THERAPEUTIC USES**

**Hamideh HAMMAMCHI**

**PROF. DR. NİLÜFER CİHANGİR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

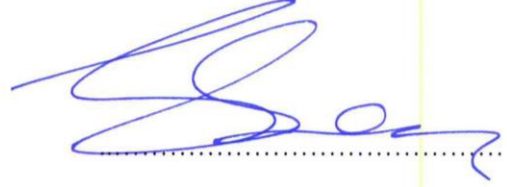
2019



**Hamideh HAMMAMCHI** 'nın hazırladığı **Biyolojik Yollar ile Sentezlenen Organik / İnorganik Nanopartiküllerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi ve Tedavi Amaçlı Kullanımları**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

Başkan



Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Danışman



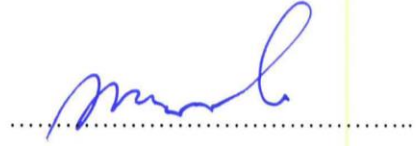
Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye



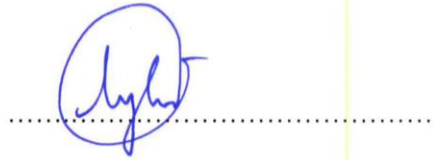
Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Üye



Doç. Dr. Üyesi Özer Aylin GÜRPINAR

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



*Canım Aileme*





## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19 / 06 / 2019  
  
Hamidel HAMMAMCHI



## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezim kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.



19 / 06 /2019

Hamideh HAMMAMCHI



## ÖZET

# **Biyolojik Yollar ile Sentezlenen Organik / İnorganik Nanopartiküllerin Bioaktivitelerinin Belirlenmesi ve Tedavi Amaçlı Kullanımları**

**Hamideh HAMMAMCHI**

**Doktora, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR**

**Eş Danışman: Prof. Dr. Reyhan Neslihan GÜRSOY**

**Haziran 2019, 168 sayfa**

Günümüzde nano-sistemler özellikle çok fonksiyonlu organik/ inorganik nanoparçacıklar biyomedikal alanında çok ilgi çekmektedir. Nanoteknolojide inorganik nanoparçacıklar olarak bilinen ve önemli bir yere sahip metalik nanopartiküller olarak bilinen gümüş nanopartiküller antibakteriyel ve antikanser özellik göstermektedir. Gümüş nanopartikülün insan teması gerektiren alanlarda kullanım bulması, nanopartikül sentezini biyolojik sistemlerle yapmaya yönlendirmektedir. Böylelikle daha çevre dostu yapılar ortaya çıkmaktadır. Organik nanoparçacıklar olarak bilinen pullulan biyopolimeri biyoyumlu, biyobozunur ve biyofonksiyonel özelliklerinden dolayı son derece ilgi çekmektedir. Bu özelliklerinin yanı sıra biyolojik yollar ile sentezlenebilmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapi uygulaması sırasında kanser özelliği taşıyan hücrenin yanında bireyin kendi sağlıklı hücrelerinin de yok edilmesi, kemoterapi yönteminin en büyük dezavantajıdır. Nanoteknoloji alanında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, yeni nano yapılar tasarlayıp sentezlemek veya var olan nano yapıları yeni özellikler kazandırmak ve bu özellikleri yeni işlevlerde kullanmaktır. Son yıllarda rapor edilen çalışmalar sonucunda biyomedikal ve tıp alanlarında başta olmak üzere nanobiyoteknolojinin insanların yararına kullanılmasına yönelik veriler elde edilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada mikroorganizma ve mikroorganizmaların metabolitleri kullanılarak hücre dışı organik/inorganik biyo-nanopartikül üretimine yeni ve biyolojik bir alternatif yaklaşım getirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, biyolojik yollarla sentezlenen organik biyopolimerin ve inorganik metal nanopartiküllerin komplekslerinin oluşturulması ve kanser hücreler üzerinde etkilerinin incelenmesidir. Mikroorganizmaların hücre ekstraktları kullanılarak sentezlenen biyomalzemelerin karakterizasyon işlemleri her bir nanomalzeme için gerçekleştirilerek, sentezlenen biyomateryallerin AgNP ve pullulan biyopolimerleri olduğu belirlenmiştir. Sentezlenen biyomateryallerin üretim ve sentez aşamasındaki farklı fiziksel ve kimyasal parametreleri optimize edilmiştir. AgNP'ler ve Pullulan biyopolimerleri biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilerek elde edilen veriler doğrultusunda AgNP+Pullulan biyopolimer kompleksleri oluşturulmuştur. nce karakterize edilip daha sonra biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre AgNP'lerin antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksisite aktiviteleri pullulan biyopolimerine göre daha yüksektir. AgNP+Pullulan biyopolimer komplekslerinin biyoaktivite çalışmalarının sonucunda bu yapıların aktivitelerinin her iki biyomateryalden daha fazla olduğu grlmştir.

**Anahtar Kelimeler:** Organik/ İnorganik Nanopartiküller, Biyoaktivite

## **ABSTRACT**

# **Determination of Bioactivities of Organic / Inorganic Nanoparticles Synthesized by Biological Pathways and their Therapeutic Uses**

**Hamideh HAMMAMCHI**

**Doctor of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR**

**Co- Supervisor: Prof. Dr. Reyhan Neslihan GÜRSOY**

**June 2019, 168 pages**

Nowadays, nano-systems especially those multifunctional organic / inorganic nanoparticles are of particular interest in the biomedical field. Silver nanoparticles, which are also known as inorganic nanoparticles and belong to the group of metallic nanoparticles having an important place in nanotechnology, exhibit antibacterial and anticancer properties. The use of silver nanoparticles in the field that requires human contact leads to nanoparticle synthesis with biological systems. Thus, more environmentally friendly structures emerge.

Pullulan biopolymer, known as organic nanoparticles, is of great interest due to its biocompatible, biodegradable and biofunctional properties. In addition to these properties, it can be synthesized by biological pathways. The main disadvantage of chemotherapy approach is the destruction of one's own healthy cells as well as the cell that has cancer characteristic during process. The aim of the studies in the field of nanotechnology is to design and synthesize new nanostructures or to add new features to existing nanostructures and to use these features in new functions.

As a result of the studies reported in recent years, data have been obtained for the use of nanobiotechnology for the benefit of people, mainly in biomedical and medical fields.

In this thesis study, a new and biological alternative approach to the production of extracellular organic / inorganic bio-nanoparticles has been introduced by using metabolites of microorganisms and microorganisms. The aim of this study has been established the complexes of organic biopolymers and inorganic metal nanoparticles synthesized biologically and to investigate their effects on cancer cells. The characterization procedures of the biomaterials which are synthesized by using cell extracts of microorganisms have been determined to be AgNP and pullulan biopolymers synthesized by performing nanomaterials for each nanomaterial. The different physical and chemical parameters of the synthesized biomaterials at the production and synthesis stages were optimized. AgNPs and pullulan biopolymers bioactivity studies were performed and AgNP + Pullulan biopolymer complexes were prepared according to the data obtained. It was first characterized and then bioactivity studies were carried out. According to the results, antimicrobial, antibiotic, antioxidant and cytotoxicity activities of AgNPs are higher than pullulan biopolymer. As a result of bioactivity studies of AgNP + Pullulan biopolymer complexes, it was observed that the activities of these structures were higher than both biomaterials.

**Keywords:** Organic / Inorganic Nanoparticles, Bioactivity



## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca; ilgisini, sevgisini ve sonsuz anlayışını benden esirgemeyen her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, bütün çalışmama ışık tutan her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Cihangir'e,

Bilgi ve tecrübeleri ile tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli emeği bulunan daima yol gösteren çok değerli eş danışman Prof. Dr. Reyhan Neslihan Gürsoy'a;

Jürimde olabilmek için bana zaman ayıran Prof. Dr. Sema Çalış ve Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar'a;

Her zaman güvenleri, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, üzüntülerimi, sevinçlerimi paylaştığım, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen, her şeyimi borçlu olduğum annem Tahereh Babapour'a ve babam Reza Hammamchi'ya;

Varlığıyla hayatımı eşsiz yapan, sonsuz sevgisi, anlayışı, sabrıyla ve desteğiyle yüreğimi isitan, atacağım her adımda yanımda olan ve her konuda bana güven ve moral veren eşim Mehdi Mazaheri'ye;

Her zaman yanımda olan ve varlığı ile sevinçlerimi tamamlayan, huzunlerimi azaltan Vahid Hammamchi'ya;

Uzarlarda olsa da hep gönlümde taşıdığım abim Hamid Hammamchi eşi ve yeğenlerime;

Beni anlayan, dinleyen ve hep destek olan sevgisiyle bana güç veren canımdan bile çok sevdim can dostarım Elmira ve Samira Karimi ve değerli ailesine;

Tezimin bütün aşamalarında bana yardımcı olan, mutluluğumda ve üzüldüğümde hep yanımda olan iyi dostum çalışma arkadaşım Dr. Gözde Koşarsoy Ağçeli'ye;

Bana her zaman manevi destekte bulunan ve her tür yardım istediğim zaman bana yok demeyen iyi dostum Dr. Süheyla Pınar Kodal'a;

Geçen bu süreçte beni destekleyen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Hamideh Hammamchi

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nanopartikül .....	3
2.1.1. Gümüş Nanopartiküller .....	3
2.1.2. AgNP Etki Mekanizması.....	4
2.1.2.1. AgNP antimikrobiyal etkisi .....	4
2.1.2.2. AgNP Antiviral etkisi.....	6
2.1.2.3. AgNP Antifungal/mantar önleyici etkisi.....	6
2.1.3. AgNP Sentez Yöntemleri .....	6
2.1.3.1. Mikroorganizmalardan Nanopartiküllerin Biyosentezi.....	8
2.1.3.1.1. Mikroorganizmalar Tarafından Nanopartiküllerin Hücre İçi Sentezi....	12
2.1.3.1.2. Mikroorganizmalar Tarafından Nanopartiküllerin Hücre Dışı Sentezi.....	15
2.1.3.1.3. Nanopartiküllerinin Aktinomiset Aracılığı ile Sentezi .....	17
2.1.3.1.4. Nanopartiküllerin Maya Aracılığı ile Sentezi.....	18
2.1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi için Kritik Parametreler.....	18
2.1.5. Biyolojik Nanopartiküllerin Avantajı .....	20
2.1.6. AgNP'lerin Kullanım Alanları .....	24
2.1.6.1. Kanserde AgNP'lerin Potansiyel Tedavi Edici Uygulamaları .....	25
2.1.6.2. Meme Kanserinde Uygulama.....	25
2.1.7. AgNP Karakterizasyonu.....	27
2.1.8. Gümüş Nanopartiküllerin Geleceği.....	28
2.2. Biyopolimer.....	29
2.2.1. Pullulan.....	29
2.2.2. Pullulan üreten suşlar.....	32

2.2.2.1. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	33
2.2.3. Pullulanın kullanım alanları.....	34
2.2.4. Pullulan Karakterizasyonu.....	34
2.2.4.1 Yapısal karakterizasyon .....	34
2.2.4.2 Moleküler Ağırlığı .....	35
2.2.4.3 Termal ve Mekanik Özellikler .....	35
2.2.5. Pullulanın Geleceği.....	36
2.3. Farklı Biyopolimerler ile Bağlanan Gümüş Nanopartiküller .....	37
2.3.1. Nanopartiküllerin Toksisitesi.....	41
2.3.2. Gelecekte Nanopartiküller.....	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi.....	43
3.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonu .....	45
3.1.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Ortamı Optimizasyonu.....	45
3.1.1.2. Gümüş Nanopartiküllerin Reaksiyon Ortamı Optimizasyonu.....	45
3.1.4. Pullulan Biyopolimeri Üretimi.....	46
3.2.4.1. Pullulan Biyopolimeri Üretiminde Kullanılan Mikroorganizma ve Üretim Ortamları.....	46
3.2.4.2. Pullulan Biyopolimer Eldesi.....	48
3.2.4.3. Analitik Metotlar.....	48
3.2.4.4. Pullulan Biyopolimeri Tayini .....	48
3.2.4.4. Üretilen Biyopolimerin Pullulan Olduğunun Belirlenmesi.....	48
3.2.4.5. Pullulan Biyopolimer Optimizasyonları.....	49
3.2.4.5.1. Pullulan Biyopolimeri Üretim Ortamı Optimizasyonları.....	49
3.2.4.5.1.1. Üretim Ortamı pH'sının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	49
3.2.4.5.1.2. İnkübasyon Zamanının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	50
3.2.4.5.1.3. Sıcaklığın Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	50
3.2.4.5.1.4. İnokülüm Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi .....	50
3.2.4.5.1.5. Azot Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	50
3.2.4.5.1.6. Karbon Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	51
3.2.4.5.1.8. Substrat Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	51
3.2.4.5.2. Pullulan Biyopolimeri Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları.....	51
3.2.4.5.2.1. Etanol Miktarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	51

3.2.4.5.2.1. Reaksiyon Ortamı Karıştırma / Statik Koşullarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	52
3.2.6. AgNPs Yüklü Pullulan Biyopolimer Hazırlanması.....	52
4. Elde Edilen Biyomalzemelerin Karakterizasyonu.....	52
4.1. Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge Spektroskopisi .....	54
4.2. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi .....	54
4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	54
4.4. X-Işını difraksiyonu (XRD).....	55
4.5. Zeta Sizer ve Potansiyel.....	55
4.7. Termogravimetrik Analizi (TGA).....	55
5. Biyomalzemelerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi.....	55
5.1. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	55
5.2. Biyomalzemelerin Antibiyotik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	57
5.3. Biyomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	58
5.4. Biyomalzemelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	59
5.5. Biyomalzemelerin Sitotoksisitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	60
5.6. İstatistiksel Analizler.....	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi.....	63
4.2. Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonları.....	65
4.2.1. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Ortamı Optimizasyonları.....	65
4.2.1.1. pH Optimizasyonu.....	65
4.2.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu.....	65
4.2.1.3. Üretim Süresi Optimizasyonu.....	67
4.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları.....	67
4.2.2.1. pH Optimizasyonu.....	67
4.2.2.2. Gümüş Nitrat Solüsyon Miktarının Optimizasyonu.....	69
4.3. Pullulan Biyopolimeri Üretimi.....	71
4.3.1. Üretilen Biyopolimerin Pullulan Olduğunun Belirlenmesi.....	73
4.3.2. Pullulan Biyopolimer Optimizasyonları.....	75
4.3.2.1. Pullulan Biyopolimeri Üretim Ortamı Optimizasyonları.....	75
4.3.2.1.1. Üretim Ortamı pH'sının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	75
4.3.2.1.2. İnkübasyon Zamanının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	77
4.3.2.1.3. Sıcaklığın Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	78

4.3.2.1.4. Azot Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi .....	79
4.3.2.1.5. Karbon Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	80
4.3.2.1.6. Substrat Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	81
4.3.2.2. Pullulan Biyopolimeri Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları.....	83
4.3.2.2.1. Etanol Miktarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	83
4.3.2.2.2. Reaksiyon Ortamı Karıştırma / Statik Koşullarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi.....	84
4.3. Elde Edilen Biyomalzemelerin Karakterizasyonu.....	85
4.3.1. Gümüş Nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	85
4.3.1.1. Ultraviyole (UV) ve görünür bölge spektroskopisi.....	85
4.3.1.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi.....	86
4.3.3. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM).....	89
4.3.4. X-Işını difraksiyonu (XRD).....	93
4.3.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta potansiyeli.....	94
4.3.2. Pullulan Biyopolimer karakterizasyonu.....	97
4.3.2.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı.....	97
4.3.2.2. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi.....	98
4.3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	100
4.3.2.4. Termogravimetrik Analizi ve Diferansiyel Termal Analizi (TGA-DTA).....	101
4.3.3. AgNPs Yüklü Pullulan Biyopolimer Hazırlanması.....	102
4.3.3.1. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi.....	102
4.3.3.2. AgNPs Yüklü Pullulan Biyopolimer SEM ile Görüntülenmesi.....	104
4.3.3.4. Termogravimetrik Analizi ve Diferansiyel Termal Analizi (TGA-DTA).....	106
4.4. Biyomalzemelerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi.....	107
4.4.1. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	107
4.4.2. Biyomalzemelerin Antibiyotik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	113
4.4.3. Biyomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	118
4.4.4. Biyomalzemelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	122
4.4.5. Biyomalzemelerin Sitotoksitlik Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	124
5. YORUM.....	146
6. KAYNAKLAR .....	148
EKLER.....	167
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	167
ÖZGEÇMİŞ .....	168

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gümüş nanopartikülünün şarap rengi görüntüsü.....	4
Şekil 2.2. Gümüş nanopartiküllerinin anti-mikrobiyal etki basamakları.....	5
Şekil 2.3. Nanopartiküllerin hücre içi sentezlerinin şematik akış diyagramı.....	9
Şekil 2.4. Nanopartiküllerin hücre dışı sentezlerinin şematik akış diyagramı.....	9
Şekil 2.5. Tekil Dağılımlı, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküllerin üretme parametreleri.....	20
Şekil 2.6. Biyomedikal ve Çevresel Alanlarda Metal Nanopartiküllerinin Biyolojik Sentezi ve Uygulamaları.....	23
Şekil 2.7. Gümüş nanopartiküllerden (AgNPs) kaynaklı sitotoksosite için olası mekanizmaların şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.8. Pullulan biyopolimerinin kimyasal yapısı.....	31
Şekil 3.1. Biyojeik Nanopartikül Oluşumu.....	46
Şekil 4.1. A) Gümüş nitrat solusyonu. B) santrifügasyon işlemi sonunda elde edilen supernatant. C) supernatant + gümüş nitrat solusyonu.....	63
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların sentezlediği AgNP lerin şematik görüntüleri.....	63
Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde <i>Candida</i> türlerinin üreme miktarları.....	66
Şekil 4.4. Mikroorganizmaların üreme sıcaklığı optimizasyonu.....	66
Şekil 4.5. Mikroorganizmaların üretim süresi optimizasyonu.....	67
Şekil 4.6. <i>Candida</i> türlerinden farklı pH'larda üretilen AgNP lerin boyut ölçer cihazı ile elde edilen sonuçlar. A) <i>C. parapsilosis</i> , B) <i>C. glabrata</i> , C) <i>C. albicans</i> .....	68
Şekil 4.7. <i>Candida</i> türlerinden farklı derişimlerde üretilen AgNP lerin boyut ölçer cihazı ile elde edilen sonuçlar. A) <i>C. parapsilosis</i> , B) <i>C. glabrata</i> , C) <i>C. albicans</i> .....	70
Şekil 4.8. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'den elde edilen pullulanın 13C NMR analiz sonucu.....	74
Şekil 4.9. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'den elde edilen pullulanın HNMR analiz sonucu.....	75
Şekil 4.10. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında farklı pH larda polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.....	76
Şekil 4.11. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında zamana göre polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.....	77
Şekil 4.12. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında sıcaklığa göre	

polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.....	78
Şekil 4.13. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında farklı azot kaynaklarına göre polisakkarit, pullulan ve biyomass miktarının optimizasyonu.....	79
Şekil 4.14. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında farklı karbon kaynaklarına göre polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.....	81
Şekil 4.15. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'un kültür ortamında glukoz miktarına göre polisakkarit, pullulan ve biyomass miktarının optimizasyonu.....	82
Şekil 4.16. Reaksiyon ortamı etanol miktarının pullulan üretimi üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.17. Reaksiyon ortamı karıştırma/statik koşulların pullulan üretimi üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.18. <i>Candida</i> türlerinden sentezlenen AgNP'lerin UV-vis spektrumu.....	85
Şekil 4.19. <i>Candida parapsilosis</i> 'ten üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.....	87
Şekil 4.20. <i>Candida glabrata</i> 'dan üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.....	87
Şekil 4.21. <i>Candida albicans</i> 'tan üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.....	88
Şekil 4.22. <i>Candida</i> türlerinden üretilen AgNP'lerin SEM görüntüsü. A) <i>Candida parapsilosis</i> , B) <i>Candida glabrata</i> , C) <i>Candida albicans</i> .....	90
Şekil 4.23. <i>Candida</i> türlerinden üretilen AgNP'lerin EDX spektrom görüntüsü A) <i>Candida parapsilosis</i> , B) <i>Candida glabrata</i> , C) <i>Candida albicans</i> .....	92
Şekil 4.24 <i>Candida</i> türlerinden üretilen AgNP'lerin XRD spektrum görüntüsü.....	93
Şekil 4.25. <i>Candida</i> türlerinden üretilen AgNP'lerin Zeta büyüklüğü ve dağılımı görüntüsü. A) <i>Candida parapsilosis</i> , B) <i>Candida glabrata</i> , C) <i>Candida albicans</i> .....	95
Şekil 4.26. <i>Candida parapsilosis</i> tarafından üretilen AgNP'lerin Zeta Potansiyel görüntüsü.....	96
Şekil 4.27. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'dan üretilen pullulan biyopolimerinin Zeta Sizer analiz verileri. A) sonikasyona tabi tutulmayan pullulan (PB), B) sonikasyona tabi tutulan pullulan (PB*).....	98
Şekil 4.28. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253'dan üretilen pullulan biyopolimerinin FTIR spektrumu.....	99
Şekil 4.29. Mikrobiyal olarak sentezlenen pullulan nanopartiküllere ait SEM görüntüleri. A) 20000 x, B) 50000 x, C) 200000 x.....	102
Şekil 4.30. Mikrobiyal olarak sentezlenen pullulan nanopartiküllere ait TGA-DTA verileri.....	102
Şekil 4.31. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin FTIR spektrumu.....	103

Şekil 4.32. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerin SEM görüntüsü. A) 50000 x, B) 10000 x, C) 200000 x.....	105
Şekil 4.33. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin TGA-DTA spektrumu.....	106
Şekil 4.34. AgNP'lerin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri...	109
Şekil 4.35. Pullulan biyopolimerinin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.....	110
Şekil 4.36. Antibiyotiklerin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.....	114
Şekil 4.37. AB+ (AgNP+PBP) farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.....	114
Şekil 4.38. AgNP'lerin <i>Candida</i> türleri üzerine antibiyofilm etkileri.....	119
Şekil 4.39. Pullulan biyopolimerinin <i>Candida</i> türleri üzerine antibiyofilm etkileri...	119
Şekil 4.40. AgNP+ Pullulan biyopolimerinin <i>Candida</i> türleri üzerine antibiyofilm etkileri.....	120
Şekil 4.41. Sentezlenen biyomalzemelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi.....	123
Şekil 4.42. MFC-7 hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.....	125
Şekil 4.43. MFC-7 hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.....	125
Şekil 4.44. MFC-7 hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	126
Şekil 4.45. MFC-7 hücre hattına uygulanan 200 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	126
Şekil 4.46. MFC-7 hücre hattına uygulanan 600 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.....	127
Şekil 4.47. MFC-7 hücre hattına uygulanan 900 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	127
Şekil 4.48. MFC-7 hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	128
Şekil 4.49. MFC-7 hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	128
Şekil 4.50. MFC-7 hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	129



Şekil 4.51. SKBR hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	129
Şekil 4.52. SKBR hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.. ....	130
Şekil 4.53. SKBR hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.....	130
Şekil 4.54. SKBR hücre hattına uygulanan 200 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	131
Şekil 4.55. SKBR hücre hattına uygulanan 600 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	131
Şekil 4.56. SKBR hücre hattına uygulanan 900 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	132
Şekil 4.57. SKBR hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	132
Şekil 4.58. SKBR hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	133
Şekil 4.59. SKBR hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri. ....	133
Şekil 4.60. MFC-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlara göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Biyomalzemelerin sate göre MFC-7 hücre hatı üzerindeki inhibisyon etkisi. ....	139
Şekil 4.61. SKBR-1 hücre hattı üzerinde AgNPS, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlara göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Biyomalzemelerin sate göre SKBR hücre hatı üzerindeki inhibisyon etkisi. ....	140
Şekil 4.62. AgNPs, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat inkübasyon sonrasında MFC-7 ve SKBR hücre hatları üzerine etkisinin karşılaştırılması. Biyomalzemelerin 24 saatlik hücre hatlarına inhibisyon etkisi. ....	141
Şekil 4.63. AgNPs, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat inkübasyon sonrasında MFC-7 ve SKBR hücre hatları üzerine etkisinin karşılaştırılması. Biyomalzemelerin 24 saatlik hücre hatlarına inhibisyon etkisi. ....	143

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyolojik nanoparçacıkların mikroorganizmalardan sentezi ve uygulamaları.....	11
Çizelge 2.2. Metal nanopartikül sentezleyen Küflerin listesi.....	14
Çizelge 2.3. Metal nanopartiküller sentezleyen Aktinomisetler ve Mayalar.....	18
Çizelge 2.4. Patojenik mikroorganizmalara karşı biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal özellikleri.....	27
Çizelge 2.5 Pullulan biyopolimeri üreten suşlar.....	33
Çizelge 2.6. Pullulan ve pullulan içerikli maddelerin uygulama alanları.....	34
Çizelge 2.7. Gümüş nanopartiküllerin biyomedikal alanındaki uygulamaları.....	38
Çizelge 3.1. Gümüş Nanopartikül Sentez Aşamasında Kullanılan Mikroorganizmalar.....	44
Çizelge 3.2. <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 201253 üretilmesinde kullanılan kültür ortam içeriği g\L.....	47
Çizelge 3.3. Pullulan biyopolimerinin üretiminde kullanılan üretim ortamı içeriği g\L.....	47
Çizelge 3.4. üretim ve reaksiyon koşullarının optimizasyonunda incelenen olan parametreler.....	49
Çizelge 3.5. Gümüş Nanopartikül karakterizasyonunda kullanılan yöntemler.....	53
Çizelge 3.6. Pullulan ve <u>AgNP+PBP</u> kompleksinin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler. ....	53
Çizelge 3.7. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	57
Çizelge 4.1. Tez kapsamında gümüş nanopartiküllerin üretiminde kullanılan mikroorganizmatürleri.....	64
Çizelge 4.2. Optimum koşullarda üretilen pullulan biyopolimeri.....	83
Çizelge 4.3. Pullulan biyopolimerinin FTIR spektrumları analiz sonucunda.....	99
Çizelge 4.4. Pullulan biyopolimerinin %75 kütle kaybı sıcaklıkları.....	101
Çizelge 4.5. PBP+AgNP'lerin FTIR spektrumları analiz sonucunda.....	103
Çizelge 4.6. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin %40 kütle kaybı sıcaklıkları...	106
Çizelge 4.7. İstatistiksel olarak antimikrobiyal aktivitelerin değerlendirilmesi.....	112
Çizelge 4.8. İstatistiksel olarak sinerjik aktivitelerin değerlendirilmesi. ....	117

Çizelge 4.9. İstatistiksel olarak antibiyofilm aktivitelerin değerlendirilmesi.....	121
Çizelge 4.10. İstatistiksel olarak antioksidan aktivitelerin değerlendirilmesi.....	123
Çizelge 4.11. MFC-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde AgNPS, PBP ve <u>AgNP+PBP</u> kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti.....	136
Çizelge 4.12. İstatistiksel olarak sitotoksisite aktivitelerin değerlendirilmesi.....	144

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

mm	Milimetre
nm	Nanometre
mg	Miligram
g	Gram
g/l	Gram/Litre
mg/ml	Miligram/mililitre
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/mililitre
θ	Teta
α	Alfa
°C	Santigrat derece
mM	Milomolar
M	Molar
Da	Dalton
KDa	Kilodalton
Kv	Kilovolt
mv	Milivolt
atm	Atmosfer
v/v	Hacimce Yüzde

### Kısaltmalar

NP	Nanopartikül
AgNP	Gümüş Nanopartikül
PBP	Pullulan Biyopolimer
Ag <sup>+</sup>	Gümüş İyonu
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

ELISA	Enzim ilintili immün test (Enzyme linked immunosorbent assay)
ATP	Adenozin trifosfat
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi (Transmission electron microscopy)
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscopy)
FTIR	Fourier dönüşümü kızıl ötesi (Fourier transform infrared)
AFM	Atomik kuvet mikroskobu (Atomic force microscopy)
XRD	X-Işını Difraktometresi
EDX	Enerji yayılımı X-ışını
<sup>13</sup> CNMR	Karbon-13 nükleer manyetik rezonans
<sup>1</sup> HNMR	Hidrojen-1 nükleer manyetik rezonans
DLS	Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi
XPS	X-ışını Fotoelektron Spektroskopis
TGA	Termogravimetrik Analiz
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry)
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
MTT	[3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
ROS	Reaktif oksijen türü
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
Au	Altın
Pt	Platin
Ds	Dekstran sülfat
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş nitrat
NaCl	Sodyum klorür
O <sub>2</sub>	Oksijen
C	Karbon
H	Hidrojen
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline)

# 1. GİRİŞ

Nanoteknoloji ve biyoteknoloji bilimleri birleşerek nanobiyoteknoloji kavramını ortaya çıkarmaktadırlar. Bu bilim dalı son yıllarda enerji, tıp, farmasötik endüstri, biyomedikal, görüntüleme, mühendislik ve uzay endüstrileri gibi pek çok alanda uygulamalarından dolayı önem kazanan, disiplinler arası bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nanopartiküllerin tıbbi amaçlar için cazip olma sebebi, diğer partiküllerinden kıyasla çok daha büyük olan yüzeyden kütle oranına, ilaçlar, problemler ve protein gibi diğer bileşenleri yüzeyde toplama ve taşıma kapasiteleri gibi önemli ve kendine has özelliklere dayalı olmasıdır. Boyutları 100 nm ve altında kalan parçacıklar olarak bilinen nanopartiküller, nanometre boyutunda olan malzemelerin ve böylelikle nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Nanoteknolojide nanopartiküller organik ve inorganikler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Organik ve inorganikler nanoyapıların sentezi için farklı fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle nanopartiküllerin sentezlenme süresi ve maliyeti düşük olsa da, elde edilmiş nanopartiküllerin birçoğunun sentez aşamasında toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Dolayısıyla elde edilen nanopartiküller toksik özellikler taşımaktadırlar. Diğer taraftan günümüzde insanların pek çok yaşam alanlarında kullanılan bu nanopartiküllerin toksisiteleri büyük bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle herhangi bir toksik kimyasal kullanmadan, doğal yöntemler kullanılarak nanopartiküllerin sentezlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla biyoteknolojik yöntemleri kullanarak partiküllerin sentezlenmesi araştırılmıştır. Literatürde birçok biyolojik yöntemler kullanılarak nanopartiküllerin sentezi rapor edilmiştir.

Kanser, yıllık on iki milyondan fazla insidans oranı ile gelişmiş ülkelerde başlıca ölüm sebebidir. Mevcut kanser tedavi seçenekleri kemoterapi, radyasyon ve cerrahi ile kısıtlanmıştır. Son birkaç yılda geleneksel kanser tedavi seçenekleri önemli oranda ilerleme göstermiş olmasına rağmen, kanser tedavisi halen beklenenden çok uzaktır, çünkü kanser karşıtı ilaçların spesifik olmayan dağılımı; tümör bölgesine ulaşan ilaçların yetersiz konsantrasyonu, kabul edilemez toksisiteler ve çoklu ilaç direncinin artması başlıca sorunlardır. Bu nedenle, mevcut kanser tedavilerinin performansını iyileştirebilen yeni yenilikçi teknolojiler için acil bir talep vardır. Son yıllarda, kanserde

nanoteknolojiinin uygulanması bu kapsamda önemli oranda ilgi görmüştür. Nanoteknoloji, mühendislik, biyoloji, fizik ve kimya disiplinlerinin ötesine geçen geniş çaplı araştırma alanlarını kaplayan yeni bir multi-disipliner yaklaşımdır. Kanser nanoteknolojisi, kanser tedavi ve tanısında uygulama ile evrimsel bir yaklaşımdır. Kanserlin erken teşhisi ve tespiti, tedaviye verilen yanıtın öngörülmesi veya kişiselleştirilmiş kanser tedavilerinin geliştirilmesi için yeni bir araç sunar. Hedeflenen tedavi ve görüntüleme kısımlarının uygulanması için kullanılan nano-taşıyıcılar, lipozomlar, polimerik miseller, nanopartiküller, dendrimeler, karbon nanotüpler, nanokonsollar ve kuantum noktalarını içerir ancak bunlarla sınırlı değildir

Bu tez kapsamında biyolojik olarak gümüş nanopartiküllerin üretimi ve elde edilen partiküllerin antibakteriyel ve sitotoksik özelliklerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda mikroorganizmalar kullanılarak hücre dışı organik/inorganik biyo-nanopartikül üretimine yeni ve biyoteknolojik bir alternatif yaklaşım getirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, biyolojik yollarla sentezlenen organik biyopolimerin ve inorganik metal nanopartiküllerin komplekslerinin oluşturulması biyoaktivite çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve oluşturulan yeni nanoyapıların kanserli hücreler üzerinde etkilerinin incelenmesidir.

AgNP+PBP biyomalzemesi ilk defa bu tez kapsamında oluşturulmuş, detaylı olarak optimizasyon, karakterizasyon ve en önemlisi biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanopartikül

Nanoteknoloji, boyut olarak yaklaşık 1-100 nm arasındaki parçacıkların yapısının sentezi, stratejisi ve manipülasyonu ile ilgilenen önemli bir modern araştırma alanıdır. Bu boyut aralığında, tüm özellikler (kimyasal, fiziksel ve biyolojik) bireysel atom/moleküller değişmektedir. Nanopartikül ve nanomateryallerin yeni uygulamaları, boyuta, dağılımlarına ve morfolojilerine dayalı olarak tamamen yeni ya da gelişmiş özelliklerinden dolayı hızla büyümektedir. Sağlık, kozmetik, biyomedikal, gıda ve yem, ilaç-gen dağıtımı, çevre, sağlık, mekanik, optik, kimyasal endüstriler, elektronik, uzay endüstrileri, enerji bilimi, kataliz, ışık yayıcılar, tekli elektron transistörleri, doğrusal olmayan optik cihazlar ve foto-elektrokimyasal uygulamalar gibi birçok alanda yaygınlık kazanmaktadır [1][2].

Yukarıda bahsedilen tüm amaçlar için kullanılan nanopartiküller arasında, metalik nanopartiküller umut vaat etmektedir. Çünkü metal iyonları büyük yüzey alanlarından dolayı önemli antibakteriyel özellikler içerir. Böylece antibiyotiklere karşı artan mikrobiyal direnç ve bu dirençli suşların geliştirilmesinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedirler [3]. Tüm metal nanopartiküller arasında gümüş nanopartiküller, kompozit lifler kriyojenik süper iletken materyaller, kozmetik ürünler, gıda endüstrisi ve elektronik bileşenler içerisinde birleştirilebilecek antiinflamatuvar aktivitelere ek olarak, kimyasal stabilite, iyi iletkenlik, katalitik ve en önemlisi antibakteriyel, antiviral, antifungal gibi kendilerine has özelliklerinden dolayı nanoteknoloji alanında sınırsız ilgi görmektedir [4][5]. Bu yapılar biyomedikal uygulamalar için, antiseptik olarak yara pansumanlarına, topikal kremlere, antiseptik spreylere ve kumaşlara eklenir ve hücre zarlarının bozulması böylece enzimatik aktivitelerinin inhibe edilmesi aracılığıyla mikroorganizmalara karşı geniş biyosidal etki gösterirler.

#### 2.1.1. Gümüş Nanopartiküller

Nanopartiküller (NP'ler), doğal kaynaklardan, kimyasal olarak sentezlenen ürünlerden ya da yan ürünlerin birinden elde edilebilir [6][7]. Yüksek yüzey-hacim oranından ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle, tıp alanında uygulama bulmaktadırlar [8][9]. Çeşitli mevcut nanomateryaller arasında, AgNP'ler makro ve mikro yapılarının aksine farklı



fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı ilgi çekmiştir (Şekil 2.1). Gümüş, hastalığa neden olan 650 farklı organizma türünü öldürme potansiyeline sahip olan güvenli bir antimikrobiyal ajandır [9]. AgNP'ler sentezlenmiş ve potansiyel antimikrobiyal etkiler taşıdığı gösterilmiştir [10][11] [12][13]. Biyofilm üreten organizmaları antibakteriyel ajanlara karşı dirençli olduğu için, AgNP'lerin küçük parçacık boyutu DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olur [14] [15]. AgNP'ler, restoratif dişçilik (kompozit reçineler ve yapışkanlar) [16][17], endodontik [18][19], periodontik, implant dişçiliği (titanyum diş implantları) [20][21][22], dişçilik (porselen ve akrilik reçineler), ortodonti, ağız kanserlerinde kullanılmaktadır [23].



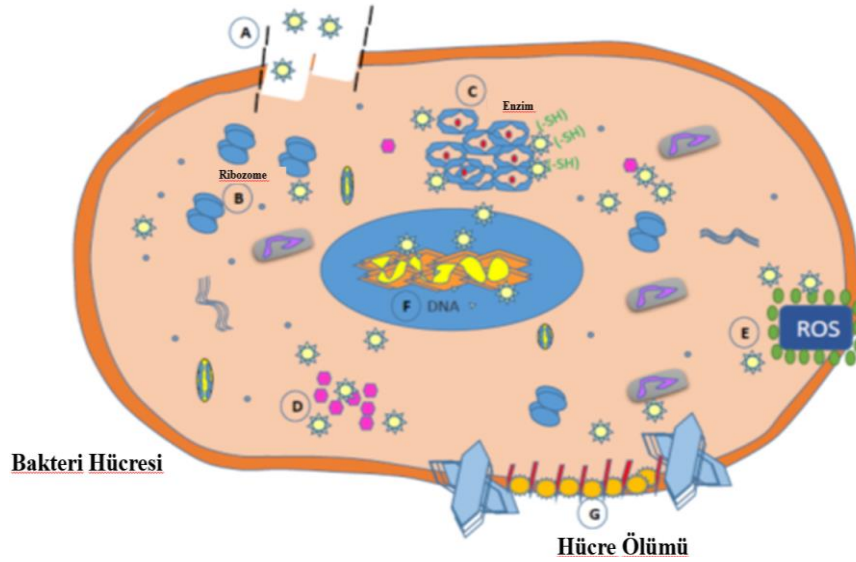
Şekil 2.1. Gümüş nanopartikülünün şarap rengi görüntüsü.

## 2.1.2. AgNP Etki Mekanizması

### 2.1.2.1. AgNP antimikrobiyal etkisi

AgNP'ler hem Gram pozitif hem de Gram negatif organizmalar ve çeşitli ilaca dirençli suşlar üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etki göstermiştir. Antibakteriyel etki için çeşitli mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen, tam etki yöntemi tamamen anlaşılmamıştır (Şekil 2.2.). Jones ve Hoek'e göre [24], en yaygın etki yöntemi, ATP moleküllerini kesintiye uğratan ve AgNP'ler tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve DNA replikasyonunu önleyen ya da gümüş iyonları (Ag<sup>+</sup>) ile hücre zarında doğrudan

hasara neden olan serbest gümüş iyonu alımı olabilir. AgNP formlarının, artan geçirgenliğe ve hücre ölümüne neden olarak gram negatif organizmalarının hücre duvarına yerleştiği kabul edilir. Genel olarak, AgNP'ler denatürasyona neden olur ve hücre yıkımı ile sonuçlanan hücre duvarını okside eder [25][26]. AgNP'ler aynı zamanda organizmaların sinyal iletimini kesintiye uğratan ve çoğaltmayı önleyen peptitlerin fosfotrosin profilini de değiştirmektedir [27].



Şekil 2.2. Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki basamakları. (A) bakteriyel hücre içerisine AgNP difüzyonu ve alımı: Plazma zarında AgNP birikmesi ve çözünmesi hücre sızıntısına neden olmaktadır. (B) Ribozomların destabilizasyonu: Protein sentezini ve plazma zarı degradasyonunu inhibe ederek ribozomların doğasını değiştirir. (C) Enzim etkileşimi: AgNP'ler solunum enzimlerindeki tiyol grubu ile (-SH) bağlanır ve onları etkisizleştirir. (D) Elektron transfer zincirinin kesintiye uğraması: AgNP'ler sinyal yolunu etkileyerek elektron taşınmasını engeller. (E) Reaktif Oksijen Türleri (ROS): Mitokondriyal hasar, proteinleri okside eden ROS'u indükler. (F) DNA Hasarı. AgNP'ler, apoptoza neden olan replikasyon ve multiplikasyonunu önleyerek DNA ile bağlanır. (G) Hücre Ölümü: Hücre zarında çukur ve delik oluşumu, hücre organellerinin salımına ve hücre ölümüne neden olur.

AgNP'lerin anti-bakteriyel etkisi, Ag<sup>+</sup> iyonlarının salımından kaynaklanmaktadır. Anti-bakteriyel etki için küçük AgNP kullanıldığı zaman (10nm parçacık boyutundan daha az) Ag<sup>+</sup> salımı daha yüksektir [1]. AgNP minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC), *Fusobacterium nucleatum* [2] için yaklaşık 0.003 mg/mL, *Streptococcus mutans* için 0.04

mg/mL ve *Actinomyces oris* [3] için 0.5 mg/mL'dir. 2004 yılında Sonni ve ark. tarafından yapılan deneyin gözlemine göre, 50–60 µg AgNP konsantrasyonu *Escherichia coli* bakteri üremesinin %100 baskılanmasına neden olur [26]. Ayrıca, AgNP bakteriyel özellikleri boyuta bağlıdır. Hücre zarı yüzeyi ile doğrudan etkileşim ile 1-10nm aralığında AgNP, geçirgenliği değiştirir ve hücre hasarına neden olur [10].

### **2.1.2.2. AgNP Antiviral etkisi**

AgNP'lerin bağlayıcılıklarını ve kopyalanmalarını baskılayarak, virüslerin dış proteinlerine bağlanabilecekleri kaydedilmektedir. AgNP'lerin antiviral mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. [28].

### **2.1.2.3. AgNP Antifungal/Mantar önleyici etkisi**

AgNP'ler, çeşitli mantar türlerinin 44 suşuna karşı antifungal etki göstermiştir [29]. *Candida albicans*'a karşı AgNP etkisi, hücre çoğalmasını baskılayarak hücre zarı bütünlüğünün yıkımı olabilir [30]. Bu sebeple, AgNP'ler ağızla ilgili mantar enfeksiyonlarını önleme ajanlarından biri olabilir. Reçinelere katılmış 1 µg/ml AgNP konsantrasyonu, hiçbir sitotoksikite olmaksızın etkili antifungal aktivite göstermiştir [31].

### **2.1.3. AgNP Sentez Yöntemleri**

Gümüş nanopartiküllerin sentezi için birçok yol öne sürülmüştür: (i) kimyasal yöntemler [32] [33]; (ii) fiziksel yöntemler [34], ve (iii) biyolojik yöntemler [15]. Gümüş nanoyapıların sentezi için kimyasal yöntemler, kimyasal indirgeme [33], elektrokimyasal teknikler [35], ışınlama destekli kimyasal yöntemler [36], ve piroliz / ısı bozunma [34] olarak sayılabilir. Çözeltide gümüş nanoyapıların sentezi genellikle üç ana bileşen içerir: metal öncüller, indirgeme ajanları ve hidrazin bileşenleri. Nanoyapılı SiO<sub>2</sub> üzerinde desteklenen AgNP'lerin, Ag içeriğini ve boyutunu yakından kontrol etmeyi sağlayan alev aerosol teknolojisi ile elde edildiği bildirilmiştir [36]. Benzer şekilde, diğerlerine göre küçük boyuta sahip Ag/silika nanopartikülleri, alev spreyi pirolizi ile yapılmıştır (alev aerosol teknolojisi) [36]. Bu yöntemler, fiziksel buhar yoğunlaşması

[33], Ark boşalmasını [37], enerji topu işleme yöntemini [38] ve doğru akım (DA) magnetron püskürtmesini [39] içerir. Fiziksel yöntemlerin başka bir avantajı ise, elde edilen AgNP'lerin dar boyutlu dağılıma sahip olduğudur [39]; ancak, başlıca engel ise yüksek enerji tüketimleridir. AgNP'lerin biyolojik sentezinde, zehirli indirgeme ajanları ve stabilizatörlerin yerini, canlı bakteri, mantar, maya ve bitkilerin ürettiği zehirli olmayan moleküller (proteinler, karbonhidratlar, antioksidanlar, vb.) almaktadır. Bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmalara dayalı biyolojik yöntemler çok sayıda rapor edilmiştir. Limon otu, Aloe vera, deniz yosunu, kaba yonca, çay, nim ağacı, hardal, safeda, lotus ve tulsu gibi daha ucuz bitki sistemleri AgNP sentezi için araştırılmıştır. Biyolojik sentez için muhtemel mekanizmalar, enzimatik (örneğin; NADPH redüktazı) ve enzimatik olmayan indirgemeyi kapsar [40]. Genel olarak, bitki ekstratlarını kullanan AgNP sentezi, en sık kullanılan çevre dostu üretim yöntemidir [41].

Nanopartiküllerin sentezi için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar daha yüksek üretim oranı ve sentezlenen nanopartiküller üzerinde daha iyi kontrol sunmasına rağmen, yüksek maliyet, enerji gereklilikleri, anaerobik koşullar, zehirli reaktiflerin kullanımı ve tehlikeli atıkların üretiminden dolayı elverişsiz olarak görülmektedir. Bu dezavantajlar, üretim maliyetini yükseltir ve çevre hakkında kaygılara neden olur. Dahası, kimyasal açıdan sentezlenen nanopartiküller biyolojik açıdan daha az uyumludur ve sentez için zehirli kimyasalların kullanımı ve stabilite eksikliği klinik uygulamalardaki kullanımlarını sınırlamıştır [42][43]. Bu nedenle, nanopartiküllerin sentezi için çevresel açıdan güvenli, ekonomik ve biyolojik olarak uyumlu prosedürlerin geliştirilmesi arzu edilmektedir. Biyolojik yöntemler ile nanopartiküllerin sentezi, fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha ekonomik, zehirli olmayan ve çevre dostu alternatif sunmaktadır [44]. Mikropların küçük nano-fabrikalar olduğu ortaya konmuştur ve nanopartiküllerin mikrobiyal sentezi biyoteknoloji, mikrobiyoloji ve nanoteknolojiyi yeni bir nano-biyoteknoloji alanında birleştirmiştir. Biyo-iyileştirme ve biyoözütleme biyomineralizasyon için metal-mikrop etkileşimleri yaygın şekilde kullanılmıştır, ancak nano-biyoteknoloji halen ilk gelişim aşamasıdır [45]. Mikrobiyal sentezi, sağlık ve nanotıp alanlarındaki potansiyel uygulamaları umut vadetmektedir [43].

### 2.1.3.1. Mikroorganizmalardan Nanopartiküllerin Biyosentezi

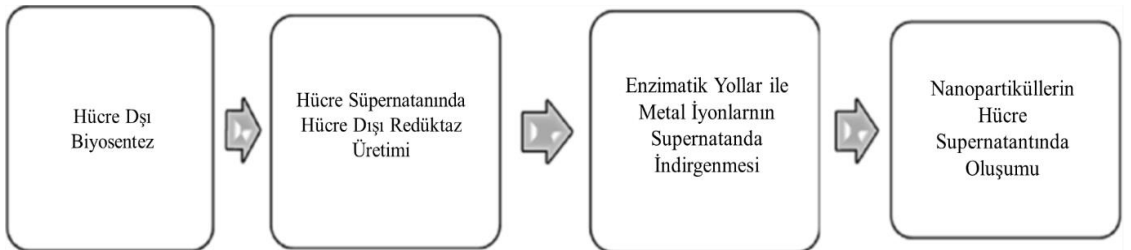
Nanopartiküllerin biyolojik sentezi için, bitkiler ve mikroorganizmalardan dünya çapında faydalanılmıştır [43]. Bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmalar hızlı büyüme oranları, kolay üremeleri, pH ve basınçtan dolayı, nanopartiküllerin (NP) sentezi için (Çizelge 2.1) tercih edilmektedir. Mikroorganizmalar metal içeren ortama uyum yeteneklerinden dolayı, hücre içi (şekil 2.3) ve hücre dışı (şekil 2.4) yollar aracılığıyla nanopartikülleri sentezlemek için yapısal bir potansiyele sahiptir. Mikroorganizmalar enzimatik aktiviteleri aracılığıyla bu metal iyonlarını temel forma dönüştürürler [46]. Bakteriler, nanopartiküller üretmek için ağır metal iyonlarını önemli oranda indirgeyebilir. Araştırmacılar, metal iyon indirgeyebilen bazı bakterilerin nanometre düzeyinde metalleri çökeltme özelliklerini ispatlamıştır. Bakteriye dayalı nanopartikül sentezinin başlıca avantajı ise, toksik kimyasalların minimal kullanımı ile büyük ölçekli sürdürülebilir üretimleridir. Mantar da, iyi tanımlanan geometrilere ve boyutlara sahip tekil dağılımlı nanopartikülleri üretmek için çeşitli hücre içi ve hücre dışı enzimlere sahiptir. Diğerlerine nazaran daha büyük biyokütleden dolayı, bakteri ile kıyaslandığı zaman nanopartiküllerin verimi mantarda yüksektir., *Collitotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium luteoalbum* *Asperigillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Alternaria taalternata*, *Trichothecium sp.* vb. gibi çeşitli mantar türlerinin, çeşitli boyutlar ve şekillerde nanopartiküller ürettiği bildirilmiştir [43][47].

Mikroorganizmalardan metal sülfid nanopartiküllerinin biyogenik sentezi, genellikle çözünebilir tuzlar formunda metal ve sülfür öncülleri gerektirir. Hücre içi sentez sırasında, bu çözünebilir iyonlar, manganez ya da magnezyum taşıma zinciri aracılığıyla hücre sitoplazmasına girme ve sitoplazmada bulunan hücre içi enzimlerin etkisi ile nanopartiküllere dönüşme eğilimi gösterirler. Ancak, nanopartiküllerin sentezinde hücre zarında yer alan enzimler aracılık eder ya da büyüme ortamına salınır. Bu şekilde üretilen nanopartiküller, hücre zarında tutunabilir ya da ortamda kalabilir. Mikroorganizmalarda nanopartiküllerin hücre dışı oluşumu, ortamdaki metal iyonlarının varlığından kaynaklanabilen stressiz koşullarda gerçekleşebilir. Dahası, daha kolay, maliyeti az ve büyük ölçekli nanopartikül sentezi sunar [42]. Metal oksitler önemli fizikokimyasal özellikler taşır ve metalik, yalıtkan ya da yarı iletken özellikler ile yapısal polimorfizme sahiptir. Sadece birkaç çalışma, metal oksit nanopartiküllerinin mikrobiyal sentezini ispatlamıştır. *Aquaspirillum magnetotacticum* ve *Magnetospirillum magnetotacticum*

gibi bakteriyel türlerin, oksit nanopartikülleri sentezlediği bildirilirken, uranyum dioksit nanopartiküllerinin *Shewanella oneidensis* ve *Desulfosporosinus* türleri tarafından başarılı bir şekilde sentezlendiği bildirilmiştir [47]. Boyutlarını, kararlılıklarını, geometrilerini, vb. içeren birçok faktör, biyotıpta nanomateryallerin potansiyelini etkiler. Küçük boyutlu NP'ler, biyomedikal alanda kullanımlarını sağlayan alım mekanizmaları aracılığıyla plazma zarına kolayca girerler. Ortam konsantrasyonu, pH, sıcaklık, zaman, basınç, vb. gibi sentez prosedürlerinde yer alan fizikokimyasal parametrelerini ayarlayarak, nanopartiküllerin geometrisi ve kararlılığı kontrol edilebilir. Barabadi ve ark. (2014), *Penicillium crustosum* ile iyi tanımlanan boyutları ve monodispersitesi olan altın nanopartiküllerin sentezi ispatlanmıştır [48]. Bulgulara göre, bu özellikler, substrat konsantrasyonu, ortam pH'ı ve inkübasyon sıcaklığından etkilenmiştir. Benzer şekilde, Sharma ve ark. (2012) da nanopartiküllerin kararlılığının kaplama ajanlarına bağlı olduğunu, ancak NP boyutunun inkübasyon zamanından etkilendiğini bildirmiştir [43].



Şekil 2.3. Nanopartiküllerin hücre içi sentezlerinin şematik akış diyagramı.



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin hücre dışı sentezlerinin şematik akış diyagramı [43].

Mikroorganizmaların, çevre dostu, maliyeti az ve fizikokimyasal sentez için gereken yüksek enerjiye sahip önemli nanofabrikalar olduğu gösterilmiştir. Mikroorganizmalarda nanopartikülleri sentezleme mekanizması ve deneysel yöntemleri Çizelge 2.1'de tanımlanmaktadır. Geçtiğimiz birkaç yılda, bakteri (Aktinomisetler gibi), mantar ve mayalar dâhil olmak üzere mikroorganizmalarda, metal nanopartikül sentezi hücre içi ve hücre dışı olarak incelenmiştir (Çizelge 2.1). Bakteriyel biyokütle, süpernatant ve türev

bileşenler kullanılarak nanopartikül sentezi için bir biyolojik protokol dizisi rapor edilmiştir. Hücre dışı sentez hücre içi senteze göre daha fazla ilgi görmüştür çünkü hücre içi sentezde, sentezlenen maddelerin hücre dışına çıkması için ekstradan işlemler gerekmektedir. Dahası, metale dirençli genler, proteinler, peptitler, enzimler, indirgeme kofaktörleri ve organik materyaller indirgeme ajanları olarak hareket ederek önemli roller taşır. Hatta, bunlar nanopartikülleri sentezlemek için doğal kaplama sağlamada yardımcı olur, böylece nanopartiküllerin agregasyonunu önler ve ek kararlılık sağlayarak uzun bir süre kararlı kalmalarına yardımcı olur. Yapılan son araştırmalarda, *Pseudomonas deceptionensis* [49], *Weissella oryzae* [50], *Bacillus methylotrophicus* [51], ve *Bhargavaea indica*[52][53] dahil olmak üzere bakteriler, gümüş ve altın nanopartikül sentezi için araştırılmıştır. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Rhodobactersphaeroides* [54], *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Streptomyces anulatus*'da [55] nanopartikül üretme potansiyeli gösterilmiştir. Metal nanopartikül sentezi için *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Weissella*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, *Streptomyces*, *Sargassum*, *Shewanella*, *Plectonemaboryanum*, *Rhodopseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Pyrobaculum* ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizma cinsleri bildirilmiştir [51]. Bu araştırmalar, bakteri kullanarak nanopartikül sentezinin başlıca mekanizmasının enzimlere bağlı olduğunu ileri sürer [56]; örneğin, nitrat reduktaz enziminin *B. licheniformis* gümüş nanopartikül sentezinden sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Bakteri kullanmak yerine, kararlı ve kolay biyolojik nanopartikül sentezi gerçekleştirmek için mantar kullanılması açık ve anlaşılır bir yaklaşımdır. Dahası, bakteriler ile kıyasladığı zaman, özellikle yüksek verimli nanopartikül üretimi için mantar biyokütlesi metallere daha yüksek tolerans gösterir ve metaller için alım yeterliklerine sahiptir [57][58]. *Penisilium* türleri ve *Fusarium oxysporum*, nitrat reduktaz ve NADPH-bağımlı reduktazlar gibi mantar enzimlerinin, bakteride bulunan mekanizmaya benzer şekilde, nanopartikül sentezinde [59] önemli bir role sahip oldukları ortaya konmuştur.

*Streptomyces* türünden reduktaz enziminin metal tuzların indirgenmesi sonucunda gümüş, bakır ve çinko gibi nanopartiküllerinin sentezi gösterilmiştir [60]. Nanopartiküllerin hücre dışı sentezi için mayalar da geniş çaplı olarak araştırılmıştır [61][62]. Ayrıca, nanopartiküllerin virüsler aracılığı ile sentezi de mümkündür. Batarya

elektrotları, fotovoltaiik cihazlar ve süperkapasitörler gibi çeşitli uygulamalar için kurulan fonksiyonel parçalar ile nanokabloları sentezlemek için virüsler kullanılabilir [63] [64].

Çizelge 2.1. Biyolojik Nanoparçacıkların Mikroorganizmalardan Sentezi ve Uygulamaları [51].

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Hücre İçi / Dışı Sentez</b>	<b>Nanopartikül</b>	<b>Şekli</b>	<b>Boyutu nm</b>	<b>Uygulama Alanı</b>
<b>Bakteri</b>					
<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Yuvarlak	10-30	Antimikrobiyal ve Antibiyofilm
<i>Weissella oryzae</i>	Hücre İçi	Gümüş	Yuvarlak	10-30	Antimikrobiyal ve Antibiyofilm
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Yuvarlak	10-30	Antimikrobiyal
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Yuvarlak	10-30	Antimikrobiyal
<b>Küf</b>					
<i>Neurospora crassa</i>	Hücre Dışı ve İçi	Gümüş ve Altın	Yarı küresel	>100	-
<b>Aktinomiset</b>					
<i>Streptomyces sp. LK3</i>	-	Gümüş	Yuvarlak	5	kene öldürücü
<b>Mayalar</b>					
<i>Yarrowia lipolytica NCYC 789</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Yuvarlak	15	Antibiyofilm
<i>Candida utilis NCIM 3469</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Yuvarlak	20-80	Antibakteriyal



Son yıllarda, *Trichothecium sp.*, *Trichoderma asperellum*, *T. viride*, *Phaenerochaete chrysosporium*, *F. solani* USM 3799, *F. semitectum*, *A. fumigatus*, *Penicillium brevicompactum*, *Coriolus versicolor*, *Colletotrichum sp.*, *Aspergillus niger*, *Phomaglomerata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium fellutanum*, *Fusarium oxysporum* ve *Volvariella volvaceae* fungusları, nanopartikül sentezi için araştırılmıştır. Diğer mikroorganizmalar ile kıyaslandığı zaman mantarlar birçok açıdan daha avantajlıdır. Mantar miçelyal yapısı, bitki materyalleri ve bakteriler ile kıyaslandığı zaman ve çalkalamaya ve biyoreaktörlerdeki diğer koşullara daha dirençlidir [65].

#### **2.1.3.1.1. Mikroorganizmalar Tarafından Nanopartiküllerin Hücre İçi Sentezi**

Hücre içinde sentezlenen nanopartiküllerin serbest kalması için, ultrasonik işleme tabi tutulması ya da uygun deterjanlar ile reaksiyon gibi ek işleme adımları gerekmektedir. Hücre yüzeyinde Ag(I) biyosorpsiyonu ve biyo-indirgenmesi de, *Lactobacillus sp. A09* suşunda 24 saatte pH 4.5'de, 30 °C'de bildirilmiştir [65]. Benzer bir diğer çalışmada, *Corynebacterium sp. SH09* suşunun kurutulmuş hücreleri kullanılarak 10-15 nm boyut aralığında 72 saatte 60 °C'de hücre duvarında gümüş nanopartiküller üretilmiştir. Mikroorganizma kendini gümüşün toksik etkisinden korumayı, hücre yüzeyinde gümüşü bağlayan küçük periplazmik gümüş bağlayıcı proteinler ve gelen metalleri ileriye iten ve sonuç olarak sitoplazmayı toksisiteden koruyan dışa akış pompası yardımı ile gerçekleştirmektedir [65]. Yapılan bir çalışmanın sonunda, havadan izole edilen *Bacillus sp.*'nin Ag<sup>+</sup> iyonlarını Ag<sup>0</sup>'a indirgediği ortaya konmuştur. Bu bakteri, hücrenin periplazmik bölgesinde 5-15nm boyutunda olan metalik gümüşü biriktirmiştir [65]. Bazı bakterilerin ise birden fazla nanopartikül ürettiği rapor edilmiştir. Nair ve Pradeep yaptıkları çalışmada [79], ekşimiş süttten izole ettikleri *Lactobacillus sp.*'nin üremelerinde hiçbir bozulma olmaksızın hücre içerisinde iyi mikroskopik morfolojiye sahip olan altın, gümüş ve altın-gümüş karışımı kristalleri ürettiğini saptamıştır. Altın kristalleri, altıgen ve üçgen şekillerinde 20-50 nm boyutlarında tespit etmişlerdir. *B. subtilis*, sülfür indirgeyen bakteri, *S. alger*, *P. boryanum*, *Lactobacillus sp.*, *R. capsulatus*, *P. Stutzeri*, *E. coli*, *Corynebacterium sp.* ve *Bacillus sp.*, suşları ile altın ve gümüş nanopartiküllerinin hücre içi sentezi gerçekleşmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ise 5-200 nm boyut aralığında

küp, altıgen, daire gibi farklı morfolojiler halinde bu nanopartiküller elde edilmiştir [66] (Çizelge 2.1).

Mikroorganizmanın içerisinde oluşan nanopartiküller, hücre dışında indirgenmiş nanopartiküllerin boyutu ile kıyaslandığı zaman daha küçük olabilir. Bunun nedeni ise, organizmaların içerisinde çekirdeklenen partiküller ile ilgili olabilir.

*Phoma PT35* bir mantar türüdür bu mikroorganizma seçici olarak gümüşü biriktirebilir böylelikle *Phoma sp.* aslında gümüş nanopartikülleri hazırlamak için uygun bir biyosorbenttir [65].

*Verticillium sp.* mantar biyokütlesinin gümüş nitrat çözeltisi içine konulduğunda, hücresi içinde göz ardı edilmeyecek miktarda gümüş nanopartiküllerini biriktirdiği rapor edilmiştir [65]. Vigneshwaran ve ark. gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda ise [67], 72 saat boyunca gümüş nitrat çözeltisi ile inkübe edilen, *Aspergillus flavus* suşunun hücre duvarının yüzeyinde gümüş nanopartiküllerin (Ortalama partikül boyutu 8.92 nm). *Verticillium sp.*, *Trichothecium sp.* ve *V. luteoalbum* tarafından üretilen altın nanopartiküllerinin ve *Verticillium sp.* ve *Aspergillus flavus* tarafından üretilen gümüş nanopartiküllerinin hücre içi sentezi, 8.92–25 nm boyut aralığında daire, yarı altıgen ve çubuk morfolojileri Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Metal nanopartikül sentezleyen Küflerin listesi [66].

Mikrorganizma	Hücre İçi / Dışı Sentez	Nanopartikül	Morfoloji	Boyut nm
<b>Küf</b>	<b>Hücre İçi</b>			
<i>Verticillium sp.</i>	Hücre İçi	Altın	Küreler	20
<i>Trichothecium sp.</i>	Hücre İçi	Altın	-	-
<i>Verticillium sp.</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	25
<i>Aspergillus flavus</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	8.92
<b>Küf</b>	<b>Hücre Dışı</b>			
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hücre İçi	Altın	Küreler ve Üçgen	20-40
<i>Colletotrichum sp.</i>	Hücre İçi	Altın	Küreler	20-40
<i>T. viride</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	5-40
<i>F. oxysporum</i>	Hücre İçi	Gümüş	-	550
<i>F. solani USM 3799</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	16
<i>F. semitectum</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	10-60
<i>F. acuminatum</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	5-405-25
<i>Coriolus versicolor</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	444-491
<i>Aspergillus niger</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	20
<i>Phoma glomerata</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	60-80
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	10-100
<i>Penicillium fellutanum</i>	Hücre İçi	Gümüş	Küreler	5-25
<i>F. oxysporum</i>	Hücre İçi	Gümüş- Altın	-	8-14
<i>Volvariella volvacea</i>	Hücre İçi	Gümüş- Altın	Küresel, altıgen	20-150

### 2.1.3.1.2. Mikroorganizmalar Tarafından Nanopartiküllerin Hücre Dışı Sentezi

Metal nanopartiküllerin mikrobiyal yollar ile sentezi, hücrelerin indirgeyici bileşenlerinin lokalizasyonuna bağlıdır. Hücre duvarı redüktif enzimleri ya da çözümlü halde enzimleri hücrenin dışına salgıladığı zaman, bu enzimler hücre dışında bulunan metal iyonlarının redüktif sürecine dahil olarak metal nanopartiküllerin hücre dışı sentezlenmesine sebep olurlar. Nanopartiküllerin hücre dışı üretimi, hücre içi birikmeye göre optoelektronik, elektronik, biyo görüntüleme ve sensör teknolojisi gibi birçok farklı alanda daha geniş uygulamalara sahiptir.

Bir çalışmada rapor edildiği gibi, *Aeromonas sp. SH10* suşunun kurutulmuş hücrelerinin 4 saatte  $[Ag(NH_3)_2]^+$ 'yi  $Ag^0$ 'a indirgeyerek 6.4 nm çapı olan gümüş nanopartiküllerinin ürettiğini ortaya koymuştur. Bu partiküller, tekil dağılımlıdır ve boyut açısından tek tiptir, agregasyon ve çökeltme sonrasında 6 aydan uzun süre kararlı kalmışlardır [66]. Enterobakterler (*Klebsiella pneumonia*, *E. coli* ve *Enterobacter cloacae*) kültür süpernatantları da  $Ag^+$ 'ı  $Ag^0$ 'a indirgeyerek ortalama 28.2- 122 nm boyutunda gümüş nanopartiküllerini hızlıca sentezlemiştir [66]. Bir diğer çalışmada, patojen olmayan *B. licheniformis* suşunun kültür süpernatantı 50 nm gümüş nanopartiküllerinin hücre dışı sentezi için kullanılmıştır [66].

Rapor edilen son verilere göre, HIV-1 virüsünün özellikle boyutu 1-10 nm aralığında olan gümüş nanopartiküllerine bağlandığını ortaya konmuştur [66]. Enterobakter gurubuna ait olan böcek midesinde izole edilmiş *Morganella sp.* suşunun gümüşe dirençli olmasına rağmen  $20\pm 5$  nm boyutunda daire morfolojiye sahip nanopartiküller ürettiği bildirilmiştir [66].

*Aeromonas sp. SH10*, *A. Xylinum*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *B. Licheniformis* ve *Morganella sp.* gibi farklı bakterilerden elde edilen hücre dışı gümüş nanopartiküllerinin 6.4 ve 52.5 nm aralığında olup ve sadece yuvarlak morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir [66] (Çizelge 2.1).

Hücre dışında nanopartiküllerin sentezinin birçok uygulaması vardır çünkü hücreden gelen hücresel bileşenler hücre dışı sentezde bulunmaz. Çoğunlukla, mantarlar yüksek miktarda hücre dışı materyal salgıladıklarından dolayı nanopartikülleri hücre dışında

üreten organizmalar olarak bilinirler. Bhainsa ve D'Souza gerçekleştirdikleri çalışmalarda [68], *Aspergillus fumigatus*'a gümüş nitratı ekledikleri zaman, 10 dakikada 5-25 nm boyutunda tekil dağılımlı gümüş nanopartiküllerinin üretimini gerçekleştirerek TEM mikrografi ile, ağırlıklı olarak yuvarlak ve üçgen olmak üzere çeşitli şekillere sahip nanopartiküller ürettiklerini göstermiştir. Bu indirgeme süreci, biyolojik sürece göre ve hatta fiziksel ve kimyasal süreç ile kıyaslandığı zaman en hızlı indirgemedir.

Beyaz çürükçül grubuna ait olan *P. chrysosporium*'un gümüş nitrat ile reaksiyona girerek piramit morfolojisine sahip gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezini gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, hücre dışında sentezlenen nanopartiküller SEM analizi ile incelendiklerinde, miselyumun yüzeyinde gümüş nanopartiküllerinin 50-200 nm boyut aralığında olduğu ortaya konulmuştur. Bu işlem, gümüş iyonlarını gümüş nanopartiküllerine indirgeyen miselyumun yüzeyinde redüktaz enzimlerinin varlığını göstermiştir [66].

Basavaraja ve ark. [69] *F. semitectum* kültür filtratına gümüş iyonları ile muamele edildiği zaman, polidisperseiteyi işaret ederek yuvarlak morfoloji ile 10-60 nm boyut aralığında gümüş nanopartiküllere indirgediğini göstermiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen nanopartiküllerin birkaç hafta kararlılıklarını koruduklarını rapor etmişlerdir.

Benzer şekilde, topraktan izole edilmiş *Aspergillus niger* çapı 20nm boyutunda olan yuvarlak gümüş nanopartikülleri üretmiştir. Temel spektroskopi, nanopartiküllerin stabilizasyonu için mantar proteininin varlığını göstermiştir. Nitrat redüktaz enzimlerinin etkisi ve hücre dışı elektron transferinde kinin etkisi ile  $Ag^+$  iyonları indirgemesi gerçekleşmiştir [66]. Ek olarak, fitopatogenik soğan mantarı olan *Fusarium. solani* (USM-3799) suşunun 16.23 nm aralığında çoğul dağılımlı yuvarlak gümüş nanopartikülleri ürettiği rapor edilmiştir [66] (Çizelge 2.2).

Patojenik olmayan ve biyokontrol ajanı olarak bilinen *Trichoderma asperellum* ise birkaç ay kararlılığını koruyan, 13-18 nm boyut aralığında gümüş nanopartiküller üretmiştir [66]. *P. glomerata* suşunun filtratı, gümüş nitratı ile muamele edildiği zaman 60-80 nm aralığında yuvarlak gümüş nanopartikülleri sentezlediği belirtilmiştir. Hücre dışı olarak

sentezlenen bu nanopartiküller aynı zamanda *P. Aeruginosa*, *E. coli*, ve *Staphylococcus aureus* türlerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir [66].

Beyaz çürükçül bir mantar olan, *C. versicolor*'un, alkali koşulda hücre dışı ve hücre içi gümüş nanopartikülleri üretmek için biyoindirgeme ve biyokaplama ajanları olarak proteinleri kullandığı tespit edilmiştir [66] (Çizelge 2.2). TEM analizi ile incelenen bu nanopartiküllerin, 25–75 nm (hücre dışı) ve 444 – 491 nm (hücre içi) boyutlarında yuvarlak morfolojiye sahip gümüş nanopartiküller olduğu rapor edilmiştir.

Balaji ve ark. [70] *C. cladosporioides* mantarı tarafından hücre dışı gümüş nanopartiküllerinin üretimini göstermiştir. TEM analizi yardımı ile, çoğul dağılımlı ve yuvarlak şekilli partiküllerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Mantar tarafından salgılanan proteinler, polisakkaridler ve organik asitlerin, farklı kristal şekillerin oluşumunu hızlandığını ve yuvarlak kristalleri oluşturduklarını belirtmişlerdir. Bir diğer çalışmada, çürükçül sap mantarı ekstratı olan *V. volvacea*, gümüş, altın, altın-gümüş nanopartikülleri üretmek için kullanılmıştır [66]. Altın nanopartiküllerinin üçgen nanoprizmalardan yuvarlak ve altıgen şekillere kadar farklı şekillerde olduğu ve 20-150 nm aralığında bir boyuta sahip olduğunu, gümüş nanopartiküllerin ~15 nm boyutu ile yuvarlak olduğu ve Au–Ag bimetalik nanopartiküllerinin her iki metal iyonunun birlikte indirgenmesi ile oluşturulduğu bulunmuştur [66].

#### **2.1.3.1.3. Nanopartiküllerinin Aktinomiset Aracılığı ile Sentezi**

Aktinomisetler fungus özelliklerini taşıdıkları için, prokaryot sınıfında sınıflandırılmıştır. Yeni bir ekstremofilik aktinomiset olan *Thermomonospora sp.*, ışın mantarı olarak bilinir. Bu suş kullanılarak ortalama 8nm boyutunda hücre dışı tekil dağılımlı yuvarlak altın nanopartikülleri sentezlenmiştir [66]. FTIR analizi sonucunda ise, bu nanopartiküllerin yüzeyinde kaplama ve stabilize etme ajanı olarak amid (I) ve protein varlığını belirterek partiküllerin 6 aydan uzun bir süre kararlı kaldıklarını rapor etmişlerdir. Tam aksine, bir alkalotolerant Aktinomiset olan *Rhodococcus sp.* hücre içi yolla 5-15 nm boyutunda altın nanopartiküllerini biriktirmiştir (Çizelge 2.3). [66]. Bu zamana kadar, Aktinomisetler genel anlamda antibiyotikler gibi sekonder metabolitleri sentezlemek için birincil kaynak olarak bilinmektedirler. Ancak yeni çalışmalara bakılırsa, nanomateryallerin sentezinde Aktinomisetlerin önemli rolleri olacaktır.

Çizelge 2.3. Metal Nanopartiküller sentezleyen Aktinomisetler ve Mayalar (66).

Mikroorganizma	Hücre İçi/ Dışı	Nanopartiküller	Morfoloji	Boyut nm
<b>Aktinomisetler</b>	<b>Hücre İçi</b>			
<i>Rhodococcus sp.</i>	Hücre İçi	Altın	-	5-15
<b>Aktinomisetler</b>	<b>Hücre Dışı</b>			
<i>Thermomonospora sp.</i>	Hücre Dışı	Altın	Küresel	8
<b>Maya</b>	<b>Hücre İçi</b>			
<i>Schizosaccharomyces cerevisiae</i>	Hücre İçi	Altın	Küresel	>100
<i>Pichia jadinii</i>	Hücre İçi	Altın	Küresel	<100
<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>NCIM 3589</i>	Hücre İçi	Altın	Küresel, altıgen, üçgen	15
<i>Candida glabrata</i>	Hücre İçi	Cds	Küresel	20
<b>Maya</b>	<b>Hücre Dışı</b>			
<i>Yeast strain MKY3</i>	Hücre Dışı	Gümüş	Altıgen	2-5

#### 2.1.3.1.4. Nanopartiküllerin Maya Aracılığı ile Sentezi

Ökaryotik mikroorganizmalar arasında, mayalardan ağırlıklı olarak yarı iletken maddelerin sentezi için faydalanılmıştır. Gümüş nanopartiküllerinin hücre dışı üretimi sadece büyümenin logaritmik fazında altıgen gümüş nanopartiküllerini (2-5nm) sentezlemiş bir gümüş toleranslı suşu olan *MKY3* mayasında bildirilmiştir [66]. (Çizelge 2.3).

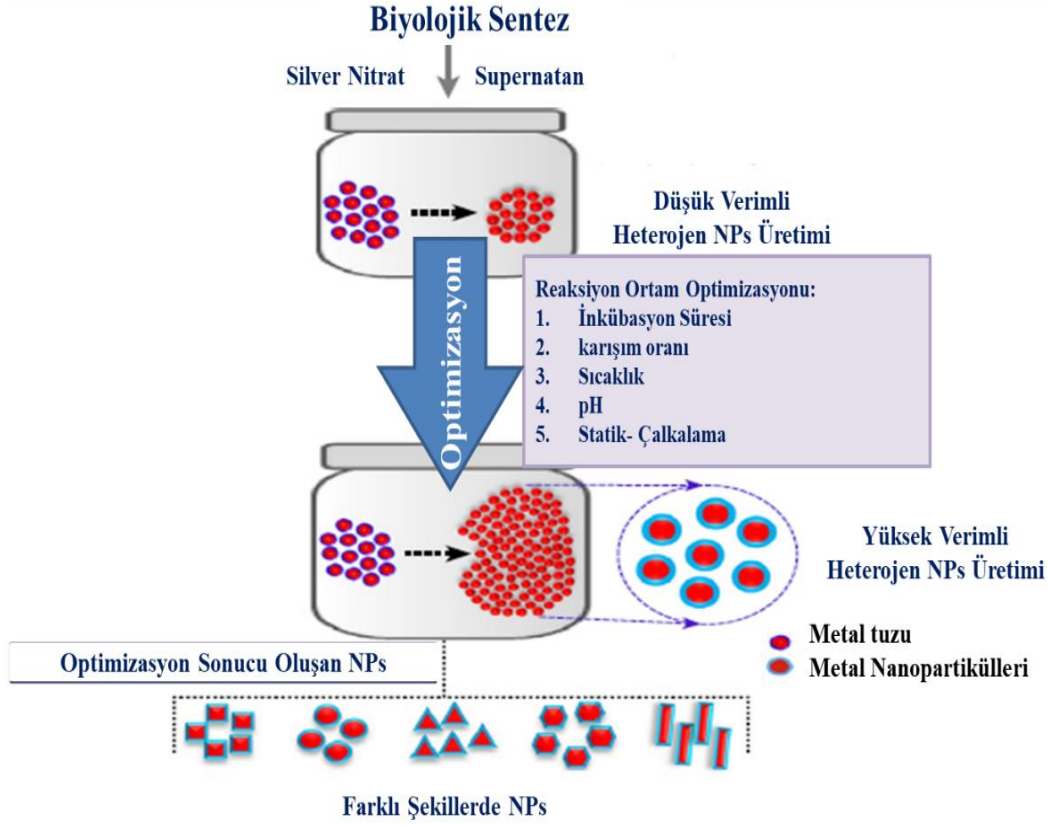
#### 2.1.4. Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi için Kritik Parametreler

Nanopartiküllerin biyolojik sentezinin birkaç avantajına rağmen, oluşan nanopartiküllerin polidispersitesi günümüz çalışmalarının sorunu olmaya devam etmektedir.

Bu nedenle, yapılan son çalışmalarda bilim adamları homojen boyut ve morfolojiye sahip nanopartikülleri üretmek için rasyonel açıdan istikrarlı bir sistem kurma girişiminde bulunmuşlardır (Çizelge 2.1 ve 2.2). Birçok çalışmada metal nanopartiküllerinin şekil ve boyutunun kontrolü, ya çevresel büyümelerini kısıtlayarak ya da fonksiyonel moleküllerini değiştirerek gerçekleştirilmiştir [53] [71]. Örneğin, *Ganoderma spp.* türü kullanılarak 20 nm tekil dağılımlı ve biyolojik açıdan uyumlu altın nanopartiküllerinin üretimi, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, tuz konsantrasyonu, havalandırma, karıştırma oranı ve ışınım dahil olmak üzere farklı reaksiyon koşulları iyileştirerek gerçekleştirilmiştir [72]. Mikroorganizmaları kullanarak nanopartiküllerin sentezi için optimum sıcaklıkta üretim tavsiye edilir, çünkü yüksek sıcaklıklarda nanopartikül sentezinden sorumlu enzimler daha aktif hale gelirler [51]. Üretimi etkileyen en önemli faktörlerden bir diğeri ise pH etkenidir ve farklı nanopartiküller farklı pH değerlerinde sentezlenebilir. Örneğin, Gurunathan ve ark. pek çok gümüş nanopartikülünün *Escherichia coli*'de pH 10'da sentezlendiğini göstermiştir [51]. Mantarlar arasında, nanopartikül sentezi için alkali pH (*Isaria fumosorosea* [73]), pH 6.0 (*Penicillium fellutanum* [51]) ve asidik pH (*Fusarium acuminatum*) optimal olduğu gösterilmiştir.

Boyut ve şekil kontrollü biyolojik sentezin başka bir örneği ise, Kora ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucu ispat edilmiştir. Bilim adamları bu çalışmada *Anogeissus latifolia* tarafından 5.7 - 0.2 nm boyutlarında, yeşil yollardan sentezleyerek elde edilen gümüş nanopartiküllerin boyut kontrolünü gerçekleştirmişlerdir [74]. (Şekil 2.5.).





Şekil 2.5. Tekil Dağılımlı, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküllerin üretme parametreleri [75].

Biyolojik yollar ile sentezlenen nanopartiküllerde birçok parametrenin (tuz konsantrasyonu, biyolojik ekstrat ve metal tuzunun karıştırma oranı, pH değeri, sıcaklık, inkübasyon süresi, ve havalandırma) benzer boyutta ve şekilde homojen nanopartiküller üretmek için optimizasyonu gerekmektedir.

### 2.1.5. Biyolojik Nanopartiküllerin Avantajı

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanopartiküllerin biyoyumlu ve düşük sitotoksiteli olmaları gerekmektedir. Biyojenik yollardan elde edilen nanopartiküller, fizikokimyasal olarak türetilmiş nanopartiküller ile kıyaslandığında zaman, fizikokimyasal sentez sırasında nanopartiküllere bağlanan yan ürünlerin toksik olmaları bu maddelerin biyomedikal uygulamalarını sınırlamaktadır [76]. Hızlı ve çevre dostu üretim metodolojileri, sentezlenen nanopartiküllerin maliyeti ve biyoyumlu yapısı dahil olmak üzere nanopartiküllerin biyolojik sentezinin birçok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajların yanı sıra, bitki ve mikroorganizma bileşenleri kendi kendilerine kaplama ve

stabilize etme ajanları olarak hareket ettiği için, bu yollardan sentezlenen nanopartiküller başka stabilize edici ajanlara ihtiyaç duymaz [51]. Dahası, biyolojik nanopartiküllerin yüzeyleri biyolojik sistemler ile etkileşim halinde olan bir korona oluştururlar. Bu korona tabakaları, çıplak biyolojik nanopartiküller üzerinde ekstra etkililik sağlayarak, nanopartiküllerin kompleks biyolojik sıvılar ile temas ettiği zaman kademeli ve seçici olarak biyomolekülleri yüzeylerinde toplarlar [77]. Böylece, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynaklardan sentezlenen nanopartiküllerin aktif bileşenlere bağlanması daha kolaydır.

Özellikle tıbbi bitkilerde, farmakolojik aktiviteye sahip birçok metabolit bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışma bu metabolitlerin sentezlenen nanopartiküllere bağlanarak daha etkili hale geldiğini ve nanopartiküllere daha fazla özellik kattığını göstermiştir [78]. Nanopartiküllerin biyolojik sentezinin bir diğer avantajı ise, fizikokimyasal sentezde nanopartiküllerin aktif hale gelebilmesi için yüzeylerine bazı fonksiyonel grupların eklenmesi gerekirken biyolojik yollarda sentezlenen nanopartiküllerde bu adımın gerekli olmamasıdır [76]. Ek olarak, nanopartiküllerin biyosentezi için gereken zaman, fizyokimyasal yaklaşımlar için gereken süreden daha kısadır. Birçok araştırmacı, çeşitli bitki kaynaklarından yararlanarak yüksek verimli ve hızlı sentezlenen metodolojiler geliştirmiştir. Örneğin, 2 dakika [79], 45 dakika [80], 1 saat [81], ve 2 saat [82] içerisinde çeşitli bitki ekstratları kullanılarak gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir. Bitki ekstratlarını kullanarak nanopartiküllerin basit ve hızlı sentezinin altını çizerek, altın nanopartiküllerinin 5 dakika [82] ve 10 dakika [81] içerisinde sentezleneceği gösterilmiştir [51].

Biyomedikal uygulamalar için fizyokimyasal nanopartiküller ile kıyaslandığı zaman biyolojik nanopartiküllerin daha yüksek etkinliğinden dolayı antikanser ve antimikrobiyal uygulamalar dahil olmak üzere birçok biyomedikal içerikte uygulandığı görülmüştür. Örneğin, Mukherjee ve ark. yaptıkları antikanser çalışmalarında, *Oxalacandens* yaprağından elde edilen biyolojik gümüş nanopartiküllerin ilaç dağıtımı, biyoyumluluk ve görüntüleme hızlandırıcı aktivite açısından kimyasal olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller ile kıyaslandığı zaman daha iyi etki gösterdiğini belirlemişlerdir [83]. Dahası, biyolojik nanopartiküller A549 (insan akciğer kanseri), B16

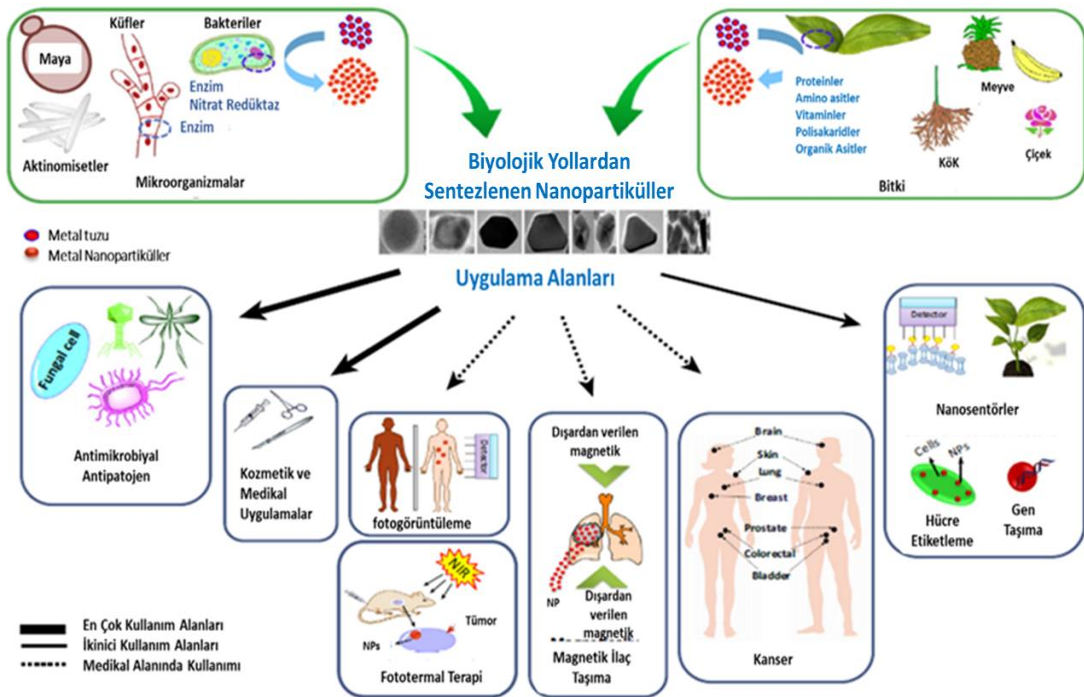
(fare melanom), ve MCF7 (insan meme kanseri) kanser hücresi hatlarında yüksek antikanser aktivite göstermiştir [83].

El-Kassas ve ark., MCF7 insan meme kanseri hücre hatları üzerinde kırmızı deniz yosunu olan *Corallina officinalis* ekstratı ile biyolojik altın nanopartiküllerin sitotoksik aktivitesini göstermiştir [84]. Wang ve ark. kanserli hücreler ile eşzamanlı olarak biyosentezlenen floresan altın nanodemetler aracılığıyla tümörlerin in vivo ortamda kendi kendini biyolojik görüntülemesini göstermiştir [örneğin, HepG2 (insan hepatokarsinoma hücre dizisi) ve K562 (lösemi hücre dizisi) [85]. Mukherjee ve ark., *Olaxscandens* yaprağı ekstratını kullanarak altın nano-konjugatların fabrikasyonu için biyosentetik bir yaklaşım göstermiş ve akciğer (A549), meme (MCF-7) ve kolon (COLO 205) kanser hücre hatlarına uygulamıştır. Bu sonuçlar, A549 kanser hücrelerinde floresan görüntülemesini ve kanser hücresi çoğalmasının önemli oranda baskılandığını göstermiştir [86]. Patra ve ark., kimyasal olarak sentezlenen nanopartiküller ile kıyaslandığı zaman HUVEC ve ECV-304 hücre hatlarında biyolojik altın ve gümüş nanopartiküllerin daha biyoyumlu olduklarını göstermiştir. Dahası, doksorubisin ile birleştirilen biyolojik nanopartiküllerin, kimyasal nanopartiküller ile birleştiğinde B16F10 hücre hattında daha yüksek antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [87]. Nanopartiküllerin antikanser mekanizması, hücresel bileşenlerde hasara neden olarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile gerçekleştirilir. Bu olay partiküllerin boyutları ve şekilleri ile ilişkilidir [88]. Ek olarak, nanopartiküller mitokondriye ve kaspaza bağlı yollar aracılığıyla apoptozis ile sonuçlanabilir.

Araştırmalar, fizyokimyasal nanopartiküller ile kıyaslandığı zaman biyolojik olarak sentezlenen nanopartiküllerin daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Mukherjee ve ark., 30 nm' lik biyolojik nanopartiküllerin %96.67 antibakteriyel aktivite gösterdiğini, ancak kimyasal olarak sentezlenen nanopartiküllerin aynı konsantrasyonda anlamlı etki göstermediğini ispat etmiştir [89]. Bir diğer çalışmada, *Desmodium gangeticum*'dan elde edilen biyolojik nanopartiküllerin, kimyasal olarak sentezlenen nikel nanopartiküllerine kıyasla, LLC PK1'de (epitelyal hücre hatları) daha tekil dağılımlı olduğunu ve daha yüksek antioksidan, antibakteriyel ve biyoyumlu aktivitelere sahip olduğunu ileri sürmüştür [51]. Rapor edilen bir diğer çalışmada ise, biyolojik sentezlenen çinko nanopartiküllerinin, kimyasal olarak sentezlenen çinko

nanopartikülleri ile kıyaslandığı zaman, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ve *B. subtilis* ATCC 6633'e karşı daha fazla antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir [51]. Hücre zarının bozulması; hücresel DNA ve proteinlerin değiştirilmesi, elektron taşınması, besin alımı, protein oksidasyonu, zar potansiyeli ya da hücre ölümüne neden olan ROS oluşumu dahil olmak üzere nanopartiküller için önerilen çeşitli etki mekanizmaları olmasına rağmen, tam ve kesin antimikrobiyal mekanizmaları belirlenememiştir.

Antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerine ek olarak, biyolojik nanopartiküllerin biyosensörlerin tasarlanmasında daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Dahası, biyolojik metal nanopartiküllerin daha yüksek etkili ve biyoyumlu yapısına dayalı olarak, biyolojik nanopartiküllerin, gereken ilaç dozajını düşüren ve yüksek ilaç miktarının yan etkilerini önleyen, belirli hücrelere karşı ilaç dağıtımını hızlandırarak tipik bir antikanser ilaç etkisini geliştirebileceği varsayılmıştır. Hatta, biyolojik nanopartiküller foto görüntüleme ve termal tedavilerde fizyokimyasal olarak sentezlenen altın ve demir nanopartiküllerinin yerini alabilir. Dahası, biyolojik nanopartiküller kozmetik ve tıbbi uygulamalarda kullanılabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Biyomedikal ve Çevresel Alanlarda Metal Nanopartiküllerinin Biyolojik Sentezi ve Uygulamaları [51].

Gümüş nanopartiküller, antimikrobiyal etkilerinden dolayı çoğunlukla tıbbi alanda kullanılır, çinko ve titanyum nanopartiküller ise kozmetik alanında kullanılır. Gümüş, çinko ve diğer metal nanopartiküller, geniş yelpazede antimikrobiyal etkilerinden dolayı gıda paketleme, yara pansumanları, ilaç salınımda kullanılır. Biyolojik nanopartiküllerin ikinci uygulama alanı, çevresel faktörler ve tarım ile ilgili çeşitli biyomoleküller için sensör geliştirilmesidir. Dahası, nanopartiküller bitkilerde ve tıpta gen taşınımı ve hücre etiketlemede kullanılır. Fotogörüntüleme, fototermal tedavi ve manyetik olarak duyarlı ilaç verimi gibi metal nanopartiküllerin bazı uygulamaları halen geliştirilme aşamasındadır.

### **2.1.6. AgNP'lerin Kullanım Alanları**

AgNP'ler, sağlık endüstrisi, gıda depolama, tekstil kaplamaları ve çok sayıda çevresel uygulamada antibakteriyel ajanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. AgNP'ler ile yapılan ürünler, ABD FDA, ABD EPA, Japonya SIAA, Kimyasal Sanayi için Kore Test ve Araştırma Enstitüsü ve FITI Test ve Araştırma Enstitüsü dâhil olmak üzere bir dizi akredite kurum tarafından onaylanmıştır [90]. Antibakteriyel ajanlar olarak, AgNP dezenfekte edici tıbbi cihazlardan ve beyaz eşyalardan su arıtımına kadar geniş yelpazede uygulamalarda kullanılmıştır. Bunların yanı sıra, tekstil sanayiinde kumaşlarda AgNP'ler kullanılmaktadır. AgNP içeren pamuk fiberler, *Escherichia coli*'ye karşı yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir [90].

Gümüş nanopartiküllerin sentezi ve biyomedikal uygulamalar:

Gümüş nanopartiküllerin biyosentezinin diğerlerine nazaran daha basittir. Ancak, partikül boyutu ve morfolojisinin kontrolü kolay bir iş değildir. Araştırmacılar sürfaktan uygulamasının gümüş nanopartiküllerinin dağılmasına izin verdiğini ve yüksek antimikrobiyal aktivite ile sonuçlandığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada, *Pseudomonas floresans* kullanılarak gümüş nanopartikülleri sentezlenmiş, ilaca dirençli mikroorganizmalara karşı yaygın antibiyotikler ile biyosentetik nanopartiküllerinin sinerjistik etkisi gözlemlenmiştir. Gerçekleşen bir diğer çalışmada ise, antikanser uygulamaları için *Escherichia coli*'de biyosentetik gümüş nanopartiküllerinin sitotoksik etkisini gözlemlenmiştir [91].

Biyosentetik gümüş nanopartiküllerinin uygulamaları, biyomedikal araştırma ile sınırlı değildir. Örneğin, bir çalışmada indirgenmiş grafen oksit-gümüş nanokompozitinin bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenebileceğini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elektrokimyasal tespiti için kullanılabilirliğini göstermiştir. Az miktarda gümüş nanopartiküllerin üretimi diğer nanopartiküllere göre kolaydır. Ancak, ölçeklendirilebilir üretim ve endüstriyel uygulamalar için sürekli süreçler gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada, sıtma, dang humması, Zika ve diğer şiddetli hastalıkların bulaşmasından sorumlu olan sivrisinek larvasını kontrol etmek için gümüş nanopartiküllerin kullanılabilirliği rapor edilmiştir. Araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucu bildirildiği üzere gümüş nanopartiküllerinin iyi bilinen antimikrobiyal özelliklerinin yanında, serbest radikal temizleyici olarak kullanılabildiğini tespit etmiştir. Aktinomiset türüne ait olan *Gordonia amicalis* karotenoid pigmentleri aracılığıyla hem gümüş hem de altın nanopartikül üretebilmektedir [91].

#### **2.1.6.1. Kanserde AgNP'lerin Potansiyel Tedavi Edici Uygulamaları**

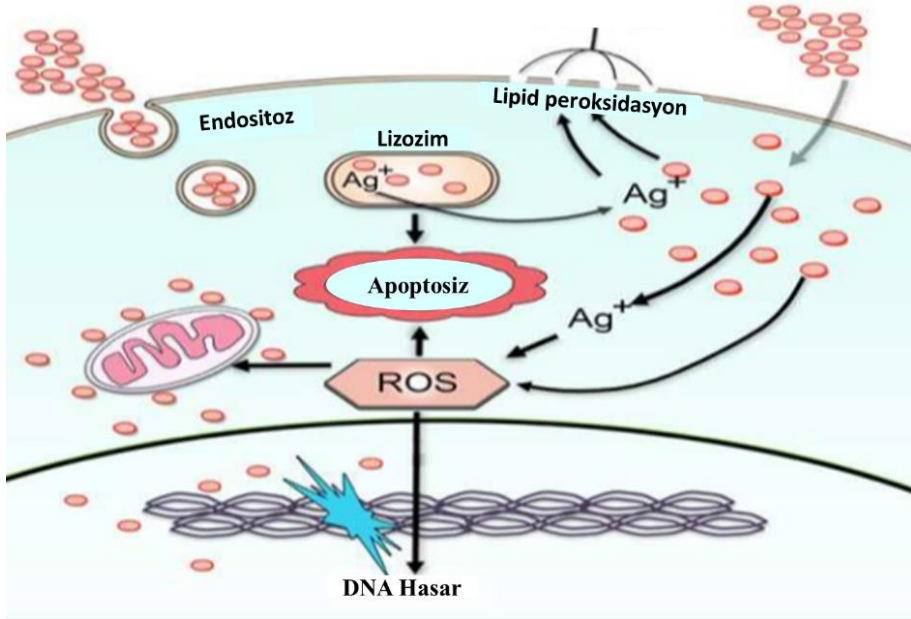
AgNP'lerin, umut vaad eden antitümör etkileri kanıtlanmıştır. Hiçbir anlamlı sitotoksikite kaydedilmemiş olmasına rağmen, AgNP'lerin düşük konsantrasyonunun DNA hasarına ve kromozal aberasyonlara (genotoksikite) neden olabileceği rapor edilmiştir [92].

Ancak, Lima ve ark. 10 mg/mL'ye kadar kaplı AgNP (çapı 6–80 nm) ile tedavi edilen farklı insan kültür hücrelerinde hiçbir genotoksikite gözlemlenmediğini göstermiştir [93]. Nanopartiküller ile ilgili birçok toksikolojik verinin üretilmesi kimi zaman kullanımları konusunda negatif bir algı yaratmaktadır. Ancak, toksisite kendi başına kanser tedavileri için faydalı olabilir. AgNP'leri kanser tedavileri içerisine katınca, pozitif sonuçlara ulaşılmıştır. Sadece hücreler ile pasif olarak etkileşime geçmezler, aynı zamanda hücre fonksiyonlarını düzenlemek için moleküler süreçlere aktif olarak aracılık ederler.

#### **2.1.6.2. Meme Kanseri Uygulama**

Yapılan çalışmalarda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde AgNP'lerin doza bağımlı sitotoksik etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir [94]. Daha yakın zamanda, Gurunathan ve ark. [95], ROS oluşturma, kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu ile AgNP'nin MDA-MB-231 hücre ölümünü tetiklediğini ortaya koymuştur. Bu grup tarafından yapılan

başka bir çalışma da tek kristalli AgNP'lerin apoptotik özellikler ile sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir [96].



Şekil 2.7. Gümüş nanopartiküllerden (AgNPs) kaynaklı sitotoksisite için olası mekanizmaların şematik gösterimi [97].

Gümüş nanopartiküllerin özellikleri:

1. AgNP ler, biyomedikal uygulamalar için kendine has tedavi edici özellikler taşır.
2. AgNPler, fotoduyarlayıcılar/radyoduyarlayıcılar, antiviral ve antikanser ajanlar gibi yeni gelişen uygulamalarda kullanılır.
3. Çeşitli kanser tedavisi, AgNP ile belgelenmiştir.
4. AgNP'lerin antikanser mekanizmaları;
  - (1) hücre zarlarının bozulmasını ve
  - (2) proteine ya da DNA'ya zarar vermek için reaktif oksijen türleri ve Ag<sup>+</sup> üretimini içerir.
5. AgNP'lerin ışığa duyarlı hale getirme mekanizması, foto enerjiyi ısıya enerjiye dönüştüren radyatif olmayan bozunuma dayalıdır.

Patojenik mikroorganizmalara karşı biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal özellikleri Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Patojenik mikroorganizmalara karşı biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal özellikleri [43].

AgNP leri Sentezleyen Mikroorganizmalar	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Cryphonectria</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Ochrobactrum anhtropi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Vibrio cholera</i>
<i>Trichoderma viride</i>	Çeşitli gram negatif ve positif bakteriler
<i>Alternaria alternata.</i>	<i>C. albicans</i> , <i>P. glomerata</i> <i>Trichoderma sp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>
<i>Lysinibacillus varians</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>

### 2.1.7. AgNP Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu, nanopartikül sentezi ve uygulamalarını anlamak ve kontrol etmek için önemlidir. Geçirimli ve taramalı elektron mikroskopu (TEM, SEM), atomik kuvvet mikroskopu (AFM), dinamik ışık saçılımı (DLS), X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), X ışını difraktometre (XRD), Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve UV-Vis spektroskopisi gibi çok çeşitli farklı teknikler kullanılarak karakterizasyon gerçekleştirilir. Bu teknikler, partikül boyutu, şekil, kristallik, gözenek boyutu ve yüzey alanı gibi farklı parametrelerin belirlenmesi için kullanılır. Örneğin; morfoloji ve partikül boyutu TEM, SEM ve AFM ile belirlenebilir. SEM ve TEM gibi geleneksel mikroskoplara göre AFM avantajı şudur, AFM üç boyutlu görüntüleri ölçer, böylece partikül boyu ve hacmi de hesaplanabilir. Dahası, partikül boyutu dağılımının belirlenmesi için dinamik ışık saçılımı kullanılır. Hatta, UV-Vis spektroskopisi plazmon rezonansı göstererek örnek oluşumunu doğrulamak için kullanılırken, kristallik belirlenmesi için ise X ışını difraksiyonu kullanılır [90].



### 2.1.8. Gümüş Nanopartiküllerin Geleceği

Gümüş nanopartiküller, diğer biyomedikal nanomateryallerden farklılık göstererek kendine has fiziksel, kimyasal, optik ve biyolojik özellik sergilemekte ve böylece, aşağıdaki birçok biyomedikal uygulamaya dahil olmaktadır; (i) antiviral ajanlar; (ii) foto-duyarlaştıran ve/veya radyo-duyarlaştıranlar ve (iii) lösemi, meme kanseri, hepatosellüler karsinomu, akciğer karsinomu ve cilt ve/veya ağız karsinomunda kanser karşıtı tedavi edici ajanlar. Ancak, tıbbi uygulamalardaki umut vaat edici potansiyellerine rağmen, insan sağlığı üzerindeki AgNP etkisinin (hem pozitif hem negatif), daha geniş kullanımından önce tamamen anlaşılması gerekir. Gümüş nanoteknolojisinin klinik ihtiyaçlarına uygun bir hale getirilmesi, AgNP'lerin basit, maliyet etkin ve çevre dostu yollar ile hazırlanmasının geliştirilmesini, klinik uygulamalarda bu nanopartiküllerin biyoparçalanabilirliği ve farmakokinetiğinin, yanında güvenlik kontrol mekanizmalarının daha net anlaşılmasını gerektirir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, sağlık ve tıp alanlarında kullanılan farklı nanopartiküllerin sentezi ve potansiyel uygulamaları için mikrobiyal yolların uygunluğu belirtilmiştir. Mikroorganizmalar, kimyasal alternatifleri ile kıyaslandığı zaman nanopartikül sentezinin güvenli, çevre dostu ve ekonomik olarak uygun bir yaklaşımını sunmasına rağmen, tekil dağılımlılık eksikliği, kontrolsüz boyut ve zaman alıcı üretim sürecinden dolayı ticari ölçekte üretimi sınırlıdır. Biyosentezlenen nanopartiküllerin toksik olmamasından dolayı, nano-tıp alanında kullanılabilirlik potansiyeli göstermişlerdir, ancak ilaç taşınması ve tanıdaki kullanımları halen gelişiminin ilk aşamasındadır.

Çalışmalar, tıp alanındaki rollerinin in vitro çalışmalar ile sınırlı olduğunu bu nedenle klinik uygulamalarda kullanılmadan önce insanlara biyo-uyumluluğunu ve sitotoksitesini ispat etmenin zorunlu olduğunu ortaya koymuştur. Dahası, daha yüksek üretim oranları ve istenen morfolojiye ulaşmak için nanopartiküllerin tam mekanizmaları üzerinde ileri araştırma gerekmektedir.

## 2.2. Biyopolimer

Biyopolimerler, biyouyumlulukları, biyoabsorplanabilirliği ve toksik olmamaları nedeniyle tıbbi alandaki uygulamalar için umut vaat eden adaylardır. Tıbbi alandaki en son popüler polimerler aljinat, kitin/kitosan, selüloz, hidrojeller, hidrokolloidler, süper emici polimerleri kapsar. Biyopolimerler genelde biyolojik olarak parçalanan ve doğal kaynaklardan üretilen toksik olmayan polimerlerdir. Biyopolimer, petrol temelli geleneksel plastiklere daha güvenli ve daha iyi bir alternatiftir. Bu polimerler, şeker, nişasta, doğal yağlar ya da esanslar gibi biyolojik başlangıç materyallerinden kimyasal olarak ya da mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi biyolojik sistemlerden üretilir. Dört ana biyopolimer tipi, nişasta, şeker, selüloz ve sentetik materyallere dayalıdır [98].

Biyopolimer uygulamalarının birçoğu ilaç taşıma sistemleri, yara kapatma, iyileştirme ürünleri ve cerrahi implant cihazları, vb. gibi tıbbi alanlardadır. Biyopolimerler, kapsülleme, kararlılık ve ilaçların ve nanopartiküllerin korunmasını iyileştiren fiziksel ve kimyasal özellikleri (yüzey yükü, vb) modüle ederek işlevselleştirme için bir strateji sağlamıştır. Nanoteknolojideki son gelişmeler ve biyopolimerlerin işlevselleştirilmesinin çeşitli süreçleri, ilaç taşıyıcı olarak fonksiyonelliğini artırmış ve geliştirmiştir [99].

### 2.2.1. Pullulan

Biyopolimerler genel olarak, yeni ve kendine has fiziki özellikleri olan bir dizi mikroorganizma tarafından üretilmiş suda çözünür haldedirler. Bu özelliklerden dolayı, bunların gıda, farmasötik ve diğer alanlarda geniş yelpazede uygulama alanları vardır. Uygulama alanlarından bazıları emülsifiye ediciler, stabilize ediciler, bağlayıcılar, jelleştirici maddeler, koagulant, yağlama maddeleri, film oluşturucu maddeler, kalınlaştırma maddeleri ve süspansiyon ajanı maddeler olarak bilinmektedir [100].

Pullulan, *Aureobasidium pullulans* suşunun fermentasyon ortamından elde edilen polimerlerden biridir [100]. İnvertzaz, amilaz, glukoz oksidaz, glukosidaz, fruktosiltransferaz gibi enzimlere ve küçük miktarlarda proteolitik enzimlere karşı aktivite gösterir [100]. Mikrobiyal hücrelerin yüzeyinde biçimsiz bir dilim halinde üretilen eksopolisakkarit olarak bilinmektedir. Pullulan uygulaması, deniz yosunu ve

diğer bitkilerden üretilen doğal polimerler ile rekabet edebilir ve ekonomik polimerik malzeme kaynağı olarak ortaya çıkar [101].

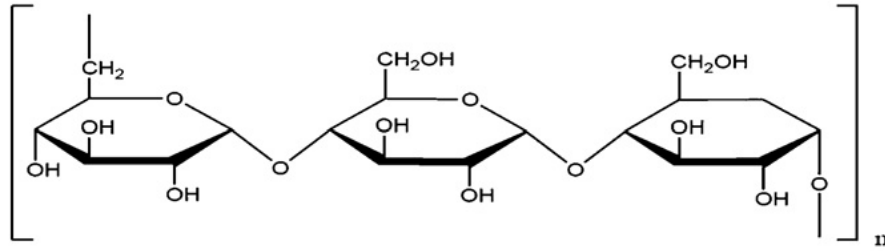
Biyopolimerler, mikrobiyal sistemler, bitkiler tarafından ya da çeşitli biyolojik yapı bloklarından kimyasal olarak sentezlenebilirler. Mikroorganizmalar, kendine has fiziki ve kimyasal özellikte üç türü sentezleyebilir, polisakkaridler, poliesterler ve proteinler [101]. Mikrobiyal olarak üretilen polisakkaridler, morfolojik lokalizasyonlarına dayalı olarak hücre içi, yapısal ya da hücre dışı olabilir [102]. Mikrobiyal olarak üretilen biyopolimerlerin bazıları; bakteriyel selüloz, levan, pullunan, kefiran, ksantan, gellan, haloferaks eksopolisakkaridler, polidroksalkanoatlar vb. [103].

Mikrobiyal yollardan pullulan üretmek için çeşitli karbon kaynakları kullanılmıştır, örneğin; palmiye şekeri, yağı alınmış jatrofasid keki ve mısır likörü, Asya pal çekirdeği [104], jack meyvesi çekirdeği [105], glukoz, sukroz, maltoz, laktoz [106], vb.. Yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak sukroz kullanılarak *A. pullulans*'dan pullulan fermentasyon üretimi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [101].

Pullulan,  $\alpha$ -(1 → 6) glikosidik bağlar ile bağlanan mal-totrioz tekrarlayıcı birimleri ile doğrusal ve dallara ayrılmamış bir polimerdir. Pullulan karakteristik dimerik segmentleri;  $[\rightarrow x)- \alpha -d\text{-glukopiyranosil-(1} \rightarrow 4)- \alpha -d\text{-glukopiyranosil-(1} \rightarrow ]$  ve  $[\rightarrow 4)- \alpha -d\text{-glukopiyranosil-(1} \rightarrow 6)- \alpha -d\text{-glukopiyranosil-(1} \rightarrow ]$ ; burada (1 → 4) bağlantılı segmenti için x ya 4 ya da 6 olabilir. Pullulan yapısında  $\alpha$  -(1 → 6) ve  $\alpha$  -(1 → 4) glikosidik bağlantılarının birlikte varolması, sıklıkla amiloz ve dekstran yapısı arasındaki aracı olarak görülür. Pullulan,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  moleküler formülüne ve kültür parametrelerinden büyük ölçüde etkilenen  $4.5 \times 10^4$  to  $6 \times 10^5$  Da moleküler ağırlık aralığına sahiptir. Suda (hem sıcak hem soğuk) ve seyreltik alkalide kolayca çözünen beyaz higroskopik bir tozdur. Dimetilsulfoksit ve formamid haricinde, alkol ve diğer organik çözücüler içerisinde çözünmez. Pullulan zincirinin yapısındaki esneklik, herhangi bir çözücünün etkisine karşı pullulan hidrodinamik özelliklerinden sorumludur. Pullulanın erime sıcaklığı  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ dir,  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde karbonlaşarak çözünmeye başlar. Toksik değildir, mutajenik değildir, yenilebilir, kokusuzdur ve tadı yoktur. Ana zincirde hidroksil grupların yüksek konsantrasyonundan dolayı içsel fizyolojik aktiviteye sahiptir. Bu kendine has kimyasal ve fiziksel özelliklerden dolayı, pullulan ve türevleri çok sayıda gıda, farmasötik ve biyomedikal uygulamada hayati bir role sahiptir [101]. Pullulanın

biyomedikal uygulamaları; ilaç taşınımı, gen taşınımı [103], doku mühendisliği, aşılama [107], kapsül kaplama, vb. dir. Vejeteryanlar, diyabetikler ve sınırlı diyetleri olan kimselerin kültürel ve besinsel gereklilikleri için uygun kapsüller hazırlamak için kullanılabilirler [103]. Biyomedikal uygulamalarının dışında, pullunan birkaç gıda uygulamasına da sahiptir. GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilme) statüsüne sahiptir ve düşük kalorili besinlerin üretimi için kullanılabilir [101]. Prebiyotik, katı gıdaların yanında sıvılarda nişasta replasmanı, içecekler ve soslarda düşük vizkozite doldurucu, kurabiyelere fıstıkları yapıştırmak için yapıştırıcı malzeme, vb. olarak işlev gösterebilir [101]. Pullulan filmleri berrak, fazlasıyla oksijen geçirmezdir ve aynı zamanda üstün mekanik özelliklere sahiptir [103]. Bu filmler, gıdada nem içeriğini korumak ve mikrobiyal floranın nefes almasını baskılayarak mikrobiyal artışın azaltılmasına yardımcı olmak için kullanılabilir. Pullulan içeren film basedoral bakım ürünü, pullulanaz kullanılarak mal-totrio şurubu hazırlanması için kullanılmıştır [101].

Pullulan'daki  $\alpha$ -(1→6) bağlantılarını hidrolize eden ve maltotrioza dönüştüren enzim pullulanazı keşfetmiştir. Böylece, pullunan, maltotrioz alt birimlerinin  $\alpha$ -(1→6) bağlantılı polimeri olarak görülür. (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Pullulan biyopolimerinin kimyasal yapısı [101].

Pullulan, bir gıda malzemesi ve farmasötik hacim artırıcı olarak Japonya'da güvenli bir kullanım geçmişine sahiptir.

ABD'de genel olarak geniş yelpazede uygulamalar için güvenli (GRAS) statüsünde kabul edilmiştir. İnsan gönüllü çalışmaları, daha yüksek dozlarda hafif gastrointestinal semptomlar ile günde 10g pullulan dozunda sadece karın şişkinliği bildirmiştir. Pullulan, farmasötik tabletlerde yardımcı madde olarak kullanılmak üzere kabul edilir ve ilaçlar için Japonya İçindekiler Standartlarında listelenir [101].

Pullulan ticari üretimi, Okayama, Japonya'da bulunan Hayashibara Şirketi tarafından 1976 yılında başlamıştır. Pullulan üretimi, 1883 yılında kaydedilen nişasta şurubu

üretimini doğal bir sonucudur. Pullulan filmleri, 1982 yılında Hayashibara tarafından ticarileştirilmiştir [101].

### **2.2.2. Pullulan Üreten Suşlar**

Birçok mikroorganizma, *Aureobasidium spp.*, *Tremella mesenterica*, *Cytaria spp.*, *Cryphonectria parasitica*, *Teloschistes flavicans*, ve *Rhodotorula bacarum* dahil olmak üzere pullulan üreten mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler. Bu mikroorganizmalar, büyük/ticari ölçekte pullulan üretimi için kullanılmaktadır. Ancak, yüksek miktarda pullulan üretiminden dolayı *A. pullulans* suşu ticari açıdan en çok kullanılmaktadır [101].

*A. pullulans* yüksek üretim oranı ve pullulan tarafından üretilen üstün materyal özelliklerinden dolayı yaygın şekilde tercih edilmektedir. Çizelge 2.5’de pullulan üreten sışlar, üretim miktarları ve saflıkları gösterilmiştir.

Çizelge 2.5 Pullulan biyopolimeri üreten suşlar [101].

<i>A. pullulans</i> suşu	Üretilen pullulan	Safılık Oranı
P56	16,7 g/L	-
ATCC 62921 ATCC 42023	22,6 g/L	-
P56	21,1 g/L	64-84%
NRM2	25,1 g/L	97%
FB-1	23,1 g/L	-
Y68	52,5 g/L	-
MTCC 2195	80,0 g/L	-
ATCC 9348	7.02 g/L	-
AP 329	29.4 g/L	95.2%
ATCC 9348	18.0 g/L	90.0%
FB-1	45,0 g/L	94.3%
FB-1	44,2 g/L	-
CGMCC 1234	27.4 g/L	94.0%
ATCC 201253	25.8 g/L	94.5%
ATCC 201253	60,7 g/L	95.2%
ATCC 201253	1.33 g/L/saat	93.0%
ATCC 42023	21.9 mg/g hücre/saat	59.0%

### 2.2.2.1. *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans*, orman toprağı, tatlı ve deniz suyu, bitki ve hayvan dokuları, vb. dahil olmak üzere tüm ekolojik sistemlerde yaygın şekilde bulunur. Genel olarak, *A. pullulans* patojenik olmayan mikroorganizma sınıfında sınıflandırılmıştır; ancak, bazı suşlar insanda sağlık sorunlarına neden olabilir ve bitkilere patojeniktir. *A. pullulans* suşlarından bazıları, derin deniz ve kıyı su bölgelerinde mevcuttur [101]. Siyah melanin pigmentinin üretiminden dolayı "siyah maya" adı verilmiştir. Üretilen melanin,

mikroorganizmaya fagositoza karşı direnç sağlar. Pullulan biyopolimerinin büyük ölçekli üretimi geliştirilmiş olmasına rağmen, pullulan üretimi ile ilgili asıl sorun, eş zamanlı olarak mikroroganizma tarafından sentezlenen melanin pigmentinden kaynaklanan renk oluşumudur. Neyse ki, vizkosite ve moleküler ağırlık dağılımı gibi fiziksel özelliklerinde önemli değişiklikler olmaksızın pullulan üretme kabiliyetlerini kaybetmeyen birkaç suş yakın zamanda belirlenmiştir [101].

### 2.2.3. Pullulanın Kullanım Alanları

Pullulan, gıda imalatından farmasötik uygulamalara kadar çeşitli alanlarda uygulanmış, hatta monosakkarid kaynağı olarak da kullanılmıştır. İlk ticari olarak üretilen pullulan 1959 yılında Okayama, Japonya'da Hayashibara Şirketi tarafından satılmıştır [108]. Pullulan değişiklikleri ve uygulamaları ile ilgili yakın zamanlı literatür Çizelge 2.6'da özetlenmiş ve aşağıdaki gibi ele alınmıştır.

Çizelge 2.6. Pullulan ve pullulan içerikli maddelerin uygulama alanları [108].

Pullulan ve pullulan içerikli maddeler	Potansiyel uygulamaları
Pullulan	İlaç/gen taşıma ve görüntüleme
Carboxymethyl pullulan jel	Yara örtüsü antibakteriyel özellikli
Antibakteriyel film	Gıda paketlenme

Pullulan, yüksek moleküler ağırlık ve film oluşturucu özelliğinden dolayı gıda ve farmasötik uygulamalarda kapsamlı şekilde kullanılmıştır. Pullulan, güçlü ajitasyon koşulları altında *E. coli* ve *Bacillus subtilis* korumak için immobilizasyon taşıyıcısı olarak kullanılabilir. Pullulan'ın fiyatı, ksantan ve dekstran gibi diğer polisakkaridlerden üç kat daha yüksektir [108].

### 2.2.4. Pullulan Karakterizasyonu

#### 2.2.4.1 Yapısal karakterizasyon

Belli bir dalga boyunda örnekte spesifik fonksiyonel gruplar/bağlantılar tarafından kızılötesi (IR) enerjinin emilmesine dayalı olarak, bileşen yapısı tahmin edilebilir. Fonksiyonel gruplar, germe ve biyopolimerlerin kimyasal bağlanması, FTIR

spektroskopisi ile kolayca belirlenebilir. Fermentasyondan pullulan NMR spektral analizi, birkaç araştırmacı tarafından bildirilmiştir [108]. Proton NMR spektrumunda, örnekte bulunan protonlar 4.5 ve 5.6 ppm arasında sinyaller sergiler. <sup>13</sup>C-NMR'de, örnekte bulunan 6-deoksi şekeri 16.8 ppm'de pik rezonansı ile gösterilir. Arındırılmış örnekteki piranoz yapısı, 82 ile 88 ppm aralığındaki sinyallerin yokluğu ile belirlenir. Anomerik karbon varlığı  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), 100.1 ppm'de pik değer ile gösterilir [108].

#### **2.2.4.2 Moleküler ağırlığı**

Pullulan'ın moleküler ağırlığı, aşağıdaki faktörlerden oldukça etkilenir: (1) kullanılan suş türleri; (2) başlangıç ortam pH değeri; (3) kullanılan substratın yapısı ve oluşumu; (4) ortam oluşumu; (5) hasat zamanı. Pullulan ortalama moleküler ağırlığı (Ma) 362 - 480 kDa arasındadır. Genel olarak, glukoz gibi sentetik ortamdan elde edilen ile kıyaslandığı zaman tarım atıklarından daha yüksek moleküler ağırlıklı pullulan elde edilir [108].

#### **2.2.4.3 Termal ve Mekanik Özellikler**

Termal kararlılık, polisakkaridlerin başka bir önemli özelliğidir. Polisakkarid örneğinin termo gravimetrik özelliği genellikle TGA-DSC ile analiz edilir. Araştırmacılar, pullulan parçalanma noktasının 250 ile 280°C arasında olduğunu gözlemlemiştir. Asya palm çekirdeği ve *cassava* küspesinden üretilen mikrobiyal pullulanın parçalanma noktasının sırasıyla 245°C ve 296.72°C'de olduğu ortaya konmuştur [108]. Kimyasal kompozisyon, bileşen yapısı, moleküler ağırlık, parçalanma sıcaklığını ve cam geçiş sıcaklığını etkiler.

Gıda ve farmasötik endüstrilerde kullanılan pullulan filminin başka bir önemli gereksinimi mekanik dayanmadır. Yapılan çalışmalar pullulan filminin çekme dayanımını %65 nem olarak bildirmiştir (35 MPa). Biyopolimerin moleküler ağırlığı, çekme dayanımı ve çekme katsayısı gibi mekanik özellikleri etkiler [108]. Bir diğer çalışmada ise araştırmacılar, doğal pullulanın çekme dayanımını bildirmiştir (30 MPa) ve çekme dayanımı, nanoselülozik maddelerin eklenmesi ile geliştirilmiştir. Ancak, doğal pullulana göre, asetillenmiş pullulanın (pullulan asetat) yüksek uzama ile daha düşük çekme dayanımına sahip olduğu görölmüştür [108].



### 2.2.5. Pullulanın Geleceği

Pullulan verimi yıllardır önemli oranda sabit olmasına rağmen, genetik mühendisliği yöntemleri pullulan üretimini daha da artırmaktadır ve pullulan için artan talebi karşılamak amacıyla derhal pullulan sentezinin açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Mikrobiyal eksopolisakkaridlerin bir üyesi olan pullulan, biyoaktif özelliğinden dolayı uygulamalar için yüksek potansiyele sahiptir. Pullulan üretiminin başlıca sınırlaması, melaninin ortadan kaldırılmasıdır. Bu sorun 1990'ların başında çözüldüğü için, pullulanın üretim maliyeti daha da düşürülebilir ve bu nedenle dekstran, ksantan ve diğer mikrobiyal yollarla üretilen polisakkaridler gibi benzer ürünler için daha rekabetçi bir hale gelebilir.

Geçtiğimiz yirmi yılda, ağırlıklı olarak gıda piyasasında pullulan kullanılmıştır. İleri modifikasyon teknolojileri ile, farklı özellikler taşıyan pullulan üretimi gerçekleştirilebilir. Sonuç olarak, farmasötik, medikal ve çevresel iyileştirme alanlarında pullulan uygulamaları ile ilgili çok sayıda çalışma rapor edilmiştir.

Pullulan için yeni gelişen bir alan kanser tedavisi olabilir. Modifiye edilmiş pullulan, bazı sitotoksik moleküller ile yüksek biyoaktivite sergiler ve onlarla konjugatlar oluşturur. Bu konjugatlar, hedef dokuda birikebilir ve bu sitotoksik molekülleri yavaş yavaş salabilir. Umut vaad eden başka bir alan ise biyoyileştirme olabilir çünkü pullulan toprak ve su ortamında ağır metale yönelik güçlü soğurma özelliği gösterir. Doğal pullulan ve türevleri, kendilerine özgü yapısal özelliklerden dolayı çok sayıda biyomedikal ve farmasötik uygulamalara sahiptir. Modifiye edilmiş pullulan türevleri, sadece in vitro çalışmalarda incelenmiştir. Günümüzde araştırmacıların odak noktası, pullulan ve türevlerinin in vivo etkililiği hakkında bilgi edinmeleridir. Kanser hücrelerinin tedavisi için bu nanopartiküllerin in vivo incelemesi henüz yapılmamıştır. Pullulan hidrojelleri, kirlenmeyen yüzey özelliklerine sahiptir ve kemik dokusu mühendislik uygulamalarında çok az araştırma mevcuttur [101]. İleride, kemik defektinde kemik dokularının gelişmesini desteklemede rollerini araştırmak üzere klinik denemeler yapılabilir. Proteine bağımlı iyileştirme etkisini artırmak için bir araç olarak kolesterol taşıyan pullulan hidrojelleri incelenebilir. Bu bulgular, yeni araştırmaların pullulan özelliklerini

geliştirebileceğini böylece de pullulan uygulamaları için biyomedikal alanda yeni kapılar açtığını göstermektedir.

Pullulan biyopolimerinin özellikleri:

(i) Mikrobiyal pullulan, biyoçözünebilir, biyouyumlu olması, mutajenik, toksik ve higroskopik olmaması nedeniyle ticari pullulan ile rekabet edebilir. Pullulan, yüksek ayrışma noktası, yüksek moleküler ağırlık ve ince filmler oluşturabilme özelliğine sahiptir.

(ii) Termal kararlılık ve moleküler ağırlık gibi özel özelliklerinden dolayı gıda, medikal, farmasötik ve doku mühendisliği alanında geniş çaplı uygulamalarına rağmen, pullulanın maliyeti halen yüksektir ve büyük ölçekli pullulan kullanımı yüksek maliyetinden dolayı engellenmektedir. Düşük maliyetli yem stokundan mikrobiyal pullulan üretmek için birkaç girişimde bulunulmuştur.

(iii) Pullulan türevi nanopartiküller ya da jeller, gıda ve ilaç endüstrilerinde gen transferi ve ilaç taşıma materyalinde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

### **2.3. Farklı Biyopolimerler ile Bağlanan Gümüş Nanopartiküller**

Yeni gelişen bir disiplin olan nanoteknoloji, nanometre boyut aralığında yapıların oluşumunu, yönetimini ve uygulanmasını kapsar. Nanotüpler, nanokabuklar ve nanopartiküller gibi çeşitli nanomateryaller, nanotıbbın bir parçası olarak kullanılır. Nanoteknoloji, hastalıkların moleküler tedavisi ve hızlı tespit edilmeleri için yeni araçlar sağlamaktadır. Materyalleri nanometrik boyuta ulaştırır ve ilacı yönlendirmek için nanoboyutlu ilaç dağıtım sistemlerinin (nanosistemler) yenilikçi tasarımında yöntem önerir [109].

Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) kılavuzlarına göre, nanopartikül boyutu 1 mikrondan daha küçük son ürün ile sonuçlanan ilaç oluşumunda kullanılan bir malzemedir [110]. Bu zamana kadar elde edilen bilimsel verilere göre, nanopartiküllerin etkili ilaç dağıtım sistemleri dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda inanılmaz bir potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır [111]. Çizelge 2.7’de, Gümüş nanopartikülleri önemli biyomedikal uygulamalarını özetlemektedir.

Çizelge 2.7. Gümüş nanopartiküllerin biyomedikal alanındaki uygulamaları [109].

AgNP'ler	Biyomedikal Uygulamaları
PVP-AgNP	Anti lösemi
AgNP	Meme kanseri
TAT-AgNP	Deri kanseri
AgNP	Meme ve akciğer kanseri
AgNP	Antibakteriyel ajan (çeşitli bakterilere karşı)
BSA ve PVP - AgNP	Antibakteriyel ajan (MDR M. tuberculosis)
AgNP	Antiviral aktivite (HIV-1)
PVP-AgNP	Antiviral aktivite (H1N1)
Kitosan/ AgNP	Yanık ortusu uygulamaları
Kollajen/ AgNP	Gen taşıma

Yakın zamanda, AIDS, kanser, tüberküloz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi en ölümcül hastalıklara karşı savaşmak için birçok ilaç ve tedavi sunulmuştur. Ancak, bu ilaçların ve tedavilerin önemli dezavantajı, hedefe özgü olmamaları ve bu nedenle çok sayıda hastada yan etkilere sebep olabileceğidir [109]. Birçok çalışma, nanoteknolojinin, biyopolimerler ile bağlanan küçük nanomateryalleri kullanarak faydalı ilaçlar sunabileceğini kanıtlamıştır [112] [113].

Athar ve Das [114], kan-beyin engeli aracılığıyla taşıma dahil olmak üzere, hücre ve hücre içi hedeflere ilaç taşınımı yapmak için nanopartiküllerin özellikle de metal nanopartiküllerin biyolojik yollar kullandığını bildirmiştir. Daha küçük boyutlarından dolayı nanopartiküller konakçı hücrelere kolayca girer ve vücut içerisinde dolaşıma karışırlar. Hedef bölgeye kemoterapik ajanlar (ilaçlar) ya da terapötik genleri taşımak için uygundur. Biyomedikal alanda asal metal nanopartiküllerinin en önemli özelliklerinden biri, yüzey kararlılıklarıdır. Nanopartiküllerin bu özelliği, çeşitli biyolojik ve organik moleküller ve polimerler ile yüzey modifikasyonlarına izin verir [109]. Çeşitli polimerler ile bağlanmış nanopartiküller, gümüş (Ag), altın (Au) ve platin (Pt) gibi metal nanopartiküllerdir [109].

Eski çağlardan bu yana, bakır, altın ve gümüş gibi ağır metaller enfekte hastalıkların kontrolü ve tedavisi için kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. Bunlardan, Ag iyi bilinen antimikrobiyal özelliklerinden dolayı yaygın şekilde kullanılmış en başta gelen metaldir ve böylece, bir antimikrobiyal ajan olarak, tıbbi uygulamalarda her zaman tercih edilir. Ag, halk sağlığında başta gelen konulardan biri olan antibiyotik dirençli organizmalara karşı potansiyel aktivite gösterir [109]. Son günlerde, metalik Ag'nin yerini Ag nanopartikülleri almıştır (AgNPs). Dahası, AgNP üzerinde son birkaç yılda yapılmış birkaç çalışma, çeşitli enfekte hastalıklarla savaşılabilen ve yeni bir nanotıp uygulaması olarak kullanılabilen önemli bir antimikrobiyal ajan olarak potansiyelini kanıtlamıştır [115]. Aslında, Ag dahil olmak üzere diğer metal nanopartikülünün aktivitesi temel olarak koloidal kararlılığına bağlıdır. Çeşitli organik moleküllerin, poli (laktik-koglikolik) asit (PLGA/PLA), poli (laktid-koglikolid-kokaprolakton), kitosan, dekstran, siklodekstrinler, jelatin [109] gibi organik olmayan materyal ya da polimerlerin ve diğer biyopolimerlerin Ag nanopartiküllerinin bağlanması için kullanılabilmesi ispatlanmıştır.

Farklı polimerleri kullanarak nanopartiküllerin daha önceden bahsedilen modifikasyonu, kataliz, optik, elektronik, antimikrobiyal aktivite ve ilaç taşınımı gibi kullanımlarını kolaylaştırır. Bunların yanı sıra ilaç taşıma sistemi, çözünürlüğü artırmak, in vivo kararlılığı geliştirmek, biyodağıtımı optimize etmek gibi çok sayıda rol oynamaktadır [109].

Son yıllarda, AgNP'lerin organik molekülleri bağlama kabiliyeti ve düşük toksisiteleri ilgi uyandırmıştır. AgNP'lerin hedef hücreler ya da belli dokular içerisinde ilaç ve aşı taşıyıcısı olarak önemli bir rol oynadığı geniş çalışmalar ile rapor edilmiştir [109].

Dahası, farmasötik bileşenlerin taşınmasını ve kontrollü salınımı kontrol etmek için yenilikçi yollarla AgNP'lerin kendine has kimyasal, fiziksel ve foto-fiziksel özelliklerinden faydalanılabilir [109]. Benzer şekilde, polimerler ile bağlanarak kararlı hale getirilen AgNP'ler yanık kapama, deri donörü ve alıcı bölgeler, su arıtma sistemleri ve tıbbi cihazlar gibi çok çeşitli sağlık ürünlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir [109]. Araştırmacılar, sonrasında antimikrobiyal olarak farklı tıbbi uygulamalarda ve ilaç dağıtımında kullanılan AgNP bağlanması için birkaç polimerden başarılı şekilde faydalanmıştır.

AgNP'lerin biyo-konjugasyonu üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla anti-mikrobiyallere yönlendirilmiştir. Golubeva ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada prolin açısından zengin C-Bac3.4 peptit ile bağlanmış AgNP'ler elde etmişlerdir. Bu biyokonjugatların biyoaktivitesini çıplak nanopartiküller ve peptit gibi bileşenlerinin aktivitesi ile kıyaslamışlardır. Sonuç olarak, peptit-konjuge nanopartiküller hem standart hem de *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* gibi çoklu ilaca karşı dirençli bakterilere karşı etkili antimikrobiyal aktivite göstermiştir [116]. Sripriya ve ark. (2013), tedavi edici ilaçlar yüklemek ve taşımak için çok fonksiyonlu polielektrolit ince filmlerinin fabrikasyonu için basit bir yöntem geliştirmiştir. Poli (allilamin hidroklorür) (PAH) ve dekstran sülfat (DS) ile film oluşturulmuş daha sonra, *Hybanthus enneaspermus* yaprak ekstratından sentezlenen biyojenik AgNP'ler başarılı bir şekilde film içerisine yerleştirilmiştir. Böylece, antibakteriyel ilacın etkili taşınım ve salımı gösterilmiştir [117].

Bir diğer çalışmada ise poli (glisidil metakrilat) ile dekore edilen AgNP'ler hazırlanmış ve antibakteriyel aktiviteleri için değerlendirilmişlerdir. Deneyler, AgNP kaplı polimer kürelerinin oluşum mekanizmasını açıklığa kavuşturmuş ve *E.coli*'ye karşı boyut ve konsantrasyona bağlı aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [118]. Başka bir çalışmada, kontrollü ilaç salımı için AgNP gömülü nanokapsüller, polielektrolitlerin tabaka tabaka düzeneğinden geliştirilmiştir [119]. Nanokapsüller poli (allilamin hidroklorür) (PAG) ve desktran sülfat (DS) düzeneği ile yapılmıştır. Nanokapsüller, modern tıp, malzeme bilimi ve biyokimya alanlarında ileri gelişme gösteren etkin ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılabilir. Kitin, biyouyumlu, toksik olmayan, düşük immünojenik ve biyoçözünebilir olan doğada bulunan biyopolimerdir [120]. Madhumathi ve ark.(2010), yara iyileştirme uygulamaları için kitin/nanogümüş iskelesi geliştirmiştir. Kitin/nanogümüş iskelesi kan pıhtılaştırma özelliğinin yanı sıra, *S. aureus* ve *E. Coli* türlerine karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir [121].

AgNP'ler virüs enfeksiyonuna karşı kullanılabilir [122]. Çeşitli çalışmalar, farklı biyopolimerler ile bağlanmış AgNP'lerin antiviral etkinliğini kanıtlamıştır.

Baram-Pinto ve ark. (2010) ayrıca merkaptoetan sülfonat (MES) ile bağlanmış AgNP tasarlamış ve bunları Herpes Simplex Virüsü tip 1'e karşı (HSV-1) test etmiştir. Bu AgNP'lerin konakçı hücrelere bağlanmayı önleyerek HSV-1 enfeksiyonlarını baskılamak

ve nihayetinde hücrelere virüs girişini engellemek için güçlü bir özelliği olduğunu ortaya koymuşlardır [123]. Başka bir çalışmada, maymun Çiçek Virüsüne karşı (MPV) çıplak ve polisakkarid kaplı AgNP'lerin boyutunu ve doza bağımlı aktivitesini değerlendirmiştir. Araştırmacılar, 25, 55 and 80 nm boyutunda çıplak AgNP ve 10, 25 ve 80 nm boyutunda polisakkarid kaplı AgNP'leri kullanmıştır. 25nm boyutunda polisakkarid kaplı AgNP'ler ve çıplak 55nm boyutlu AgNP'ler MPV plak oluşumu üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Dahası, AgNP'lerin virüs konakçı hücre tutunmalarını engelleyerek virüs girişinin erken adımlarını önleyebileceğini ya da hücre içi virüs replikasyonunu bozabileceği sonucuna varmışlardır [124].

### 2.3.1. Nanopartiküllerin Toksisitesi

Son yıllarda, nanopartiküllerin insanlar ve çevre üzerinde etkisi ile ilgili kaygı hakimdir. Çevreye nanopartikül salımından dolayı kaygı duyulmaktadır [109]. Başlıca kaygı, genel olarak metalik nanopartiküller ve AgNP'ler ile ilgilidir çünkü bunlar çoğunlukla güçlü antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır [109]. Antibakteriyel aktiviteleri ve toksisite modları halen tamamen anlaşılmamıştır ve tartışılmaktadır [125].

AgNP'lerin hem çıplak hem de kaplı halde kullanıldıkları bilinmektedir. Bu nedenle, toksisiteleri üzerinde veriye ihtiyaç vardır. Ahn ve ark. (2014) tarafından yürütülen yakın zamanlı bir çalışma, nematod *C.elegans* üzerinde 8 ve 38 nm boyutlu çıplak ve PVP kaplı AgNP toksisitesini karşılaştırmıştır [126]. Çalışma, gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) ve AgNP'lerin benzer toksisitelere sahip olduğunu ancak PVP ile kaplamanın AgNP toksisitesini düşürdüğünü iddia etmiştir. Ancak,  $AgNO_3$ , çıplak AgNP'lerin ve PVP-AgNP'lerin (8 nm) oksidatif DNA hasarını indüklemiştir. Öte yandan, ne çekirdekte ne de mitokondride polimeraz-baskılayıcı DNA lezyonu oluşturduğu ortaya konmamıştır. Sucul organizmalara NP etkisini belirten birçok rapor vardır. Bu NP'ler sindirim sisteminde birikebilir ve büyümelerini etkileyebilir.

Ivask ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada bakteri (*E. coli*), maya (*Saccharomyces cerevisiae*), yosun (*Pseudokirfchneriella subcapitata*), ve fare Balb/3T3 fibroblastlarına 5 farklı boyutta (10, 20, 40, 60 ve 80 nm) sitrat kaplı AgNP'lerin toksisitesini analiz etmiştir. Çalışma, AgNP toksisitesinin kati surette çözünmeye bağımlı olduğunu

bildirmiştir. 10nm AgNP'leri, çözünürlüklerinden dolayı oldukça zehirli bulunmuşlardır [127].

Tüm bu verilerden, nanopartikül toksisitesi hakkında bilimsel verilerin diğerlerine nazaran çok az olduğu görülmektedir. Nanopartiküllerin çevresel ve insan üzerindeki etkisi derinlemesine anlaşılmamıştır. Nanopartikül toksisitesi mekanizmasında daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin zararlı etkisini ele alan derinlemesine çalışmaların devamı gerekmektedir.

### **2.3.2. Gelecekte Nanopartiküller**

Büyüleyici özelliklerinden dolayı çok sayıda nanopartikül geniş çaplı incelenmiştir. Metal nanopartiküller birçok özellikleri ve potansiyellerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi çekmiştir. Bunları çeşitli biyopolimer türleri ile bağlanma performansları artırılabilir. Bu zamana kadar, daha öncede bahsedildiği gibi, sayısız biyopolimer ile kaplanmış metal nanopartikülleri sentezlemek için birçok girişimde bulunulmuştur. Ancak, bu konu nanoteknoloji alanında halen tam olarak açıklanmamıştır. Nanopartiküllerin tanımlanması, yüzey modifikasyonu, üretimi için yeni yolların belirlenmesi gibi daha fazla çalışma gerekmektedir. Bu alan halen gelişimin ilk evrelerindedir ve gelecek vadetmektedir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi

Mikroorganizma çeşitliliği, her mikroorganizmanın büyüme ve üremesi için farklı koşullara ihtiyaç duymasına yol açmaktadır. Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmalar Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Bu çalışmada, AgNP'lerin sentezlenmesi için farklı mikroorganizmalar ile çalışma yapılmıştır. Bu mikroorganizmalar, uygun içerikli besiyerinde 4°C'de saklanarak her 2 haftada bir taze besi ortama ekim yapıp kültür yenilenmiştir.

Bu proses süresince ortam sterilizasyonunu takiben, uygun ışık, sıcaklık, nutrient, pH gibi kontrollü koşullar oluşturulmuştur. Kullanılan her bir mikroorganizma için 250 ml'lik erlenlerde optimum pH ve sıcaklıkta büyüme kinetiği çıkarılmıştır. Bunun için, spektrofotometrik absorbans ölçümü, hücre sayımı, kuru ağırlık gibi verilerin zamana karşı grafiği çıkarılmıştır.

Küfler için hücre sayımı amacıyla Thoma veya Neubauer sayım lamı kullanılmıştır. Kuru hücre ağırlığı ölçümü için ise filtrasyon (cam fiber filtre düzeneği) ve kurutma (105°C, 2 saat) işlemleri sırayla uygulanarak küflerin hücre konsantrasyonundaki (litredeki gram hücre konsantrasyonu, g/l artış takip edilmiştir.

Bu çalışmada, AgNP'lerin sentezlenmesi için 16 farklı mikroorganizma arasından 3 farklı *Candida* türü ile çalışma yapılmıştır. Mikroorganizmalar, SDA (Sabouraud Dextrose Agar) üzerinde 4°C'de saklanarak her 2 haftada bir taze besi ortama ekim yapıp kültür yenilenmiştir.



Çizelge 3.1. Gümüş Nanopartikül Sentez Aşamasında Kullanılan Mikroorganizmalar.

Mikroorganizma	Mikroorganizma türü	Besiyeri	Büyüme ortamı koşulları
<b>Bakteri</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>Proteus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i> <i>B. subtilis</i>	Nutrient Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 37±2°C
<b>Maya</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia Pastoris</i> <i>Yarrowia lipolytica NBRC 1658</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i>	Sabouraud Dextrose Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 30±2°C
<b>Küf</b>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Monascus purpureus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Sabouraud Dextrose Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 30±2°C

Mikroorganizmalar SDB (Sabouraud Dextrose Broth) sıvı besiyerinde uygun koşullar altında üretilmiştir. 50 ml'lik falkonlara alınan kültürler 5 dk 10000 rpm'de santrifüj

edilerek pellet toplanmıştır. Santrifügasyon işlemi sonunda 5 ml supernatantın üzerine 25 ml önceden hazırlanan 1mM'lık AgNO<sub>3</sub> solüsyonundan ilave edilip ve 24 saat boyunca 25°C'de ışık altında bekletilmiştir.

### **3.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonu**

Yüksek verim elde etmek amacıyla önce mikroorganizmaların üretim koşulları daha sonra reaksiyon ortamı optimize edilmiştir.

#### **3.1.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Ortamı Optimizasyonu**

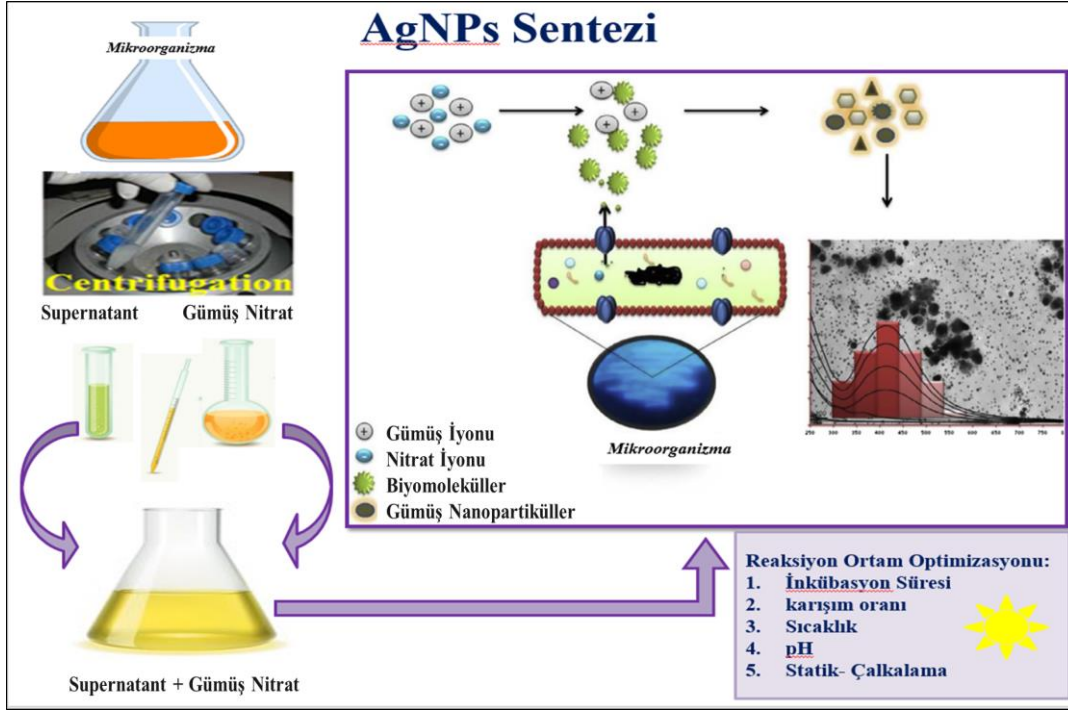
Bu doğrultuda sıcaklık, pH ve üretim zamanı ele alınmıştır. Değerlendirme aşamasında mikroorganizmaların üremeleri spektrofotometrede 420 nm'de ölçülmüştür.

#### **3.2.1.2. Gümüş Nanopartiküllerin Reaksiyon Ortamı Optimizasyonu**

Reaksiyon ortamının optimizasyonu için ise gümüş nitrat solüsyonunun farklı konsantrasyonları ve çeşitli pH koşulları değerlendirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda değerlendirmeler boyut ölçer (Zeta Sizer) ile gerçekleştirilmiştir.

AgNP'lerin Sentezlenmesi:

AgNP lerin sentezi amacıyla kullanılan mikroorganizmanın üreme ortamı koşulları optimize edildikten sonra mikroorganizmalar sıvı besiyerine inkübe edilerek uygun koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 50 ml'lik falkonlara alınan kültürler 10 dk 10000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant alınmıştır. Elde edilen supernatant, AgNP' lerin sentezi için kullanılmıştır. Literatür referans alınarak kullanılması gereken AgNO<sub>3</sub> miktarı 1mM olarak belirlenmiş ve 5 ml süpernatantın üzerine 1m M'lık 25ml olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> ilave edilmiştir. AgNO<sub>3</sub> ilave edilen falkonlar 24 saat 60 W sarı ışık altında 25°C'de bekletilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Biyojeik Nanopartikül Oluşumu.

### 3.2.4. Pullulan Biyopolimeri Üretimi

#### 3.2.4.1. Pullulan Biyopolimeri Üretiminde Kullanılan Mikroorganizma ve Üretim Ortamları

Pullulan biyopolimerinin üretimi için *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 suşu kullanılmıştır. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 Amerikan Kültür Koleksiyonu merkezinden temin edilmiştir. Mikroorganizma SDA (Sabouraud Dextrose Agar) içerikli besiyerinde 4°C’de saklanarak her 2 haftada bir taze besi ortama ekim yapıp kültür yenilenmiştir.

Çizelge 3.2. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 üretilmesinde kullanılan kültür ortam içeriği g/L:

İçerik	g/L
Sakkaroz	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.6
Maya ekstraktı	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	1.0
MnCl <sub>2</sub>	0.01
pH	6.5

Çizelge 3.3. Pullulan biyopolimerinin üretiminde kullanılan üretim ortamı içeriği g/L:

İçerik	g/L
Sakkaroz	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.6
maya ekstraktı	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	1.0
MnCl <sub>2</sub>	0.01
pH	6.5

Kullanılan mikroorganizma geliştirme ve üretim ortamları, 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltisi ile yapılan gerekli pH ayarlamalarından sonra 1.5 atm basınçta, 121°C’de 20 dk süreyle sterilize edilmiştir.

### **3.2.4.2. Pullulan Biyopolimeri Eldesi**

Öncelikle SDA'da üretilen mikroorganizmalar hazırlanan kültür ortamına inoküle edilerek 28°C sıcaklıkta 48 saat boyunca üretilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizmalar, aseptik koşullarda %5 (v/v) oranında, pullulan biyopolimerinin üretim ortamına 1'er ml olacak şekilde steril koşullar altında inoküle edilerek 200 rpm 28°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.2.4.3. Analitik Metotlar**

Üretim ortamından alınan 50 ml örnek 10000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek mikroorganizmalar (Pellet) ayırt edilmiştir. Daha sonra saf su kullanılarak pellet iki defa santrifügasyona tabi tutularak yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 80°C'de kurutulup tartılarak kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir. Santrifügasyon işlemi sonucunda elde edilen supernatantın üzerine etanol 1:2 oranında ilave edilerek reaksiyon ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra reaksiyon ortamı karıştırılıp +4°C'de bekletilerek polisakkaritlerin çökmesi sağlanmıştır. Bekleme süresinin sonunda 10000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöken kısım alınıp 80°C'de kurutularak tartılıp mikrobiyal polisakkarit miktarı belirlenmiştir.

### **3.2.4.4. Pullulan Biyopolimeri Tayini**

Üretim ve reaksiyon aşamaları sonucunda elde edilen polisakkarit içindeki pullulan miktarının tespit etmek amacıyla, elde edilen polisakkaritten 10 mg/ml oranında alınarak 0.05 M sodium asetat (pH 5.0) çözeltisi içinde çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözünen örnekten 1 ml alınıp üzerine 10 µl Pullulanaz (Sigma) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında bir gece inkübe edilmiştir.

### **3.2.4.4. Üretilen Biyopolimerin Pullulan Olduğunun Belirlenmesi**

Elde edilen polimerin pullulan olup olmadığının anlaşılması için karbon analizi (<sup>13</sup>C NMR) ve proton analizi (<sup>1</sup>H NMR) yapıлып, literatürdeki pullulan verileriyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen

pullulan biyopolimerinden bir miktar distile su içinde çözdürülerek karbon ve proton analizleri için kullanılmıştır.

### 3.2.4.5. Pullulan Biyopolimeri Optimizasyonları

Mikroorganizma üretim ortamında üretilerek steril koşullar altında hazırlanan %5 (v/v) oranında üretim besiyerine inokule edilerek en fazla pullulan üretimini sağlamak amacıyla hem üretim koşullarının hem reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İncelenen olan parametreler Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Üretim ve reaksiyon koşullarının optimizasyonunda incelenen parametreler.

Üretim ortamının koşulları		Reaksiyon ortamının koşulları
<b>Fiziksel</b>	<b>Kimyasal</b>	
Sıcaklık	Karbon Kaynağı	Etanol Miktarı Karıştırma hızı
pH	Azot Kaynağı	
Statik/Çalkalamalı	Substrat Miktarı	
İnkübasyon		

#### 3.2.4.5.1. Pullulan Biyopolimeri Üretim Ortamı Optimizasyonları

Tüm deneylerde mikroorganizmanın üreme miktarı, elde edilen polisakkarit ve pullulan miktarı tespit edilmiştir.

##### 3.2.4.5.1.1. Üretim Ortamı pH’sının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Yüksek verimde pullulan eldesi için uygun pH’yı belirlemek amacıyla mikroorganizma farklı pH (pH:4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) değerlerinde hazırlanan besiyerlerine inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası besiyerleri 28°C’de 200 rpm’de inkübasyona tabi tutularak maksimum pullulan üretiminin olduğu optimum pH değeri saptanmıştır. Deneyler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.4.5.1.2. İnkübasyon Zamanının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Mikroorganizmanın yüksek miktarda pullulan ürettiği inkübasyon zamanını belirlemek amacıyla inkübasyonun belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Bunun için optimum pH koşullarında hazırlanan üretim besiyerine mikroorganizma inoküle edilerek 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin başlatılma saati baz alınarak 10 günlük zaman aralıklarında her gün aynı saatte örnek alınmıştır. Spektrofotometre cihazı kullanılarak 600 nm’de ölçümler gerçekleştirilerek üreme eğrisi çıkartılmıştır. Elde edilen üreme eğrisi doğrultusunda üretilen biyopolimer miktarı belirlenmiştir. Deneyle 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.4.5.1.3. Sıcaklığın Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Mikroorganizmanın sıcaklığa göre biyopolimer üretim verimini belirlemek amacıyla kültürler inokülasyondan sonra 24 °C, 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C ve 36 °C’de çalkalamalı ve statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bunun için optimum pH koşullarında hazırlanan besiyerine mikroorganizma inoküle edilerek farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılarak maksimum pullulan elde edilmiştir.

### **3.2.4.5.1.4. İnokülüm Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

İnokülüm miktarlarının pullulan üretimi üzerine etkisinin incelenmesi için optimum pH koşullarında hazırlanan besiyerlerine farklı oranlarda (%1, %2, %3, %4, %5, %6 ve %7 (v/v)) mikroorganizma inoküle edilerek inkübasyona sonucu maksimum pullulan elde edilmiştir.

### **3.2.4.5.1.5. Azot Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Mikroorganizmanın hangi azot kaynaklarında daha fazla pullulan üretimi gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla Üre, Amonyum nitrat, Sodyum nitrat, Maya özütü, Pepton, Tripton, Amonyum karbonat, Malt, Amonyum sülfat, Kazein ve Amonyum okzalol olmak üzere 11 çeşit farklı azot kaynağı seçilerek bu deneyde kullanılmıştır. Bunun için her bir besiyerinde içerik ve pH sabit tutularak sadece azot kaynağında değişiklik yapılarak aynı oranda inokülasyon

gerçekleştirilmiş ve 28°C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda maksimum pullulan üretimi için en uygun azot kaynağı belirlenmiştir. Deneyler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.5.1.6. Karbon Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Optimum pH koşullarında hazırlanan besiyerlerine karbon kaynağı olarak %5 (w/v) içeriğinde glukoz, fruktoz, sukroz, maltoz ve laktoz, ilave edilerek kültürler uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Bu karbon kaynaklarının yanı sıra maksimum pullulan elde edilen karbon kaynağına ilaveten %1-%5 mannitol ilave edilerek pullulan üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir.

#### **3.2.4.5.1.8. Substrat Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Substrat miktarlarının pullulan üretimini nasıl etkilediğini araştırmak için denenen karbon kaynakları arasından en yüksek verim elde edilen karbon kaynağı seçilip farklı oranlarda (%1, %2, %3, %4 ve %5 (v/v)) üretim ortamına ilave edilip, optimizasyon gerçekleştirilerek maksimum pullulan üretilmiştir.

#### **3.2.4.5.2. Pullulan Biyopolimeri Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları**

Yukarıda belirtilen optimizasyonların yanı sıra en fazla pullulan üretimini sağlamak amacıyla reaksiyon koşullarının optimizasyonu Çizelge 3.4’de belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

##### **3.2.4.5.2.1. Etanol Miktarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Üretim ortamı optimizasyonundan elde edilen verilere baz alınarak hazırlanan üretim besiyeri inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda santrifügasyona tabi tutularak elde edilen supernatantın üzerine farklı oranlarda etanol (örnek: etanol sırasıyla 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5) eklenerek reaksiyon başlatılmış optimum etanol miktarı elde edilen pullulan miktarına göre belirlenmiştir.



### **3.2.4.5.2.1. Reaksiyon Ortamı Karıştırma / Statik Koşullarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Üretilen pullulan biyopolimerinin reaksiyon ortamına karıştırma ve statik koşulların etkisini belirlemek amacıyla supernatantın üzerine etanol ilave edilmiştir. Reaksiyon ortamının biri statik koşullarda diğeri ise karıştırılarak reaksiyona konulmuştur. Böylece en uygun reaksiyon koşulunda maksimum pullulan elde edilmiştir.

### **3.2.6. AgNP Yüklü Pullulan Biyopolimerin Hazırlanması**

Pullulan ile AgNP kaplanması için öncelikle pullulan distile su içinde tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Nanopartikül yüklü pullulan uygulaması için antimikrobiyal aktivite analizi sonucunda tespit edilen inhibisyon konsantrasyonu “% nanopartikül miktarı” olarak biyopolimer çözeltisine ilave edilmiştir. Çözelti yüksek hızda 30 dk daha karıştırılmıştır. Oda şartlarında 48 saat kurumaya bırakılan polimer yüklü nanopartiküller biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere UV uygulaması (5 dk) ile steril edilmiştir.

## **4. Elde Edilen Biyomalzemelerin Karakterizasyonu**

Elde edilen biyomalzemelerin sentezini belirlemek için, büyüklüğü, yüzey yükü, yüzeyinde olan bileşikleri ve morfolojisini tespit etmek için bazı cihazlar kullanılmıştır. Bu amaçla, üretim optimizasyonu yanısıra reaksiyon ortamı optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen biyomalzemeler Zeta boyut ölçer, Zeta Potansiyeli, Taramalı elektron mikroskopu (SEM), Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-Ray Powder Diffraction, Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) vs cihazları ile karakterize edilerek literatürle karşılaştırılması yapılmıştır. Her bir biyomalzemenin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler ve kullanım amaçları Çizelge 3.5 ve 3.6’da tanımlanmıştır.

AgNP örneklerindeki partikül hariç diğer bakteri bileşiklerini ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla, ilk olarak partiküller 2 ml’lik ependorf tüplerine paylaştırılmış ve 10000 rpm’de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. Ancak bu hızda partiküller tamamen çökmemiştir. Bu nedenle, partiküller önce 12000 rpm daha sonra da 16000 rpm de 20 dakika santrifüjlenmiş, böylece çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda supernatant atılmış, elde edilen pellet kısmının üzerine eşit miktarda distile su ilave edilmiştir. Santrifügasyon işlemine geçmeden önce çökmüş olan

partiküller 5 dakika sonikatörde bekletilerek partiküllerin çözelti içerisinde daha iyi dağılması sağlanmıştır. Daha sonra santirifügasyon işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak saf gümüş nanopartiküller elde edilebilmiştir. Böylece elde edilen saf AgNP'ler karakterizasyon işlemi için kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Gümüş Nanopartikül karakterizasyonunda kullanılan yöntemler.

<b>Metot</b>	<b>Kullanım amacı</b>
<b>ζ-Zeta potansiyeli analizörü (Zeta-Sizer)</b>	Sulu çözelti içindeki nanopartiküllerin yüzey yükünün ölçümü
<b>Taramalı elektron mikroskobu (SEM)</b>	Nanopartikül şekli ve yüzeyinin içeriğinin tanımlanması
<b>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)</b>	Nanopartikül yüzeyinde kimyasal kompozisyonu tanımlanması
<b>Ultraviyole görünür spektroskopisi (UV-vis) Mikroplaka okuyucu</b>	Renk değişimine dayalı nanopartikül karakterizasyonu
<b>X-ışını kırılma (XRD)</b>	Elemental içeriğin belirlenmesi

Çizelge 3.6. Pullulan ve AgNP+PBP kompleksinin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler.

<b>Metot</b>	<b>Kullanım amacı</b>
<b>ζ-Zeta potansiyeli analizörü (Zeta-Sizer)</b>	Sulu çözelti içindeki nanopartiküllerin yüzey yükünün ölçümü
<b>Taramalı elektron mikroskobu (SEM)</b>	Nanopartikül şekli ve yüzeyinin içeriğinin tanımlanması
<b>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)</b>	Nanopartikül yüzeyinde kimyasal kompozisyonu tanımlanması
<b>Termogravimetrik Analizi (TGA)</b>	Sıcaklığa karşı kütle kaybı

#### **4.1. Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge Spektroskopisi**

Gümüş iyonlarının biyoreaksiyonları oluşan renk değişimi ile tespit edilmiştir. Reaksiyon sonrası ortam sarı renkten kahve rengine dönüşmüştür. Daha sonra UV-Vis Cihazı kullanılarak elde edilen pikler, nanopartiküllerin gümüş nanopartikül olduğunu göstermektedir. Örnekler çözelti halinde hazırlanıp kuartz küvetlere alınarak 300 – 700 nm dalga boyu arasında taranmıştır. Örneklerin SPR özellikleri kuartz küvet içinde ölçülmüştür.

#### **4.2. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi**

Fourier transform infrared spektroskopisi cihazı organik / inorganik birleşiklerin analizi için kullanılmaktadır. Mikrobiyal yollardan sentezlenen biyomateryallerin yüzeylerinde mikroorganizmaların bileşikleri bulunmaktadır. Mikroorganizmaların hangi fonksiyonel grupları kullanarak bu materyallerin sentezlenmesine sebep olduğunu anlamak için, maddelerin yüzeyinde olan bileşikler ve fonksiyonel gruplar Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ile belirlenmiştir. Bu analizin gerçekleştirilmesi için, her bir örnek tamamen saflaştırıldıktan sonra suyunun kurutulması gerekmektedir. Bunun için örnekler üç kez distile su ile yıkanarak petri kaplarına dağıtılıp 80°C sıcaklığında vakum etüvde kurutulmaya bırakılmıştır. FT-IR spektrumu 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte alınmıştır. Kurutma işlemi sonunda örnekler petri kaplarından toplanarak Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ndeki FTIR (Thermo scientific- NİCOLET İS 10) cihazı ile incelenmiştir.

#### **4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)**

SEM analizi elde edilen biyomateryallerin morfolojisi, boyutu ve şekli hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır. Örneklerin SEM görüntülerinin alınabilmesi için önce saflaştırma işlemi gerçekleştirmiştir. Daha sonra örnekler spin coater cihazı ile homojen bir şekilde daha önceden 1x1 cm boyutunda, 1mm inceliğinde cam yüzeyler üzerine dağıtılarak 80°C'de kurutulmaya bırakılmıştır. Tamamen kurutulduktan sonra örnekler ince bir altın film tabakasıyla kaplanmış, böylelikle örnekler geometri, şekil ve boyut dağılım açısından değerlendirilmiştir. Hazırlanan örnekler ODTÜ Merkezi Laboratuvarında olan QUANTA 400F Field Emission SEM cihazı ile analiz edilmiştir.

#### **4.4. X-Işını Difraksiyonu (XRD)**

Sentezlenen biyomalzemeler kurutulduktan sonra XRD analizinde kullanılmıştır. Örneklerin XRD analizi  $20^{\circ} \leq 2\theta \leq 100^{\circ}$  aralığında 40KV'da incelenmiştir.

#### **4.5. Zeta Sizer ve Potansiyel**

Biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenen biyomateryallerin boyut ve yüzey yüklerini ölçmek için zeta cihazı kullanılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra örnekler 5 dakika sonikatör cihazında bekletilerek partiküllerin ortam içerisinde daha iyi dağılması sağlanmıştır. Zeta sizer analizi için hazırlanan örnekler kuartz küvetlere alınarak cihaza yüklenmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel analizi için hazırlanan örnekler ise şırınga ile cihaza yüklenmiş ve yüzey yükleri belirlenmiştir.

#### **4.7. Termogravimetrik Analizi (TGA)**

Saflaştırılmış örnekler  $80^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında kurutularak toz haline getirilmiştir. Daha sonra her örnek 6 mg azot gazı atmosferinde, dakikada  $10^{\circ}\text{C}$  ısıtma hızıyla  $22-900^{\circ}\text{C}$  arasında analiz edilmiştir.

### **5. Biyomalzemelerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi**

Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) ve pullulan biyopolimerinin (PBPs) biyoaktiviteleri ilk önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBPS+AgNPs kompleksi halinde etkileri incelenmiştir.

#### **5.1. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve pullulan biyopolimerin (PBP) antimikrobiyal etkileri ilk önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBP+AgNP kompleksi halinde etkileri incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite Balouiri vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada belirtilen agar disk-difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Bu etki bakteriler, maya ve küf üzerinde denenmiştir. Uygun

koşullarda inkübasyon sonrası agar yüzeyinde oluşan beyaz zon çapı ölçülerek nanopartiküllerin antimikrobiyal etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin ve pullulan biyopolimerin antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen biyomalzemelerin antimikrobiyal etkisinin gözlemlenebilmesi amacıyla çeşitli mikroorganizmalar petrilere yayma ekim yöntemiyle inoküle edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 3.7’ de belirtilmiştir. Test bakterileri 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanmış ve Muller Hinton Agar (MHA, Merck)’a 0,1 ml miktarında inoküle edilmiştir. Maya suşuları 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanıp ve Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)’a 0,1 ml inoküle edilmiştir.  $1 \times 10^6$ /ml spor içeren *Aspergillus niger* kültüründen 0,1 ml alınarak Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)’ a inoküle edilmiştir. Optimize edilerek üretilen gümüş nanopartiküllerin, pullulan biyopolimerinin ve PBP+AgNP kompleksi farklı konsantrasyonlarda boş antibiyotik disklerine emdirilmiştir. Antimikrobiyal etkisinin gözlemlenebilmesi amacıyla çeşitli mikroorganizmalar petrilere yayma ekim yöntemiyle inoküle edilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örnekler steril koşullarda kuyucuklara ilave edilerek antimikrobiyal etkisinin olup olmadığı zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. Zon çaplarının yorumlanması ise çeşitli antibiyotikler kullanılarak elde edilen zon çapları ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. İnhibisyon çapları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kurallarına göre inhibisyon zonu ölçümleri alınarak belirlenip ve mm cinsinden kaydedilmiştir. Yapılan tüm antimikrobiyal deneyler 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Mikroorganizma türü	Besiyeri	Büyüme ortamı Koşulları
<b>Bakteri</b>	<i>E. coli</i> 27922 ATCC <i>Klebsiella pneumonia</i> 13883 ATCC <i>Proteus mirabilis</i> 25933 ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 ATCC <i>Salmonella typhimurium</i> 14028 ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990 ATCC <i>Bacillus subtilis</i> 6633 ATCC <i>Shigella sonnei</i> <i>Enterococcus faecalis</i> 29212 ATCC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 ATCC	Nutrient Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 37±2°C
<b>Maya</b>	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Candida albicans</i> 10213 ATCC	Sabouraud Dextrose Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 30±2°C
<b>Küf</b>	<i>Aspergillus niger</i>	Sabouraud Dextrose Agar	pH: 7±1 Sıcaklık: 30±2°C

## 5.2. Biyomalzemelerin Antibiyotik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Biyosentez yöntemleri kullanılarak elde edilen AgNP ve PBP antimikrobiyal aktivitesi 3.2.3.1. bölümde bakteriyel patojenlere karşı incelenmiştir. Üretilen biyomalzemelerin maksimum antimikrobiyal aktivite gösterdiği mikroorganizmalar belirlenmiştir. Sinerjik aktivitenin belirlenmesi için disk-difüzyon metodu kullanılmıştır. Standart antibiyotik diskler ile AgNP'lerin ve PBP'lerin kombine formülasyonları hazırlanarak, seçilen test mikroorganizmalar üzerindeki sinerjik etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla kullanılan antibiyotik diskleri: Ciprofloxacın (CIP, 5 µg/disk; florokinolonlar grubu), Ampicillin (AM, 10 µg/disk; betalaktam antibiyotik grubu), Gentamicin (GN, 10 µg/disk; aminoglikozid) ve Amoxicillin clavulanic acid (AMC, 30 µg/disk; betalaktam antibiyotik grubu). Standart antibiyotik diskler Oxoid firmasından temin edilmiştir.

Sinerjik aktivitenin belirlenmesi için, ilk önce her bir test suşundan tek bir koloni alınarak Muller-Hinton Broth (MHB) besiyerine inoküle edilerek bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bir gece boyunca inkübasyona bırakılan test suşları %0.9 NaCl ile seyreltilerek 0.5 McFarlanda göre ayarlanarak petri kaplarına yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. Farklı miktarlarda standard antibiyotik disklere taze hazırlanmış AgNP, PBP ve PBP+AgNP komplekslerinden emdirilmiştir. Daha sonra diskler petrilere yerleştirilerek 37 °C’de inkübe edilmiştir.

Antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi için zon çapları ölçülmüştür. Zon çaplarının yorumlanması ise çeşitli antibiyotikler kullanılarak elde edilen zon çapları ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. İnhibisyon çapları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kurallarına göre inhibisyon zonu ölçümleri alınarak mm cinsinden kaydedilmiştir. Yapılan tüm antimikrobiyal deneyler 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **5.3. Biyomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin ve pullulan biyopolimerinin (PBP) biyoaktiviteleri antibiyofilm etkileri önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBP+AgNP kompleksi halinde etkileri incelenmiştir. Biyomalzemelerin antibiyofilm etkileri *Candida* türleri üzerinde denenmiştir. Çalışma kapsamında biyofilm oluşumları “Plak Üzerinde Kristal Viyole Boyamalı Biyofilm Ölçümü” ile araştırılmıştır. Biyofilm ürettiği bilinen *Candida albicans*, *Candida glabrata* ve *Candida parasilosis* suşları, Brain Heart İnfüzyon (BHI) sıvı besiyerine inoküle edilerek uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üreyen suşlar 10 ml yeni hazırlanan BHI besiyerine aktarılarak tekrardan inkübe edilmiştir. Her bir suşa ait kültürden MacFarland 2.0 ( $6 \times 10^8$  CFU/mL) standardına uygun olacak şekilde inoküle edilerek 37°C’de 24 saatlik bir inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında ise, örnekler 1:100 oranında seyreltilip 1’er ml alınarak steril koşullar altında 24 kuyucuklu polistren plağın kuyucuklara aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda AgNP, PBP eklenmiştir. Örnekler, kuyucuklara yüklendikten sonra plağın kapağı kapatılarak 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli

inkübasyon süreleri tamamlanan plaklar, etüvden çıkarılmıştır. Plaktaki sıvı kültürler plak ortamından alınmış ve kuyucuklar hiç kültür artığı kalmayacak şekilde distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan plaklar kurumaya bırakılmıştır. Plak kurduktan sonra, kuyucuklara %1'lik kristal viyole çözeltisi ilave edilerek 20-30 dakika boyunca boyama işlemi için bekletilmiştir. Kuyucuklara 1'er ml Etanol–Asetik Asit (90:10) çözeltisi ilave edilerek, kristal viyole çözeltisinin çözünmesi sağlanmıştır. Etanol–Asetik Asit solüsyonu içerisinde çözünen kristal viyole miktarı, 560 nm'de spektrofometre cihazında ölçülerek tespit edilmiş ve gümüş nanopartiküllerin biyofilm üzerindeki etkisi bu şekilde değerlendirilmiştir. Yapılan tüm antibiyofilm deneyler 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Gümüş anopartikül ve pullulan biyopolimerin tek tek antibiyofilm aktiviteleri belirlenerek elde edilen verilere göre PBP+AgNP kompleksi hazırlanarak aynı test suşları ve aynı yöntem kullanılarak antibiyofilm etkileri incelenmiştir.

Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

#### **5.4. Biyomalzemelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve pullulan biyopolimerinin (PBP) biyoaktiviteleri ve antioksidan etkileri ilk önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBP+AgNP kompleksi halinde etkileri incelenmiştir. Mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik AgNP, PBP ve PBP+AgNP komplekslerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için DPPH metodu uygulanmıştır.

Yöntemin temeli; DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanmaktadır. Proses sonucunda meydana gelen mor renkli çözeltinin absorbans değerinin azalması 520 nm'de ölçülerek reaksiyon takip edilmiştir.

Yöntemin uygulaması; Maya suşları YPD Broth besiyerinde 2 kez 28°C'de 48 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip, elde edilen pelletler fosfat tamponu (PBS; %0,02 KCl, %0,144 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0,024



KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0,8 NaCl, pH:7,0) ile 3 kez yıkanıp ve 1 mL PBS ile resüspanse edilmiştir. Hücre yoğunlukları 0,5 nolu Mc Farland standartına göre ayarlanıp, 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanan maya süspansiyonundan 1000 µL alınıp 1 mL 1,1-difenil-2-pikril hidrazil çözeltisi (%0,008 DPPH, metanolde çözülmüştür) ile muamele edilerek, karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir.

1. Örneklerin optikal yoğunlukları 520 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülmüştür.
2. Kontrol olarak 1000 µL boş PBS ile 1 mL DPPH çözeltisi kullanılmıştır.

Suşların % DPPH radikalini gidermesinin hesaplanması:

B517

$$A = [1 - \frac{C517}{B517}] \times 100$$

C517

A: Antioksidan aktivite (%)

B517: Suşlarla muamele edilen DPPH örneklerinin yoğunluğu

C517: Kontrol grubu (Boş PBS ve DPPH çözeltisi)

Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 5.5. Biyomalzemelerin Sitotoksitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve pullulan biyopolimerinin (PBP) sitotoksik etkileri ilk önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBP+AgNP kompleksi halinde etkileri incelenmiştir.

Mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin ve pullulan biyopolimerinin sitotoksitesinin belirlenmesi için SKBR ve MCF-7 insan meme kanser hücresi hatları kullanılmıştır. Hücre hatları Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar (Hacettepe Üniversitesi

Biyoloji Bölümü) tarafından temin edilmiştir. Hücreler besiyeri ortamında (%10 DMEM-F12, %10 FBS, %1 penisillin/streptomisin solüsyonu), 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> özelliği olan inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Deney süresinde istenilen yeterli sayıya ulaşan hücreler, 96'lık plakalara her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına eklenmiştir. Sentezlenen gümüş nanopartiküller, steril distile ile çözündürülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan stok solüsyondan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır. Sonrasında plakaların içindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara besiyeri içerisinde hazırlanan gümüş nanopartiküller, pullulan biyopolimeri ve PBP+AgNP kompleksi farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışmada, hücrelerin besiyeri ortamında kültüre edildiği 'kontrol' ve besiyeri ortamı %0,1 oranında DMSO içeren 'DMSO kontrol' grupları da oluşturulmuştur. Plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Deneyler bir birinden bağımsız 3 tekrar ve her grup 8 örnek olarak çalışılmıştır. Sitotoksisite belirleme yöntemlerinden biri olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, canlı hücrelerin mitokondrisinde var olan süksinat dehidrogenaz enzimi, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan tuzlarını meydana getirir. Bu yöntemde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir. Elde edilen bu değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri artış göstermektedir. MTT stok solüsyonundan, besiyeri ile çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Gümüş nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı plakalara inkübasyon süreleri sonunda, içindeki besiyerleri uzaklaştırılıp her kuyucuğa MTT çalışma solüsyonundan, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde ilave edilmiştir. Plaka 3-4 saat etüvde inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda, oda sıcaklığında 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) kuyucuklara eklemiştir. Plakaların absorbans değerleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda, her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okutulmuştur. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 5.6. İstatistiksel Analizler

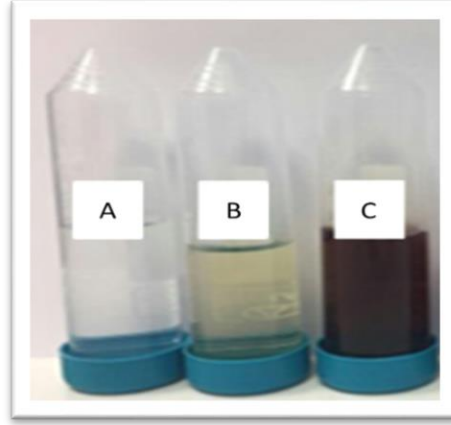
Tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm biyoaktivite çalışmaları istatistiksel olarak SPSS 21,0 Chicago İllinois yazılım programı ile değerlendirilmiştir. Gerek uygulanan biyomalzemelerde gerekse uygulanan zaman ve madde konsantrasyonları karşılaştırılmasında, ikili karşılaştırmalar için Mann-Whintney U testi kullanılırken çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel testler, genellikle parametrik veya nonparametrik testler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Gerçekleşen

alışmalar sonucunda elde edilen verilerin bu testlerden hangisine uygun olduğunu belirlemek için normalik testi yapılmaktadır. Bu doğrultuda, eğer veriler normal dağılıma sahip ise parametrik testler kullanılırken, verilerin dağılımı normal değilse nonparametrik testler ile karşılaştırmalar gerçekleştirilecektir. Tez kapsamında elde edilen veriler her iki test türünde olduğu için ikisi de verilerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

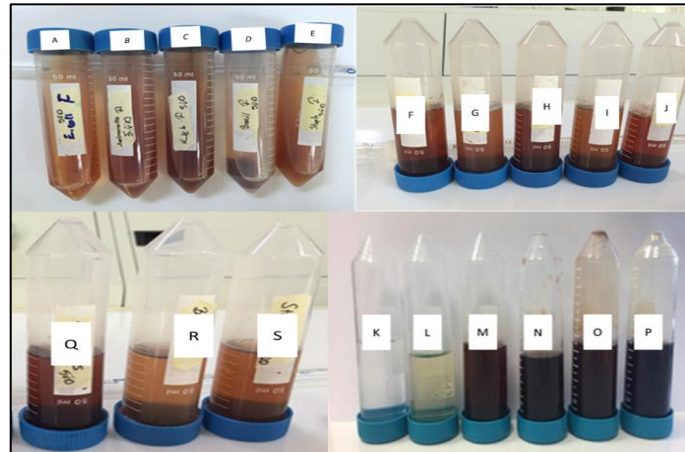
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji AnaBilim Dalı Kültür Koleksiyonu' nda bulunan çeşitli mikroorganizmalar gümüş nanopartiküllerin sentezlemesi için kullanılmıştır. Her bir mikroorganizma kendine özel besi ortamı ve koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon aşaması sonunda santrifüjasyona tabi tutulan mikroorganizmaların supernatantları AgNP lerin sentezi için kullanılmıştır. Supernatant ve gümüş nitrat tuzunun etkileşimi sonucunda reaksiyon ortamında renk değişimi gerçekleşerek AgNP ler elde edilmiştir. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. A) Gümüş nitrat solusyonu. B) santrifüjasyon işlemi sonunda elde edilen supernatant. C) Supernatant + gümüş nitrat solusyonu.



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların sentezlediği AgNP'lerin şematik görüntüleri.

Çizelge 4.1. Tez kapsamında gümüş nanopartiküllerin üretiminde kullanılan mikroorganizma türleri.

Mikroorganizma	Örnek
<i>E.coli</i>	<b>A</b>
<i>S. typhimurium</i>	<b>B</b>
<i>K. pneumoniae</i>	<b>C</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>D</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>E</b>
<i>Proteus</i>	<b>F</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>G</b>
<i>Yarrowia lipolytica: NBRC 1658</i>	<b>H</b>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<b>I</b>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<b>J</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	<b>M</b>
<i>Candida albicans</i>	<b>N</b>
<i>Candida glabrata</i>	<b>O</b>
<i>Pichia Pastoris</i>	<b>P</b>
<i>Aspergillus niger</i>	<b>Q</b>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<b>R</b>
<i>Monascus purpureus</i>	<b>S</b>
Gümüş Nitrat	<b>K</b>
Supernatant	<b>L</b>

Ön çalışmaların sonucunda elde edilen verilere dayanarak, gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi için 17 farklı mikroorganizmanın arasından 3 *Candida* türü seçilerek deneyler planlanmıştır.

Hanan M. ve arkadaşlarının *Streptomyces rochei* MHM13 suşu ile yaptıkları çalışmada, kültür süpernatantına gümüş nitrat ilave edilerek inkübasyona bırakmışlardır ve bu süre sonunda renk değişikliğinin meydana geldiğini ortaya çıkarmışlardır [128].

Bir diğer çalışmada ise bitki ekstraktı kullanarak AgNP lerin sentezlenmesini ve renk değişimini açıklamışlardır. Bu çalışmada reaksiyon ortamının rengi sarı renkten kahve rengine dönüşmüştür [129].

Shahnaz Majeed ve arkadaşlarının 2016'daki çalışmaları *Penicillium decumbens* (MTCC-2494) suşundan levan üretmek üzerine olmuştur. Araştırmacılar AgNP lerin hücre dışı sentezini gerçekleştirerek koyu kahve renginin oluştuğunu bildirmişlerdir [130].

## **4.2. Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonları**

### **4.2.1. Gümüş Nanopartiküllerin Üretim Ortamı Optimizasyonları**

Gümüş Nanopartiküllerin üretiminde yüksek verim elde etmek amacıyla öncelikle mikroorganizmaların üretim koşulları optimize edilmiştir. Bu doğrultuda sıcaklık, pH ve üretim zamanı değerlendirilmiştir. Değerlendirme aşamasında üreme miktarı spektrofotometrede mikroorganizmanın optimum dalga boyu olan 420 nm'de ölçülmüştür.

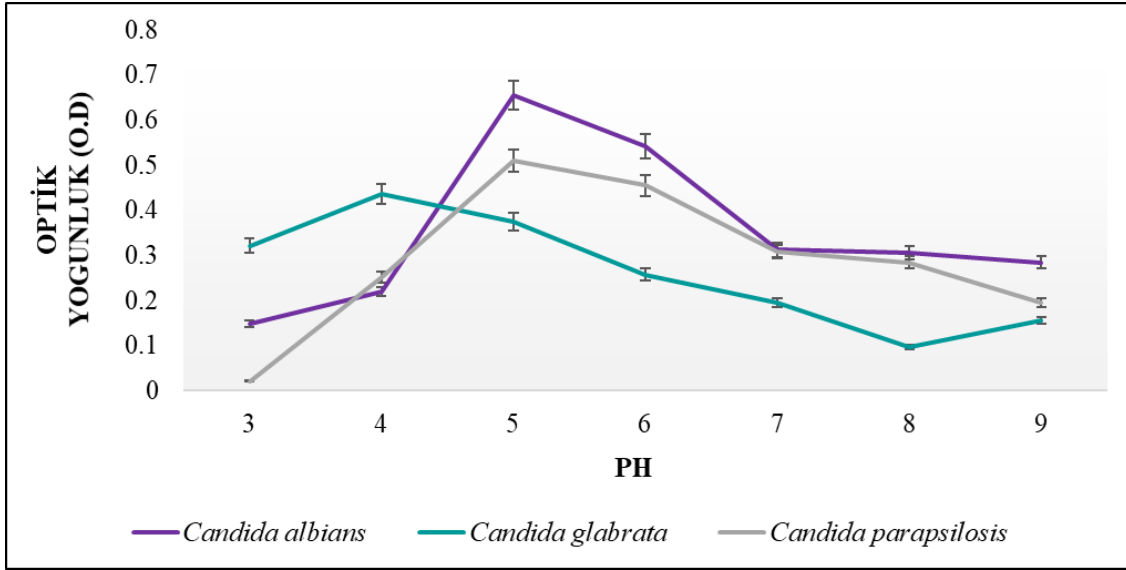
#### **4.2.1.1. pH Optimizasyonu**

Yüksek miktarda AgNPlerin elde edilmesi için farklı pH (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) değerlerinde hazırlanan besiyerlerine *Candida* türleri inoküle edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir *Candida* türü için farklı pH değeri tesbit edilmiştir. *Candida albicans*, *Candida glabrata* ve *Candida parapsilosis* suşuları için en fazla üreme sırasıyla pH 5.0, 4.0 ve 5.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

#### **4.2.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu**

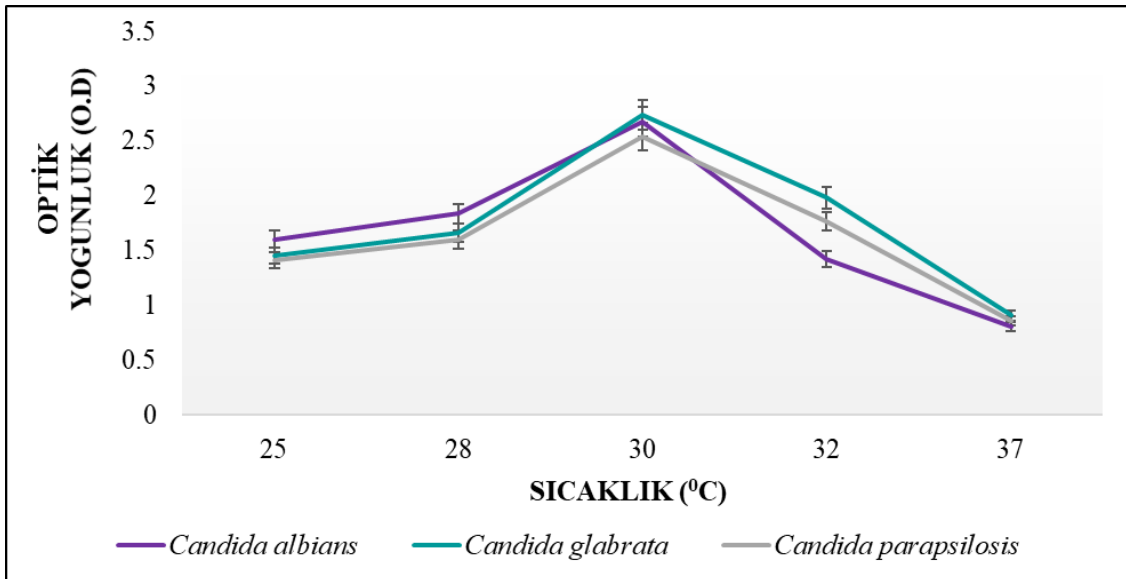
Mikroorganizmaların hangi sıcaklıkta yüksek miktarda üreme gösterdiğini belirlemek amacıyla her bir suş için pH koşulları 4.2.1.1. bölümden elde edilen sonuçlara göre sabit tutularak farklı sıcaklıklar (25°C, 30 °C, 37 °C ve 40 °C) uygulanarak en yüksek üreme

tesbit edilmiştir. Bu durumda her üç *Candida* türü 30° C’de en yüksek üremeyi göstermiştir. (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde *Candida* türlerinin üreme miktarları.

Literatürde *Candida* türleri için kullanılmış olan besi ortamı pH’sı 3-7 olarak rapor edilmiştir [131][132][133].

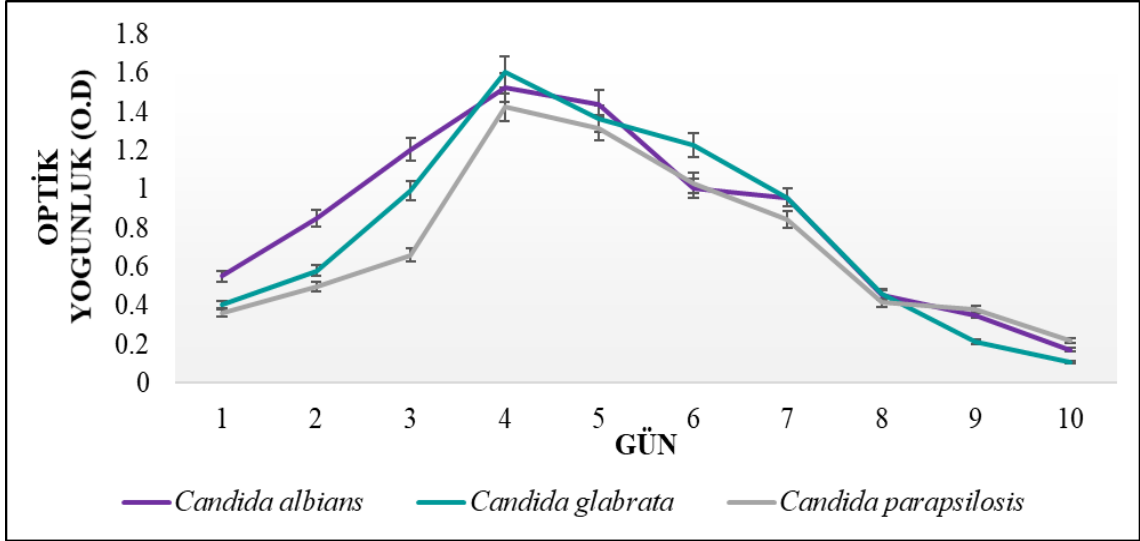


Şekil 4.4. Mikroorganizmaların üreme sıcaklığı optimizasyonu

Literatürde *Candida* türleri için kullanılmış olan besi ortamı sıcaklığı 30-34 °C olarak rapor edilmiştir [131].

#### 4.2.1.3. Üretim Süresi Optimizasyonu

Sıcaklık ve pH kadar mikroorganizmaların üretiminde zamanın da önemi büyüktür. Bu yüzden çalışmamızda mikroorganizmalar 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve üremenin en yüksek olduğu zaman tesbit edilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda her üç mikroorganizmanın da en yüksek üremeyi (OD değerini) gösterdiği gün 7. Gün olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Mikroorganizmaların üretim süresi optimizasyonu.

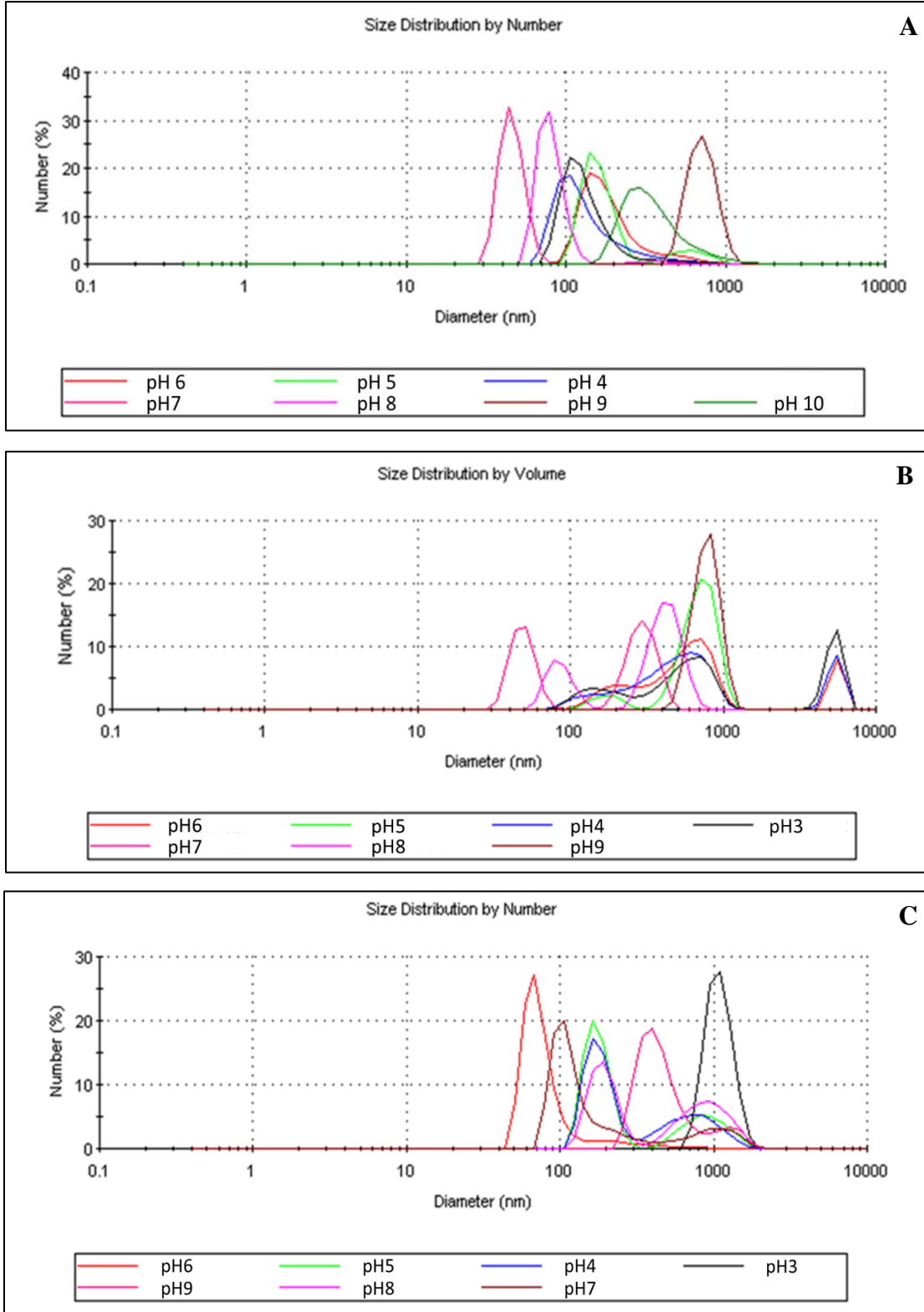
#### 4.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları

Reaksiyon ortamının optimizasyonu için çeşitli konsantrasyonlar ve çeşitli pH koşulları değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler boyut ölçer ile yapılmıştır.

##### 4.2.2.1. pH Optimizasyonu

Gümüş nanopartikül sentezi için mikroorganizmaların üretimi optimum koşullarda SDB besiyerinde gerçekleştirildikten sonra 50 ml'lik falkonlara alınan kültürler 5 dk 10000 rpm'de santrifüj edilerek pelet ayırt edilmiştir. Santrifügasyon işlemi sonunda 5 ml supernatantın üzerine 25 ml önceden hazırlanan 1mM'lik AgNO<sub>3</sub> (Gümüş Nitrat) solüsyonundan ilave edilerek pH değerleri 3.0 – 9.0'a ayarlanarak 24 saat boyunca 25°C ışık altında bekletilmiştir.





Şekil 4.6. *Candida* türlerinden farklı pH'larda üretilen AgNP lerin boyut ölçer cihazı ile elde edilen sonuçlar. A) *C. parapsilosis*, B) *C. glabrata*, C) *C. albicans*.

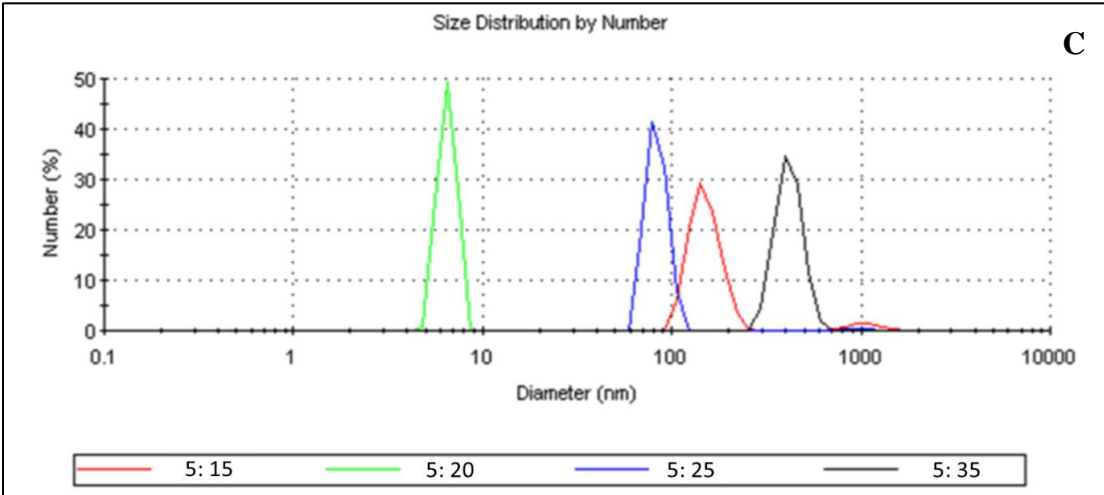
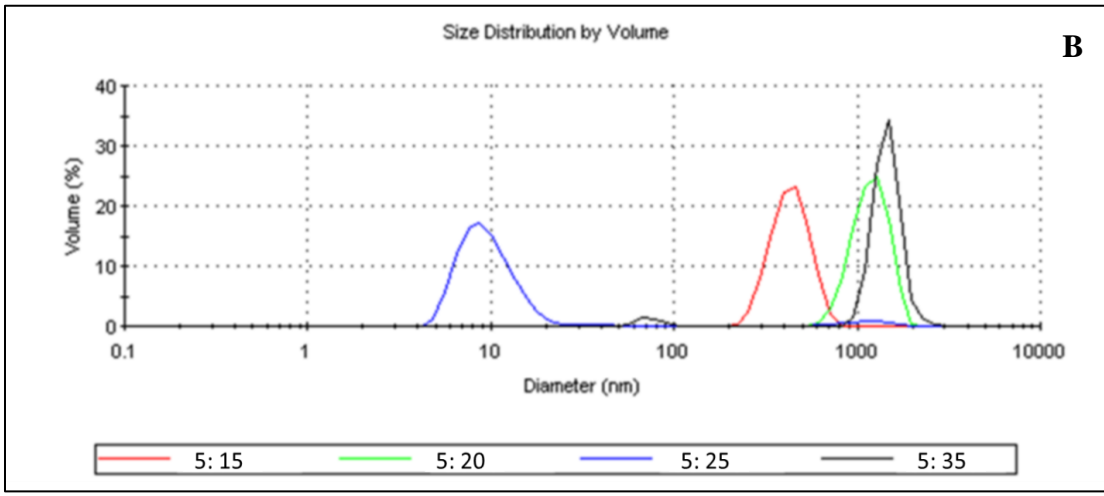
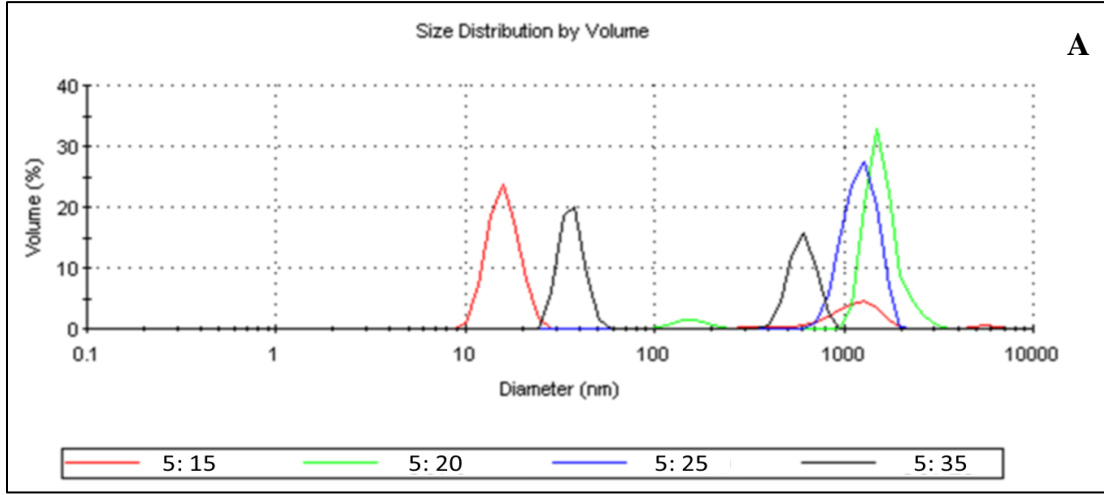
Değerlendirme sonucunda *C. albicans* için AgNP lerin üretim ortamının en uygun pH değerinin 6.0 olup *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* için bu değer 7.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu pH değerinde nanopartiküllerin ortalama boyutları diğer pH'lara göre daha düşük olarak ölçülmektedir. AgNPlerin solüsyonun boyut ölçer sonucuna bakıldığında mikron boyutunda olduğu, reaksiyon sonrasında boyutun nano mertebesine indiği ve nanopartiküllerin elde edildiği belirlenmiştir.

Chandrasekaran ve arkadaşlarının 2015'te yaptıkları çalışmada AgNP lerin sentezi için, 2 mM AgNO<sub>3</sub> solüsyonu ile % 3 sulu *Calotropis gigantea* L. özütünü pH-7'de oda sıcaklığında reaksiyona sokarak bu koşulların sentez için en uygun koşullar olduğunu belirlemişlerdir [134].

Bir diğer çalışmada ise, *Pseudomonas veronii* AS41G kullanılarak hücre dışı gümüş nanopartiküllerin sentezi farklı pH larda (5, 6, 7, 8, 9) gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bazik pH ların asidik ve nötr pH lara kıyasla sentezi etkilediklerini tesbit etmişler ve AgNP lerin sentezi için en uygun pH değerini 8.0 olarak belirlemişlerdir [135].

#### **4.2.2.2. Gümüş Nitrat Solüsyon Miktarının Optimizasyonu**

İnkübasyon sonrasında elde edilen supernatantın üzerine gümüş nitrat solüsyonunun farklı derişimleri eklenerek gümüş nitrat solüsyonunun reaksiyon ortamına olan etkisi belirlenmiştir. Bunun için her bir mikroorganizmadan elde edilen supernatant bir önceki (4.2.2.1) bölümde belirlenen pH değerlerine göre hazırlanarak gümüş nitrat solüsyonunun farklı oranları uygulanmış ve 24 saat boyunca 25°C ışık altında bekletilmiştir.



Şekil 4.7. *Candida* türlerinden farklı derişimlerde üretilen AgNP lerin boyut ölçer cihazı ile elde edilen sonuçlar. A) *C. parapsilosis*, B) *C. glabrata*, C) *C. albicans*.

Şekil 4.7. A'dan farklı gümüş nitrat derişimlerin, *C. parapsilosis* 'den üretilen AgNPs boyut dağılımları üzerinde çok büyük etkisinin olduğu, 5:15 oranında üretilen nanopartikül ile diğer derişimlerde elde edilen nanopartiküllerin boyutunda 10-100 nm boyutuna kadar inilebildiği gözlenmiştir.

Şekil 4.7. B'den farklı derişimlerin *C. glabrata*'dan üretilen gümüş nanopartiküllerin boyut dağılımları üzerinde çok büyük etkisinin olduğu, 5:25 oranında üretilen nanopartikül ile 10nm boyutunun altına kadar inilebildiği gözlenmiştir.

Şekil 4.7. C'den ise *C. albicans*'dan üretilen gümüş nanopartiküllerin boyut dağılımına etkisinin oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. 5:20 oranında üretilen nanopartikül ile 10nm boyutunun altına kadar inilebildiği gözlenmiştir. 5:25 oranında üretilenlerde ise 30-100 nm aralığında nanopartiküller gözlenmiştir.

Syed Baker ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, AgNP lerin sentezi için farklı gümüş nitrat konsantrasyonları kullanmışlar. Bu çalışmanın sonucunda 1mM'lık gümüş nitrat solüsyonnda en yüksek AgNP leri (5-50 nm) elde ettiklerini bildirmişlerdir [135].

Parastoo Pourali, Behrooz Yahyaei'nin 2015 yılında yaptıkları çalışmalar sonucunda, AgNP lerin sentezi için en uygun gümüş nitrat solüsyonunun miktarının 1mM'lık oran olduğunu rapor etmişlerdir [136].

Bir diğer çalışmada ise, 1mM'lık gümüş nitrat çözeltisi ile *Streptomyces rochei* MHM13 suşunun supernatantını 50:50 ml oranında etkileşime sokarak AgNp lerin (22–85 nm) başarılı bir şekilde sentezlediklerini belirtmişlerdir [128] .

Tüm bu çalışmaların sonucu değerlendirildiğinde, gümüş nitrat tuzunun molaritesi ve reaksiyon ortamına eklenen konsantrasyonu AgNP lerin sentezini ve boyutunu etkilediğini saptanmıştır.

### **4.3. Pullulan Biyopolimeri Üretimi**

*Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 üretim ortamında (Sakkaroz 30, maya ekstraktı 0.4, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2, MnCl<sub>2</sub> 0.01ve NaCl 1.0 (pH= 6.5)) üretildi ve steril koşullarda %5 (v/v) olucak şekilde inoküle edildi. En fazla pullulan

üretimini sağlamak amacıyla üretim ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi.

Pullulan biyopolimer üretiminin:

I. aşamasında çalkalamalı koşullarda üretilen polisakkarit, pullulan ve oluşan biyomass miktarları belirlenmiştir.

II. aşamada ise pullulan üreten ortamın farklı fiziksel ve kimyasal koşulları incelenerek bu parametrelerin pullulan üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir.

III. aşamada pullulan üretimi üzerine reaksiyon ortamının farklı parametrelerin pullulan üzerindeki etkileri hakkında bilgi edinilmiştir.

Pullulan biyopolimer üretiminin her aşamasında elde edilen biyomass, toplam polisakkarit ve pullulan miktarları da ölçülmüş, sonuçlar elde edilmiştir.

Üretimler, 250 mL'lik üretim ortamlarında pH 7.0'de bir hafta boyunca 28°C'de 200 rpm çalkalamalı koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır. Her bir üretim ortamına önceden bahis ettiğimiz eşit miktarda mikroorganizma inoküle edilmiştir. Deney 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre üretilen polisakkarit miktarı 15 g/l, Üretilen pullulan miktarı 16 g/ml ve Oluşan biyomass miktarı ise 18 g/l olarak belirlenmiştir.

### 4.3.1. Üretilen Biyopolimerin Pullulan Olduğunun Belirlenmesi

Elde edilen polimerin pullulan olup olmadığının anlaşılması için karbon ( $^{13}\text{C}$  NMR) ve proton ( $^1\text{H}$ NMR) analizler gerçekleştirilip literatürdeki pullulan verileriyle karşılaştırılmıştır.

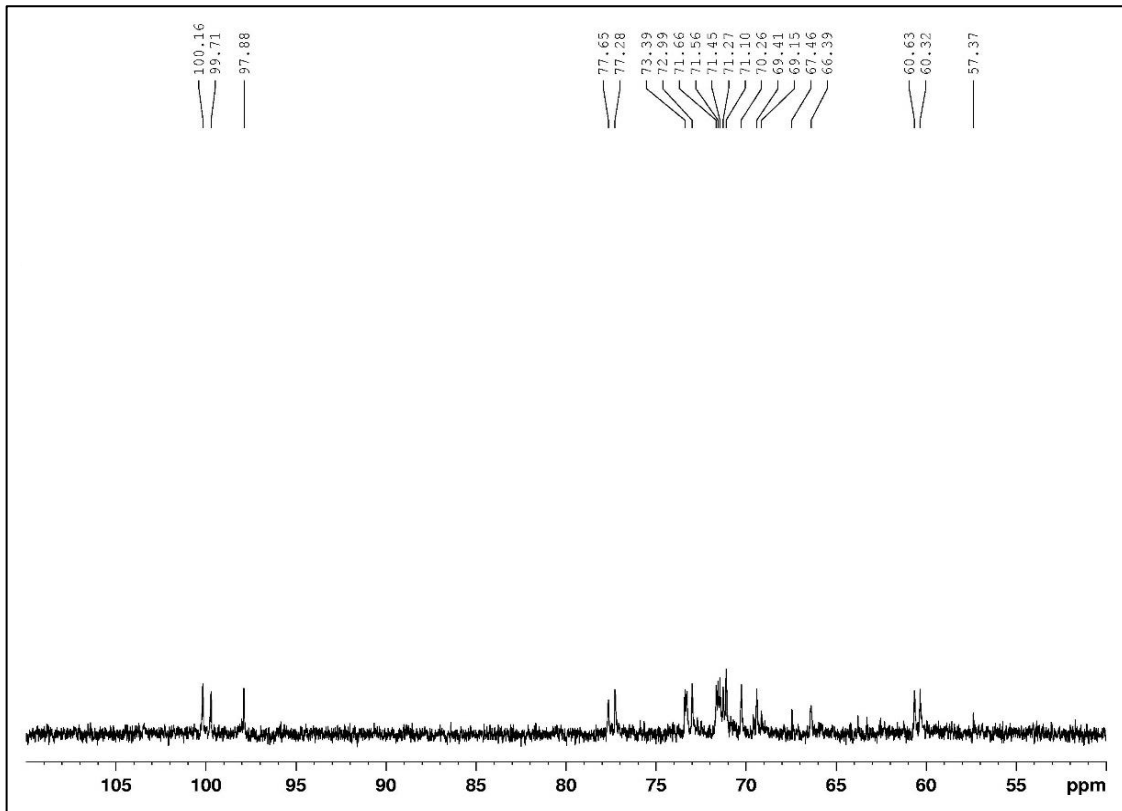
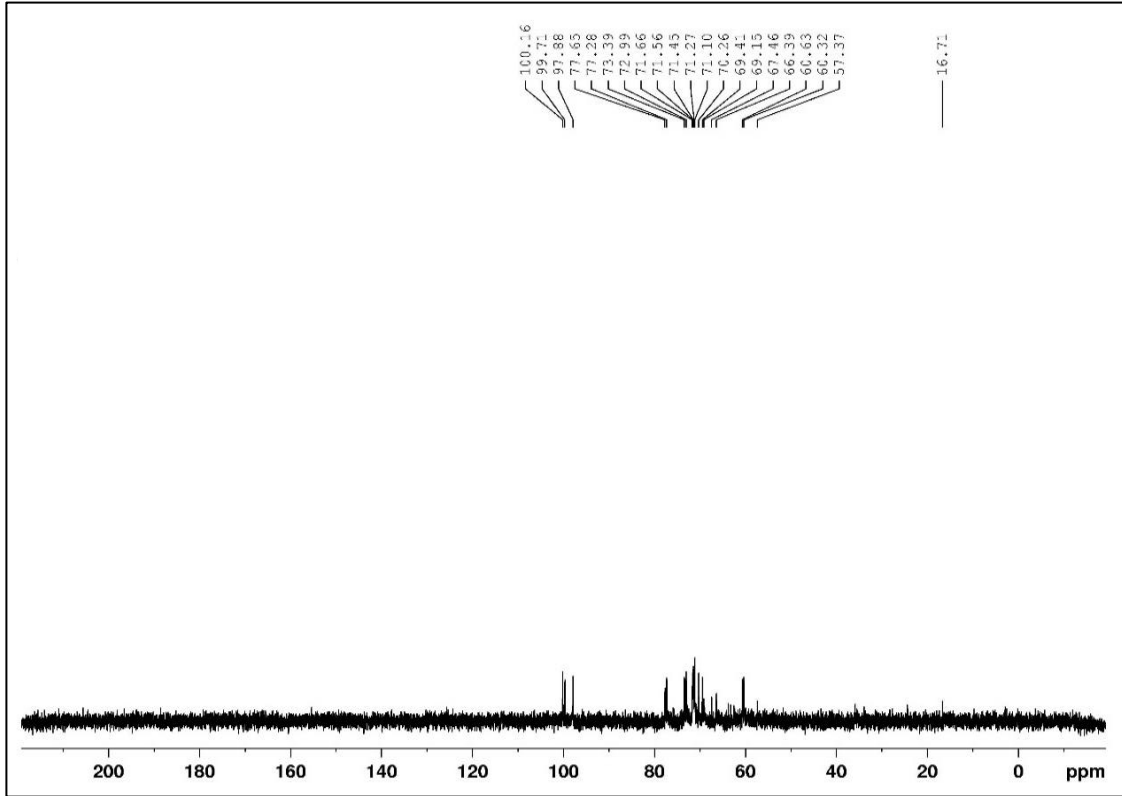
*Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'den pullulan üretim prosesi sonucunda elde edilen polimerin karakterizasyonu karbon ( $^{13}\text{C}$ NMR) ve proton analizleri ( $^1\text{H}$ NMR) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9.) Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar saf pullulan verileriyle karşılaştırılmış ve elde ettiğimiz polimer piklerinin saf pullulan pikleri ile örtüştüğü gözlemlenmiştir.

Saflaştırılmış pullulan örneğinin proton NMR pikleri  $W_{2.9}$  ile  $W_{5.4}$  arasında görünürken karbon NMR pikleri ise  $W_{20.0}$  ile  $W_{100.0}$  arasında görülmektedir. Gerçekleştirilen  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  analizleri doğrultusunda pikler standart pullulan pikleri ile aynı olup, elde edilen biyopolimerin pullulan olduğunu göstermektedir.

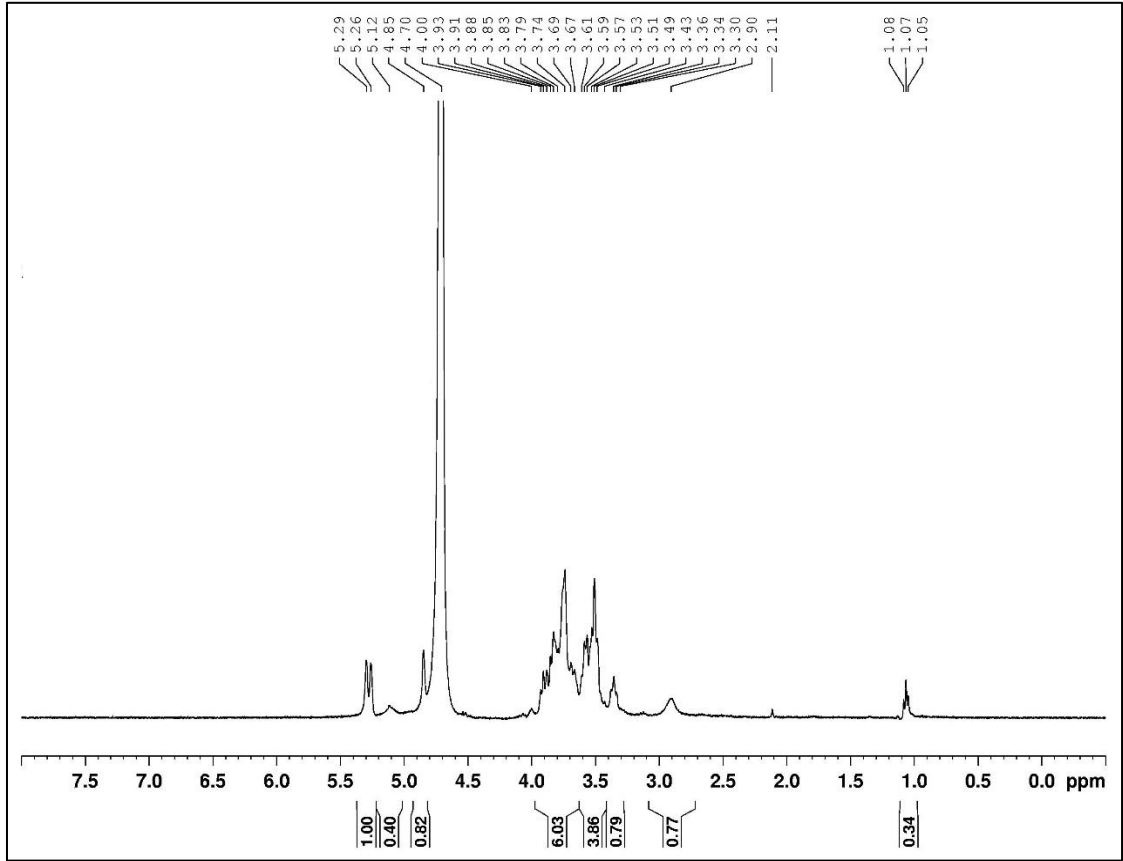
Guoqiang Chen ve arkadaşlarının 2017 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucu elde ettikleri pullulan biyopolimerinin  $^1\text{H}$ NMR ( $W_{3.3}$  -  $W_{5.4}$ ) ve  $^{13}\text{C}$ NMR analizlerinde ise ( $W_{20.0}$  -  $W_{220.0}$ ) benzer pikler elde etmişlerdir [137].

Marieta Constantin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, sentezledikleri polimerinin pullulan olduğunu  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$ NMR analizler sonucunda elde ettikleri piklere dayanarak tesbit etmişlerdir.  $^1\text{H}$  NMR analizi sonucunda 4.98, 5.38 ve 5.42 ppm'de elde ettikleri piklerin  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) ve  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) bağlarını gösterdiklerini belirtmişlerdir [138].

Jinyu Yang ve arkadaşlarının *Aureobasidium pullulans* NCPS2016 suşundan ürettikleri polimerin pullulan olup olmadığını belirlemek için NMR analizlerini kullanmışlardır. Bu analizler doğrultusunda proton NMR analiz sonuçları  $W_{3.3}$  ve  $W_{5.4}$  arasında pikler gösterirken,  $W_{60.2}$  ve  $W_{101.5}$  ise karbon NMR analiz piklerine işaret etmektedir. Elde edilen bu pikleri değerlendirerek üretilen polimerin pullulan olduğunu rapor etmişlerdir [139].



Şekil 4.8. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'den elde edilen pullulanın  $^{13}\text{C}$  NMR analiz sonucu.



Şekil 4.9. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'den elde edilen pullulanın HNMR analiz sonucu.

#### 4.3.2. Pullulan Biyopolimer Optimizasyonları

Yapılan deneyler doğrultusunda pullulan üretimi kesinleştikten sonra optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.2.1. Pullulan Biyopolimeri Üretim Ortamı Optimizasyonları

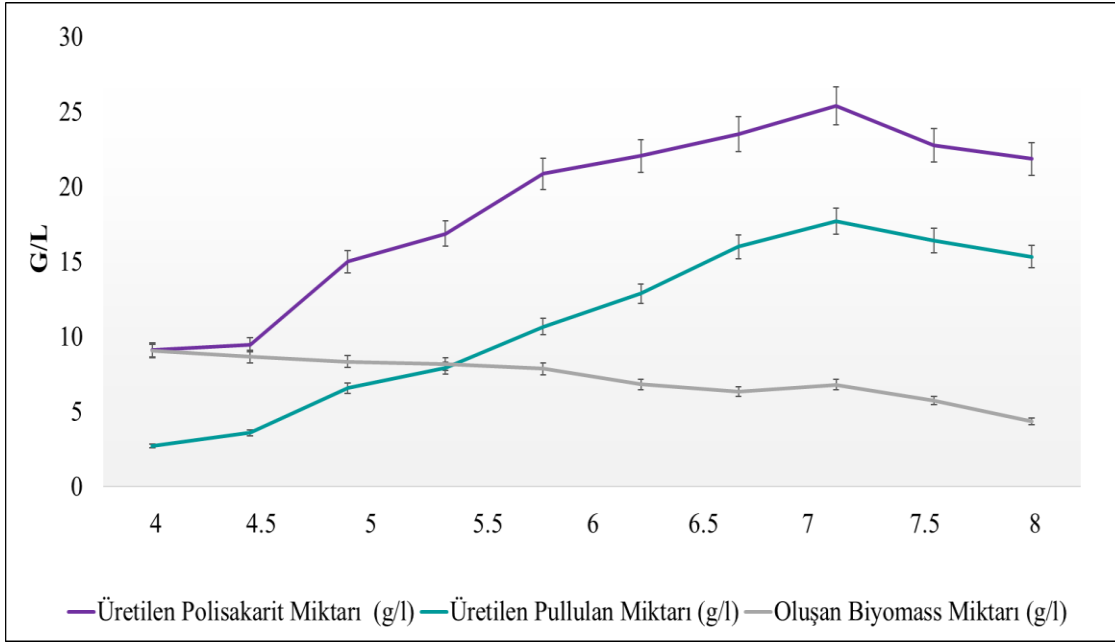
Tüm üretim ortamı optimizasyonu çalışmalarında deneyler 3 paralel olarak tekrarlanmıştır. Belirlenen parametreler teker teker denenerek bir sonraki parametrenin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.2.1.1. Üretim Ortamı pH'sının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Yüksek verimde pullulan eldesi için uygun pH'yı belirlemek amacıyla mikroorganizma 4.0 - 8.5 pH değerlerinde hazırlanan besiyerlerine inokule edilmiştir. İnokülasyon sonrası



besiyerleri 3 gün boyunca 28°C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. pH 7.5’da en yüksek pullulan üretimini gerçekleştirmiştir. (Şekil 4.10)



Şekil 4.10. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253’un kültür ortamında farklı pH larda polisakarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde mikrobiyal kaynaklardan üretilen pullulanın en uygun koşullarının belirlenmesi için farklı optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Kimyasal koşullardan biri olan pH optimizasyonu en önemli parametrelerden birisidir.

Guoqiang Chena’nın, *Aureobasidium pullulans* suşu ile yaptıkları çalışmada farklı başlangıç pH değerlerinde pullulan üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar en yüksek pullulan verimini 4 g/L tween 80 konsantrasyonunda ve pH 4’te 125 g/L olarak ölçmüşlerdir. Kullanılan mikroorganizmanın pH 4’ün altında üremesinin düşük olması levan üretimini de etkilemiştir [137].

K.R. Sugumaran ve arkadaşlarının 2013’te yaptıkları çalışmada, 4 farklı artık madde ile *Aureobasidium pullulans* suşunu kullanarak pullulan üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada pullulan üretiminin çeşitli optimizasyonlarına yer vermişlerdir. Pullulan üretiminde pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 denenerek pH’nın etkisi incelenmiştir. En yüksek levan üretimi pH 6.5’da 18.43 g/L olarak bulunmuştur [140].

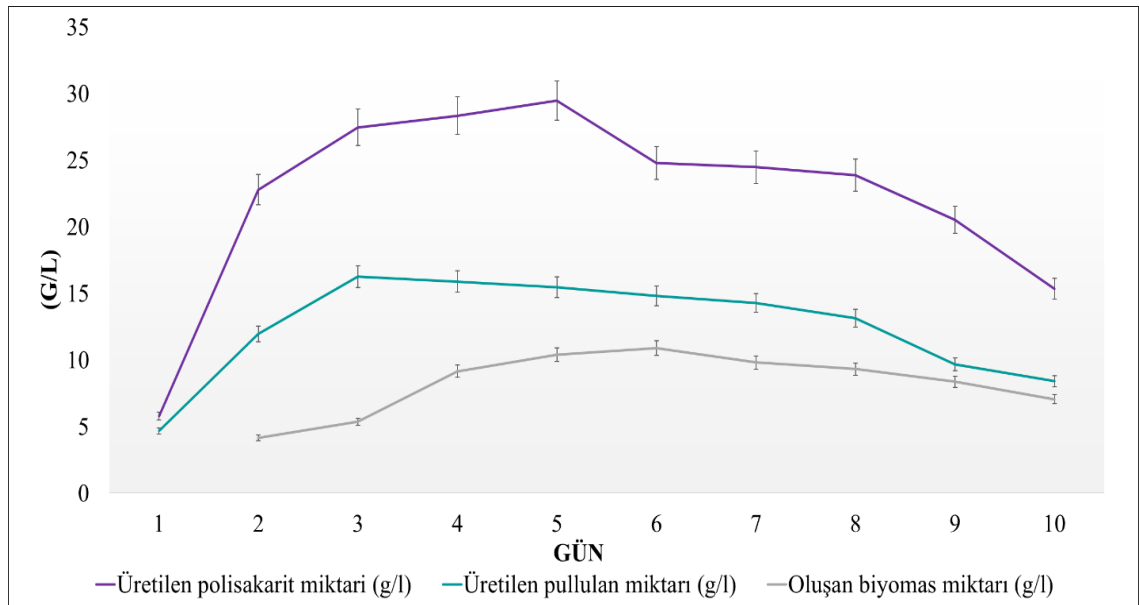
Bir diğer çalışmada ise, pullulan biyopolimerinin üretimi için yeni bir mikroorganizma ile çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada *Rhodospiridium paludigenum* PUPY-06 suşundan pH 4’te pullulan üretimi gerçekleştirmişlerdir [141].

İnkübasyon ortamının pH'sının hücre zarını, besin maddelerinin alınımını ve eksopolisakkarit biyosentezini etkileyebilecek önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Biyokütle ve polisakkarit üretimi için farklı optimum pH koşullarına ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin, Ranjan Singh ve arkadaşlarının *Aureobasidium pullulans*'ın pullulan üretimi için buldukları optimum başlangıç pH'sı 5.0 iken mikroorganizmanın üremesi için bulunan pH değerinin 6.5 olduğunu rapor etmişlerdir [142].

Tez kapsamında üretilen pullulan biyopolimerinin pH optimizasyonunun sonucunda üretilen en yüksek polisakkarit ve pullulan pH 7.5'ta sırasıyla 25.39 g/l ve 17.67 g/l iken oluşan biyomass miktarı pH 4'te 9.03 g/l dir.

#### 4.3.2.1.2. İnkübasyon Zamanının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Mikroorganizmanın yüksek miktarda pullulan ürettiği inkübasyon zamanını belirlemek amacıyla inkübasyonun belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 600 nm'de ölçülerek üreme eğrisi çıkartılarak üreme eğrisi doğrultusunda üretilen biyopolimer değerlendirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek EPS ve pullulan üretimi sırasıyla 5. ve 3. günde, en fazla üreme ise 6. günde gerçekleşmiştir. (Şekil 4.11)



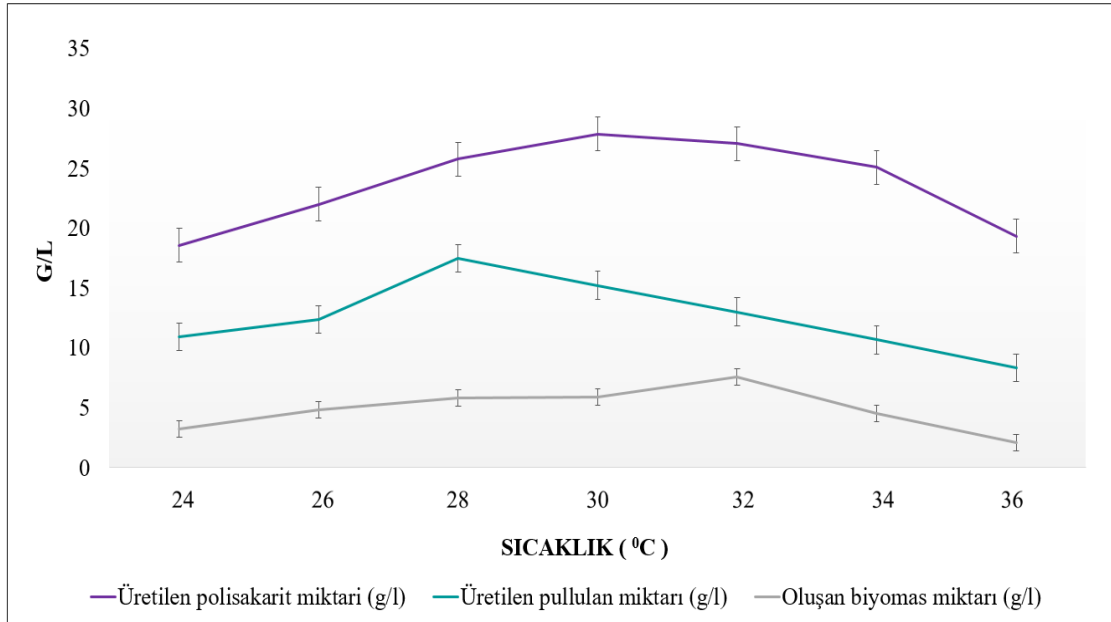
Şekil 4.11. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'un kültür ortamında zamana göre polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.

Guoqiang Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pullulan üretimi için farklı inkübasyon sürelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada en yüksek pullulan ve biyomass 14. saatte görülmektedir.

2018'te pullulan üretimi için gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise üretimin gerçekleştirilmesi için 25°C'de 10 günlük bir deney yapılmıştır. Bu çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre 7.günde en yüksek pullulan ve biyomass elde edilmişken 8.günden itibaren pullulan ve biyomass miktarında azalma görülmüştür [142]. Bir diğer benzer çalışmada ise inkübasyon süresinin pullulan üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada ortam pH'sı 6.5 iken 8 günlük inkübasyon süresinin sonunda 7.günde en yüksek pullulan elde edilmiştir [140].

#### 4.3.2.1.3. Sıcaklığın Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Mikroorganizmanın sıcaklığa göre biyopolimer üretim verimini belirlemek amacıyla kültürler inokulasyondan sonra 24°C, 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C ve 36 °C 'de 200 rpm'de çalkalamalı etüvde 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu sonucunda en yüksek pullulan üretimi 28°C'de 17.45 g/l olarak elde edilmiştir. (Şekil 4.12 ).



Şekil 4.12. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'un kültür ortamında sıcaklığa göre polisakarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.

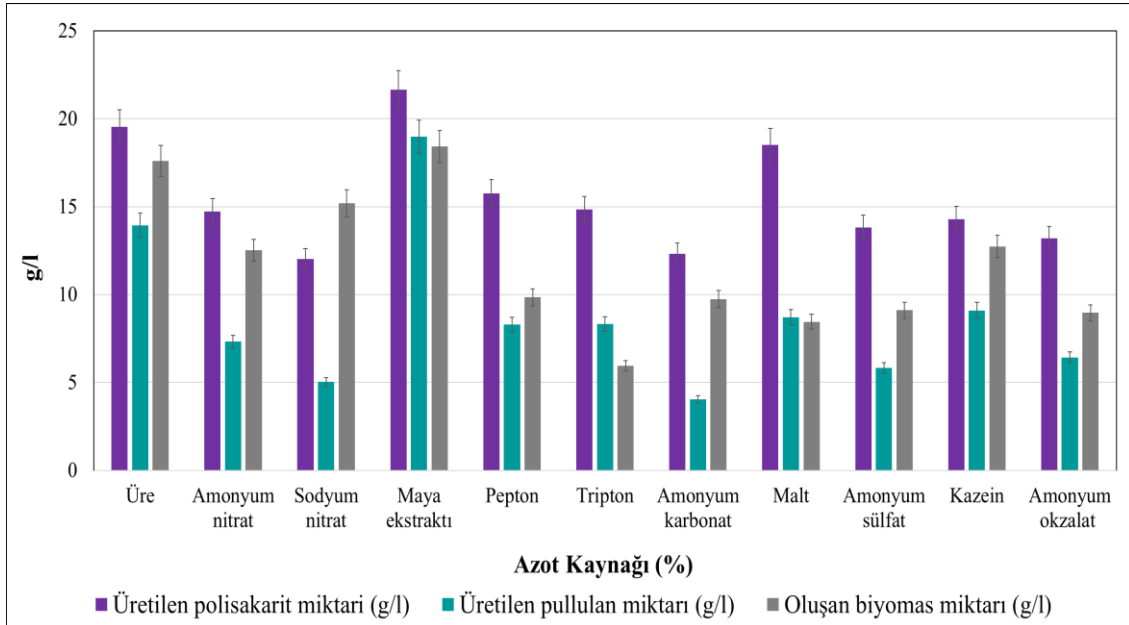
Elde edilen veriler grafiksel olarak değerlendirildiğinde, sıcaklık arttıkça polimer ve polisakkarit üretiminde azalma görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, sukroz içeren besiyerine, pH 5’de mikroorganizma inoküle edilmiş ve sıcaklıklar 30°C, 37°C, 43°C, 50°C and 60°C’ye ayarlanarak 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. En yüksek pullulan verimi 37 °C’de (4.3±0.03g/100ml) görülmüştür. Sıcaklık arttıkça pullulan üretimi azalmıştır [142].

Yapılan bir diğer çalışmada ise, pullulan üretimi için 25°C’de kullanılmıştır. Bu çalışmada pullulan üretimi için *Rhodospiridium* türü kullanılarak 25°C’de, 7 gün boyunca 150 rpm’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda pullulan üretiminin gerçekleştirildiği tesbit edilmiştir [141] .

#### 4.3.2.1.4. Azot Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

*Aureobasidium pullulans* ATCC 20125’un hangi azot kaynaklarında daha fazla pullulan üretimi gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla çalışmamızda 11 çeşit farklı azot kaynağı kullanılmıştır. Bunun için her bir besiyerinde içerik sabit olup sadece azot kaynağında değişiklik yapılmıştır. İnokülasyon sonrası besiyerleri 3 gün 28°C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 11 çeşit farklı azot kaynağı çalışmamızda en fazla pullulan üretimi maya özütünde ölçülmüştür. (Şekil 4.13)



Şekil 4.13. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253’un kültür ortamında farklı azot kaynaklarına göre polisakkarit, pullulan ve biyomass miktarının optimizasyonu.

3 gün inkübasyon sonrası *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'un azot kaynağı olarak maya özütü kullanarak ürettiği pullulan miktarı 18.9 g/L olarak belirlenmiştir. Maya özütünden sonra en yüksek levan üretimi ise azot kaynağı olarak üre kullanılan besiyerinde kullanılan ürede 13.94 g/L olarak ölçülmüştür. Maya özütünde ve ürede gerçekleşen üreme miktarları birbirine oldukça yakındır. Amonyum karbonatta üreme ve buna bağlı olarak pullulan üretimi kullanılan azot kaynakları içerisinde en düşük miktarda gerçekleşmiştir. Diğer karbon kaynakları incelendiğinde diğer kaynakların maya özütüne göre daha düşük pullulan verimi gösterdiği belirlenmiştir.

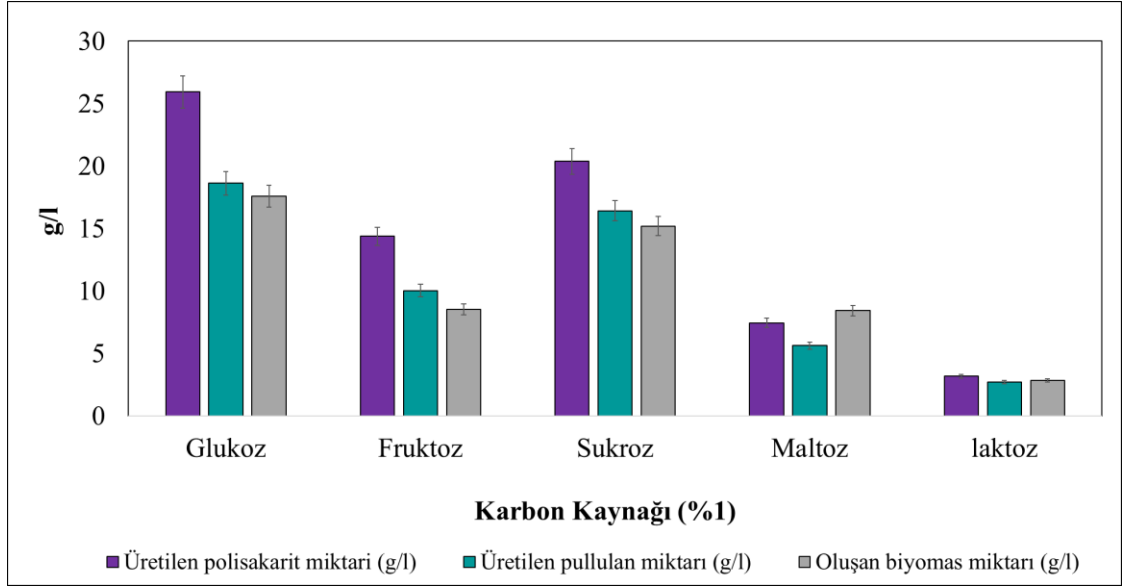
Birkaç araştırmacı daha önce azot kaynaklarının pullulan üretimi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir.

Jinyu Yang ve arkadaşlarının 2018'de yaptıkları çalışmada. Pullulan biyopolimerinin üretimi için çeşitli üretim ortamlarına farklı azot kaynakları ilave etmişlerdir. Çalışmada, azot kaynağı olarak soybean meal hydrolysates (SMHs),  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  ve  $(NH_4)_2SO_4$  kullanmışlardır. En yüksek pullulan üretimi sırasıyla  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  8.83 g/L, SMHs 7.71 g/L ve  $(NH_4)_2SO_4$  0.35 g/L kullanıldığı ortamlardan elde edilmiştir [139].

Mikroorganizmaların üremesi ve enzim üretimi farklı koşullar ve parametrelerden etkilendiği gibi azot kaynağından da etkilenmektedir. Yapılan bir çalışmada Asya hurma çekirdeklerinden izole ettikleri *Aureobasidium pullulans*'dan pullulan üretimi çalışmasında amonyum sülfat, amonyum klorür, pepton, maya ve malt özü azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışma bulgularına göre en iyi verim maya özütü (16.85 g/L) içeren üreme ortamında gerçekleşmiştir [140].

#### **4.3.2.1.5. Karbon Kaynağının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi**

Besiyerlerine karbon kaynağı olarak 5% (w/v) içeriğinde Glukoz, Fruktoz, Sukroz, Maltoz, ilave edilerek kültürler uygun sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Denenen karbon kaynakları arasından en yüksek verim elde edilen karbon kaynağı seçilip farklı oranlarda (%1, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30) üretim ortamına ilave edilerek optimizasyon sağlanmıştır. Pullulan üretiminde en verimli karbon kaynağı olarak glukoz belirlenmiştir. (Şekil 4.14)



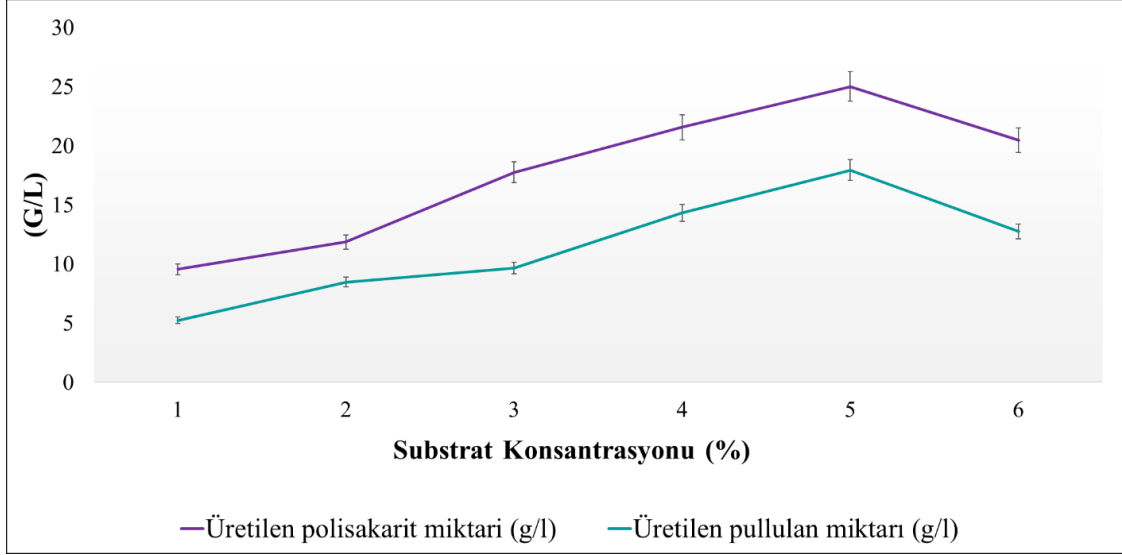
Şekil 4.14. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'un kültür ortamında farklı karbon kaynaklarına göre polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarının optimizasyonu.

Pullulan sentezinde en önemli parametrelerden biri olan karbon kaynağı olarak, birçok şeker *A.pullulans* tarafından mikroorganizma üremesi ve polisakkarit üretimi için kullanılabilir. Tatlı patates, hindistan cevizi yan ürünleri, nişastanın hidrolizat ürünleri, şeker kamışı ve keçiyoynuzu pullulan üretiminde çalışılmış çeşitli karbon kaynaklarındandır [143] [144].

Çeşitli araştırmalar, farklı karbon kaynaklarının EPS verimi üzerinde etkileri olduğunu göstermiştir [145]. Bu nedenle, yapılan bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* UVMU6-1'in kuru biyokütle ve pullulan üretimi üzerindeki etkisi glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz dahil olmak üzere incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde glukoz kullanıldığında diğer kaynaklara göre daha iyi verim elde edildiği belirtilmiştir [137].

#### 4.3.2.1.6. Substrat Miktarlarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Substrat miktarlarının pullulan üretimini nasıl etkilediğini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 3 gün, 28°C sıcaklıkta glukoz miktarının farklı oranlarının (%1, %2, %3, %4 ve %5 (v/v)) üretim besiyerine eklenmesi ile denemeler yapılmıştır. Besi ortamında %5 oranında glukoz bulunduğunda en fazla pullulan üretimi gerçekleştirilmektedir.



Şekil 4.15. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'un kültür ortamında glukoz miktarına göre polisakarit, pullulan ve biyomass miktarının optimizasyonu.

Pullulan üretimi ile ilgili raporların çoğunda substrat olarak glukoz veya sukroz kullanılmıştır.

Anirban Roy Choudhury ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada besiyerinde %5 glukoz içeren deney ortamında pullulananın zamana göre artışı incelenmiştir. 30°C'de inkübasyona bırakılan *A. pullulans*, %5'lik glukoz içeren ortamda 26.35 g/l, %25'lik glukoz içeren ortamda ise en yüksek pullulan üretimini 43.29 g/L olmak üzere 96. saatte gerçekleştirmiştir [146].

Gibson and Coughlin yaptıkları çalışmada, glukoz ve sukroz miktarlarının *A. pullulans* NRRLY-2311-1 tarafından üretilen pullulan biyopolimerinin üzerindeki etkilerini incelemiştir. Elde ettikleri veriler incelendiğinde ise, % 5 oranlı glukoz ve sukroz içerikli ortamlarda sukrozun EPS üretim veriminin glukozu göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir [147].

Üretim ortamı optimizasyonu sonucunda elde edilen tüm sonuçlar göz önüne alınıp optimum koşullarda üretim gerçekleştirilerek maksimum miktarda pullulan üretilmiştir.

Çizelge 4.2. Optimum koşullarda üretilen pullulan biyopolimeri.

İnkübasyon koşulları	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (gr/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
pH 7.5 3. gün 28°C 200 rpm %5 glukoz %1 Maya ekstresi	42.8	32.89	17.89

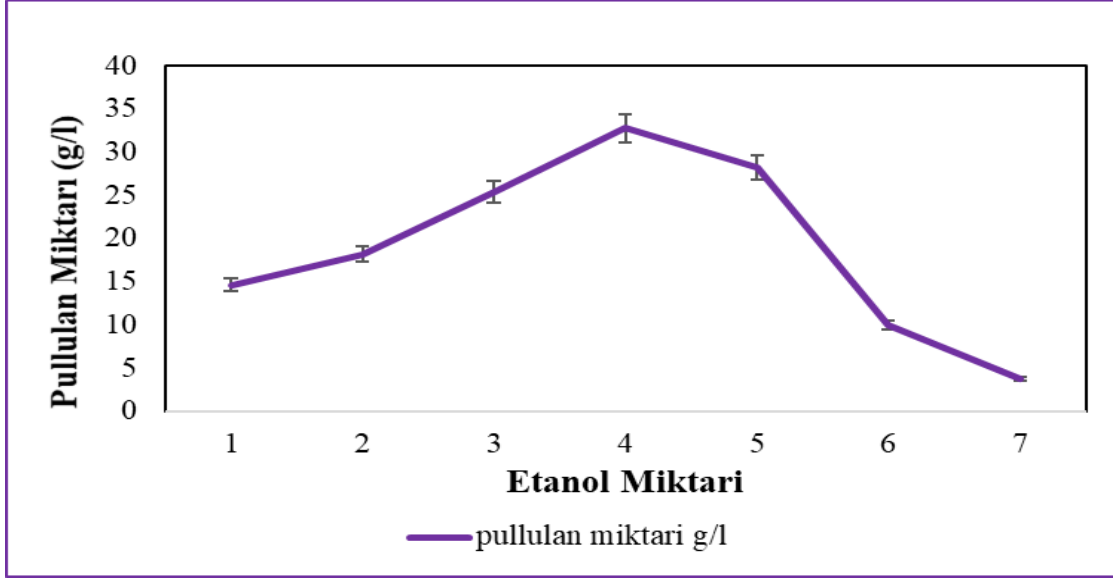
#### 4.3.2.2. Pullulan Biyopolimeri Reaksiyon Ortamı Optimizasyonları

Yukarda belirtilen optimizasyonların yanı sıra en fazla pullulan üretimini sağlamak amacıyla reaksiyon koşullarının optimizasyonu Çizelge 3.4. belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.2.2.1. Etanol Miktarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Reaksiyon ortamına eklenen etanol miktarının belirlenmesi için farklı oranlarda etanol kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda santrifügasyona tabi tutularak elde edilen supernatantın üzerine farklı oranlarda etanol (örnek: etanol sırasıyla 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5) eklenerek reaksiyon başlatılarak optimum etanol miktarı elde edilen pullulan miktarına göre belirlenmiştir.



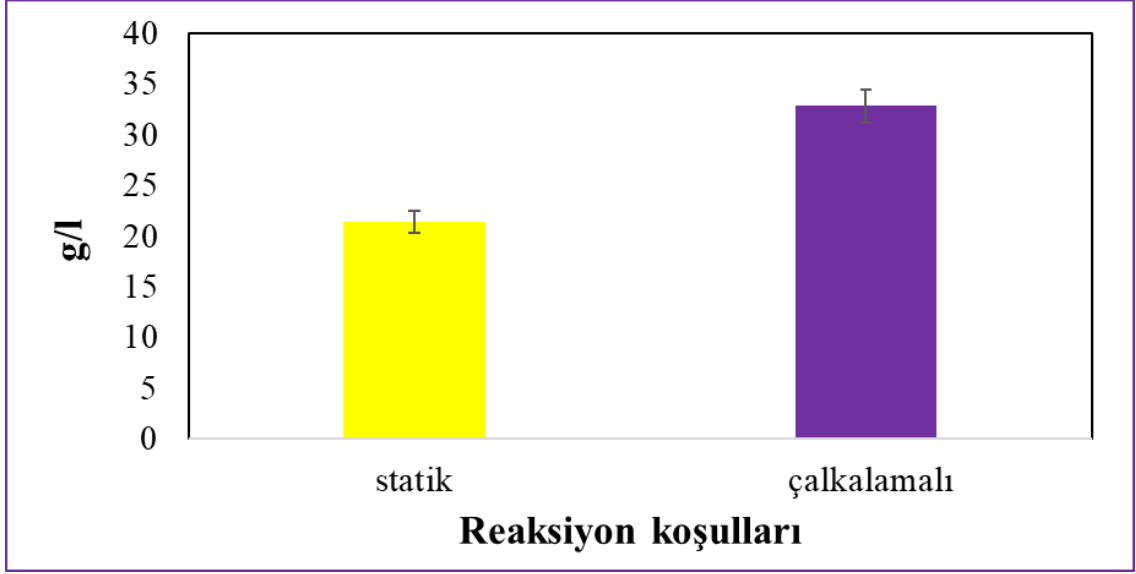


Şekil 4.16. Reaksiyon ortamı etanol miktarının pullulan üretimi üzerine etkisi.

K.R. Sugumaran ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pullulan biyopolimerinin saflaştırılması için 1:2 oranında etanol kullanmışlardır [140]. Benzer bir diğer çalışmada ise, santrifügasyon işlemi sonunda elde edilen supernatan 1:2 oranında etanol ile karıştırılarak pullulanın çökmesini gerçekleştirmişlerdir [146].

#### 4.3.2.2.2. Reaksiyon Ortamı Karıştırma / Statik Koşullarının Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Statik ve çalkalamalı koşullarının pullulan üretimi üzerine etkisini belirlemek için aynı anda iki farklı deney planlanmıştır. Deneylerde tüm koşullar sabit olup sadece reaksiyon ortamı farklıdır. I. Deneyde reaksiyon ortamı koşulları çalkamalı iken, II. deney koşullarında reaksiyon ortamı statik olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için üretim sonucu elde edilen supernatantın üzerine etanol ilave edildikten sonra reaksiyon ortamı biri statik koşullarda diğeri ise karıştırılarak reaksiyon başlatılmıştır. Böylece en uygun reaksiyon koşulunda maksimum pullulan elde edilmiştir.



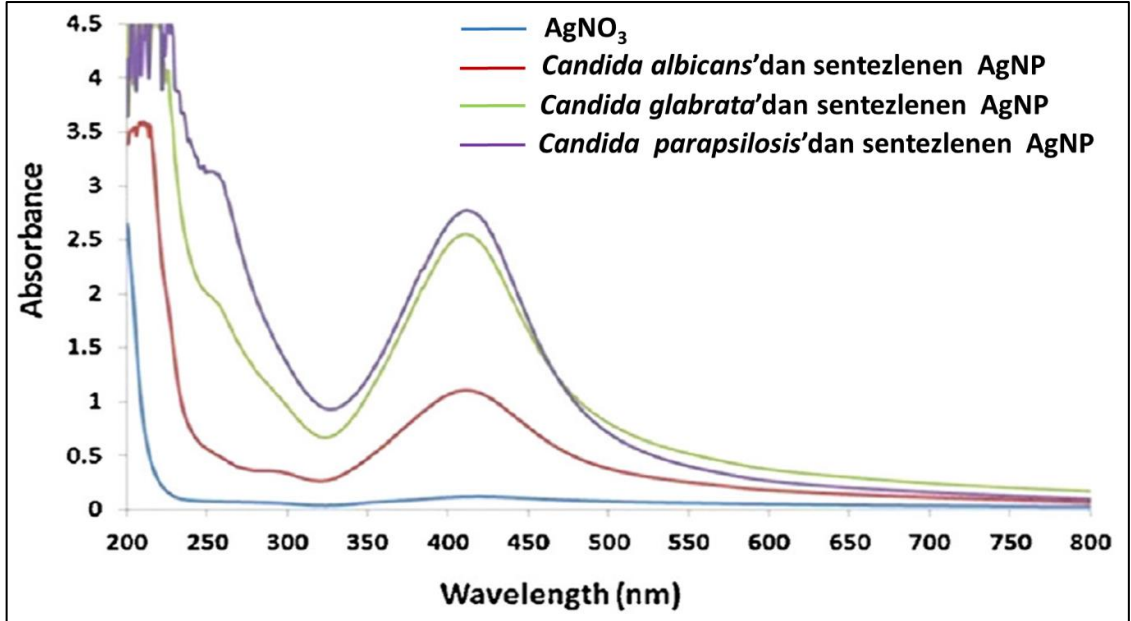
Şekil 4.17. Reaksiyon ortamı karıştırma/statik koşulların pullulan üretimi üzerine etkisi.

### 4.3. Elde Edilen Biyomalzemelerin Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Gümüş Nanopartiküllerin karakterizasyonu

##### 4.3.1.1. Ultraviyole (UV) ve görünür bölge spektroskopisi

*Candida* türlerinden sentezlenen AgNP'lerin absorpsiyon spektrumu, Şekil 4.18'de gösterilmektedir. Sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrumu, 410-420 nm'de yoğun bir absorbans pik göstermiştir.



Şekil 4.18. *Candida* türlerinden sentezlenen AgNP'lerin UV-vis spektrumu.

Araştırmacıların gerçekleştirdikleri çalışmaları sonucunda AgNP'lerin 410-450 nm dalga boyunda yzey plazmon rezonansının kresel nanopartikller gsterdiğini rapor eden birkaç çalışma bulunmaktadır [148][134][149].

Samundeeswari ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, mikrobiyal yollardan sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonunda UV-görünür bölge Spektrofotometre analizi kullanmışlardır. Gerçekleştirdikleri bu analizler sonucunda bu nanopartikllerin maksimum absorbands değerinin 409 nm dalga boyunda olduğunu gstermişlerdir.

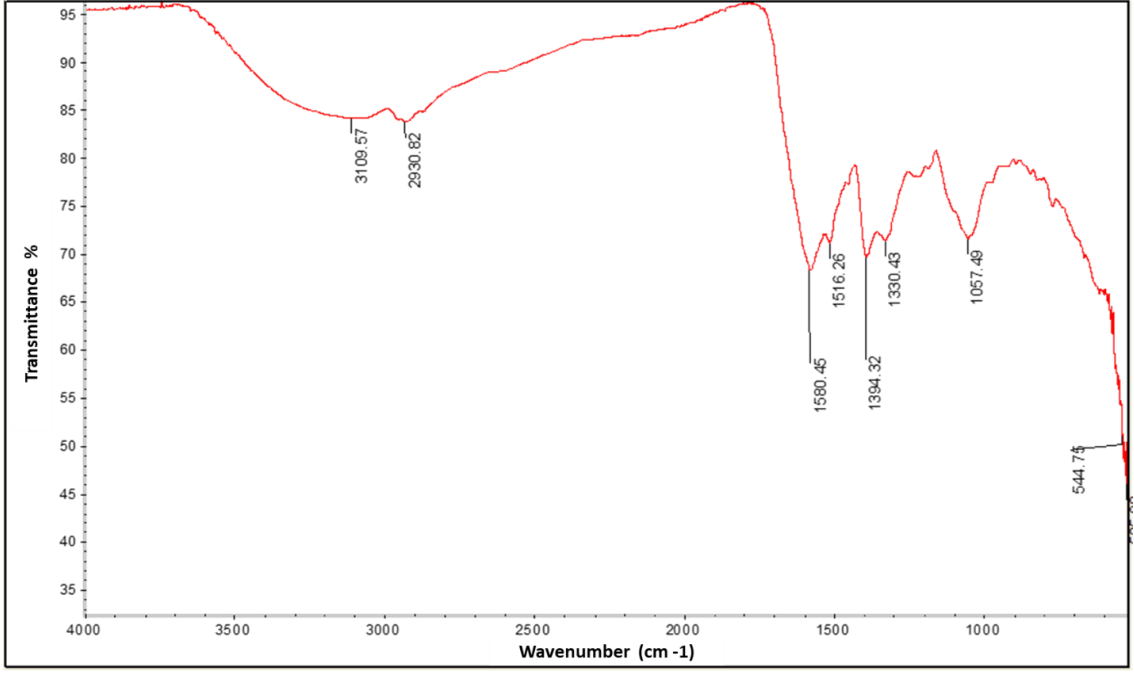
R.R. Remya ve arkadaşlarının 2015'te yaptıkları çalışmada, *Cassia fistula* bitki ekstrelerinden sentezledikleri AgNP'lerin 422nm'de maksimum absorbands gsterildiği belirlenmiştir [150].

Benzer diğer çalışmalar incelendiğinde, yeşil yollardan sentezlenen gümüş nanopartikllerin UV-görünür bölge Spektrofotometre analiz değerlerinin benzer sonuçlar verdikleri rapor edilmiştir [151][152] .

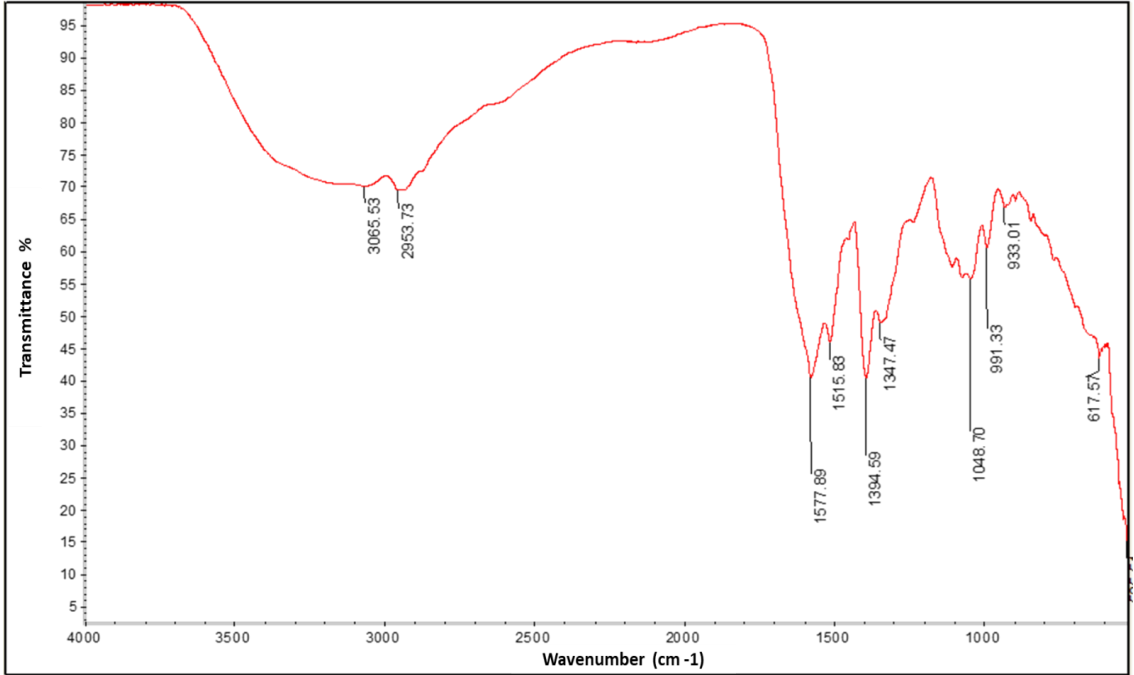
#### **4.3.1.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi**

Tez kapsamında elde edilen nanopartikllerin gümüş haricinde hangi bileşiklere sahip olduğunu anlayabilmek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Biyolojik yollardan sentezlenen gümüş nanopartikllerin biyosentezinde görev alan fonksiyonel gruplar, Ag<sup>+</sup> iyonlarını indirgeyerek oluşan nanopartikllerin üzerine bağlanmaktadır. Bu amaç için hazırlanmış örnekler FTIR cihazı ile analiz edilmiştir. Saflaştırılmış gümüş nanopartikllerden elde eden FTIR spektrumları şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de gsterilmiştir.

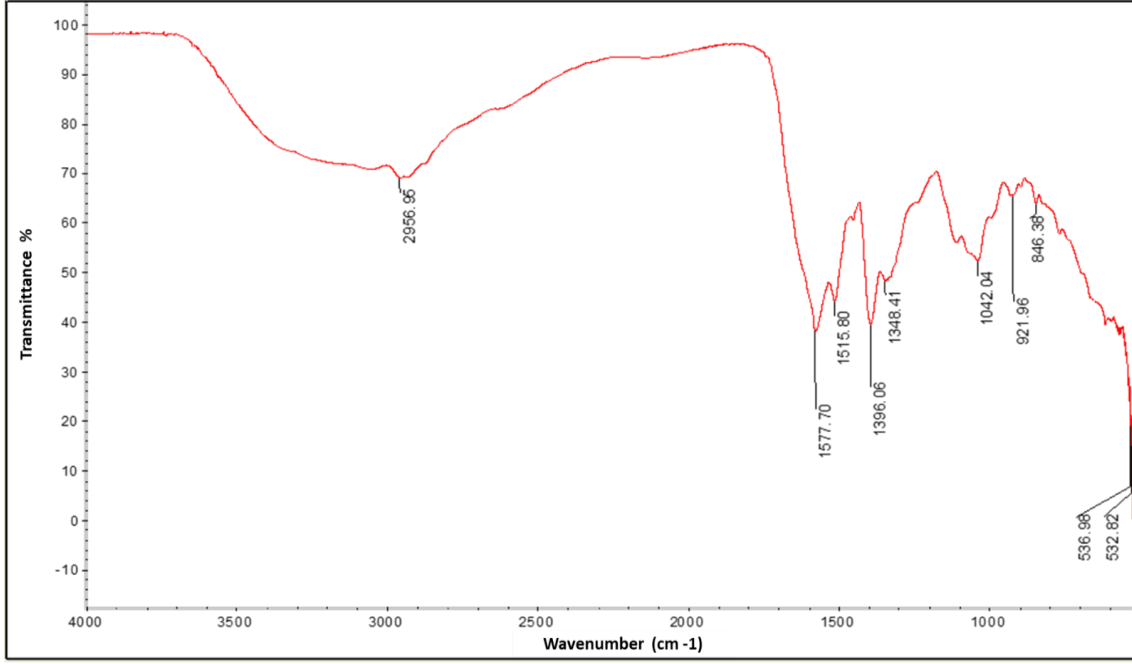
*Candida* türlerinden sentezlenen AgNP'lerin FT-IR spektrumu 4000-500 cm<sup>-1</sup> aralığında 4 cm<sup>-1</sup> özünürlükte alınmıştır.



Şekil 4.19. *Candida parapsilosis*'ten üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.



Şekil 4.20. *Candida glabrata*'dan üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.



Şekil 4.21. *Candida albicans* 'tan üretilen AgNP'lerin FTIR görüntüsü.

Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de elde edilen diyagramlar incelendiğinde, mikrobiyal hücre ekstresinde bulunan bileşikler gümüş nanopartikül yüzeyine bağlanmıştır. Şekil 19'da 1057.49, 1330.43, 1394,32, 1516.26, 1580.45, 2930.82 ve 3109.57 frekans pikleri, şekil 20'de 1048.70, 1347,47, 1394.59, 1515.83, 1577.89, 2953.73 ve 3065.53 frekans pikleri ve şekil 21'de 1042.04, 1348.41, 1396.06, 1515.80, 1577.70 ve 2956,95 frekans pikleri, amino asitlerin ve protein yapısında sık bulunan piklerdir. Dolayısı ile *Candida* türlerinin hücre ekstresinde bulunan enzimler, gümüş nanopartiküllerin üretimi ve bu enzimlerin yüzey aktif madde olarak davranışlarını belirlemiştir. Enzimlerin yapısında var olan karboksilik asit ve amin gruplarının, Ag<sup>+</sup> iyonlarının indirgenmesinde ve bu iyonların nanopartikül şeklini almasında yardımcı olduğu düşünülmektedir.

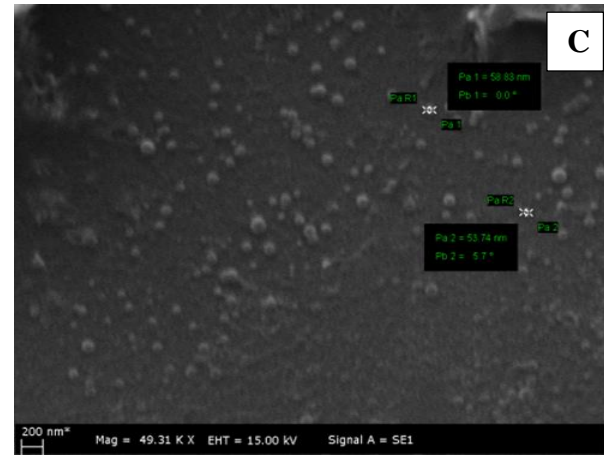
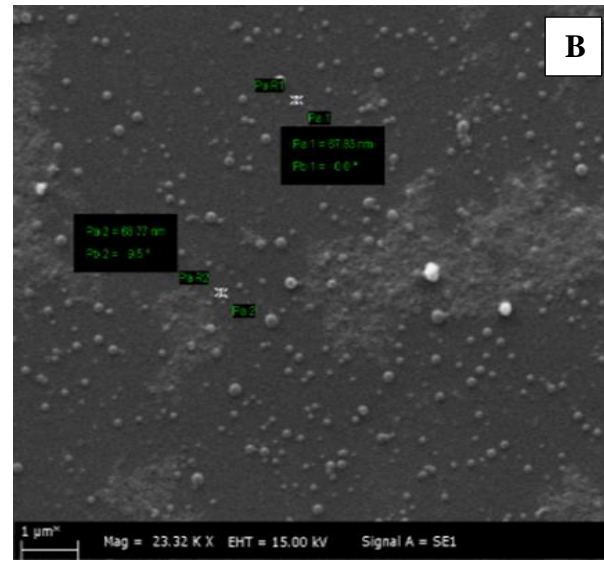
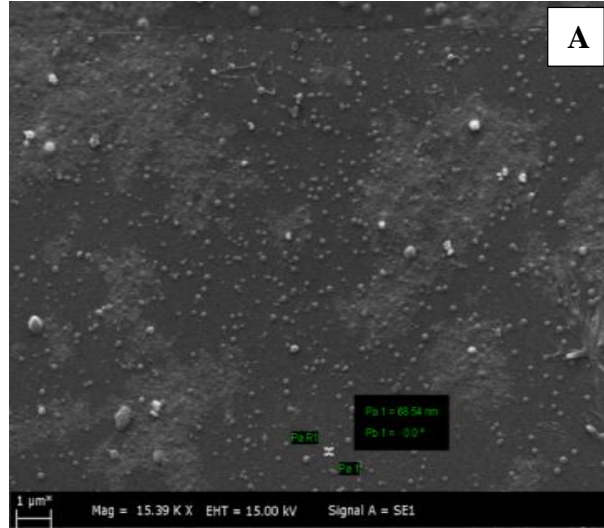
Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür [128][153][154][155]. FT-IR çalışmaları, proteinlerin amid gruplarının, yüksek miktarda metallerle bağlanma kapasiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir, böylece proteinlerin nanopartikülleri stabilize etmek için kapaklama maddesi görevi gördüklerini doğrulanmıştır [156].

### 4.3.3. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

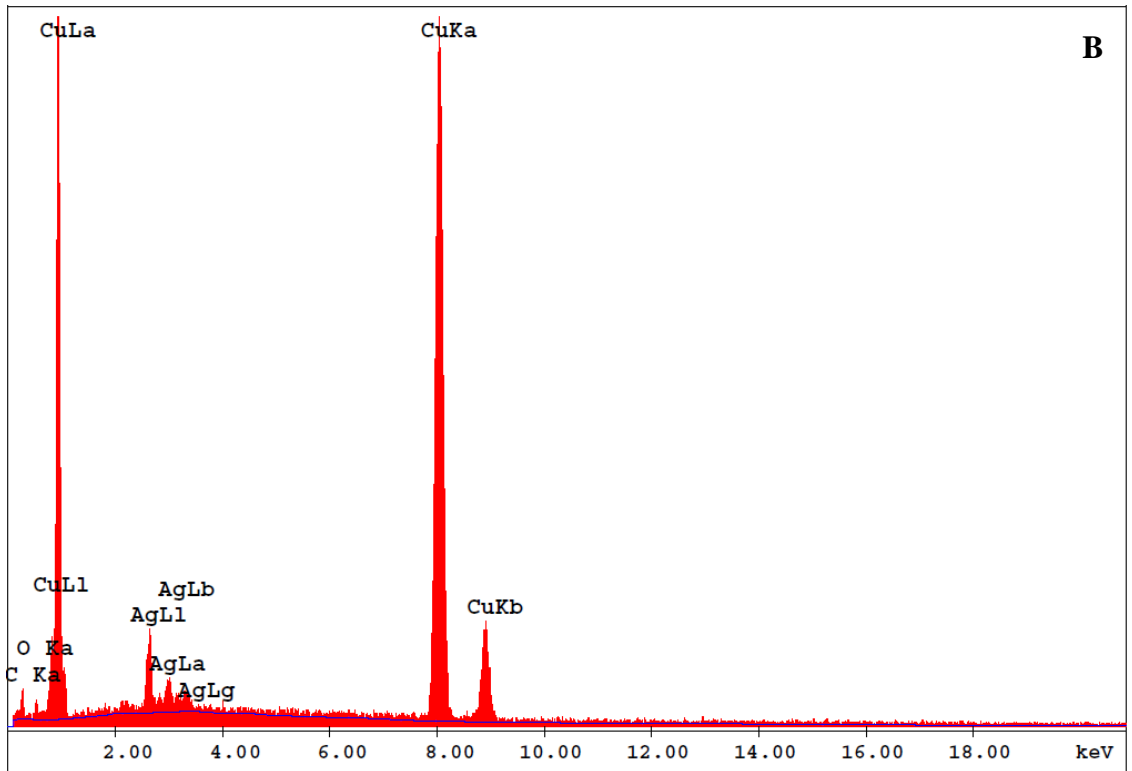
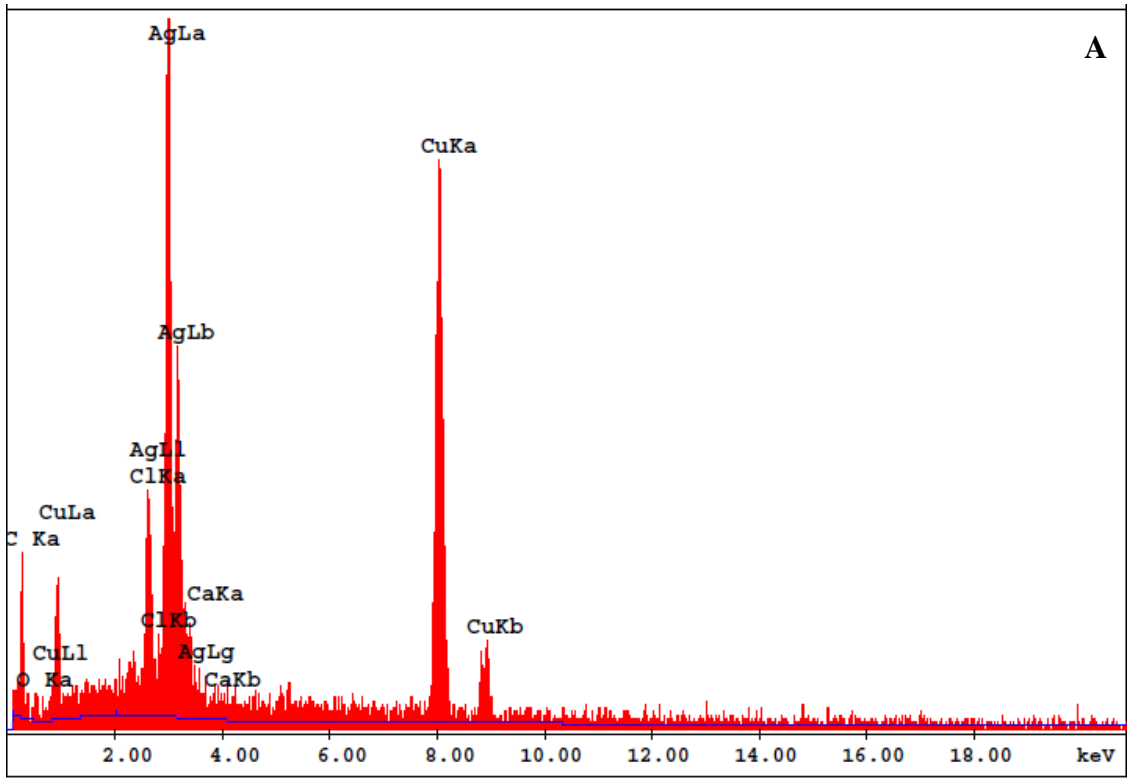
*Candida* türleri tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin şeklini ve boyutunu göstermek için taramalı elektron mikroskopu analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizi sonucunda elde edilen görüntüler incelendiğinde, *Candida* türlerinin AgNP'leri sentezleme özelliklerinin olduğu belirlenmiş, sentezlenen nanopartiküllerin küreler halinde 50-70 nm civarında boy dağılımlarına sahip oldukları gösterilmiştir. SEM görüntüsü Şekil 4.22'de verilmiştir.

Deepa ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, *Actinomyces* tarafından sentezlenen AgNP'lerin SEM analizleri incelendiğinde, bu nanopartiküllerin 20-30 nm boyutlarında olduklarını belirtmişlerdir [157].

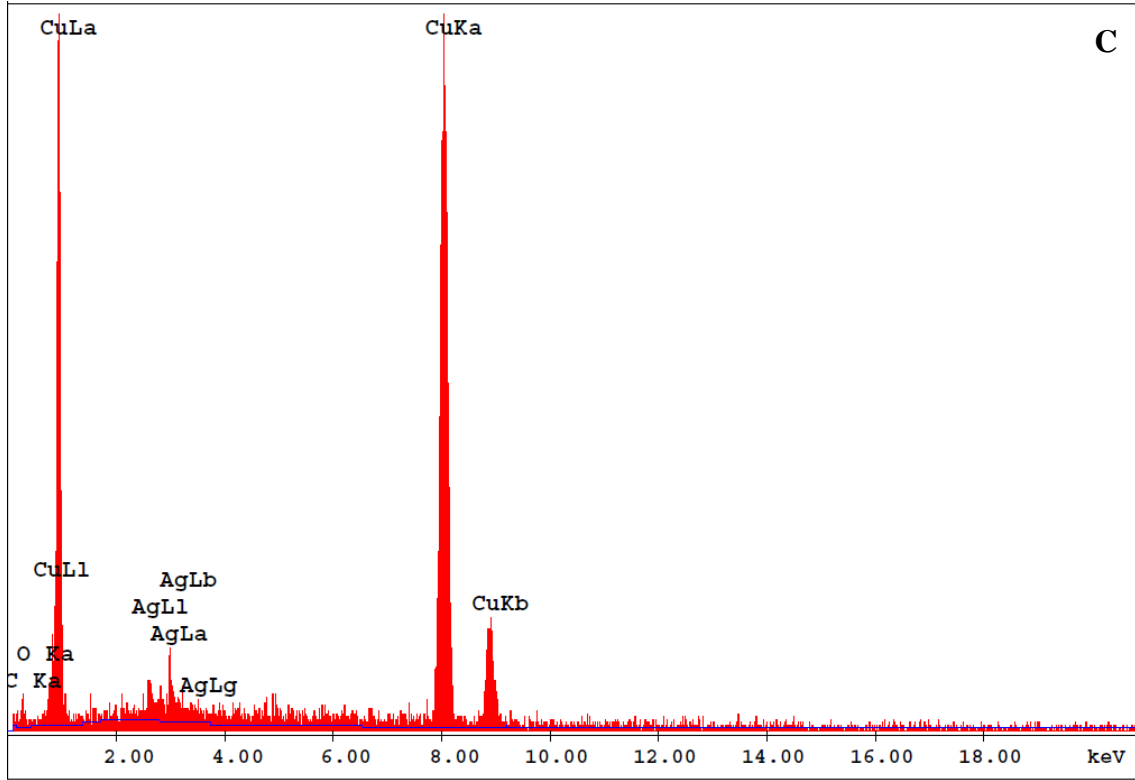
Saminathan 2015 yılında yaptığı çalışmada, biyolojik yollardan sentezlediği gümüş nanopartiküllerin küreler şeklinde ve boyutlarının 50 nm'den büyük olduklarını göstermiştir. Literatürdeki çalışmaların SEM analizleri incelendiğinde, biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin 10-100 nm boyutlarında ve farklı şekillerde oldukları rapor edilmiştir [128][158][159].



Şekil 4.22. *Candida* türlerinden üretilen AgNP'lerin SEM görüntüsü. A) *Candida parapsilosis*, B) *Candida glabrata*, C) *Candida albicans*.







Şekil 4.23. *Candida* türlerinden üretilen AgNP'lerin EDX spektrum görüntüsü A) *Candida parapsilosis*, B) *Candida glabrata*, C) *Candida albicans*.

SEM analizini yapıldıktan sonra, görüntülenen nanopartiküllerin SEM cihazı üzerinde entegre halde bulunan Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi ataçmanı ile elementel analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde ise, sentezlenen nanopartiküllerin Ag nanopartikülü olduğu doğrulanmıştır.

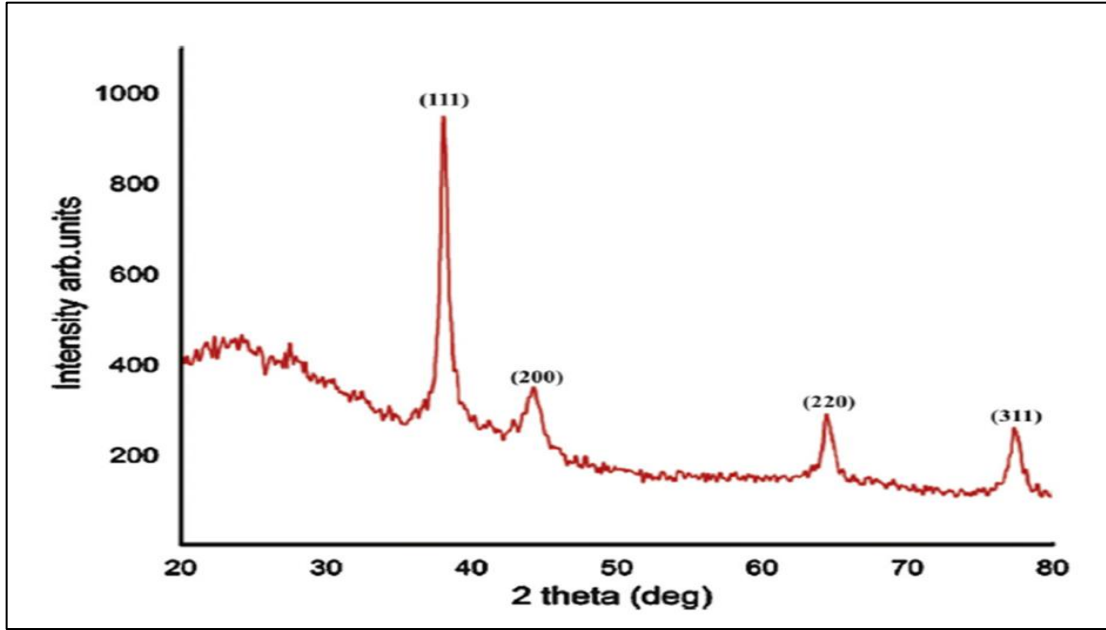
Şekil 4.23'de AgNP'lerin EDX spektrumu gösterilmiştir. EDX tarafından yapılan kalitatif ve kantitatif analizler, gümüş bölgesinde güçlü Ag sinyallerinin en yüksek spektruma sahip olmaları AgNP'lerin oluşumunu doğrulamaktadır. Gümüş nanopartiküllerin, yüzey plazmon rezonansı yaklaşık 3 KeV'de optik absorpsiyon noktası göstermiştir.

Kaviya ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, AgNP'lerin EDX analizlerini gerçekleştirmiş ve 3KeV'de Ag'nin en yüksek sinyali tesbit ederek AgNP'lerin varlığını belirtmişlerdir [160].

Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür [161][162][163].

#### 4.3.4. X-Işını difraksiyonu (XRD)

Biyosentez yoluyla elde edilen AgNP'lerin yapısı ile ilgili bilgi almak için toz haline getirilmiş nanopartiküller X-ışını difraksiyon aletinde analiz edilmiştir. Analiz sonucunda yoğun dört pik  $38^\circ$ ,  $44.27^\circ$ ,  $64.47^\circ$  ve  $77.3^\circ$ 'de elde edilmiştir; bu pikler sırasıyla 111, 200, 220 ve 311'e endekslenebilecek yoğun tepe pikleri olarak şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24 *Candida* türlerinden üretilen AgNP'lerin XRD spektrum görüntüsü.

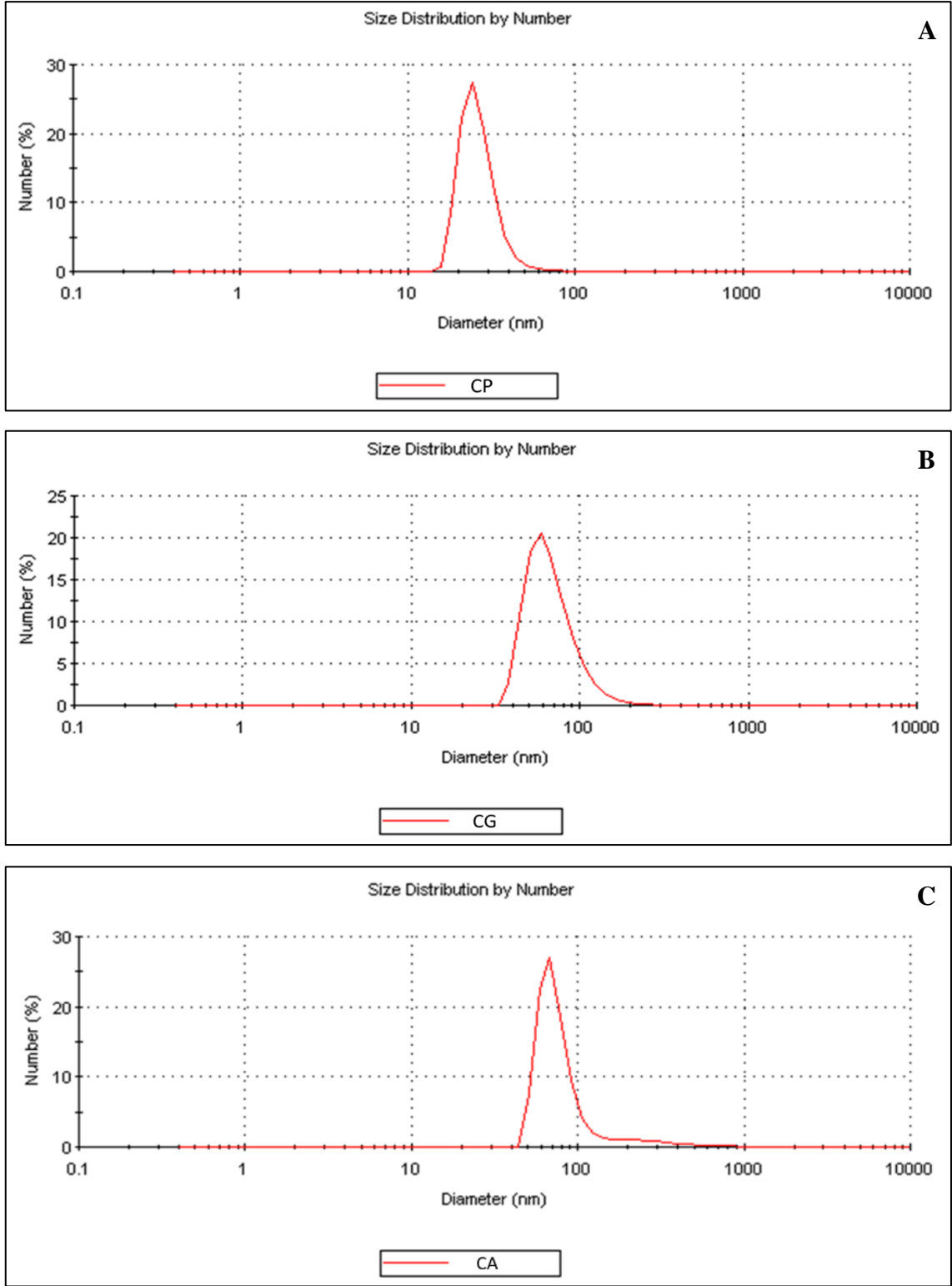
Literatürde biyosentez yoluyla üretilen gümüş nanopartiküllerin XRD görüntülerine ait çok sayıda yayın bulunmaktadır.

Tez kapsamında elde edilen AgNP'lerin XRD paterni, Kalishwaralal Kalimuthu ve arkadaşları tarafından *Bacillus licheniformis* kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin XRD sonuçları ile karşılaştırıldığında, her iki çalışmadan rapor edilen sonuçların aynı olduğu anlaşılmaktadır [164].

#### 4.3.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta potansiyeli

Zeta Sizer cihazı ile yapılan analizler değerlendirildiğinde, farklı *Candida* türlerinden elde edilen nanopartiküllerin boyutlarında farklılık görülmektedir. Şekil 4.25' de görüldüğü üzere *Candida parapsilosis* ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin boyutu 10-100 nm aralığında iken *Candida glabrata* ve *Candida albicans* suşları tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin boyutları sırasıyla 50-150 nm ve 80-155 nm aralığında belirlenmiştir.

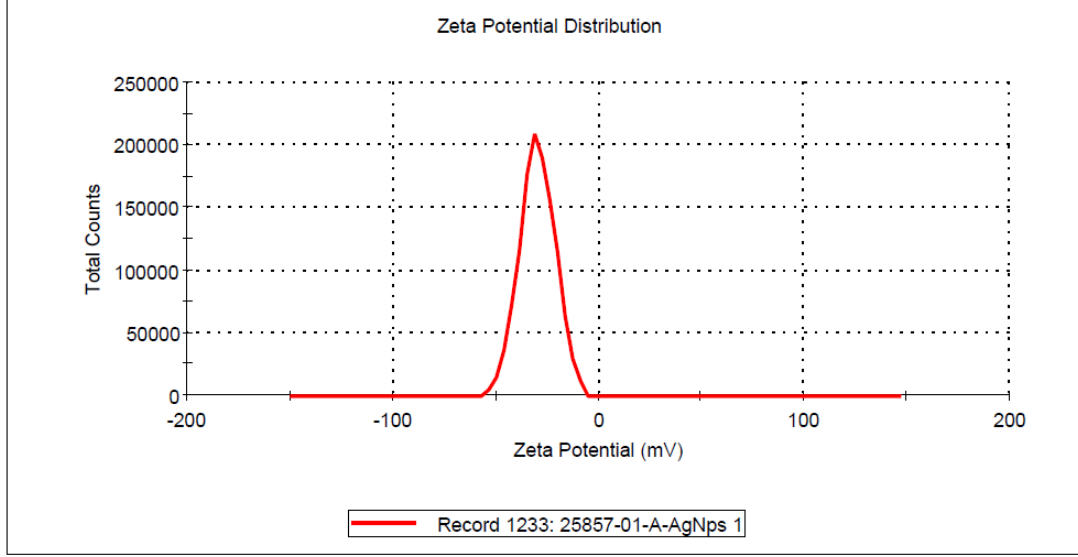
Zeta Potential cihazı ile yapılan analizler değerlendirildiğinde ise, her üç mikroorganizmadan elde edilen AgNP'lerin yüzey yükleri negatif olarak tespit edilmiştir. Analliz sonucunda elde edilen pik değerlendirildiğinde ise, bu pikin en yoğun olduğu noktanın -29.7 (mvV) olduğu Şekil 4.26'da görülmektedir. Bu verileri baz alarak yüzeyde karboksilik asit ve diğer negatif yüke sahip olan fonksiyonel grupların var olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.25. *Candida* türlerinden üretilen AgNP'lerin Zeta büyüklüğü ve dağılımı görüntüsü. A) *Candida parapsilosis*, B) *Candida glabrata*, C) *Candida albicans*.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -29,7</b>	<b>Peak 1: -29,7</b>	100,0	8,52
<b>Zeta Deviation (mV): 8,52</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,00873</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	0,0	0,00

**Result quality Good**



Şekil 4.26. *Candida parapsilosis* tarafından üretilen AgNP'lerin Zeta Potansiyel görüntüsü.

R.R. Remya ve arkadaşları tarafından *Cassia fistula* bitki ekstraktını kullanarak sentezledikleri AgNP'lerin Zeta büyüklüğü ve Zeta potansiyel sonuçları incelendiğinde, elde edilen nanopartiküllerin negatif yüklü ve 21-30 nm boyutlarında olduklarını rapor etmişlerdir [150].

Bir diğer çalışmada ise, *Catharanthus roseus* yaprağı ekstresi kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin boyutlarının 27-32 nm aralığında olduğunu bildirmişlerdir [165].

Kirthika P ve arkadaşlarının 2014 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda elde ettikleri gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyel sonuçları incelendiğinde, bu partiküllerin -13.3 mV'de en yüksek pikleri göstererek negatif yüklü olduklarını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, biyosentez yolu ile elde ettikleri nanopartiküllerin ortalama boyutlarının 58 nm olduklarını ifade etmişlerdir [166].

Thivaharan Varadavenkatesan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, biyolojik yollardan sentezledikleri AgNP'lerin yüklerinin negatif olduğunu ve bu nanopartiküllerin boyutlarının 28.21- 91.28 nm aralığında olduğunu belirtmişlerdir [167].

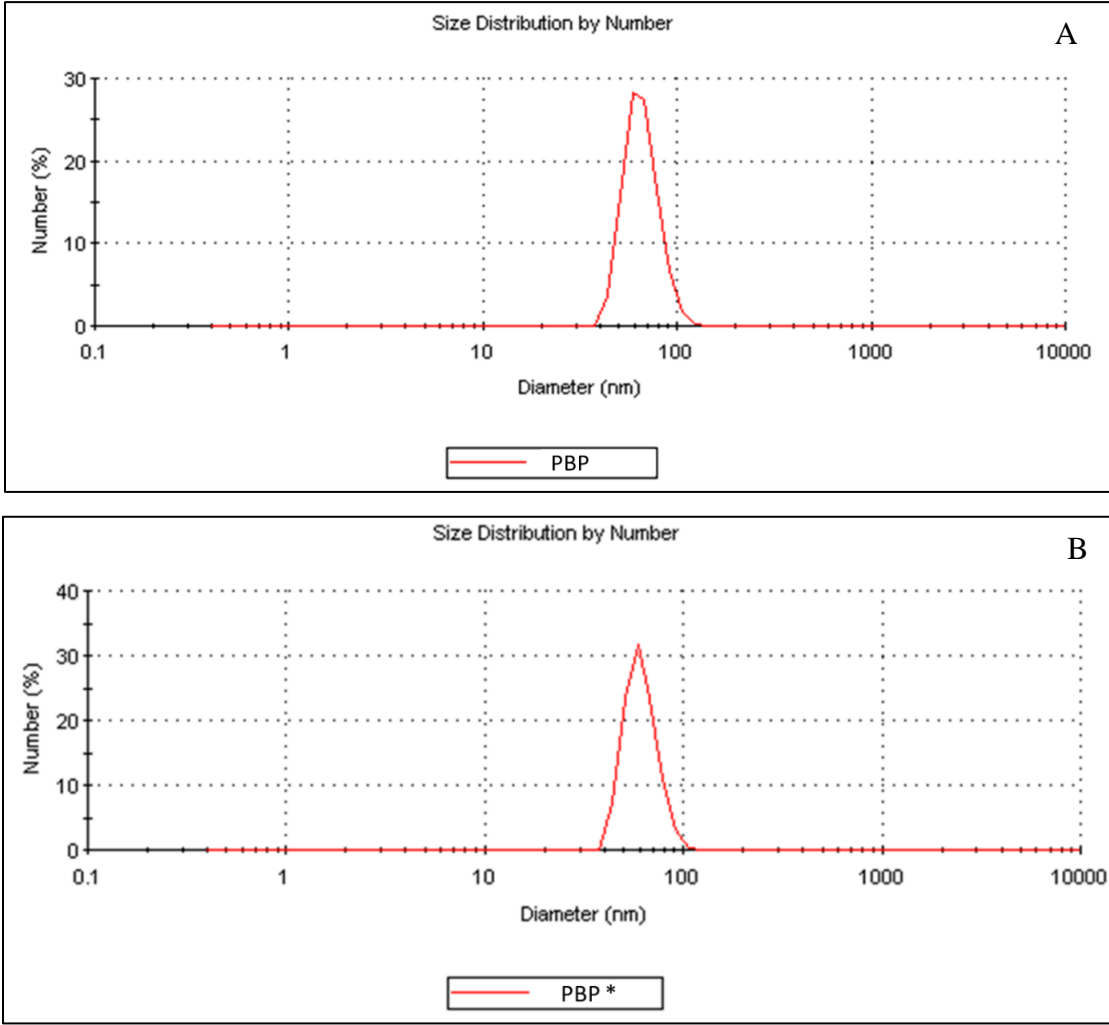
## **4.3.2. Pullulan Biyopolimer karakterizasyonu**

### **4.3.2.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı**

*Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'dan üretilen pullulan biyopolimerinin boyutunun belirlenmesi için zeta sizer analizi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen pullulanın zeta sizer analizinin yapılması için iki yol denenmiştir: I. Saflaştırılarak kurutulan pullulan oda sıcaklığında distile su içinde karıştırılarak çözündürülmüş daha sonra seyreltilerek küvette ölçümü gerçekleştirilmiştir. II. Yöntemde ise, seyreltme işlemi bittikten sonra örnekler 10 dakika boyunca sonikasyona tabi tutularak ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.27'de incelendiğinde ise, her iki yöntemde de hemen hemen aynı sonuç elde edildiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, tez kapsamında elde edilen pullulan biyopolimerinin boyutunun literatürdeki verilere göre daha küçük boyutlarda olduğu belirlenmiştir [168].



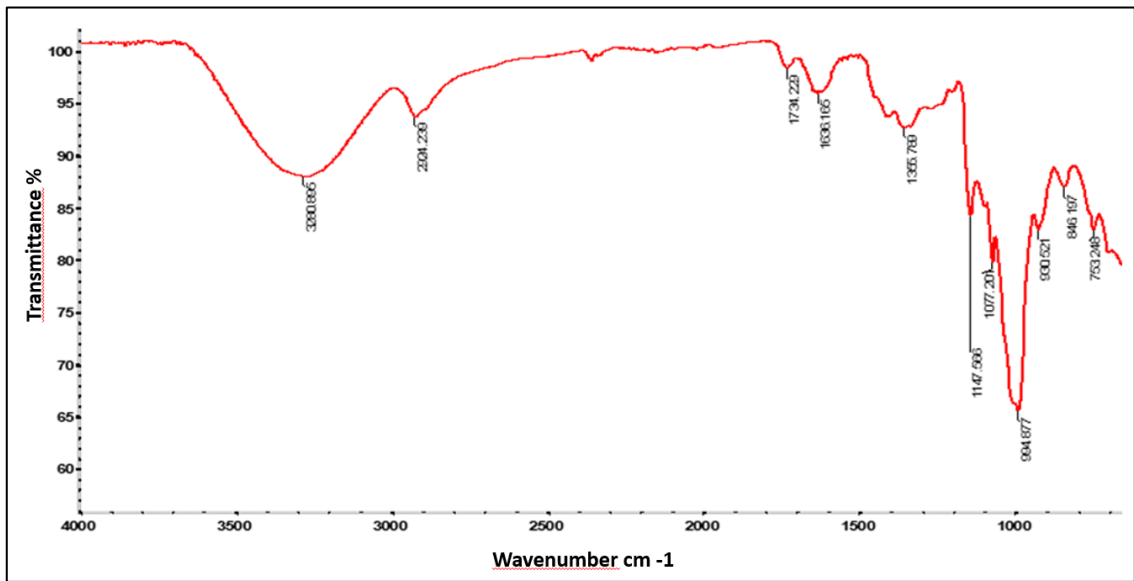
Şekil 4.27. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'dan üretilen pullulan biyopolimerinin Zeta Sizer analiz verileri. A) sonikasyona tabi tutulmayan pullulan (PB), B) sonikasyona tabi tutulan pullulan (PB\*).

#### 4.3.2.2. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopisi

Biyolojik yollar ile elde edilen saf pullulanın karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0.1 mg pullulan örneği toz haline getirilerek analiz için kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen pikler literatürdeki pullulan FTIR sonuçları ile karşılaştırılarak sentezlenen biyopolimerin pullulan olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.28'de elde edilen diyagramlar incelendiğinde, Çizelge 4.3'de yer alan FTIR spektrumları analiz sonucunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. Pullulan biyopolimerinin FTIR spektrumları analiz sonucunda

Fonksiyonel gruplar	FTIR Spektrumları
O-H	3280.896
C-H	2904.239
O-C-O	1734.229
C-O-H	1636.166
C-O-C	1355.789
C-O	1147.586
$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) glikozidik bağ	930.521
$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağ	753.248



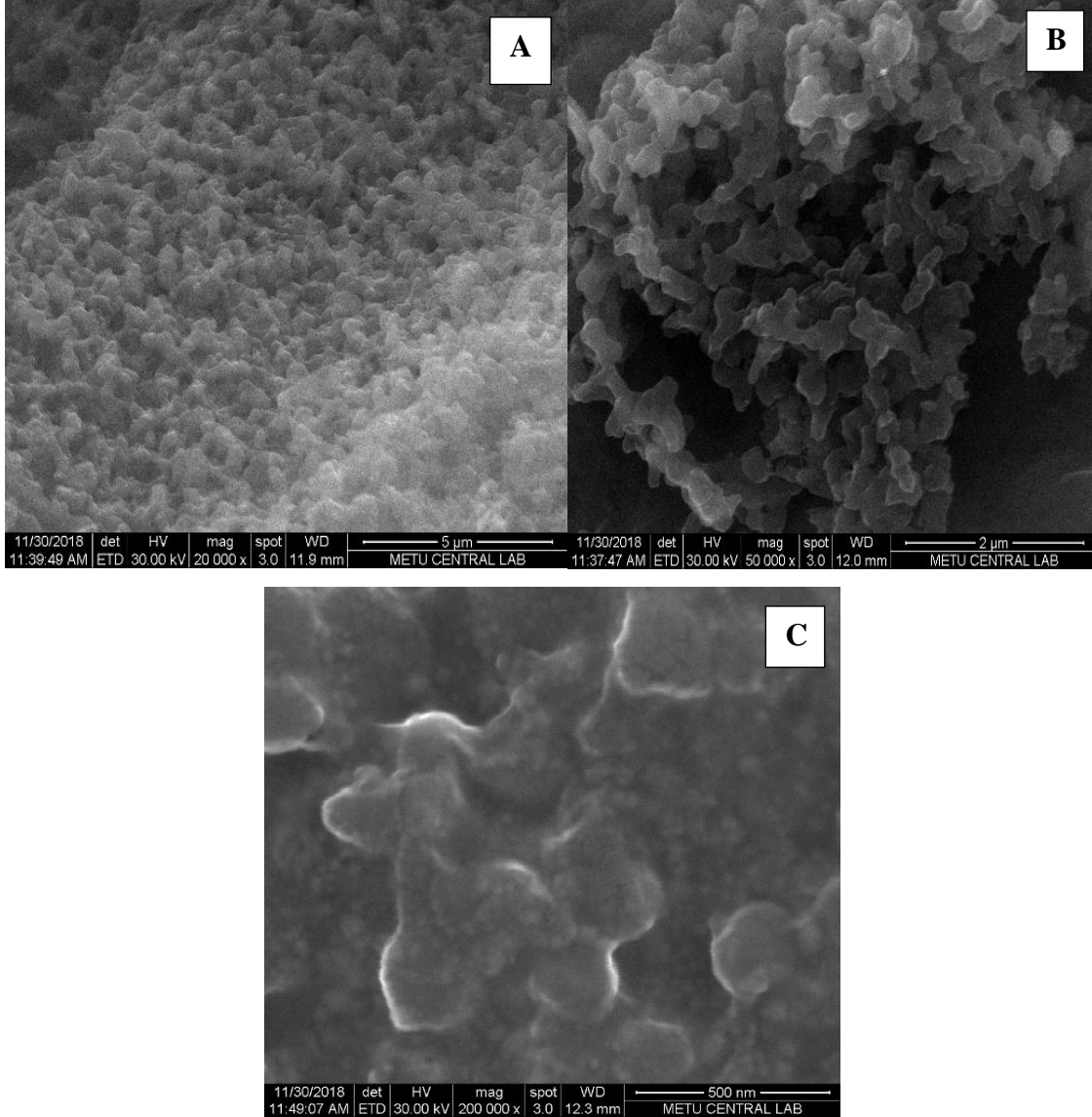
Şekil 4.28. *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253'dan üretilen pullulan biyopolimerinin FTIR spektrumu.

Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür [169] [170].



### 4.3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Tez kapsamında biyosentez yoluyla elde edilen pullulan biyopolimerinin morfolojilerinin görüntülenmesi SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen pullulan nanopartiküllerin SEM sonuçları homojen, küresel nanopartiküllerin varlığını göstermiştir.



Şekil 4.29. Mikrobiyal olarak sentezlenen pullulan nanopartiküllere ait SEM görüntüleri.

A) 20000 x, B) 50000 x, C) 200000 x.

#### 4.3.2.4. Termogravimetrik Analiz ve Diferansiyel Termal Analiz (TGA-DTA)

TGA-DTA eşzamanlı bir tekniktir. Bu cihaz örneğin ağırlık değişimi ile referans arasındaki sıcaklık farkı, kontrollü bir sıcaklık programı kullanarak ölçülmektedir. Bir malzemenin sıcaklık artışı ile bünyesinde meydana gelen termal ve gravimetrik arasındaki değişimleri belirlemek için kullanılır. Malzeme bünyesinde meydana gelen ağırlık değişimleri termogravimetri (TG), ekzotermik ya da endotermik reaksiyonlar sonucu meydana gelen sıcaklık değişimleri diferansiyel termal analiz (DTA) cihazı kullanarak tespit edilir. DTA yöntemi kullanılarak; kaynama, erime, parçalanma noktalarını yüksek bir doğrulukla tayin edilebilmektedir. Bunun yanı sıra, kristalleşme ve faz değişimleri hakkında da bilgi vermektedir.

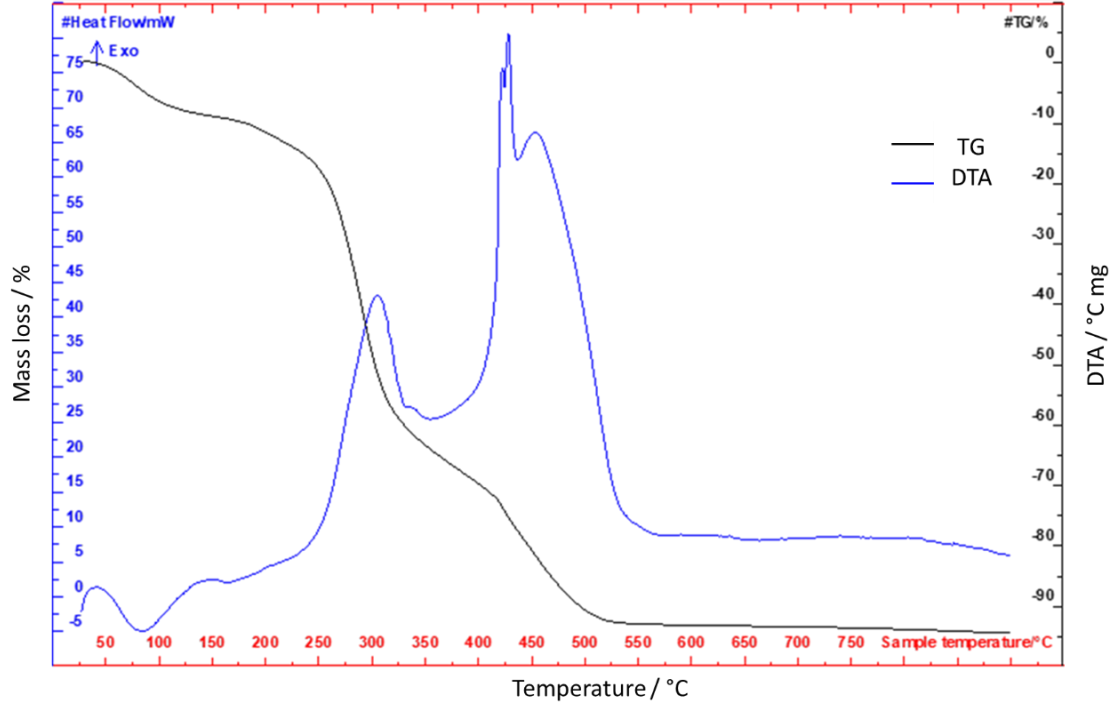
TGA-DTA analizinin gerçekleştirilmesi için Seteram marka TGA-DTA cihazında 25 °C-900 °C sıcaklık aralığında, azot ortamında 10 °C/dakika ısıtma hızında deneyler gerçekleştirilmiştir.

Pullulan örnekleri yüksek sıcaklıklarda ayrışmaya başladığında, grafik eğri içinde bir düşüş göstererek örnek kütlesi kaybına işaret eder. Analizlere dayanarak, bu yeni polimerik materyalin yüksek bozunma sıcaklıklarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Elde edilen filmlerin termogravimetrik analizleri ve Diferansiyel Termal G Şekil 4.30'de gösterilmektedir. Elde edilen bu eğrilere göre 4 basamaklı bir bölünme görülmektedir.

Çizelge 4.4. Pullulan biyopolimerinin %75 kütle kaybı sıcaklıkları.

Örnek	%75 Kütle Kaybı Sıcaklığı (°C)
I. Basamak	75 °C'den sonra birinci yan grup bozulması tespit edilmiştir.
II. Basamak	170°C 'den sonra ikinci yan grup bozulması tespit edilmiştir.
III. Basamak	350°C'den sonra ana zincir bozulması görülüp ve bu bozulma 700 °C'ye kadar devam etmektedir.
IV. Basamak	460°C'den sonra ana zincir bozulması görülüp ve bu bozulma 525 °C'ye kadar devam etmektedir.



Şekil 4.30. Mikrobiyal olarak sentezlenen pullulan nanopartiküllere ait TGA-DTA verileri.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, biyopolimerlerin artan sıcaklığa karşı kütle kaybı TGA analizi kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür [171][172].

### 4.3.3. AgNP Yüklü Pullulan Biyopolimer Hazırlanması

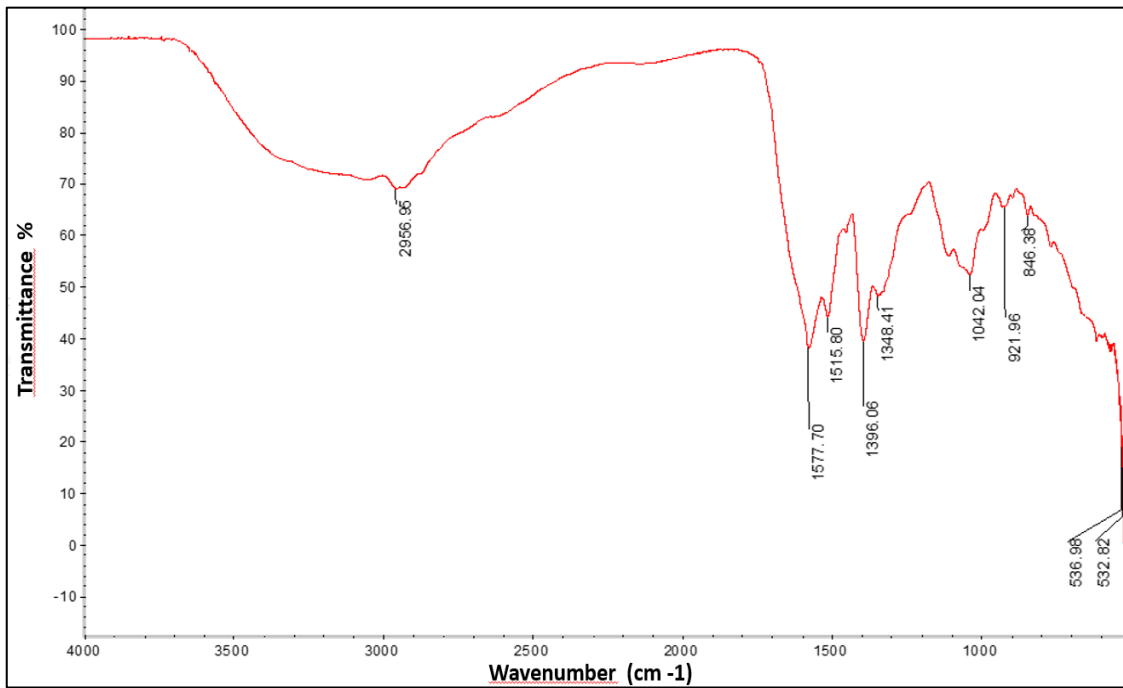
#### 4.3.3.1. Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spektroskopisi

Gümüş nanopartikül yüklü pullulan biyopolimerinin bağlarının daha iyi anlaşılabilmesi için elde edilen örneklerin FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için %5 pullulan ile AgNP leri uygun koşullarda karıştırılarak reaksiyona sokulmuştur, daha sonra örnekler -80°C’de kurutularak analiz gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonucunda elde edilen FTIR spektrumu, fonksiyonel grupları literatürdeki spektrumlarla karşılaştırıldığında, bu spektrumların AgNP+PBP’nin olduğunu göstermektedir. FTIR analiz sonuçları incelendiğinde, PBP+AgNP örnekleri için 3371  $\text{cm}^{-1}$  ila 1021  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığı ile karakteristik pikler Şekil 4.31’de göstermiştir.

Çizelge 4.5. PBP+AgNP'lerin FTIR spektrumları analiz sonucunda

Fonksiyonel gruplar	FTIR Spektrumları
O-H	2956.96
C-H	--
O-C-O	1577.70
C-O-C	1042.04
C-H	536.98



Şekil 4.31. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin FTIR spektrumu.

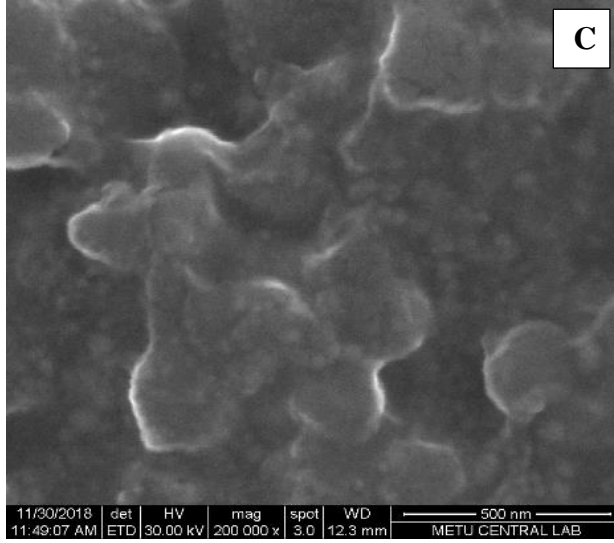
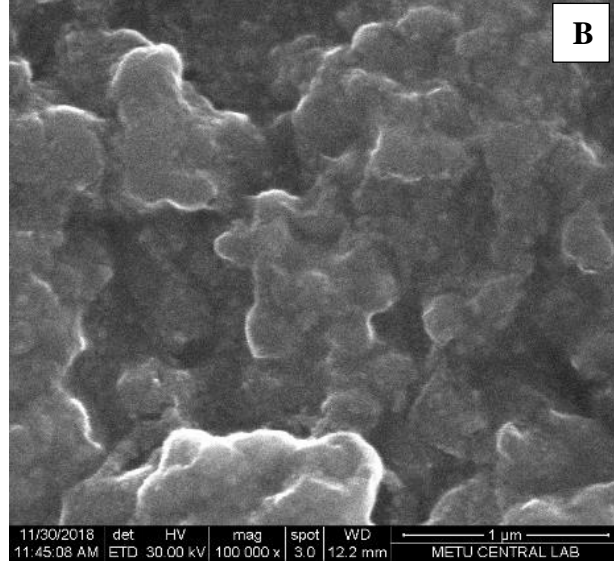
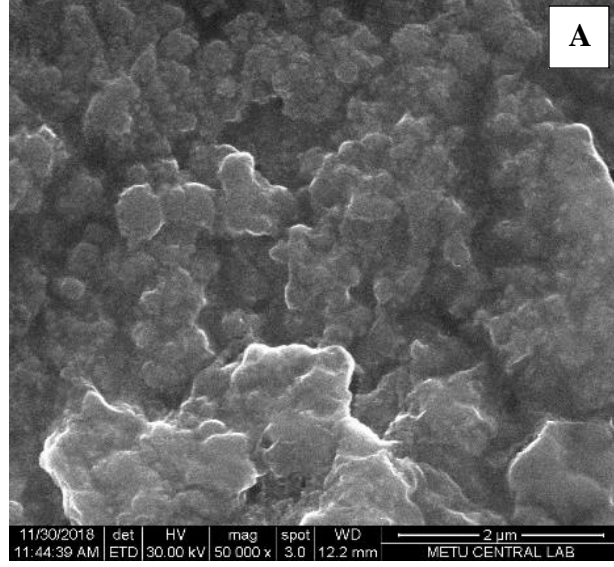
Literatürdeki FTIR spektrumları incelendiğinde, polimerin O-H grubunun, gümüş iyonları ile etkili koordinasyon yeteneği olduğu rapor edilmiştir [173]. Bu bilginin yanı sıra, gümüş yüklü pullulan ile ilgili literatürde tek bir çalışma 2016 yılında V. S. Rama Krishna Ganduri ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen gümüş yüklü pullulan polimerinin FTIR spektrumu ile tez kapsamında elde edilen spektrumun uyumlu olduğu görülmektedir [174].

#### **4.3.3.2. AgNP Yüklü Pullulan Biyopolimerinin SEM ile Görüntülenmesi**

Literatürde farklı yöntemler kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin TEM ve SEM görüntülerine ait çok sayıda yayın bulunmaktadır [175]. Gerek TEM gerekse SEM görüntüleri sonucunda elde edilen sonuçlar ile teze ait çalışmadaki sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Gümüş yüklü pullulanın morfolojisinin incelenmesi için SEM görüntüsü alınmıştır. Elde edilen görüntüler incelendiğinde 200 000 x kadar inildiğinde, gümüş nanopartiküllerin polimer içinde hapsoldükleri Şekil 4.32’de görülmektedir.

P. Kanmani ve ark. 2013 yılında Pullulan polimerine stabilize edilmiş AgNP'lerin çubuk şeklinde ve partikül büyüklüğü 2-40 nm aralığında olduğunu belirtmişlerdir [175]. V. S. Rama Krishna Ganduri ve arkadaşlarının sentezledikleri gümüş yüklü pullulanın TEM görüntüleri incelendiğinde ise gümüş nanopartiküllerin kare ve 15- 40 nm aralığında olduğunu göstermişlerdir [174].



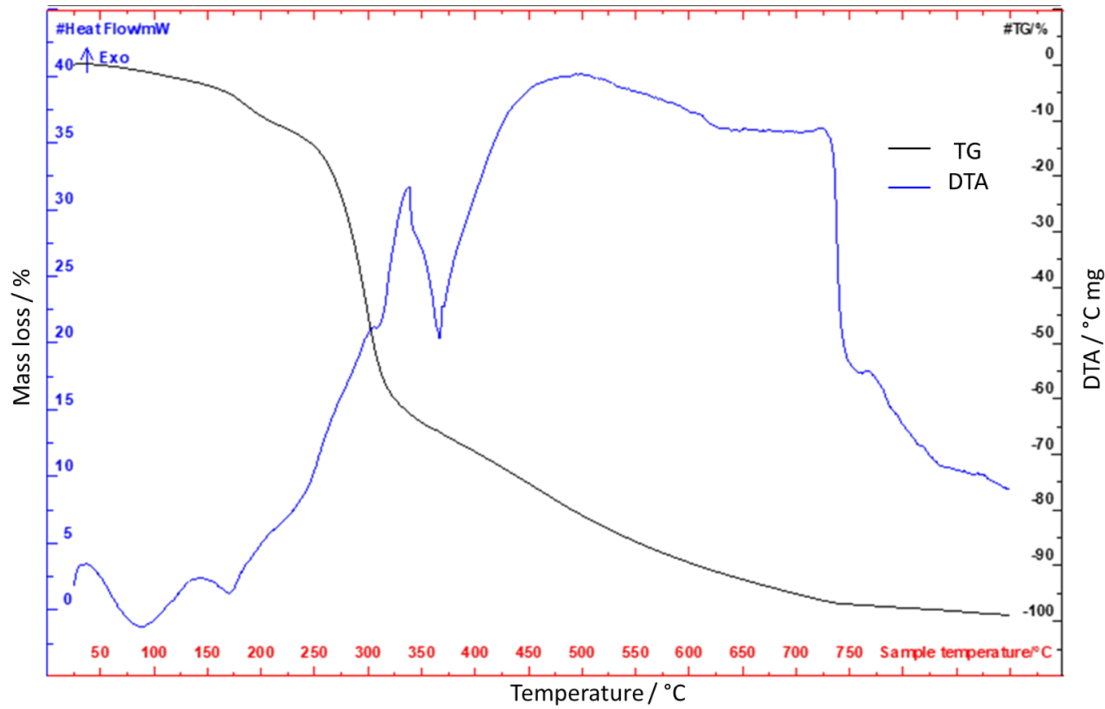
Şekil 4.32. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerin SEM görüntüsü. A) 50000 x, B) 10000 x, C) 200000 x.

#### 4.3.3.4. Termogravimetrik Analiz ve Diferansiyel Termal Analiz (TGA-DTA)

Biyolojik yollarla sentezlenen pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerin TGA-DTA analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, azot atmosferinde, 10 °C/dakkika 25 °C- 900 °C sıcaklık aralığında ısıtma hızında yapılmıştır. Elde edilen verilerde örnekte sıcaklığa karşı ne kadar örnek kaybı olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.33’de pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin TGA eğrileri görülmektedir. Elde edilen bu eğrilere göre 3 basamaklı bir bölünme görülmektedir.

Çizelge 4.6. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin %40 kütle kaybı sıcaklıkları

Örnek		%40 Kütle Kaybı Sıcaklığı (°C)
I.	Basamak	50 °C’den sonra birinci yan grup bozulması tespit edilmiştir.
II.	Basamak	175°C ’den sonra ikinci yan grup bozulması tespit edilmiştir.
III.	Basamak	375°C’den sonra ana zincir bozulması görülüp, bu bozulma 700 °C’ye kadar devam etmektedir.



Şekil 4.33. Pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin TGA-DTA spektrumu.

Pullulan biyopolimerinin TGA-DTA analiz sonucu ile pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerin TGA-DTA analiz sonuçlarını karşılaştırdığımızda, pullulan

biyopolimerine AgNP yüklemesi yapıldıktan sonra elde edilen pullulan yüklü gümüş nanopartiküllerinin:

- Parçalanma ve bölünme oranının arttığını
- Sıcaklığa daha fazla dayanıklı olduğu görülmektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde biyopolimerlerin artan sıcaklığa karşı kütle kaybı TGA analizi kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür [171][172].

#### **4.4. Biyomalzemelerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi**

Biyosentez yoluyla sentezlenen AgNP'lerin, pullulan biyopolimerinin ve bu iki biyomalzemenin komplekslerinin (PBP+AgNP) terapötik etkilerinin araştırılması için ilk önce biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için farklı mikroorganizmalardan sentezlenen biyojenik gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve pullulan biyopolimerinin (PBP) biyoaktiviteleri (Antimikrobiyal, antibiyotik sinerjik etkileri, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteleri) etkileri ilk önce tek tek araştırılmış daha sonra uygun kombinasyon oluşturulduktan sonra PBP+AgNP kompleksi halinde etkileri incelenmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra her bir biyomalzemenin ilk önce teker teker daha sonra kompleks halinde sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm biyoaktivite deneyleri SPSS 21,0 Chicago İllinois programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değişkenler arasındaki fark incelenerek tanımlayıcı ve istatistiksel veriler elde edilmiştir.

##### **4.4.1. Biyomalzemelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Biyomalzemelerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi için birden fazla patojen ATCC suş ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için literatürdeki antimikrobiyal çalışmalar göz önüne alınarak farklı konsantrasyonlarda AgNP'ler ve pullulan örnekleri hazırlanmıştır. Deneyin gerçekleştirilmesi için yayma ekim yöntemi ile petri kaplarına mikroorganizmalar ekilmiş daha sonra katı besiyeri üzerinde farklı alanlarda mantar delici kullanılarak kuyucuklar açılmıştır. Her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda

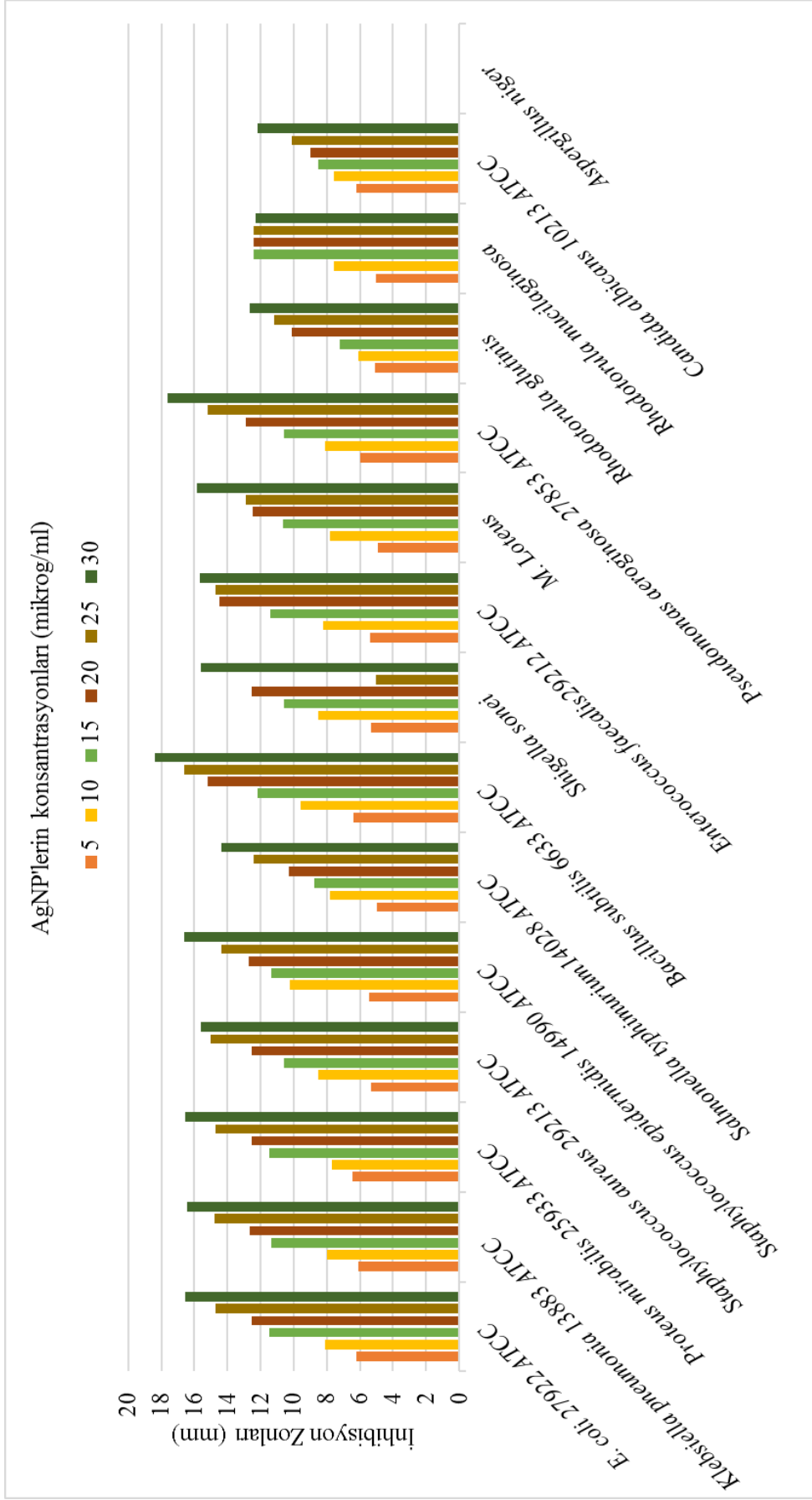


hazırlanan biyomalzemelerden ilave edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan zonlar ölçülerek milimetrik veriler elde edilmiştir. Elde edilen veriler SPSS analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

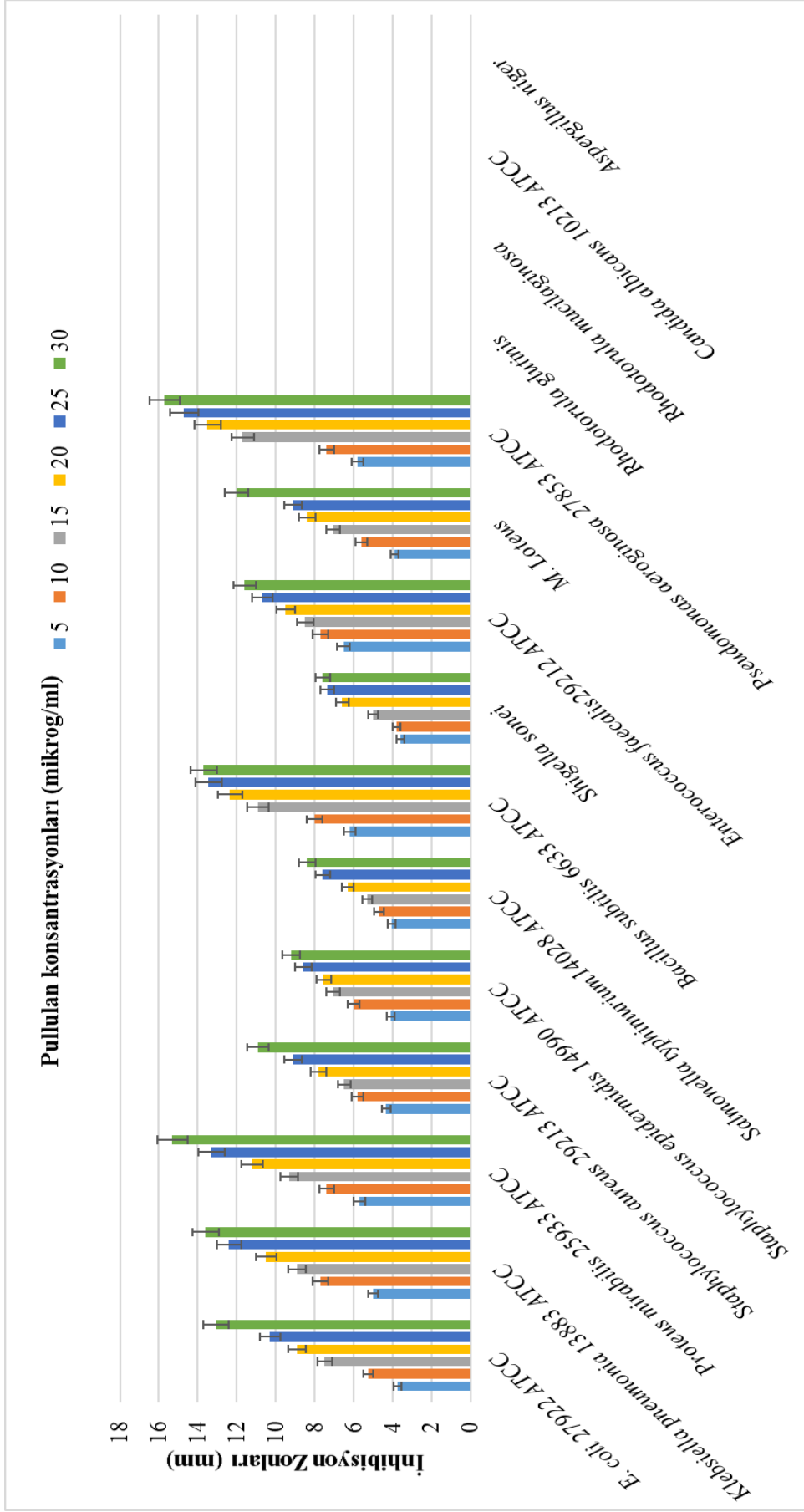
Sentezlenen AgNp'lerin ve pullulan biyopolimerinin antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, AgNp'lerin uygulandığı deneylerde *Aspergillus niger* hariç tüm suşlara antimikrobiyal aktivite gösterirken, pullulan biyopolimeri sadece bakterilere karşı antibakteriyal aktivite göstermiş ve antifungal aktivite gözlenmemiştir.

AgNp'lerin ve pullulan biyopolimerinin antimikrobiyal aktiviteleri birbirleri ile karşılaştırıldığında ise, AgNP'lerinin antimikrobiyal aktivitelerinin pullulan biyopolimerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, AgNp'lerin ve pullulan biyopolimerinin mikroorganizmalar üzerinde doza bağlı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Her iki biyomalzemenin en yüksek konsantrasyonu olan 30 µg/ml mikroorganizmalar üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sentezlenen AgNP'ler 30 µg/ml konsantrasyonunda en yüksek antibakteriyal aktiviteyi *Bacillus subtilis* 6633 ATCC' de gösterirken, pullulan biyopolimeri 30 µg/ml konsantrasyonunda en yüksek antibakteriyal aktiviteyi *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC'de göstermiştir. Deneyler 10 paralel olarak gerçekleştirilip ortalamaları hesaplanmıştır.



Şekil 4.34. AgNP'lerin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri



Şekil 4.35. Pullulan biyopolimerinin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri

İstatistiksel olarak elde edilen veriler mikroorganizma türüne, verilen biyomalzemeye ve verilen konsantrasyonlara göre Kruskal-Wallis testi ( $p<0.05$ ) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmalar arasındaki biyomalzemelerin konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda mikroorganizmalar arasındaki antimikrobiyal aktivitenin anlamlı bir fark oluşturmadığı tesbit edilmiştir.  $p < 0,710$ .

Çizelge 4.7. Farklı mikroorganizma türleri üzerinde biyomalzemelerin konsantrasyonlarının oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Mikroorganizma türleri arasındaki biyomalzemelerin oluşturdukları antimikyal aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen farklı biyomalzemeler arasında anlamlı fark olmadığı tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı mikroorganizma türleri üzerinde biyomalzemelerin aralarındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzemelerin kendi arasındaki antimikrobiyal aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda biyomalzemelerin kendi arasındaki antimikrobiyal aktivitenin anlamlı bir fark olduğu tesbit edilmiştir.  $p = 0,001$ .

Çizelge 4.7. Farklı Biyomalzemelerin kendi arasındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzemelerin konsantrasyonları arasındaki oluşturdukları antimikyal aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen farklı biyomalzemelerin konsantrasyonları arasında anlamlı fark olduğu tesbit edilmiştir.  $P=0.001$ .

Çizelge 4.7. Farklı Biyomalzemelerin konsantrasyonları arasındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.7. İstatistiksel olarak antimikrobiyal aktivitelerin değerlendirilmesi.

İstatistiksel olarak değerlendirme	Test	Sonuç
Farklı mikroorganizma türleri üzerinde biyomalzemelerin konsantrasyonlarının oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ )	fark olmadığı
Farklı mikroorganizma türleri üzerinde biyomalzemelerin aralarındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ )	fark olmadığı
Farklı Biyomalzemelerin kendi arasındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ )	fark olduğu $P=0.001$ .
Farklı Biyomalzemelerin konsantrasyonları arasındaki oluşturdukları antimikrobiyal aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ )	fark olduğu $P=0.001$ .

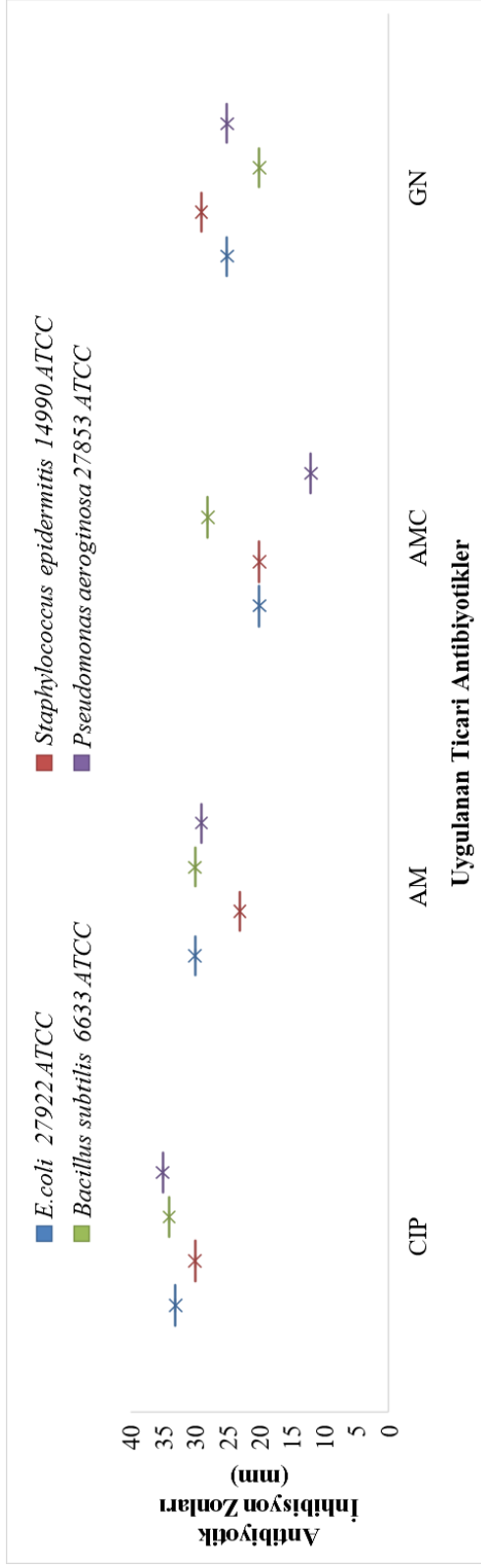
Hanan M. Abd-Elnaby ve arkadaşları biyolojik yöntemler kullanarak sentezledikleri AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerini birçok mikroorganizma üzerinde denemişler ve sonuç olarak bu nanopartiküllerin denenmiş olan tüm türler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir [128]. Bir diğer çalışmada ise AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivitelerini *Bacillus*, *Enterococci*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus* ve *E. coli* bakterileri üzerinde inceleyerek partiküllerin en çok antibakteriyel aktivitesinin *Klebsiella pneumoniae* üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir [134].

*Erythrina indica lam* bitki ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin kuyucuklara yerleştirerek antimikrobiyal özellikleri Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda denen tüm bakterilere karşı antibakteriyel aktivitenin olduğu tespit edilmiştir [129].

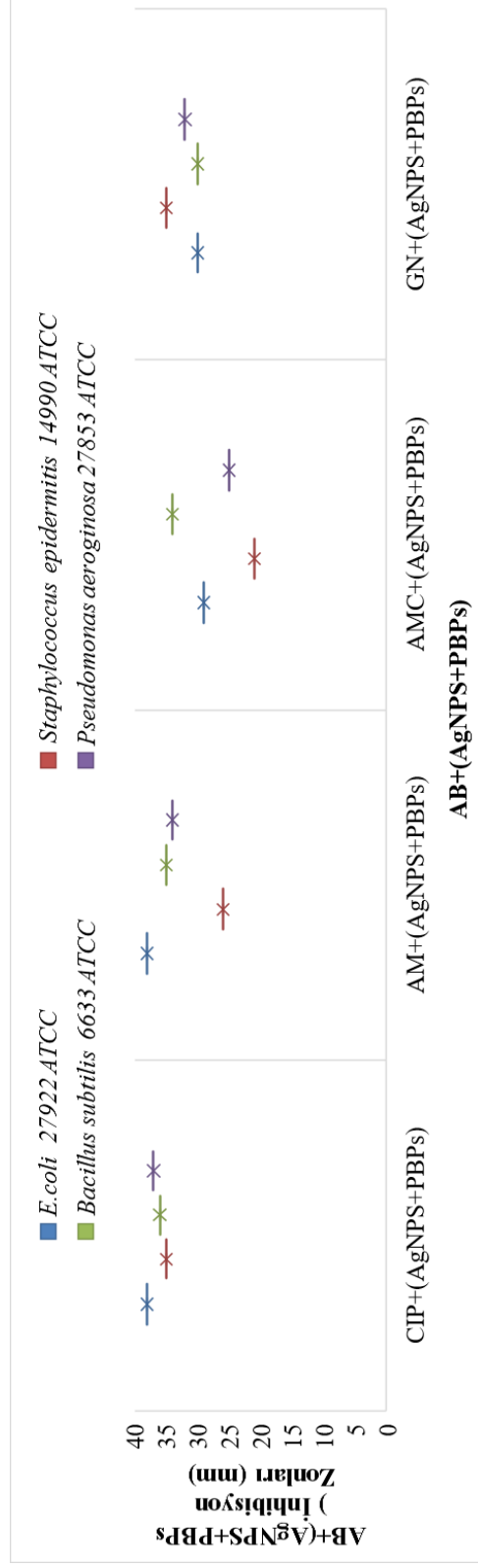
#### **4.4.2. Biyomalzemelerin Antibiyotik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Bir önceki bölümde (4.4.1) gerçekleştirilen deneyler sonucunda en çok antimikrobiyal aktivitenin olduğu bakteriler seçilerek sinerjik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak satılan antibiyotiklere AgNP+PBP yüklenerek *E.coli* 27922 ATCC, *Staphylococcus epidermitis* 14990 ATCC, *Bacillus subtilis* 6633 ATCC ve *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC suşları üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

AgNP yüklü pullulan biyopolimerlerinin farklı antibiyotikler ile sinerjik aktiviteleri incelendiğinde, farklı antibiyotik disklerine yüklenen AgNP+PBP'lerin antibiyotiklere göre daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Deneyler 10 paralel olarak gerçekleştirilip ortalamaları hesaplanmıştır.



Şekil 4.36. Antibiyotiklerin farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri



Şekil 4.37. AB+ (AgNP+PBP) farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri

İstatistiksel olarak elde edilen veriler bakteriler arası ve verilen biyomalzemeye göre değerlendirilmiştir.

Bakteriler arasındaki sinerjik etkisinin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda bakteriler arasındaki sinerjik etkisinin anlamlı bir fark oluşturmadığı tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı bakteriler arasındaki sinerjik etkisinin Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Antibiyotik ve biyomalzemelerin arasındaki sinerjik etkisinin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney Testine göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda:

I. CIP + (AgNP+PBP)

- 4 farklı Bakteriye uygulandığında bütün bakterilerde anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı bakteriler üzerinde CIP + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

- Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise, sadece *S.epidermidis* 14990 ATCC 'de anlamlı farkın olduğu ve diğer bakterilerde farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. CIP + (AgNP+PBP) yapılarının bakteri türüne göre sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

I. AM + (AgNP+PBP)

- 4 farklı Bakteriye uygulandığında bakteriler arasında anlamlı fark olmadığı ( $p < 0,146$ ) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı bakteriler üzerinde AM + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

- Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise, sadece *B.subtilis* 6633 ATCC'de anlamlı farkın olduğu ( $p < 0,011$ ) ve diğer bakterilerde farkın olmadığı tesbit edilmiştir.



Çizelge 4.8. AM + (AgNP+PBP) yapılarının bakteri türüne göre sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

### III. AMC + (AgNP+PBP)

- 4 farklı Bakteriye uygulandığında bakteriler arasında anlamlı fark olmadığı ( $p < 0,081$ ) tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı bakteriler üzerinde AMC + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

- Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise, sadece *P.aeruginosa* 27853 ATCC'de anlamlı farkın olduğu ve diğer bakterilerde farkın olmadığı ( $p < 0,047$ ) tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.8. AMC + (AgNP+PBP) yapılarının bakteri türüne göre sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

### I. GN+ (AgNP+PBP)

- 4 farklı Bakteriye uygulandığında bakteriler arasında anlamlı fark oluştuğu tesbit edilmiştir. ( $p < 0,019$ ).

Çizelge 4.8. Farklı bakteriler üzerinde GN + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

- Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise, sadece *E. coli* 27922 ATCC'de anlamlı farkın olduğu ve diğer bakterilerde farkın olmadığı  $p < 0,021$  tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.8. GN + (AgNP+PBP) yapılarının bakteri türüne göre sinerjik etkisinin Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.8. İstatistiksel olarak sinerjik aktivitelerin değerlendirilmesi.

İstatistiksel olarak değerlendirme	Test	Sonuç
Farklı bakteriler arasındaki sinerjik etkisinin	Kruskal-Wallis testine (p<0.05)	fark olmadığı
Farklı bakteriler üzerinde CIP + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin	Mann-Whitney testine (p<0.05)	fark olduğu P <,029
CIP + (AgNP+PBP) Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise,	Mann-Whitney testine (p<0.05)	<b><i>S.epidermidis 14990 ATCC</i></b> farkın olduğu P <,017
Farklı bakteriler üzerinde AM + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin	Mann-Whitney testine (p<0.05)	fark olmadığı p < 0,146
AM + (AgNP+PBP) Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise,	Mann-Whitney testine (p<0.05)	<b><i>B.subtilis 6633 ATCC</i></b> farkın olduğu p<0,011
Farklı bakteriler üzerinde AMC + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin	Mann-Whitney testine (p<0.05)	fark olmadığı
AMC + (AgNP+PBP) Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise,	Mann-Whitney testine (p<0.05)	<b><i>P.aeruginosa 27853 ATCC</i></b> farkın olduğu p <0,047
Farklı bakteriler üzerinde GN + (AgNP+PBP) yapılarının sinerjik etkisinin	Mann-Whitney testine (p<0.05)	fark oluğu p < 0,019
GN + (AgNP+PBP) Bakteri türüne göre değerlendirildiğinde ise	Mann-Whitney testine (p<0.05)	<b><i>E. coli 27922 ATCC</i></b> farkın olduğu p <0,021

Hanan M. Abd-Elnaby ve arkadaşları biyolojik yollarla sentezledikleri AgNP'lerin optimizasyon işlemlerini Plackett–Burman yöntemine göre gerçekleştirerek elde ettikleri Agnp'lerin 6 farklı antibiyotik (Ciprofloxacın, Ampicillin, Streptomycin, Gentamicin,

Tetracycline ve Lincomycin) ile sinerjik etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda gümüş nanopartikül uygulanan standart antibiyotik disklerin, bazı ilaca dirençli patojenlere karşı daha fazla aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir [128].

Shital Bonde 2011 yılında yaptığı çalışmada biyojenik olarak elde ettiği gümüş nanopartiküllerin farklı antibiyotikler ile sinerjik etkisini *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 ve *Escherichia coli* ATCC-39403 türleri üzerinde incelemiştir. Çalışmalar sonucunda gümüş nanopartiküllerin, ticari antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanıldığında iki patojenik bakteriye karşı belirgin bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [176].

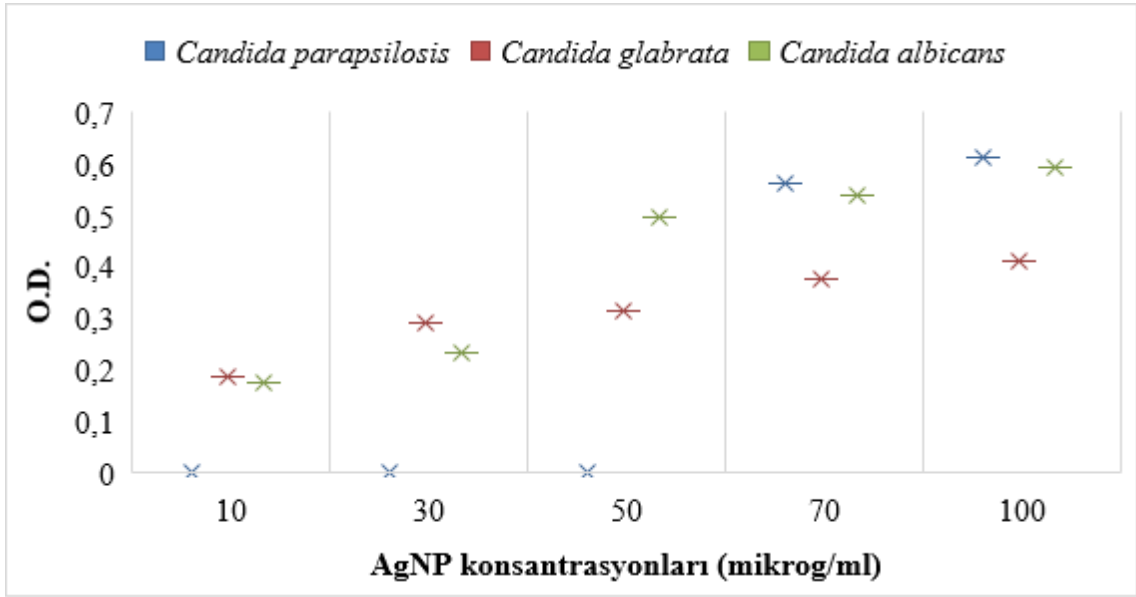
Bir diğer çalışmada ise gümüş nanopartiküllerin farklı *Candida* türleri (*C. albicans* KACC 30003 and KACC 30062, *C. glabrata* KBNO6P00368, *C. geochares* KACC 30061 and *C. saitoana* KACC 41238) üzerinde sinerjik etkileri incelenmiştir. *Candida* türlerinin sinerjik aktivitelerinin belirlenmesi için amphotericin B kullanmışlardır. AgNP'ler (2 mg/mL) ve amphotericin B (200 µg/mL) 1:1 oranında 15 dakika boyunca oda sıcaklığında sonikasyona bırakmış, daha sonra deneyi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaların sonucu incelendiğinde 50 ug/mL konsantrasyonundaki AgNP'lerin, test edilen beş *Candida* türüne karşı herhangi bir anticandidal aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. AgNP'ler (50 ug / disk) ile standart anticandidal ajan olan amfoterisin B (5 µg / disk) ile kombine halinde *Candida*'lara uygulandığında tüm türlere karşı daha güçlü anticandidal aktivite (inhibisyon zonunun 9.74 mm'den 14.75 mm'ye artmıştır) gösterdiği belirlenmiştir [177].

#### **4.4.3. Biyomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi**

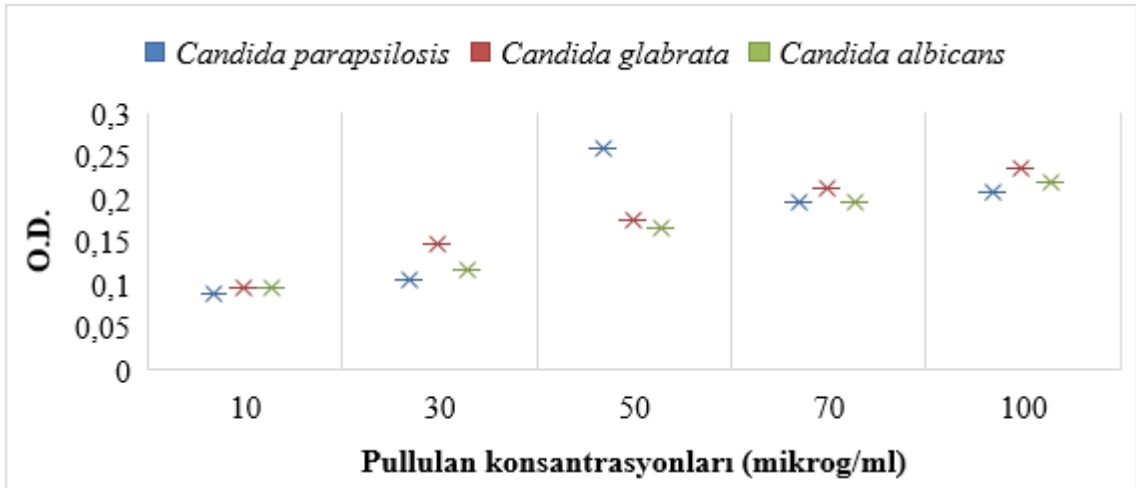
Sentezlenen biyomalzemelerin antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi için biyofilm oluşturan 3 *Candida* türü seçilmiştir. Farklı konsantrasyonlarında uygulanan AgNP'ler ve pullulan biyopolimerleri sonucu AgNP+PBP komplekslerinin farklı konsantrasyonları uygulanarak antibiyofilm aktiviteleri teker teker incelenmiştir. Deneyler 10 paralel olarak gerçekleştirilip ortalamaları hesaplanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda AgNP'lerinin pullulan biyopolimerine göre daha fazla antibiyofilm aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek antibiyofilm aktivitenin *Candida parapsilosis* türü üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, pullulanın

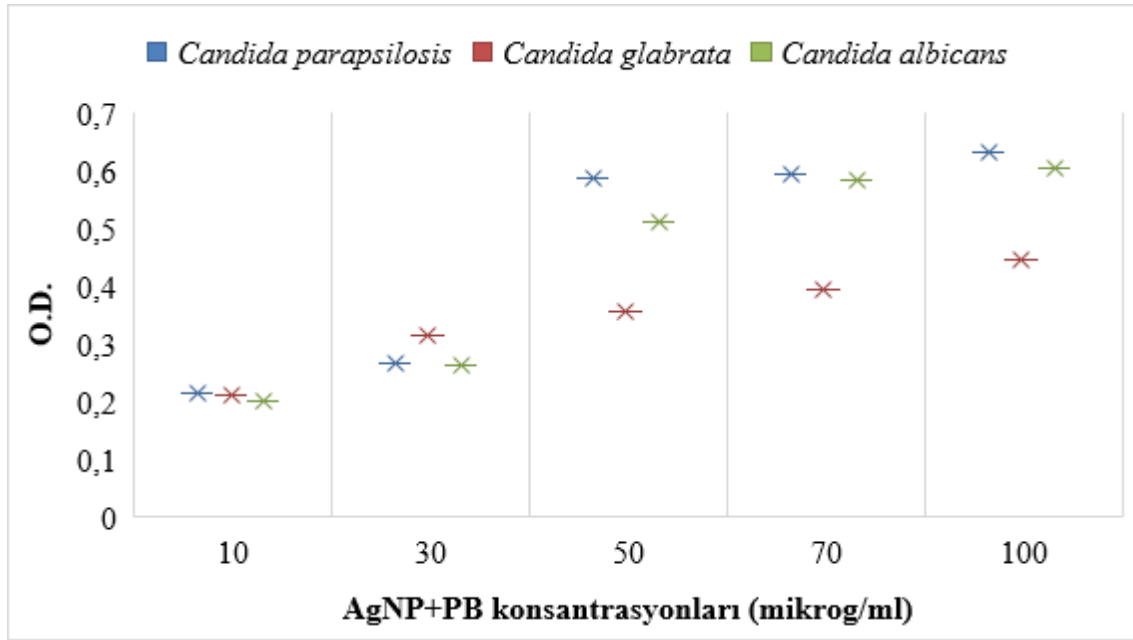
antibiyofilm aktivitesi türler üzerinde incelenirken bu biyomalzemenin her üç türe antibiyofilm aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği tür *Candida albicans* olarak belirlenmiştir. Deney süresince uygulanan farklı konsantrasyonlar incelendiğinde ise her iki biyomalzemedede de doza bağlı bir artış söz konusu olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.38. AgNP'lerin *Candida* türleri üzerine antibiyofilm etkileri.



Şekil 4.39. Pullulan biyopolimerinin *Candida* türleri üzerine antibiyofilm etkileri.



Şekil 4.40. AgNP+ Pullulan biyopolimerinin *Candida* türleri üzerine antibiyofilm etkileri.

AgNP+PBP biyokomplekslerinin uygulandığı deneyler sonucunda ise, en yüksekten en aza antibiyofilm aktivite sırasıyla *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*'da saptanmıştır. Deney süresince uygulanan farklı konsantrasyonlar incelendiğinde ise, AgNP+PBP biyokomplekslerinde de doza bağlı bir artış olduğu saptanmıştır.

İstatistiksel olarak elde edilen veriler mikroorganizma türüne, verilen biyomalzemeye ve verilen konsantrasyonlara göre Kruskal-Wallis testi ( $p < 0.05$ ) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Maya türleri arasındaki antibiyofilm aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Mayalar arasındaki antibiyofilim aktivitenin anlamlı bir fark oluşturmadığı tesbit edilmiştir.  $p < 0,710$ .

Çizelge 4.9. Farklı *Candida* türleri üzerinde biyomalzemelerin oluşturdukları antibiyofilm aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzemelerin arasındaki antibiyofilm aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen farklı biyomalzemeler arasında anlamlı fark olduğu tesbit edilmiştir.  $p < 0,001$ . En büyük fark ise AgNP+PBP verildiğinde görülmüştür.

Antibiyofilm aktiviteye göre biyomalzemeler:

$$PBP < AgNP < \underline{AgNP+PBP}$$

Çizelge 4.9. Farklı *Candida* türleri üzerinde biyomalzemelerin aralarındaki oluşturdukları antibiyofilm aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzeme konsantrasyonlarının arasındaki antibiyofilm aktivitenin farkını anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis Testine göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen farklı konsantrasyonlar arasında anlamlı fark olduğu tesbit edilmiştir.  $p = 0,001$ . Konsantrasyon artışına bağlı olarak antibiyofilm aktivitede artış tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı *Candida* türleri üzerinde biyomalzemelerin konsantrasyonları aralarındaki oluşturdukları antibiyofilm aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.9. İstatistiksel olarak antibiyofilm aktivitelerin değerlendirilmesi.

İstatistiksel olarak değerlendirme	Test	Sonuç
Farklı <i>Candida</i> türleri üzerinde biyomalzemelerin oluşturdukları antibiyofilm aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ )	fark olmadığı
Farklı <i>Candida</i> türleri üzerinde biyomalzemelerin aralarındaki oluşturdukları antibiyofilm aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ )	fark olduğu $p < 0,001$
Farklı <i>Candida</i> türleri üzerinde biyomalzemelerin konsantrasyonları aralarındaki oluşturdukları antibiyofilm	Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ )	fark olduğu $p = 0,001$

**M. Pérez-Díaz** arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada, sentezledikleri gümüş nanopartikül içerikli kitosan polimerinin *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerinde antibiyofilm etkisini incelemişlerdir. Gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda gümüş nanopartikül içerikli kitosan polimerinin her iki tür üzerinde antibiyofilm etkisinin olduğunu belirterek AgNP'lerin konsantrasyonunun artması ile antibiyofilim etkisinin de arttığını tespit etmişlerdir [178].

Lumin Yu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, Qe (kuersetin: bitki kaynaklı ilaç bileşeni), Ag NP'ler ve QA NP'lerin (QA NP: AgNP lerin Qe ile kombinasyonundan oluşturulmuştur) maddelerinin farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini incelemişlerdir. Gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda ise meme iltihabı olan inekten izole edilen çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşuna karşı QA NP'lerinin daha güçlü antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [179].

#### **4.4.4. Biyomalzemelerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Biyosentez yoluyla elde edilen AgNP'lerin, pullulan biyopolimerlerinin ve AgNP yüklü pullulan biyopolimerinin (AgNP+PBP) antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için DPPH yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde her bir biyomalzemenin farklı konsantrasyonları uygulanarak sonuçlar spektrofotometrede ölçülmüştür. Deneyler 10 paralel olarak gerçekleştirilip ortalamaları hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, AgNP+PBP biyomalzemesinin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, konsantrasyonun artışı ile aktivitede anlamlı artış saptanmıştır.

İstatistiksel olarak elde edilen veriler verilen biyomalzeme ve konsantrasyonlarına göre değerlendirilmiştir.

Biyomalzemelerin arasındaki antibiyofilm aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis Testine göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen biyomalzemelerin arasında anlamlı fark olduğu tesbit edilmiştir.  $p=0,019$ . En büyük antioksidan aktivitenin ise AgNP+PBP biyomalzemesinde tesbit edilmiştir. Antioksidan aktiviteye göre biyomalzemeler:

$$PBP < AgNP < \underline{AgNP+PBP}$$

Çizelge 4.10. Biyomalzemelerin konsantrasyonları aralarındaki oluşturdukları antioksidan aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

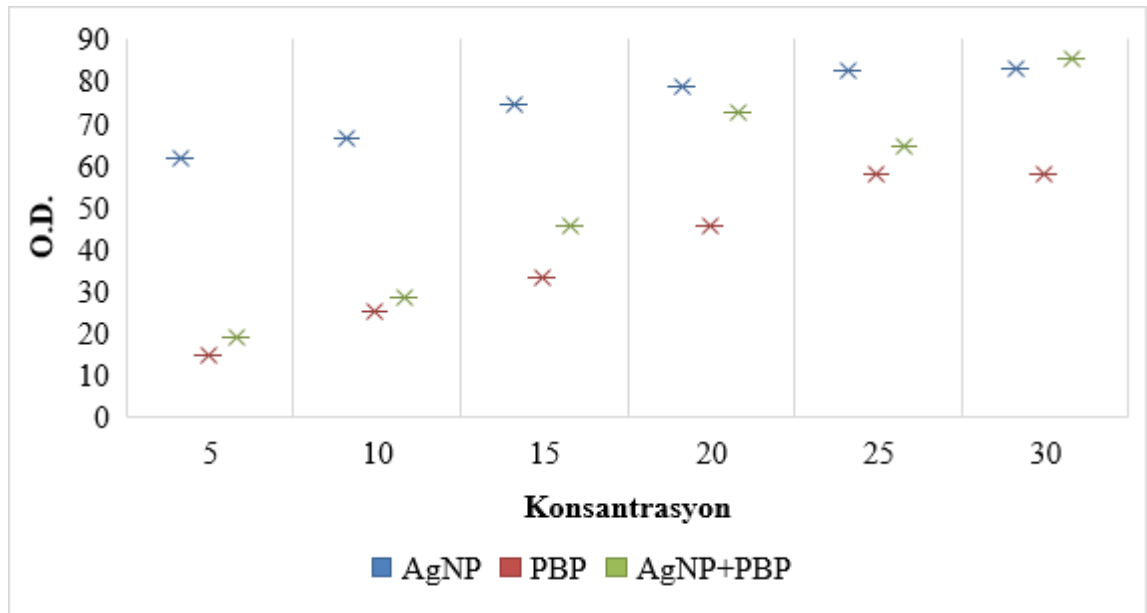
Biyomalzeme konsantrasyonları arasındaki antibiyofilm aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Kruskal-Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, verilen farklı konsantrasyonların arasında anlamlı fark olmadığı ( $p = 0,317$ ) tespit edilmiştir. Verilen farklı konsantrasyonlar arasında büyüme olmadığı belirlenerek konsantrasyon artışı ile antioksidan aktivitede belli bir artışın olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Biyomalzemelerin konsantrasyonları aralarındaki oluşturdukları antioksidan aktivitenin Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.10. İstatistiksel olarak antioksidan aktivitelerin değerlendirilmesi.

İstatistiksel olarak değerlendirme	Test	Sonuç
Biyomalzemelerin konsantrasyonları aralarındaki oluşturdukları antioksidan aktivitenin	Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ )	fark olduğu $p = 0,019$
Biyomalzeme konsantrasyonları arasındaki antibiyofilm aktivitenin meydana getirdiği farkı anlayabilmek	Kruskal-Wallis testine ( $p < 0.05$ )	fark olduğu $p = 0,317$



Şekil 4.41. Sentezlenen biyomalzemelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi.

Jayanta Kumar Patra ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada AgNP'lerin antioksidan aktivitelerini belirleyerek bu nanopartiküllerin yüksek miktarda antioksidan aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir [177].

Abdul-Rehman Phull ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Bergenia ciliata*'nın ekstraktından elde ettikleri AgNP'lerin antioksidan aktivitelerini *Bergenia ciliata*'nın ekstraktı ile karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar değerlendirildiğinde AgNP'lerin

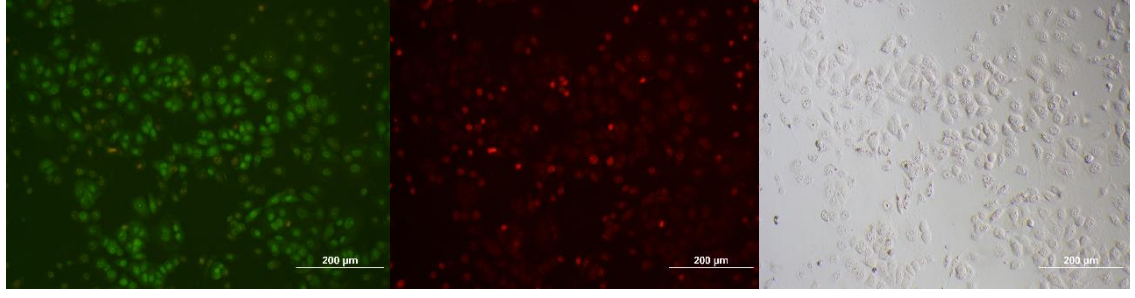


antioksidan aktiviteleri bitki ekstraktına göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir[180]. Bir diğer çalışmada yine DPPH yöntemi kullanılarak AgNP'lerin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda partiküllerin antioksidan aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir [181].

#### **4.4.5. Biyomalzemelerin Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Tez kapsamında MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatlarında toksisitenin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda biyoteknolojik yöntemler ile sentezlenen; AgNP'lerin, PBP'lerin ve bu iki maddenin kombinasyonundan oluşan AgNP+PBP 3 farklı konsantrasyon hücreler üzerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri ile uygulanarak elde edilen veriler MTT yöntemi ile incelenmiştir. Her iki hücre hatında maddelere bağlı olarak oluşan inhibisyon, floresan boya karışımı (Acridine Orange/Propidium Iodide (AO/PI)) kullanılarak floresan boyama ile görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüleme sayesinde hücrelerde oluşan üreme, büyüme ve maddelere bağlı meydana gelen hücre ölümleri veya hücre bozulmaları görüntülenebilmektedir.

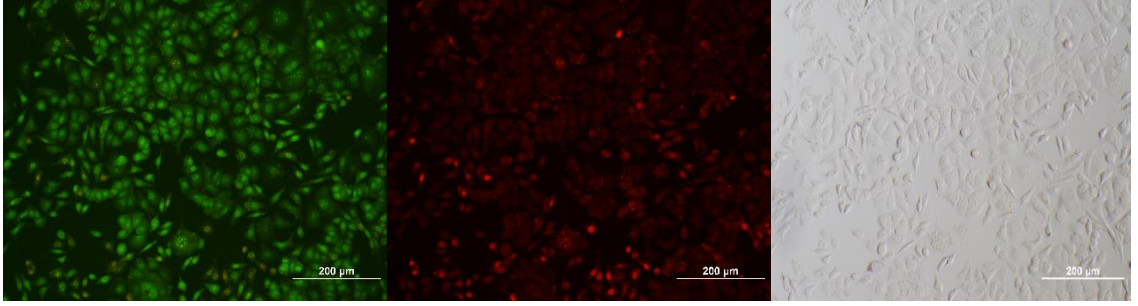
MCF-7 hücre hattı üzerinde üç farklı biyomalzemenin inhibitör etkisi floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.42., Şekil 4.43., Şekil 4.44., Şekil 4.45., Şekil 4.46., Şekil 4.47., Şekil 4.48., Şekil 4.49., Şekil 4.50.). Aynı şekilde, SKBR-1 hücre hattı üzerinde üç farklı biyomalzemenin inhibitör etkisi floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.51., Şekil 4.52., Şekil 4.53., Şekil 4.54., Şekil 4.55., Şekil 4.56., Şekil 4.57., Şekil 4.58., Şekil 4.59.).



(A)

(B)

(C)

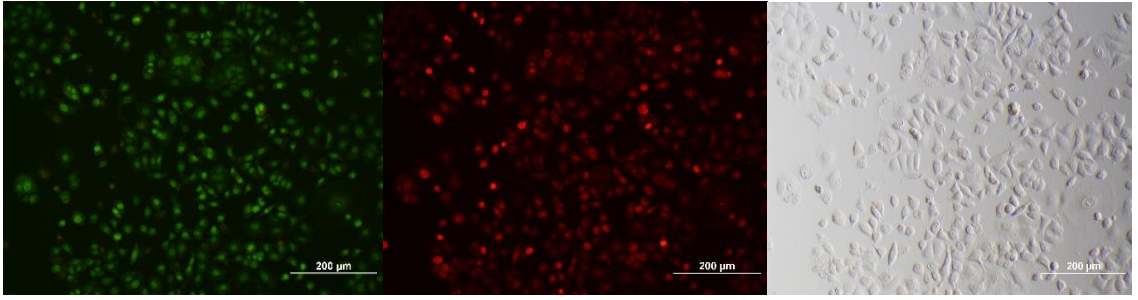


(D)

(E)

(F)

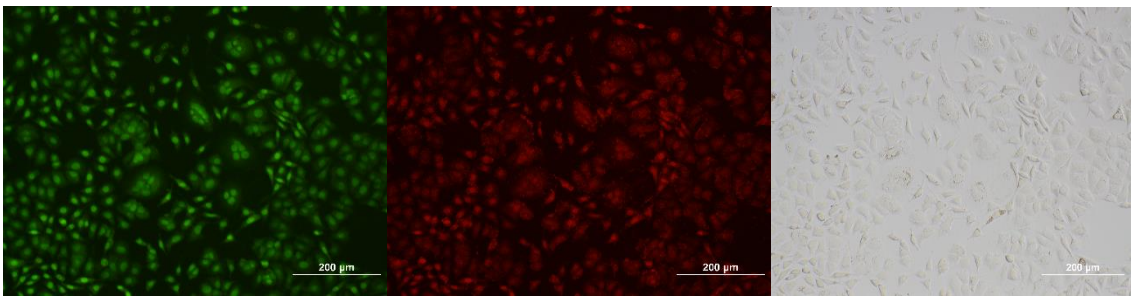
Şekil 4.42. MFC-7 hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

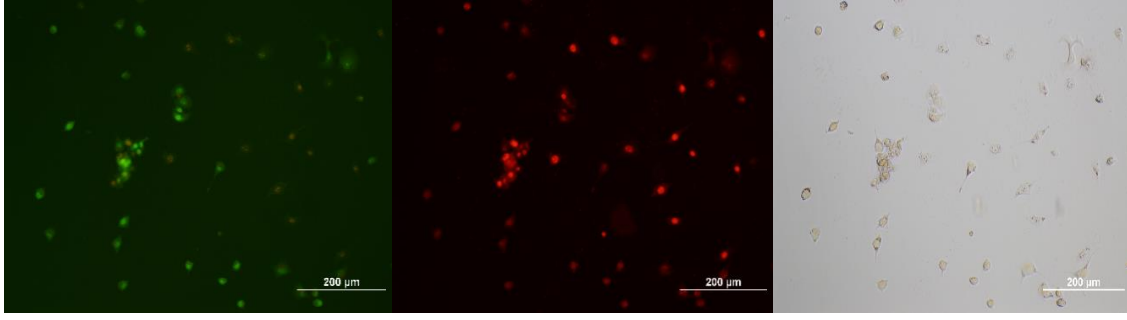


(D)

(E)

(F)

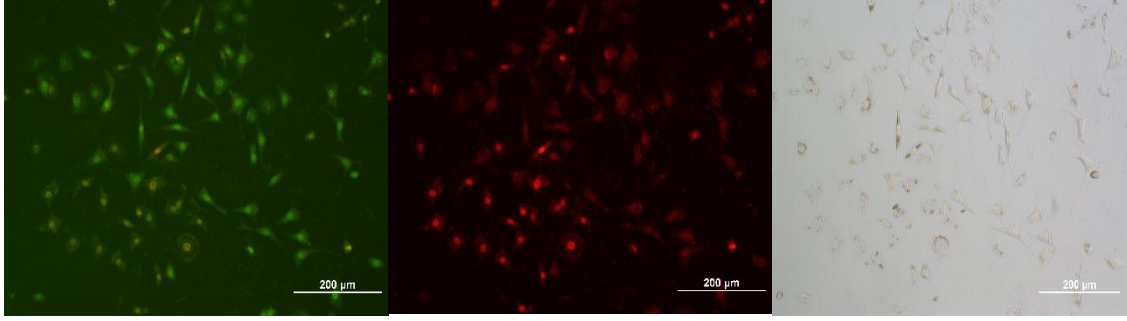
Şekil 4.43. MFC-7 hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

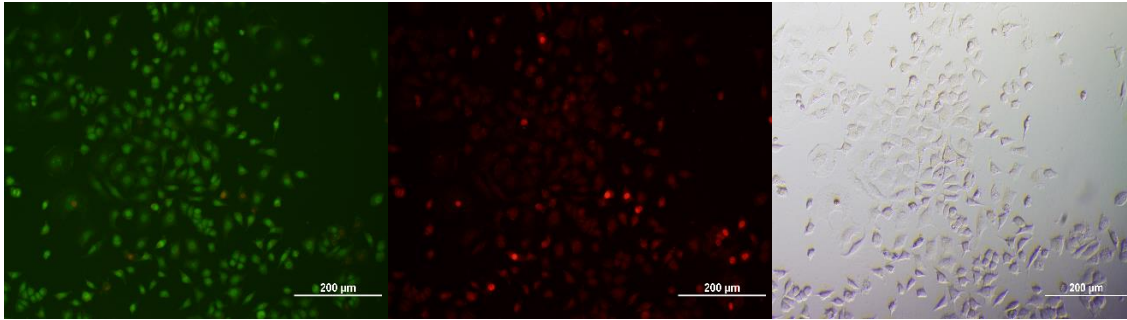


(D)

(E)

(F)

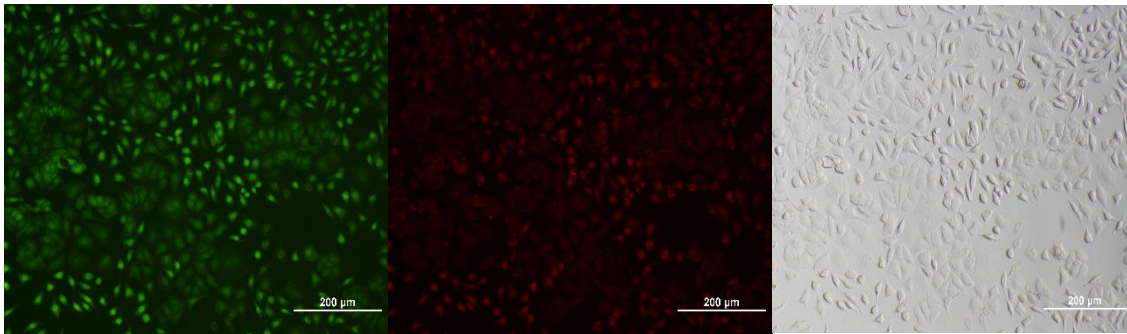
Şekil 4.44. MFC-7 hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

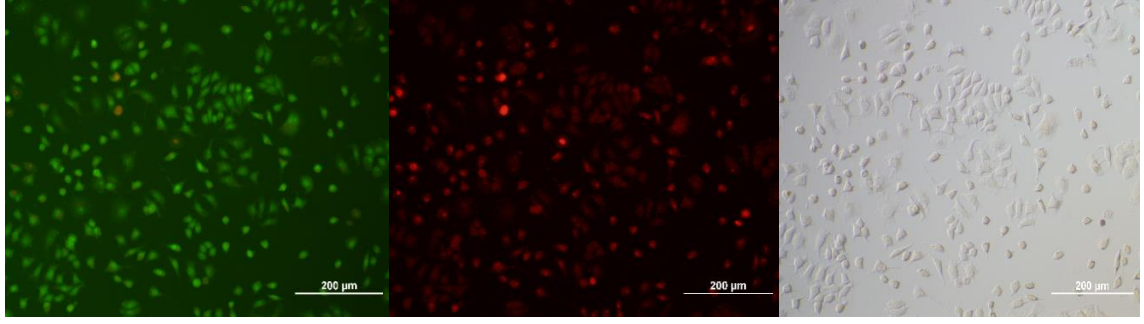


(D)

(E)

(F)

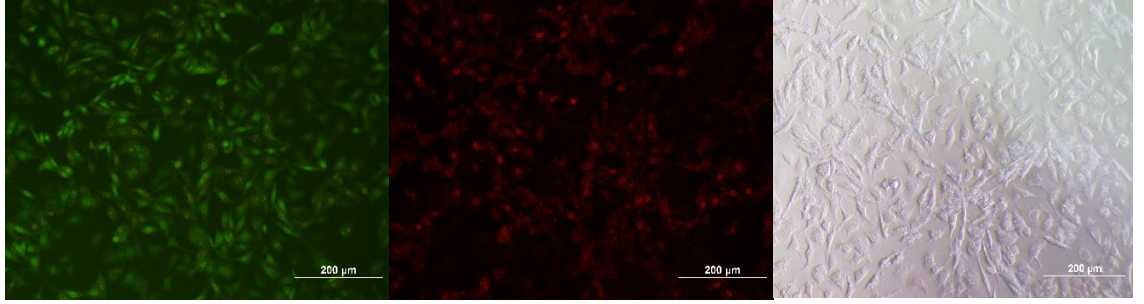
Şekil 4.45. MFC-7 hücre hattına uygulanan 200 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

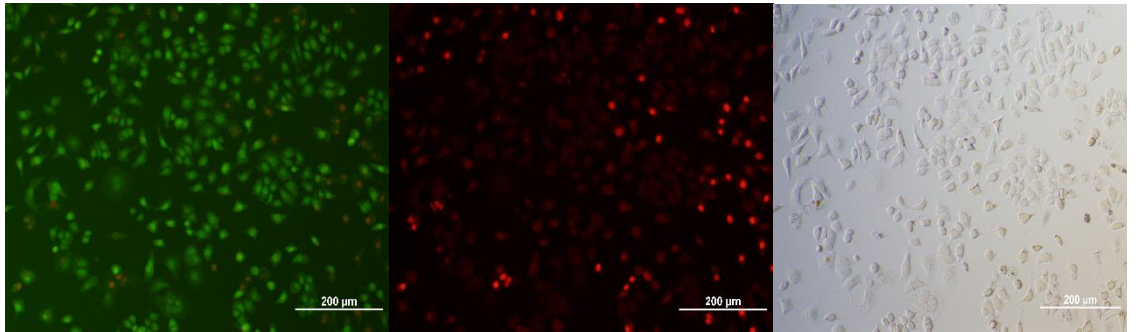


(D)

(E)

(F)

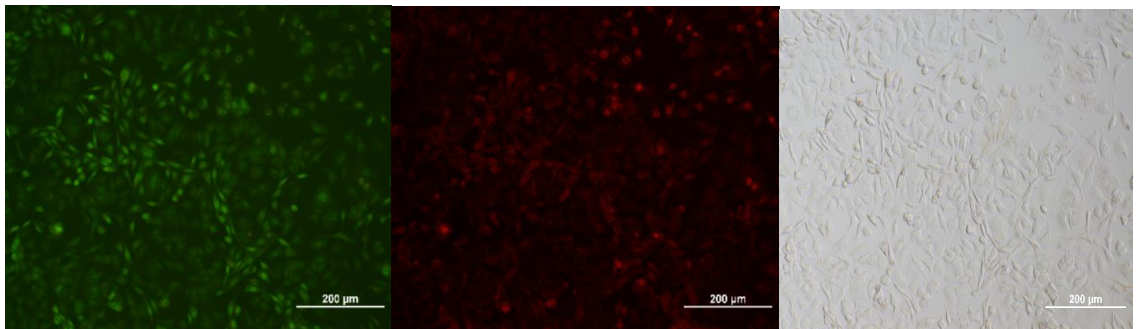
Şekil 4.46. MFC-7 hücre hattına uygulanan 600 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

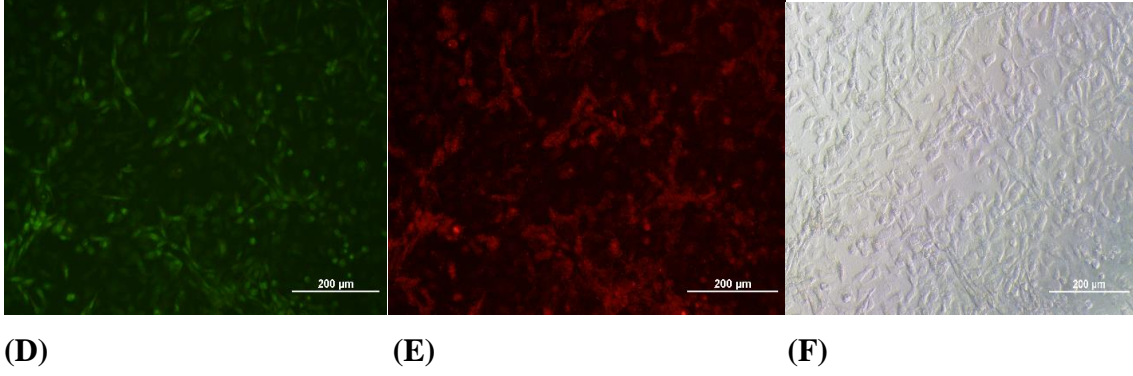
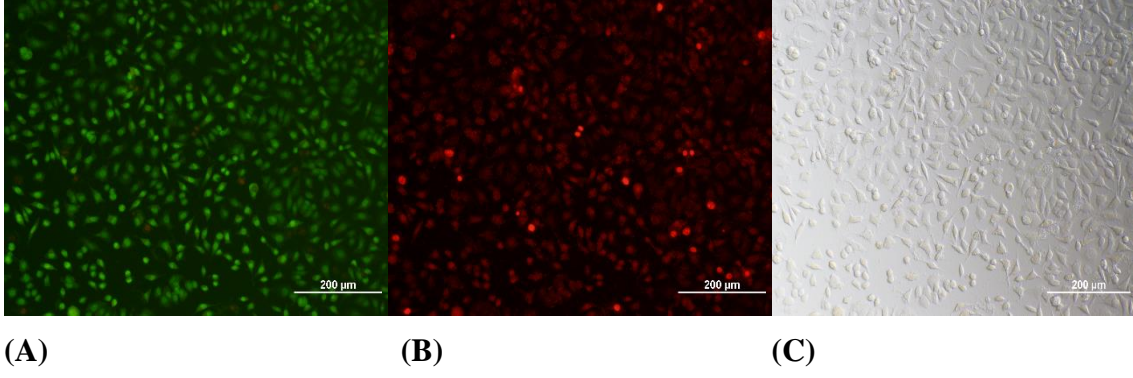


(D)

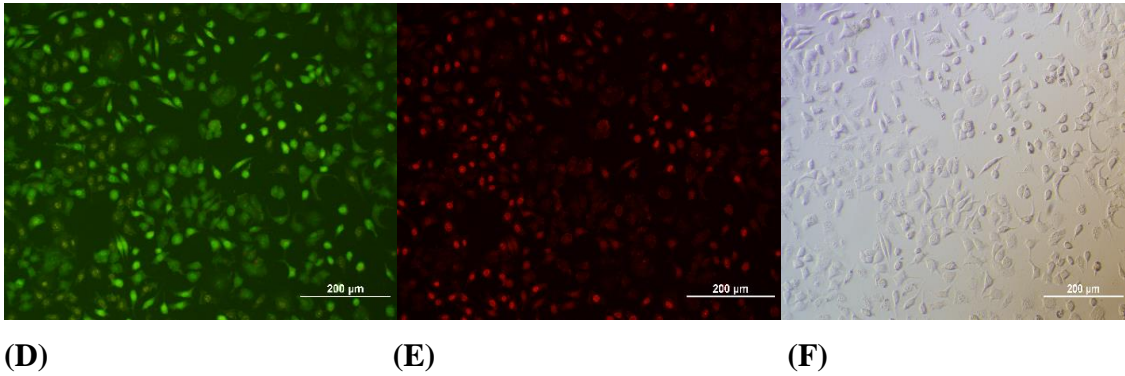
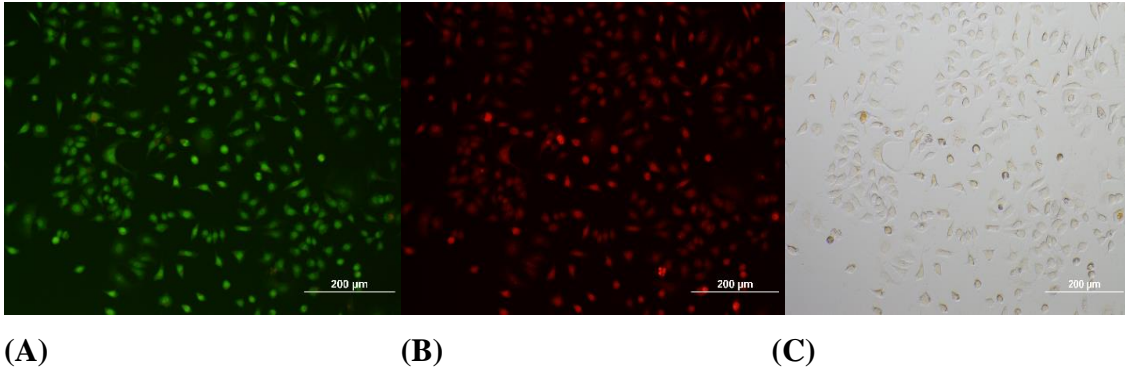
(E)

(F)

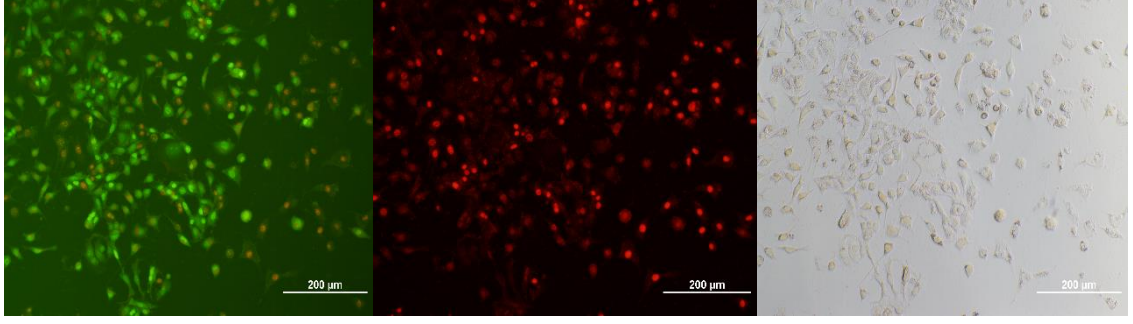
Şekil 4.47. MFC-7 hücre hattına uygulanan 900 µg/mL PBP'lerinin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.48. MFC-7 hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



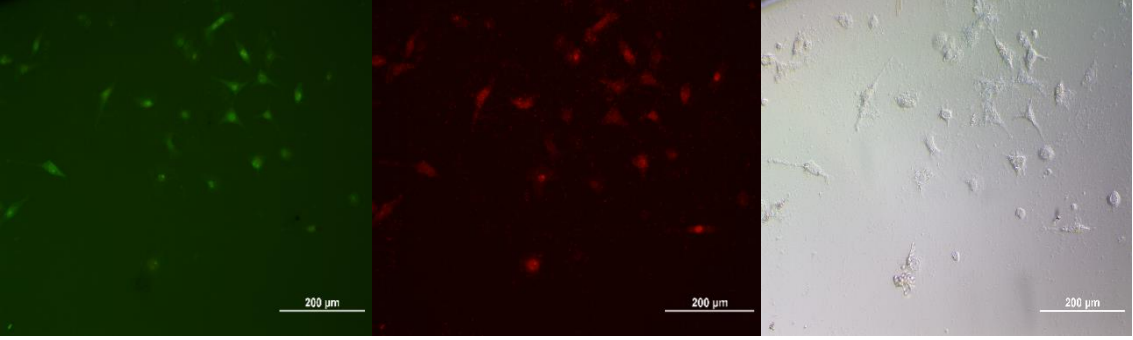
Şekil 4.49. MFC-7 hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

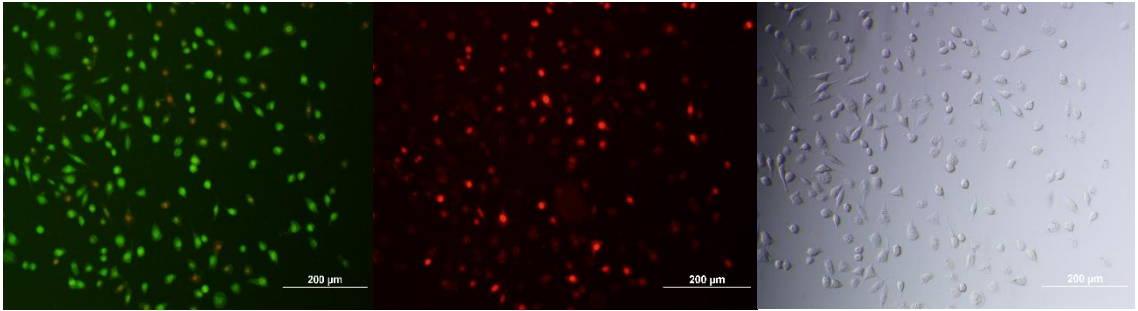


(D)

(E)

(F)

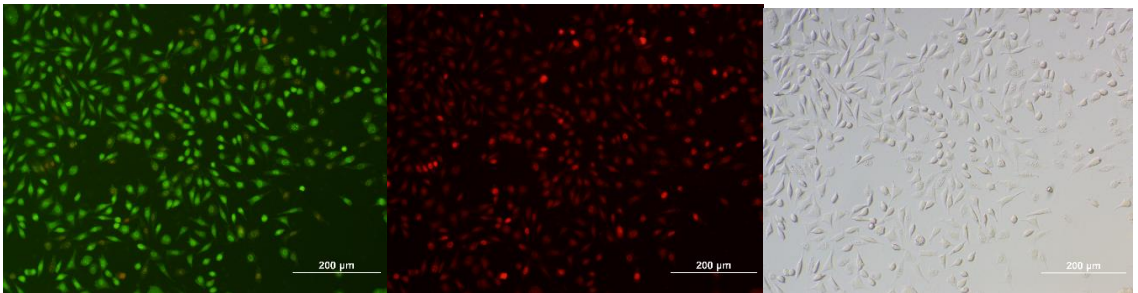
Şekil 4.50. MFC-7 hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

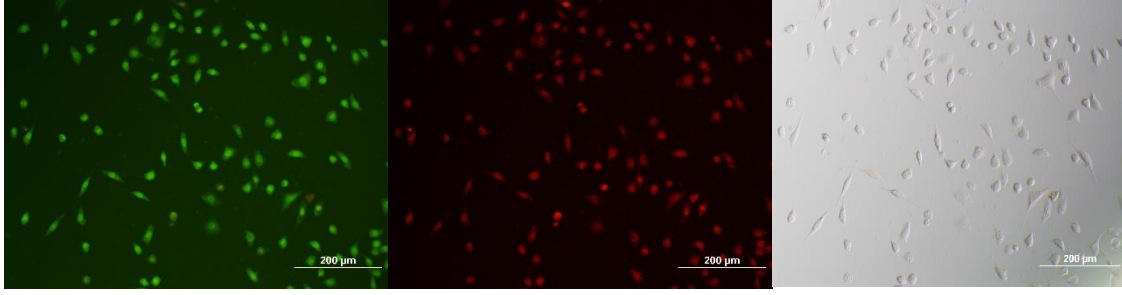


(D)

(E)

(F)

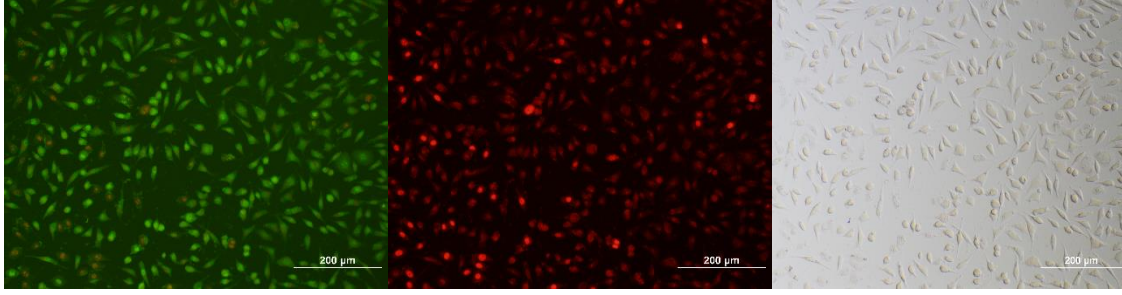
Şekil 4.51. SKBR hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

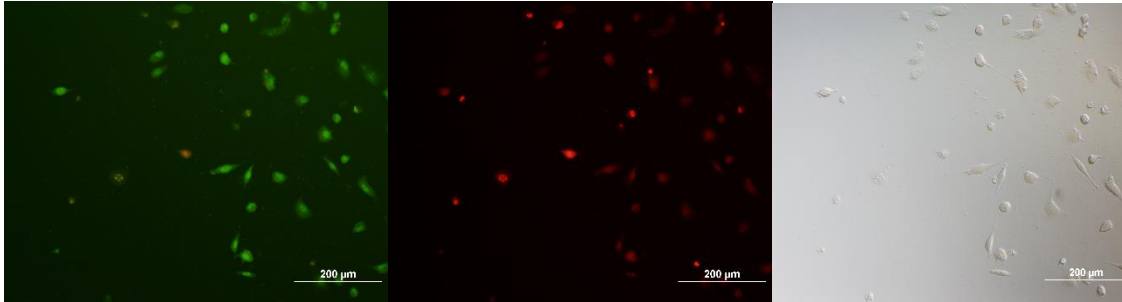


(D)

(E)

(F)

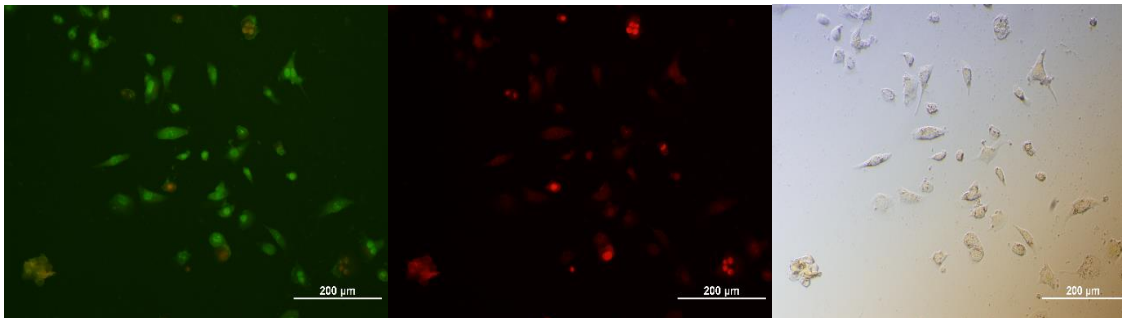
Şekil 4.52. SKBR hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri..



(A)

(B)

(C)

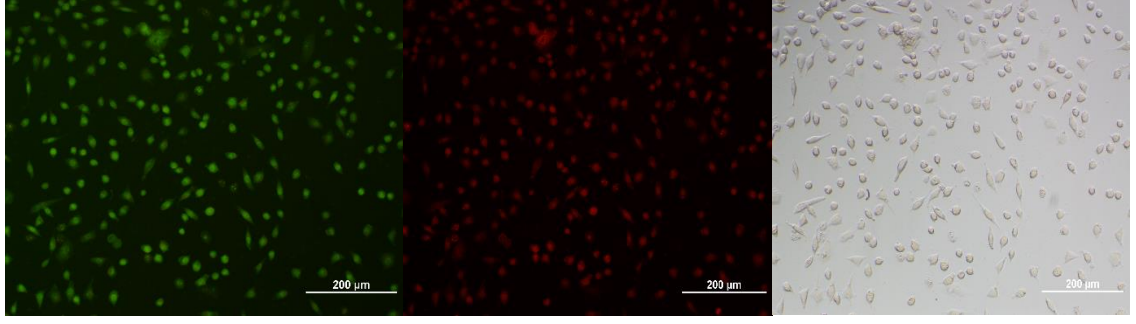


(D)

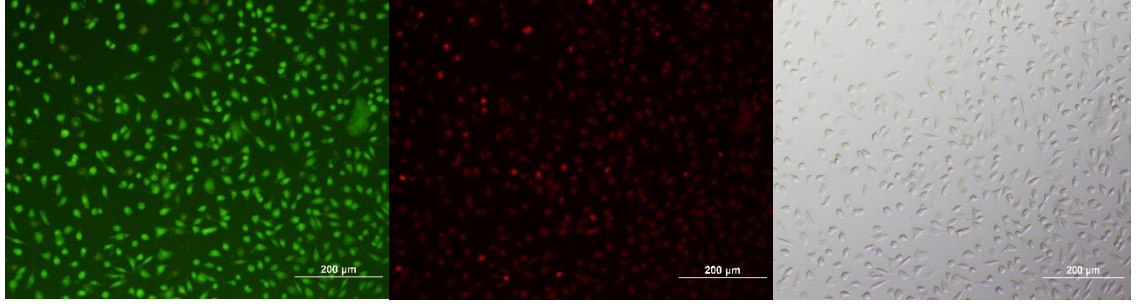
(E)

(F)

Şekil 4.53. SKBR hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri..

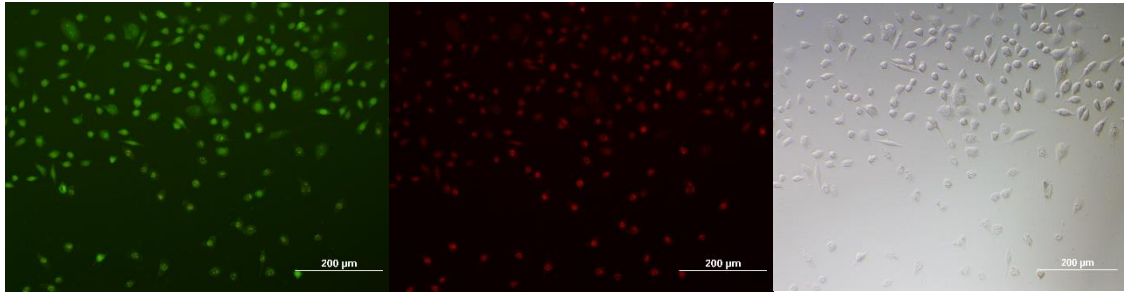


(A) (B) (C)

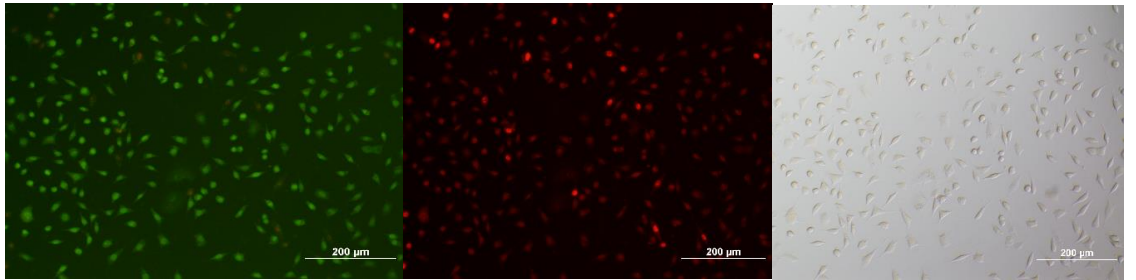


(D) (E) (F)

Şekil 4.54. SKBR hücre hattına uygulanan 200 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



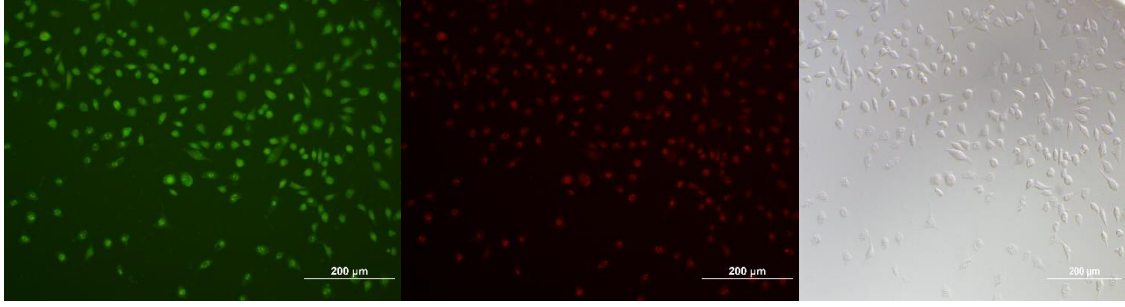
(A) (B) (C)



(D) (E) (F)

Şekil 4.55. SKBR hücre hattına uygulanan 600 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.

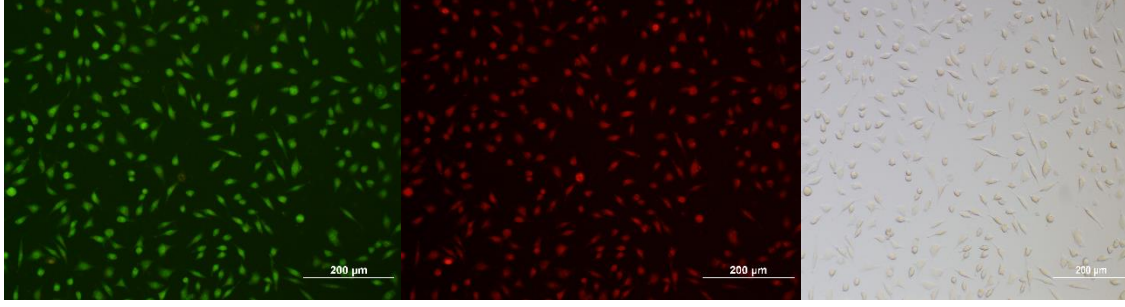




(A)

(B)

(C)

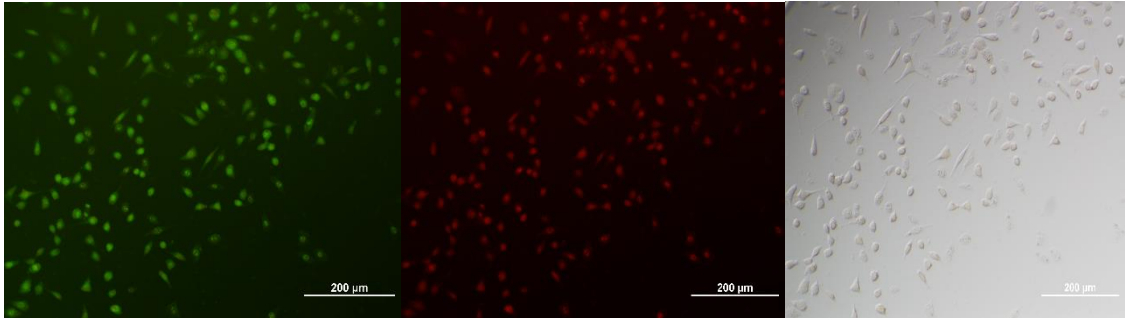


(D)

(E)

(F)

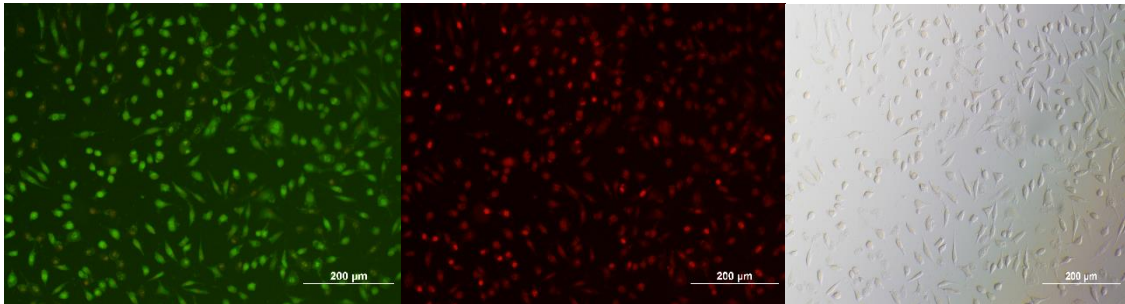
Şekil 4.56. SKBR hücre hattına uygulanan 900 µg/mL PBP'lerin, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

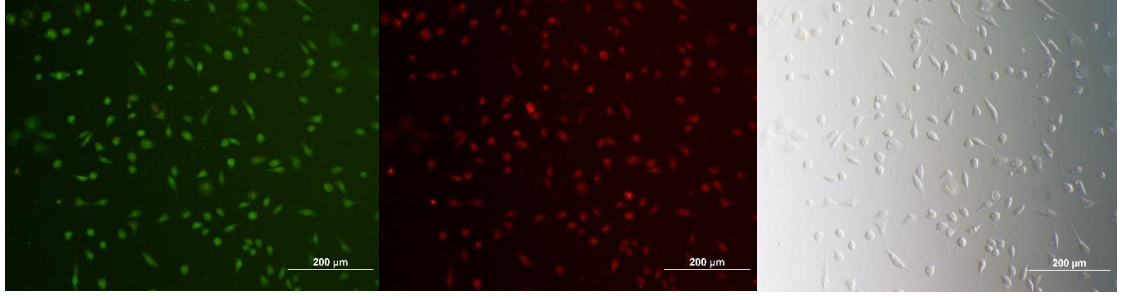


(D)

(E)

(F)

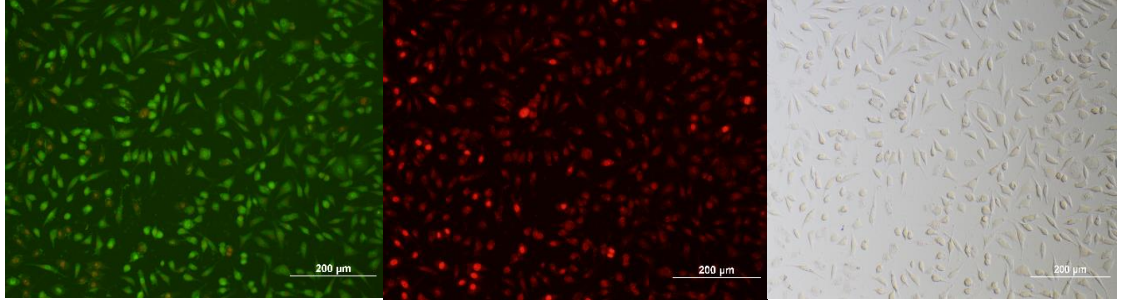
Şekil 4.57. SKBR hücre hattına uygulanan 25 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)

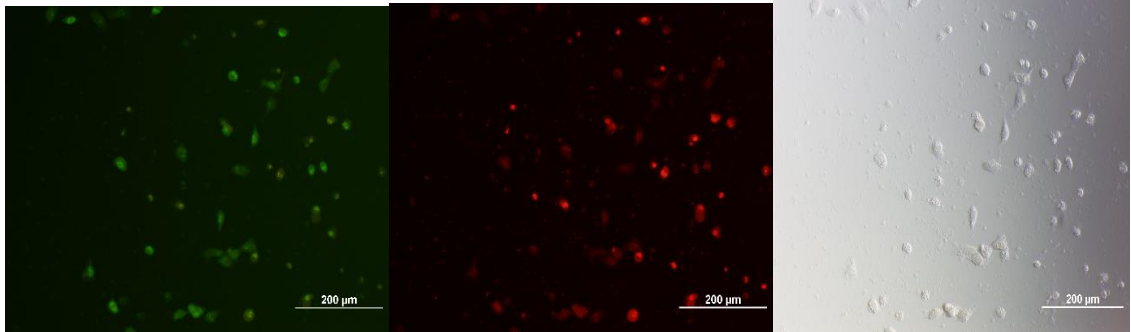


(D)

(E)

(F)

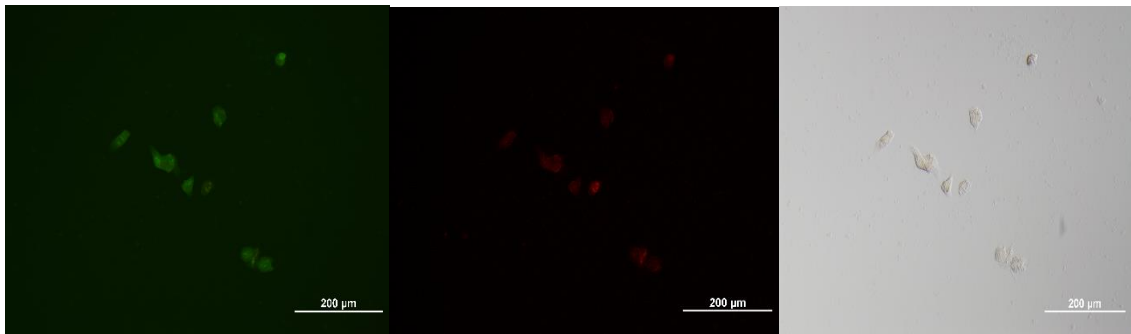
Şekil 4.58. SKBR hücre hattına uygulanan 50 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)

Şekil 4.59. SKBR hücre hattına uygulanan 100 µg/mL AgNP+PBP, 24. (A, B, C) ve 48. (D, E, F) saatlerdeki floresan boyama görüntüleri.

Sitotoksosite çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırılmasının değerlendirilmesinde Kutu ve Çizgi grafikleri kullanılmıştır. MFC-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerine göre karşılaştırılması Şekil 4.60. ve Şekil 4.61’de gösterilmiştir. Şekil 4.62 ve Şekil 4.63’de ise sırasıyla 24 ve 48 saatlerde MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatlarında ki AgNP, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının hücelere göre karşılaştırılması gösterilmiştir.

MCF-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda incelendiğinde;

- AgNP’lerin 25 ve 50 µg/ml’lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml’lik konsantrasyonunun hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu tesbit edilmiştir. Şekil 4.42, 4.43 ve 4.44’de AgNP’lerin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.
- PBP’nin 25, 50, 100 µg/ml’lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.45, 4.46 ve 4.47’de PBP’nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.
- AgNP+PBP 25 ve 50 µg/ml’lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml’lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.48, 4.49 ve 4.50’de AgNP+PBP farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.

24 saatlik inkübasyon süresi için toksik olan konsantrasyonlar (AgNP ve AgNP+PBP 100 µg/ml’lik) karşılaştırıldıklarında, AgNP+PBP kompleksinin 100 µg/ml’lik konsantrasyonlarda daha az toksik etki tesbit edilerek canlılık oranının AgNP’deki uygulanan 100 µg/ml’lik konsantrasyonuna göre daha fazla olduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.11. MFC-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti gösterilmiştir.

MCF-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendiğinde;

- AgNP'lerin 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı ama 100 µg/ml'lik konsantrasyonunun hücre hattı üzerinde toksik etkisinin 24 saatlik inkübasyona göre daha da arttığı ve ölü hücre sayısının oranının arttığı böylece canlılık oranının düştüğü tesbit edilmiştir. 100 µg/ml'lik konsantrasyon uygulandığında hücre yapısının tamamen bozulduğunu Şekil 4.42, 4.43 ve 4.44'de gösterilmiştir.
- PBP'nin 25, 50, 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı tesbit edilmiştir. Şekil 4.45, 4.46 ve 4.47'de PBP'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.
- AgNP+PBP 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.48, 4.49 ve 4.50'de AgNP+PBP farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.

48 saatlik inkübasyon süresi için toksik olan konsantrasyonlar (AgNP ve AgNP+PBP 100 µg/ml'lik) karşılaştırıldıklarında, AgNP+PBP kompleksinin 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda daha az toksik etki tespit edilerek canlılık oranının AgNP'deki uygulanan 100 µg/ml'lik konsantrasyonuna göre daha fazla olduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.11. MFC-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. MFC-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti.

Biyomalzeme	Konsantrasyon (µg/ml)	MCF-7	SKBR-1
AgNP	25	TEY	TEY
AgNP	50	TEY	TEY
AgNP	100	TEV	TEV
PBP	25	TEY	TEY
PBP	50	TEY	TEY
PBP	100	TEY	TEY
AgNP+PBP	25	TEY	TEY
AgNP+PBP	50	TEY	TEY
AgNP+PBP	100	TEV	TEV

Toksik Etki Var (TEV)

Toksik Etki Yok (TEY)

SKBR-1 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda incelendiğinde;

- AgNP'lerin 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml'lik konsantrasyonunun hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu tesbit edilmiştir. Bu konsantrasyonda hücre sayısının az olduğu ölen hücrelerin dökülmüş ve geriye çok az sayıda hücre kaldığını ve kalan hücrelerin yapı ve şekillerinin değiştiği Şekil...’ da gösterilmiştir. Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53’de AgNP’lerin farklı konsantrasyonlarının SKBR-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.
- PBP'nin 25, 50, 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan PBP'in hücre hattı üzerinde besleyici etkisinin olduğu saptanmıştır. Şekil 4.54, 4.55 ve 4.56’da PBP'nin farklı konsantrasyonlarının SKBR-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.

- AgNP+PBP 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.57, 4.58 ve 4.59'da AgNP+PBP farklı konsantrasyonlarının SKBR-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. SKBR-1 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti gösterilmiştir.

SKBR-1 hücre hattı üzerinde AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonunda incelendiğinde;

- AgNP'lerin 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı ama 100 µg/ml'lik konsantrasyonunun hücre hattı üzerinde toksik etkisinin 24 saatlik inkübasyona göre daha da arttığı böylece canlılık oranının düştüğü tesbit edilmiştir. Uygulanan 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda 48. Saatte ölü hücre sayısının biraz arttığı saptanmıştır. AgNP'lerin 100 µg/ml'lik konsantrasyon uygulandığında ise hücre yapısı ve bütünlüğünün tamamen bozulduğu Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53'de gösterilmiştir.
- PBP'nin 25, 50, 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olmadığı tesbit edilmiştir. Şekil 4.54, 4.55 ve 4.56'da PBP'nin farklı konsantrasyonlarının SKBR-1 hücre hattı üzerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.
- AgNP+PBP 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etki saptanmazken 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda toksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. AgNP+PBP uygulanan 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarda birinci güne göre ölü hücre sayısının arttığı böylece canlılık oranının düştüğü saptanmıştır. AgNP+PBP 100 µg/ml'lik konsantrasyon uygulandığında ise hücre yapısı ve bütünlüğünün tamamen bozulduğunu nerdeyse hiç canlı hücrenin olmadığı saptanarak 48 saatlik inkübasyon süresinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yeterli olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.57, 4.58 ve 4.59'da AgNP+PBP farklı konsantrasyonlarının SKBR-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu etkisinin floresan boyama mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.

48 saatlik inkübasyon süresi için toksik olan konsantrasyonlar (AgNP ve AgNP+PBP 100 µg/ml'lik) karşılaştırıldığında, AgNP+PBP kompleksinin 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda daha az toksik etki tespit edilerek canlılık oranının AgNP'deki uygulanan 100 µg/ml'lik konsantrasyonuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. MFC-7 hücre hattı üzerinde AgNP, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerinin özeti gösterilmiştir.

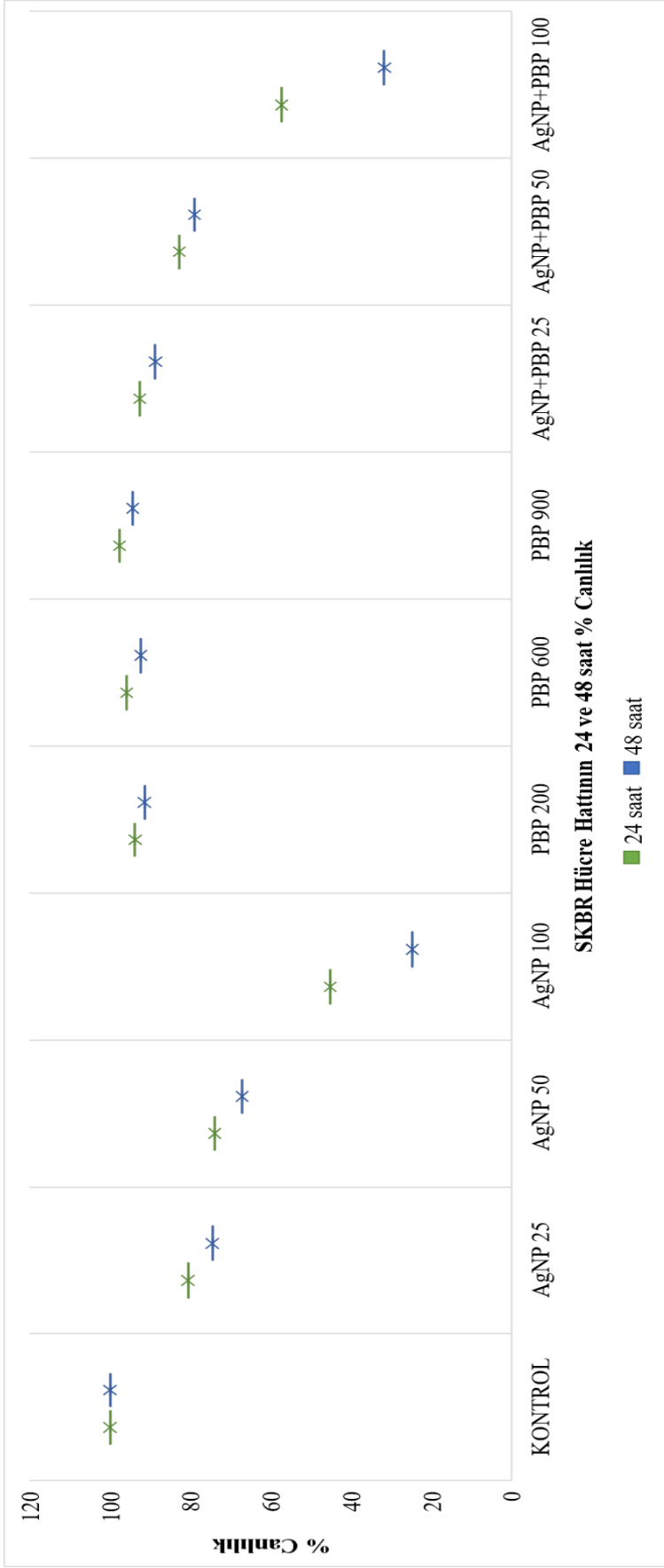
MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde uygulanan AgNPS, PBP ve AgNP+PBP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda birbiri ile karşılaştıracak olursak;

- AgNP'lerin uygulanan her üç farklı konsantrasyon 24 ve 48. saatlerin sonunda SKBR-1 hücre hattına MCF-7 hücresine göre daha toksik etkili olduğu tesbit edilmiştir.
- PBP'nin uygulanan her üç farklı konsantrasyonunun 24 ve 48. saatlerin sonunda her iki hücre için toksisitesinin olmadığı ve besleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. SKBR-1 hücre hattında 48. Saat sonunda hücreler incelendiğinde 24. Saate göre daha fazla hücre sayısı görülmüştür.
- AgNP+PBP 100 µg/ml'lik konsantrasyonu 24 saatlik inkübasyon sonunda MCF-7 hücre hattı üzerinde toksik etkisinin daha fazla olmasına rağmen SKBR-1 hücre hattı üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. 48. Saat sonunda ise ölü hücre sayısı her iki hücre hattında birinci güne göre daha fazladır.

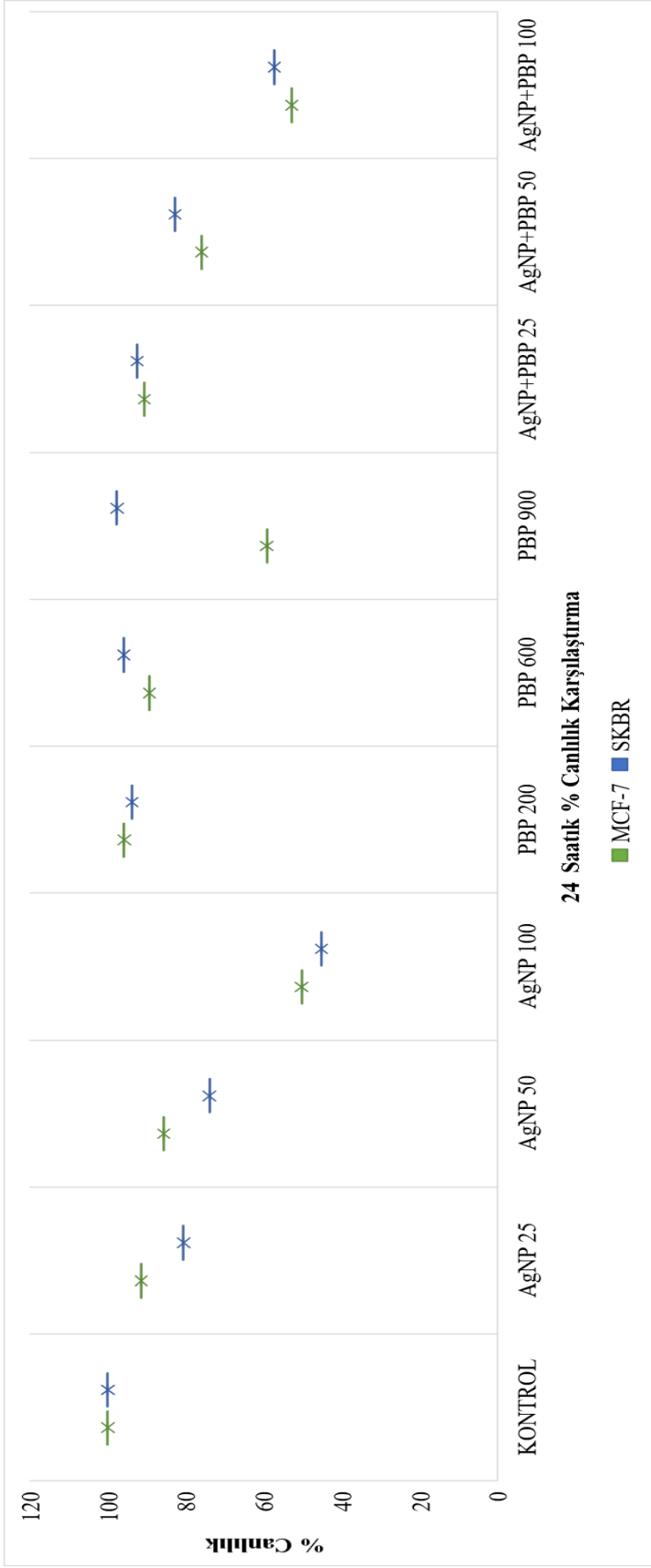


Şekil 4.60. MFC-7 hücre hattı üzerinde AgNPS, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlara göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Biyomalzemelerin sate göre MFC-7 hücre hattı üzerindeki inhibisyon etkisi.

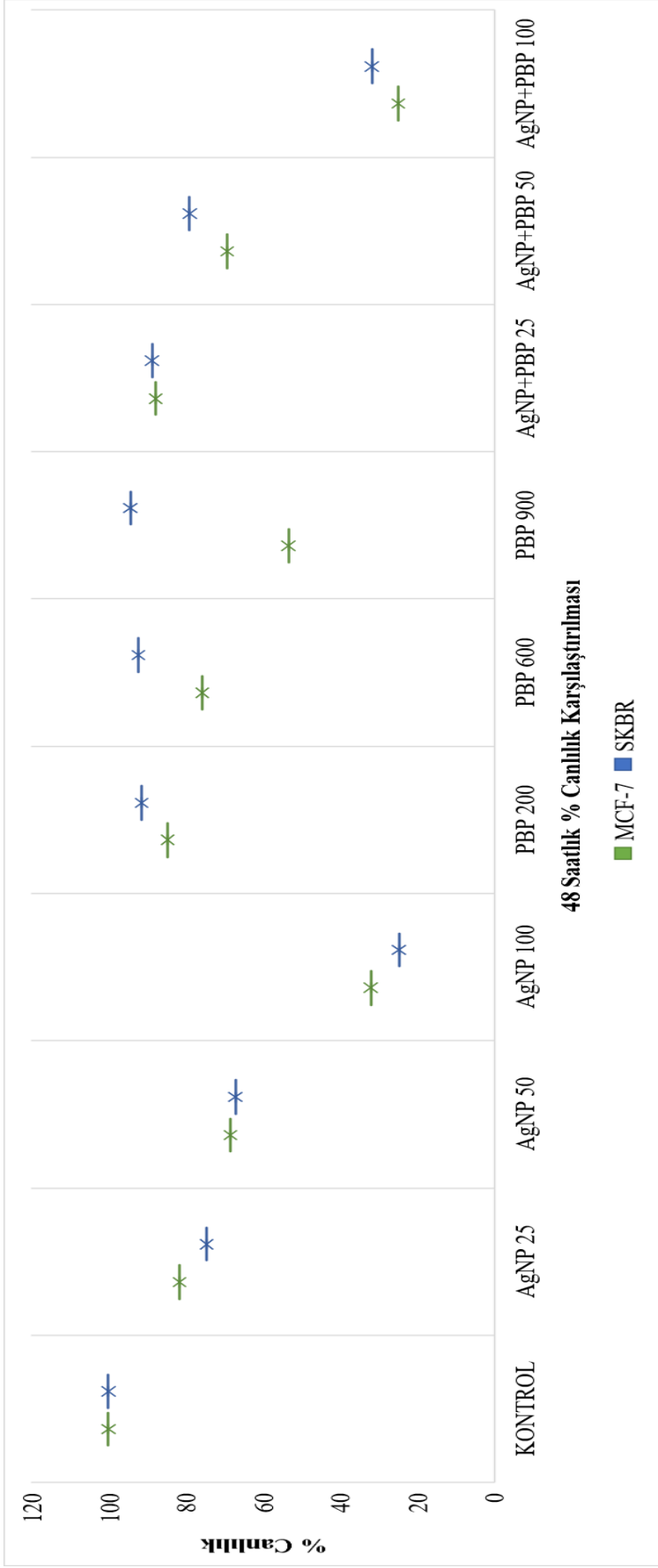




Şekil 4.61. SKBR-1 hücre hattı üzerinde AgNPs, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlara göre inhibisyonunun karşılaştırılması. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Biyomalzemelerin sate göre SKBR hücre hattı üzerindeki inhibisyon etkisi.



Şekil 4.62. AgNPs, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat inkübasyon sonrasında MFC-7 ve SKBR hücre hatları üzerine etkisinin karşılaştırılması. Biyomalzemelerin 24 saatlik hücre hatlarına inhibisyon etkisi.



Şekil 4.63. AgNPs, PB ve PB + AgNP kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat inkübasyon sonrasında MFC-7 ve SKBR hücre hatları üzerine etkisinin karşılaştırılması. Biyomalzemelerin 24 saatlik hücre hatlarına inhibisyon etkisi.

İstatistiksel olarak elde edilen veriler hücreye, süreye, verilen biyomalzemeye ve konsantrasyonlarına göre normallik testi ile değerlendirilmiştir.

Biyomalzemelerin uygulandıkları hücre tipine her bir hücrenin kendi içinde sitotoksik aktivitelerinin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney ve Kruskal Wallis testine göre gerçekleştirilmiştir.

MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde uygulanan üç farklı biyomalzemin karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ( $p < 0.05$ ) ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.26)

Yapılan analiz sonucunda, MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatlarına verilen farklı biyomalzemelerin arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir. p değeri MFC-7 hücresi için  $p < 0,480$  iken SKBR için  $p < 0,184$  olarak tespit edilmiştir. Hücreler içinde verilen biyomalzemelerin konsantrasyonları arttıkça anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Bunun yanı sıra hücrelerin kendi içinde verilen biyomalzemelerin konsantrasyonları arasında anlamlı fark oluşmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde sentezlenen biyomalzemelerin (AgNP, PBP ve AgNP+PBP) Kruskal Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzemelerin uygulandıkları süre ve hücre tipine göre Sitotoksistik Aktivitelerinin meydana getirdiği farkı anlayabilmek için istatistiksel değerlendirmeler Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, MCF-7 ve SKBR hücre hatlarında süreye göre uygulanan biyomalzemeler (AgNP, PBP ve AgNP+PBP) arasında anlamlı fark olduğu tesbit edilmiştir. p değeri her iki hücre hattı için 24 ve 48 saatlerde  $p < 0,001$  olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde sentezlenen biyomalzemelerin (AgNP, PBP ve AgNP+PBP) süreye göre (24 ve 48 saatlerde) Mann-Whitney testine ( $p < 0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Biyomalzemelerin uygulandıkları süre her bir hücre hattı için değerlendirildiğinde ise, 24 ve 48 saatlerde MFC-7 hücre hattı için anlamlı bir fark ( $p < 0,820$ ) oluşmazken SKBR hücre hattı için anlamlı fark ( $p < 0,038$ ) meydana gelmiştir. Bu analizler Kruskal Wallis testine ( $p < 0.05$ ) göre gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, p değeri her iki hücre hattı için 24 ve 48 saatlerde farklılık göstermektedir. Bu analiz sonucunda uygulanan süreye bağlı ortalamanın arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.12. MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde sentezlenen biyomalzemelerin (AgNP, PBP ve AgNP+PBP) uygulandığı süreye (24 ve 48 saatlerde) ve hücre tipine göre Kruskal Wallis testine ( $p<0.05$ ) göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.12. İstatistiksel olarak sitotoksikite aktivitelerin değerlendirilmesi.

İstatistiksel olarak değerlendirme	Test	Sonuç
MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde uygulanan üç farklı biyomalzemin karşılaştırılması	Kruskal Wallis testi ( $p<0.05$ )	fark olmadığı
MCF-7 ve SKBR-1 hücre hatları üzerinde sentezlenen biyomalzemelerin (AgNP, PBP ve <u>AgNP+PBP</u> ) süreye göre (24 ve 48 saatlerde)	Mann-Whitney testine ( $p<0.05$ )	fark olduğu $p< 0,001$
Biyomalzemelerin uygulandıkları süre her bir hücre hattı için değerlendirildiğinde ise, 24 ve 48 saatlerde	Kruskal Wallis testi ( $p<0.05$ )	MFC-7 fark oluşmazken ( $p<0,820$ ) SKBR fark olduğu ( $p<0,038$ )

Remya ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada, sentezledikleri AgNP'lerin, MCF-7 hücre hattına karşı etkili sitotoksik potansiyel sergilediğini ve inhibitör konsantrasyon (IC50), 7.19 mg / mL'de olduğunu rapor etmişlerdir. Daha sonra sentezlenen AgNP'lerin apoptotik etkilerini AO / EB boyama yöntemi ile belirleyerek bu nanopartiküllerin antikanser ajanı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [150].

Bir diğer çalışmada *Annona squamosal* bitki ekstraktlarından sentezlenen AgNP'lerin, MCF-7 ve HBL-100 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini 24 ve 48 saatlik sürelerde incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda ise, her iki hücre hattında uygulanan nanopartiküllerin dozlarına bağlı sitotoksik etkisinin olduğunu belirlemişlerdir [182].

Shahnaz Majeed ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada mikrobiyal yollarla sentezlenen AgNP'lerin sitotoksik etkilerini A-549 hücre hattı üzerinde incelemişlerdir. Deney aşamasında uygulanan farklı konsantrasyonlar sonunda 80 µg/mL üzeri konsantrasyonlarda toksik etkisinin olduğu ve bu etkisinin zamana bağlı olarak arttığını tespit etmişlerdir [130].

Literatürdeki çalışmaların sonucunda elde edilen veriler ile tez kapsamında elde ettiğimiz verileri karşılaştırdığımızda, AgNP'lerin uygulandıkları konsantrasyona, uygulandıkları süreye ve uygulanan hücre hattı türüne göre sitotoksik aktivitesi değişkenlik göstermektedir. Bunun yanı sıra uygulanan her hücre hattında farklı IC<sub>50</sub> değeri ortaya çıkmaktadır.

## 5. YORUM

- ✓ Biyosentez yoluyla elde edilen gümüş nanopartiküller ve pullulan biyopolimerleri kimyasal yollarla sentezlenen malzemelere göre daha çevre dostu, ekonomik ve devamlı sentezlenebilmektedirler.
- ✓ Mikroorganizmalar kullanılarak sentezlenen biyomalzemeler bitkilerden sentezlenen biyomalzemelere göre zaman ve ekonomik olarak daha avantajlıdır.
- ✓ Tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmada, çok geniş kullanım alanına sahip olduğu kadar oldukça da pahalı bir metal nanopartikül olan gümüş nanopartikül ve pullulan biyopolimerinin mikrobiyal yollardan üretimi incelenmiştir.
- ✓ Birden fazla mikroorganizma kullanılarak AgNP'ler sentezlenmiştir. Nanopartikül sentezinin yüksek olduğu düşünülen ve literatürde yapılan bu çalışma prosesine benzer bir çalışmanın bulunmadığı tespit edilmiş üç *Candida* türü seçilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Üç *Candida* türünden AgNP'ler sentezlenmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin gümüş olup olmadığı belirlemek için karakterizasyon işlemleri için gerçekleştirilmiştir. Bunun için çeşitli, FTIR, SEM, XRD vs. analizler kullanılmıştır.
- ✓ Yüksek miktarda AgNP eldesi için; üretim ortamı ve reaksiyon ortamı optimizasyonları gerçekleştirilerek her bir kısma uygun cihaz ve yöntemler kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Optimum koşullarda sentezlenen inorganik nanopartiküllerin detaylı karakterizasyonları çeşitli analizler ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntem ve analizler: SEM, FTIR, Zeta boyut ölçer, Zeta potansiyel, XRD vs.
- ✓ Sonuç olarak negatif yüklü 50-70 nm aralığında küreler halinde gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir.
- ✓ Sentezlenen nanopartiküllerin biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilerek, bu nanopartiküllerin antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan etkiye sahip oldukları ortaya konulmuştur. Bunların yanı sıra bu nanopartiküllerin antibiyotikler ile uygulandıklarında daha çok antimikrobiyal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.
- ✓ Biyolojik yollardan sentezlenen gümüş nanopartiküllerin kanserli hücreler (MCF-7 ve SKBR) üzerine etkisi incelenmiştir.

- ✓ Gümüş nanopartiküllerin sitotoksik etkileri literatürdeki çalışmalardan bilinmektedir. Bu sitotoksik etkisinin azaltılması için tez kapsamında doğal biyopolimer olan pullulan sentezlenmiştir.
- ✓ Pullulan biyopolimerinin sentezi mikrobiyal yollar ile gerçekleştirilerek NMR ve FTIR yöntemleri ile karakterize edilip üretim ortamı ve reaksiyon ortamı optimizasyon işlemleri tamamlanmıştır.
- ✓ Optimum koşullarda sentezlenen pullulan biyopolimeri SEM, ZETA boyut ölçer, TGA-DTA gibi yöntemler kullanılarak detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemleri sonucunda üretilen pullulanın nanopartikül boyutlarında olduğu belirlenerek AgNP'lerin kaplanması için ideal bir kaplama biyomateryal olabileceğini kanıtlamıştır.
- ✓ Pullulan biyopolimerinin kaplama materyali olarak kullanılabilmesi için biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda bu biyopolimerin biyouyumlu ve non toksik olduğu ve hatta hücrelere besleyici katkıda bulunduğu belirlenmiştir.
- ✓ Tez çalışmamızın son aşamasında, biyosentez yolu ile elde edilen AgNP'lerin ve pullulan biyopolimerinin yani inorganik ve organik nanopartiküllerimizin AgNP+PBP komplekslerinin oluşturulması deneyleri gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Fiziksel karışım sonucu elde ettiğimiz AgNP+PBP biyomateryalinin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilerek, elde edilen kompleks yapının biyoaktivite çalışmaları yapılmıştır. Yürütülen biyoaktivite çalışmaları sonucunda bu yapının bir önceki biyomalzemelere göre daha fazla antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ AgNP+PBP biyomalzemesi ilk defa bu tez kapsamında oluşturulmuş, detaylı olarak optimizasyon, karakterizasyon ve en önemlisi biyoaktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bu organik + inorganik kompleks yapıların kanser hücrelerinin gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler sonraki çalışmalar için yol gösterici olacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] I. S. Korbekandi H, “Silver Nanoparticles,” *Deliv. Nanoparticles*, 2012.
- [2] S. Kaviya, J. Santhanalakshmi, and B. Viswanathan, “Green synthesis of silver nanoparticles using *Polyalthia longifolia* leaf extract along with D-sorbitol: Study of antibacterial activity,” *J. Nanotechnol.*, pp. 1–5, 2011.
- [3] E. Khalil KA, Fouad H, “Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications,” *Int J Electrochem*, vol. 8, pp. 3483–3493, 2013.
- [4] K. M. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D and S. M. Kumar R, “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 28, pp. 313–318, 2003.
- [5] G. C. Klaus-Joerger T, Joerger R, Olsson E, “Bacteria as workers in the living factory: metal accumulating bacteria and their potential for materials science,” *Trends Biotechnol*, vol. 19, pp. 15–20, 2001.
- [6] P. Kaur and R. Luthra, “Silver nanoparticles in dentistry: An emerging trend,” *SRM J. Res. Dent. Sci.*, vol. 7, no. 3, p. 162, 2016.
- [7] A. Mahor, S. K. Prajapati, A. Verma, R. Gupta, T. R. R. Singh, and P. Kesharwani, “Development, in-vitro and in-vivo characterization of gelatin nanoparticles for delivery of an anti-inflammatory drug,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 36, pp. 55–61, 2016.
- [8] P. Kaur, “Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,” *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 32, 2012.
- [9] R. A. Bapat *et al.*, “An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, no. May, pp. 881–898, 2018.
- [10] J. R. Morones *et al.*, “The bactericidal effect of silver nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- [11] Y. J. Cheng *et al.*, “In situ formation of silver nanoparticles in photocrosslinking polymers,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 97 B, no. 1, pp.

124–131, 2011.

- [12] L. Cheng, K. Zhang, M. A. S. Melo, M. D. Weir, X. Zhou, and H. H. K. Xu, “Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles,” *J. Dent. Res.*, vol. 91, no. 6, pp. 598–604, 2012.
- [13] T. O. Peulen and K. J. Wilkinson, “Diffusion of nanoparticles in a biofilm,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 8, pp. 3367–3373, 2011.
- [14] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, “Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 11, pp. 580–588, 2010.
- [15] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 42, pp. 1712–1720, 2015.
- [16] H. Jia, W. Hou, L. Wei, B. Xu, and X. Liu, “The structures and antibacterial properties of nano-SiO<sub>2</sub> supported silver/zinc-silver materials,” *Dent. Mater.*, vol. 24, no. 2, pp. 244–249, 2008.
- [17] J. Durner, M. Stojanovic, E. Urcan, R. Hickel, and F. X. Reichl, “Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites,” *Dent. Mater.*, vol. 27, no. 7, pp. 631–636, 2011.
- [18] M. Samiei, M. Aghazadeh, M. Lotfi, S. Shakoei, Z. Aghazadeh, and S. M. Vahid Pakdel, “Antimicrobial efficacy of mineral trioxide aggregate with and without silver nanoparticles,” *Iran. Endod. J.*, vol. 8, no. 4, pp. 166–170, 2013.
- [19] M. Lotfi, S. Vosoughhosseini, B. Ranjkesh, S. Khani, M. Saghiri, and V. Zand, “Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*,” *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 35, pp. 6799–6803, 2011.
- [20] C. Y. Flores *et al.*, “Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, no. 2, pp. 402–408, 2010.
- [21] L. Zhao *et al.*, “Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with

- silver nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, pp. 5706–5716, 2011.
- [22] R. Singh, P. Kesharwani, N. K. Mehra, S. Singh, S. Banerjee, and N. K. Jain, “Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 41, no. 11, pp. 1888–1901, 2015.
- [23] K.-Y. Nam, “ In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles ,” *J. Adv. Prosthodont.*, vol. 3, no. 1, p. 20, 2011.
- [24] C. Marambio-Jones and E. M. V. Hoek, “A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 1531–1551, 2010.
- [25] H. H. Lara, L. Ixtepan-Turrent, E. N. Garza-Treviño, and C. Rodriguez-Padilla, “PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 8, pp. 1–11, 2010.
- [26] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 177–182, 2004.
- [27] S. Shrivastava, T. Bera, S. K. Singh, G. Singh, P. Ramachandrarao, and D. Dash, “Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 6, pp. 1357–1364, 2009.
- [28] S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, and M. Galdiero, “Silver nanoparticles as potential antiviral agents,” *Molecules*, vol. 16, no. 10, pp. 8894–8918, 2011.
- [29] K. J. Kim, W. S. Sung, S. K. Moon, J. S. Choi, J. G. Kim, and D. G. Lee, “Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 8, pp. 1482–1484, 2008.
- [30] K. J. Kim *et al.*, “Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*,” *BioMetals*, vol. 22, no. 2, pp. 235–242, 2009.
- [31] L. S. Acosta-Torres, I. Mendieta, R. E. Nuñez-Anita, M. Cajero-Juárez, and V. M. Castaño, “Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles

- for dentures,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4777–4786, 2012.
- [32] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. S. Chen, and G. Chen, “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 5, pp. 595–601, 2015.
- [33] Sotiriou G.A. et al, “Nanosilver on nanostructured silica: antibacterial activity and Ag surface area,” *Chem. Eng. J.*, vol. 170, pp. 547–554, 20011.
- [34] Kholoud M.M. et al., “Synthesis and applications of silver nanoparticles,” *Arab. J. Chem*, vol. 3, pp. 135–140, 2010.
- [35] M. V. et al Roldán, “Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis,” *J. Nanopart.*, vol. 7, p. pages[QA12], 2013.
- [36] Sotiriou G.A. and Pratsinis S.E., “Antibacterial activity of nanosilver ions and particles.,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, pp. 5649–5654, 2010.
- [37] Tien D. et al, “Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method.,” *J. Alloy. Compd.*, vol. 463, pp. 408–411, 2008.
- [38] A. et al. Kosmala, “Synthesis of silver nano particles and fabrication of aqueous Ag inks for inkjet printing.,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 129, pp. 1075–1080, 2011.
- [39] P. et al. Asanithi, “Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering.,” *J. Nanomater.*, vol. 8, p. [QA13], 2012.
- [40] L. et al. Ge, “Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity.,” *Int.J. Nanomed.*, vol. 9, pp. 2399–2407, 2014.
- [41] R. A. Bapat *et al.*, “An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, no. 2017, pp. 881–898, 2018.
- [42] . Hosseini, M.R., Sarvi, M.N., “Recent achievements in the microbial synthesis of semiconductor metal sulfide nanoparticles.,” *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 40, pp. 293–301., 2015.
- [43] A. Fariq, T. Khan, and A. Yasmin, “Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 15, no. 4, pp. 241–248, 2017.

- [44] S. Ahmed, Annu, S. Ikram, and S. Yudha, "Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 161, pp. 141–153, 2016.
- [45] K. B. Narayanan and N. Sakthivel, "Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 169, no. 2, pp. 59–79, 2011.
- [46] X. Li, H. Xu, Z.-S. Chen, and G. Chen, "Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications," *J. Nanomater.*, vol. 2011, pp. 1–16, 2011.
- [47] J. Jeevanandam, Y. S. Chan, and M. K. Danquah, "Biosynthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles," *ChemBioEng Rev.*, vol. 3, no. 2, pp. 55–67, 2016.
- [48] H. Barabadi, S. Honary, P. Ebrahimi, M. A. Mohammadi, A. Alizadeh, and F. Naghibi, "Microbial mediated preparation, characterization and optimization of gold nanoparticles," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1493–1501, 2014.
- [49] J. H. Jo *et al.*, "Pseudomonas deceptionensis DC5-mediated synthesis of extracellular silver nanoparticles," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 6, pp. 1576–1581, 2016.
- [50] P. Singh, Y. J. Kim, C. Wang, R. Mathiyalagan, and D. C. Yang, "Weissella oryzae DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 6, pp. 1569–1575, 2016.
- [51] P. Singh, Y. J. Kim, D. Zhang, and D. C. Yang, "Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 7, pp. 588–599, 2016.
- [52] P. Singh, Y. J. Kim, H. Singh, R. Mathiyalagan, C. Wang, and D. C. Yang, "Biosynthesis of Anisotropic Silver Nanoparticles by *Bhargavaea indica* and Their Synergistic Effect with Antibiotics against Pathogenic Microorganisms," *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–10, 2015.
- [53] P. Singh, Y. J. Kim, C. Wang, R. Mathiyalagan, and D. C. Yang, "Microbial synthesis of Flower-shaped gold nanoparticles," *Artif. Cells, Nanomedicine*

- Biotechnol.*, vol. 44, no. 6, pp. 1469–1474, 2016.
- [54] E. K. F. Elbeshehy, A. M. Elazzazy, and G. Aggelis, “Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. MAY, pp. 1–13, 2015.
- [55] N. Soni and S. Prakash, “Antimicrobial and mosquitocidal activity of microbial synthesized silver nanoparticles,” *Parasitol. Res.*, vol. 114, no. 3, pp. 1023–1030, 2015.
- [56] X. Zhang, S. Yan, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli, “Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates,” *Chemosphere*, vol. 82, no. 4, pp. 489–494, 2011.
- [57] E. Castro-Longoria, A. R. Vilchis-Nestor, and M. Avalos-Borja, “Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 83, no. 1, pp. 42–48, 2011.
- [58] S. A. Kumar *et al.*, “Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 3, pp. 439–445, 2007.
- [59] P. Golinska, M. Wypij, A. P. Ingle, I. Gupta, H. Dahm, and M. Rai, “Biogenic synthesis of metal nanoparticles from Actinomycetes: biomedical applications and cytotoxicity,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 19, pp. 8083–8097, 2014.
- [60] L. Karthik, G. Kumar, A. V. Kirthi, A. A. Rahuman, and K. V. Bhaskara Rao, “*Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 37, no. 2, pp. 261–267, 2014.
- [61] M. Apte *et al.*, “Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin,” *AMB Express*, vol. 3, no. Ncyc 789, pp. 1–8, 2013.
- [62] S. R. Waghmare, M. N. Mulla, S. R. Marathe, and K. D. Sonawane, “Ecofriendly production of silver nanoparticles using *Candida utilis* and its mechanistic action against pathogenic microorganisms,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 1, pp. 33–38, 2015.
- [63] K. T. Nam *et al.*, “Virus-Enabled Synthesis and Assembly Battery Electrodes,”

- Science* (80-. ), vol. 312, no. October, pp. 885–889, 2006.
- [64] S. Seshadri, K. Saranya, and M. Kowshik, “Green synthesis of lead sulfide nanoparticles by the lead resistant marine yeast, *Rhodospiridium diobovatum*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 27, no. 5, pp. 1464–1469, 2011.
- [65] K. B. Narayanan and N. Sakthivel, “Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes.,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 156, no. 1–2, pp. 1–13, 2010.
- [66] B. Nair and T. Pradeep, “Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by Lactobacillus Strains,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 2, no. 4, pp. 293–298, 2002.
- [67] N. Vigneshwaran, A. A. Kathe, P. V. Varadarajan, R. P. Nachane, and R. H. Balasubramanya, “Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 53, no. 1, pp. 55–59, 2006.
- [68] K. C. Bhainsa and S. F. D’Souza, “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 47, no. 2, pp. 160–164, 2006.
- [69] S. Basavaraja, S. D. Balaji, A. Lagashetty, A. H. Rajasab, and A. Venkataraman, “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 43, no. 5, pp. 1164–1170, 2008.
- [70] A. M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P. T. Kalaichelvan, and R. Venketesan, “Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 103–109, 2010.
- [71] K. Kathiresan, S. Manivannan, M. A. Nabeel, and B. Dhivya, “Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 71, no. 1, pp. 133–137, 2009.
- [72] S. Gurunathan, J. W. Han, J. H. Park, and J. H. Kim, “A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2014.

- [73] A. N. Banu and C. Balasubramanian, "Optimization and synthesis of silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea* against human vector mosquitoes," *Parasitol. Res.*, vol. 113, no. 10, pp. 3843–3851, 2014.
- [74] A. Kora, S. Beedu, and A. Jayaraman, "Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles mediated by gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its biological activity," *Org. Med. Chem. Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 17, 2012.
- [75] L. Pereira, F. Mehboob, A. J. M. Stams, M. M. Mota, H. H. M. Rijnaarts, and M. M. Alves, "Metallic nanoparticles: Microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 35, no. 1, pp. 114–128, 2015.
- [76] S. Baker *et al.*, "Plants: Emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles," *BioImpacts*, vol. 3, no. 3, pp. 111–117, 2013.
- [77] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, 2012.
- [78] L. Sintubin, W. Verstraete, and N. Boon, "Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 10, pp. 2422–2436, 2012.
- [79] F. Okafor, A. Janen, T. Kukhtareva, V. Edwards, and M. Curley, "Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 10, no. 10, pp. 5221–5238, 2013.
- [80] P. Singh, Y. J. Kim, and D. C. Yang, "A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by *Panax ginseng* leaves," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 8, pp. 1949–1957, 2016.
- [81] P. Singh, Y. J. Kim, C. Wang, R. Mathiyalagan, and D. C. Yang, "The development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using *Panax ginseng* root extract, and their biological applications," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 4, pp. 1150–1157, 2016.
- [82] P. Singh, Y. J. Kim, C. Wang, R. Mathiyalagan, M. El-Agamy Farh, and D. C.



- Yang, “Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 811–816, 2016.
- [83] S. Mukherjee *et al.*, “Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system),” *Theranostics*, vol. 4, no. 3, pp. 316–335, 2014.
- [84] H. Y. El-Kassas and M. M. El-Sheekh, “Cytotoxic Activity of Biosynthesized Gold Nanoparticles with an Extract of the Red Seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 10, pp. 4311–4317, 2014.
- [85] J. G. Wang, S. S. Jang, D. S. H. Wong, S. S. Shieh, and C. W. Wu, “Soft-sensor development with adaptive variable selection using nonnegative garrote,” *Control Eng. Pract.*, vol. 21, no. 9, pp. 1157–1164, 2013.
- [86] S. Mukherjee, B. Vinothkumar, S. Prashanthi, P. R. Bangal, B. Sreedhar, and C. R. Patra, “Potential therapeutic and diagnostic applications of one-step in situ biosynthesized gold nanoconjugates (2-in-1 system) in cancer treatment,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 7, pp. 2318–2329, 2013.
- [87] S. Patra, S. Mukherjee, A. K. Barui, A. Ganguly, B. Sreedhar, and C. R. Patra, “Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 53, pp. 298–309, 2015.
- [88] J. Y. C. Mei Jing Piao, Kyoung Ah Kang, In Kyung Leeb, Hye Sun Kimb, Suhkmann Kimc and J. W. H. Jinhee Choie, “Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis,” *Toxicol. Lett.*, vol. 201, pp. 92–100, 2011.
- [89] S. Sudhasree, A. Shakila Banu, P. Brindha, and G. A. Kurian, “Synthesis of nickel nanoparticles by chemical and green route and their comparison in respect to biological effect and toxicity,” *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 96, no. 5, pp. 743–754, 2014.
- [90] K. M. M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, and R. A. A. Ammar,

- “Synthesis and applications of silver nanoparticles,” *Arab. J. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 135–140, 2010.
- [91] E. Marsili and S. K. Das, “Biosynthetic nanoparticles for biotechnological and biomedical applications,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 95, pp. 1–3, 2016.
- [92] C. C. Tianlu Zhang, Liming Wang, Qiang Chen, “Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles,” *Yonsei Med J*, vol. 55, pp. 283–291, 2014.
- [93] R. de Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, “Silver nanoparticles: A brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 32, no. 11, pp. 867–879, 2012.
- [94] M. A. Franco-Molina *et al.*, “Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 29, no. 1, p. 148, 2010.
- [95] S. Gurunathan, J. W. Han, V. Eppakayala, M. Jeyaraj, and J.-H. Kim, “Cytotoxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–10, 2013.
- [96] A. Gurunathan *et al.*, “Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4399–4413, 2013.
- [97] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. S. Chen, and G. Chen, “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 5, pp. 595–601, 2015.
- [98] V. K. Thakur and M. K. Thakur, “Processing and characterization of natural cellulose fibers/thermoset polymer composites,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 109, pp. 102–117, 2014.
- [99] A. Jb. Jh. Wb. Rb. Sd. Fz. X, “Review of Nanocellulosic Products and Their Applications, in Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications,” *John Wiley Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.*, pp. 461–508, 2013.
- [100] V. D. Prajapati, G. K. Jani, and S. M. Khanda, “Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 95, no. 1, pp. 540–549, 2013.
- [101] R. S. Singh, N. Kaur, V. Rana, and J. F. Kennedy, “Pullulan: A novel molecule for

- biomedical applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 171, pp. 102–121, 2017.
- [102] S. V. N. Vijayendra and T. R. Shamala, “Film forming microbial biopolymers for commercial applications-A review,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 34, no. 4, pp. 338–357, 2014.
- [103] R. S. Singh, N. Kaur, and J. F. Kennedy, “Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 123, pp. 190–207, 2015.
- [104] A. Mehta, G. S. Prasad, and A. R. Choudhury, “Cost effective production of pullulan from agri-industrial residues using response surface methodology,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 64, pp. 252–256, 2014.
- [105] K. R. Sugumaran, R. V. Sindhu, S. Sukanya, N. Aiswarya, and V. Ponnusami, “Statistical studies on high molecular weight pullulan production in solid state fermentation using jack fruit seed,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 854–860, 2013.
- [106] R. S. Singh, H. Singh, and G. K. Saini, “Response surface optimization of the critical medium components for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* FB-1,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 152, no. 1, pp. 42–53, 2009.
- [107] R. S. Singh, N. Kaur, V. Rana, and J. F. Kennedy, “Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 153, pp. 455–462, 2016.
- [108] K. C. Cheng, A. Demirci, and J. M. Catchmark, “Pullulan: Biosynthesis, production, and applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 92, no. 1, pp. 29–44, 2011.
- [109] M. Rai, A. P. Ingle, I. Gupta, and A. Brandelli, “Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 496, no. 2, pp. 159–172, 2015.
- [110] A. Babu, A. K. Templeton, A. Munshi, and R. Ramesh, “Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges,” *J. Nanomater.*, vol. 2013, pp. 1–11, 2013.
- [111] J. Safari and Z. Zarnegar, “Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of

- health design A review,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 18, no. 2, pp. 85–99, 2014.
- [112] A. Z. Mirza and F. A. Siddiqui, “Nanomedicine and drug delivery: a mini review,” *Int. Nano Lett.*, vol. 4, no. 1, 2014.
- [113] R. S. Soumya and P. G. Hela, “Nano silver based targeted drug delivery for treatment of cancer,” vol. 5, no. 4, pp. 189–197, 2013.
- [114] M. Athar and A. Jyoti Das, “Therapeutic nanoparticles: State-of-the-art of nanomedicine,” *Rev. Artic. Adv. Mater. Rev. Adv. Mater. Rev. Adv. Mater. Rev.Sc. has recieved M.Sc (Environmental Microbiol. degree from Babasaheb Bhimrao Ambedkar Cent. Univ.*, vol. 1, no. 11, pp. 25–37, 2014.
- [115] G. Franci *et al.*, “Silver nanoparticles as potential antibacterial agents,” *Molecules*, vol. 20, no. 5, pp. 8856–8874, 2015.
- [116] K. Golubeva, O.Y., Shamova, O.V., Orlov, D.S., Yamshchikova, E.V., Boldina, A.S. and V.N., “Synthesis and investigation of silver-peptide bioconjugates and investigation in their antimicrobial activity,” *Mater. Challenges Test. Supply Energy Resour. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Ger.*, pp. 163-171., 2012.
- [117] J. Sripriya, S. Anandhakumar, S. Achiraman, J. J. Antony, D. Siva, and A. M. Raichur, “Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications,” *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no. 1, pp. 206–213, 2013.
- [118] G. Chen, J. Lu, C. Lam, and Y. Yu, “A novel green synthesis approach for polymer nanocomposites decorated with silver nanoparticles and their antibacterial activity,” *Analyst*, vol. 139, no. 22, pp. 5793–5799, 2014.
- [119] S. Anandhakumar, V. Mahalakshmi, and A. M. Raichur, “Silver nanoparticles modified nanocapsules for ultrasonically activated drug delivery,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 8, pp. 2349–2355, 2012.
- [120] R. Jayakumar, K. P. Chennazhi, S. Srinivasan, S. V. Nair, T. Furuike, and H. Tamura, “Chitin scaffolds in tissue engineering,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 1876–1887, 2011.
- [121] K. Madhumathi *et al.*, “Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no.

- 2, pp. 807–813, 2010.
- [122] M. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, I. R. Gupta, M. Galdiero, and S. Galdiero, “Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection,” *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 46–56, 2016.
- [123] D. Baram-Pinto, S. Shukla, A. Gedanken, and R. Sarid, “Inhibition of HSV-1 attachment, entry, and cell-to-cell spread by functionalized multivalent gold nanoparticles,” *Small*, vol. 6, no. 9, pp. 1044–1050, 2010.
- [124] J. V. Rogers, C. V. Parkinson, Y. W. Choi, J. L. Speshock, and S. M. Hussain, “A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 3, no. 4, pp. 129–133, 2008.
- [125] S. Chernousova and M. Epple, “Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 6, pp. 1636–1653, 2013.
- [126] J. M. Ahn, H. J. Eom, X. Yang, J. N. Meyer, and J. Choi, “Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*,” *Chemosphere*, vol. 108, pp. 343–352, 2014.
- [127] A. Ivask *et al.*, “Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro,” *PLoS One*, vol. 9, no. 7, 2014.
- [128] H. M. Abd-Elnaby, G. M. Abo-Elala, U. M. Abdel-Raouf, and M. M. Hamed, “Antibacterial and anticancer activity of extracellular synthesized silver nanoparticles from marine *Streptomyces rochei* MHM13,” *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 301–312, 2016.
- [129] P. R. Rathi Sre, M. Reka, R. Poovazhagi, M. Arul Kumar, and K. Murugesan, “Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 135, pp. 1137–1144, 2015.
- [130] S. Majeed, M. S. bin Abdullah, G. K. Dash, M. T. Ansari, and A. Nanda, “Biochemical synthesis of silver nanoparticles using filamentous fungi *Penicillium decumbens* (MTCC-2494) and its efficacy against A-549 lung cancer cell line,” *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 14, no. 8, pp. 615–620, 2016.
- [131] S. G. Nadeem, A. Shafiq, S. T. Hakim, Y. Anjum, and S. U. Kazm, “Effect of

- Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*,” *Open J. Med. Microbiol.*, vol. 03, no. 03, pp. 185–192, 2013.
- [132] N. Caplice and G. P. Moran, “*Candida albicans* exhibits enhanced alkaline and temperature induction of Efg1-regulated transcripts relative to *Candida dubliniensis*,” *Genomics Data*, vol. 6, pp. 130–135, 2015.
- [133] C. S. Danby, D. Boikov, R. Rautemaa-Richardson, and J. D. Sobel, “Effect of pH on In Vitro Susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 Antifungal Agents and Implications for Clinical Use ,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 3, pp. 1403–1406, 2012.
- [134] C. Rajkuberan, K. Sudha, G. Sathishkumar, and S. Sivaramakrishnan, “Antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using latex of *Calotropis gigantea* L.,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 136, no. PB, pp. 924–930, 2015.
- [135] S. Baker and S. Satish, “Extracellular synthesis of silver nanoparticles by novel *Pseudomonas veronii* AS41G inhabiting *Annona squamosa* L. and their bactericidal activity,” *Spectrochim. Acta Part a Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 150, pp. 691–695, 2015.
- [136] P. Pourali and B. Yahyaei, “Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat,” *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 34, pp. 22–31, 2016.
- [137] G. Chen *et al.*, “Pullulan production from synthetic medium by a new mutant of *Aureobasidium pullulans*,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 47, no. 10, pp. 963–969, 2017.
- [138] M. Constantin, I. Asmarandei, A. Filimon, and G. Fundueanu, “Synthesis, characterization, and solution behavior of pullulan functionalized with tertiary amino groups,” *High Perform. Polym.*, vol. 27, no. 5, pp. 625–636, 2015.
- [139] J. Yang, Y. Zhang, S. Zhao, Q. Zhou, X. Xin, and L. Chen, “Statistical optimization of medium for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* NCPS2016 using fructose and soybean meal hydrolysates,” *Molecules*, vol. 23, no. 6, 2018.

- [140] K. R. Sugumaran *et al.*, “Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 92, no. 1, pp. 697–703, 2013.
- [141] R. S. Singh and N. Kaur, “Biochemical and molecular characterization of a new pullulan producer *Rhodospiridium paludigenum* PUPY-06,” *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 28–37, 2018.
- [142] R. Singh *et al.*, “A Novel Media Optimized for Production of Pullulan in Flask Type Fermentation System,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 04, pp. 53–61, 2018.
- [143] W. Wielinga, *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. 2009.
- [144] R. Thirumavalavan, K., Manikkadan, T.R., Dhanasekar, “Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8, no. 2, pp. 254–258, 2009.
- [145] S. E. Velasco, M. J. Yebra, V. Monedero, I. Ibarburu, M. T. Dueñas, and A. Irastorza, “Influence of the carbohydrate source on  $\beta$ -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 325–334, 2007.
- [146] A. R. Choudhury, P. Saluja, and G. S. Prasad, “Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 4, pp. 1547–1552, 2011.
- [147] L. H. Gibson and R. W. Coughlin, “Optimization of high molecular weight pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch fermentations,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 18, no. 3, pp. 675–678, 2002.
- [148] M. Rivallan, S. Thomas, M. Lepage, N. Takagi, H. Hirata, and F. Thibault-Starzyk, “Evolution of Platinum Particles Dispersed on Zeolite upon Oxidation Catalysis and Ageing,” *ChemCatChem*, vol. 2, no. 12, pp. 1599–1605, 2010.
- [149] Z. Zaheer and Rafiuddin, “Silver nanoparticles to self-assembled films: Green synthesis and characterization,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 90, no. 1, pp. 48–52, 2012.
- [150] R. R. Remya, S. R. R. Rajasree, L. Aranganathan, and T. Y. Suman, “An

- investigation on cytotoxic effect of bioactive AgNPs synthesized using *Cassia fistula* flower extract on breast cancer cell MCF-7,” *Biotechnol. Reports*, vol. 8, pp. 110–115, 2015.
- [151] M. A. Elsayed, A. M. Othman, M. M. Hassan, and A. M. Elshafei, “Optimization of silver nanoparticles biosynthesis mediated by *Aspergillus niger* NRC1731 through application of statistical methods: enhancement and characterization,” *3 Biotech*, vol. 8, no. 3, 2018.
- [152] A. K. Mittal, J. Bhaumik, S. Kumar, and U. C. Banerjee, “Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 415, pp. 39–47, 2014.
- [153] A. Nanda, “Combined Efficacy of Antibiotics and Biosynthesised Silver Nanoparticles from *Streptomyces Albaduncus*,” vol. 6, no. 6, pp. 1862–1869, 2014.
- [154] R. Shetty, P. Buddana, and S. Kumar, “Production and Characterization of Protein Encapsulated Silver Nanoparticles by Marine Isolate *Streptomyces parvulus* SSNP11,” 2014.
- [155] D. Singh, V. Rathod, S. Ninganagouda, J. Hiremath, A. K. Singh, and J. Mathew, “ Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus* ,” *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2014, pp. 1–8, 2014.
- [156] M. F. Zayed, W. H. Eisa, and A. A. Shabaka, “*Malva parviflora* extract assisted green synthesis of silver nanoparticles,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 98, pp. 423–428, 2012.
- [157] S. Deepa, K. Kanimozhi, and A. Panneerselvam, “Original Research Article Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomycetes,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 2, no. 9, pp. 223–230, 2013.
- [158] A. Javaid, S. F. Oloketuyi, M. M. Khan, and F. Khan, “Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles,” *Bionanoscience*, vol. 8, no. 1, pp. 43–59, 2018.
- [159] A. B. Chanthini *et al.*, “Structural characterization, antioxidant and in vitro



- cytotoxic properties of seagrass, *Cymodocea serrulata* (R.Br.) Asch. & Magnus mediated silver nanoparticles,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 153, pp. 145–152, 2015.
- [160] S. Kaviya, J. Santhanalakshmi, B. Viswanathan, J. Muthumary, and K. Srinivasan, “Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 79, no. 3, pp. 594–598, 2011.
- [161] Z. Abbasi, S. Feizi, E. Taghipour, and P. Ghadam, “Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of dried *Juglans regia* green husk and examination of its biological properties,” pp. 1–10, 2017.
- [162] M. Vanaja *et al.*, “Degradation of Methylene Blue Using Biologically,” vol. 2014, 2014.
- [163] R. Palani, P. M. Ayyasamy, R. Kathiravan, and B. Subashni, “Rapid decolorization of synthetic melanoidin by bacterial extract and their mediated silver nanoparticles as support,” vol. 3, no. 02, pp. 6–11, 2015.
- [164] K. Kalimuthu, R. S. Babu, D. Venkataraman, M. Bilal, and S. Gurunathan, “Biointerfaces Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*,” vol. 65, pp. 150–153, 2008.
- [165] V. Subbaiah, Y. S. Rao, S. Aparna, T. N. V. K. V Prasad, A. V. Reddy, and D. V. R. S. Gopal, “Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of *Catharanthus roseus* . Linn . G . Donn and its anti microbial activity,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 105, pp. 194–198, 2013.
- [166] B. Dheebea, “Plant mediated synthesis and characterization of silver Innovare,” no. January, 2014.
- [167] T. Varadavenkatesan, R. Vinayagam, and R. Selvaraj, “Structural characterization of silver nanoparticles phyto-mediated by a plant waste, seed hull of *Vigna mungo* and their biological applications,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1147, pp. 629–635, 2017.
- [168] J. M. Chassot, L. M. Ferreira, F. P. Gomes, C. de B. da Silva, L. Tasso, and L. Cruz, “Pullulan as a stabilizer agent of polymeric nanocapsules for drug delivery,”

- Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 4, pp. 735–740, 2016.
- [169] C. An, S. jian Ma, F. Chang, and W. jiao Xue, “Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 180–185, 2017.
- [170] G. DahuiWang, XiaominJu, DonghaiZhou, “Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*,” *Bioresour. Technol. Vol. 164, July 2014, Pages 12-19*, vol. 164, pp. 12–19, 2014.
- [171] Y. Enomoto-Rogers, N. Iio, A. Takemura, and T. Iwata, “Synthesis and characterization of pullulan alkyl esters,” *Eur. Polym. J.*, vol. 66, pp. 470–477, 2015.
- [172] S. R. Soni *et al.*, “Therapeutically Effective Controlled Release Formulation of Pirfenidone from Nontoxic Biocompatible Carboxymethyl Pullulan-Poly(vinyl alcohol) Interpenetrating Polymer Networks,” *ACS Omega*, vol. 3, no. 9, pp. 11993–12009, 2018.
- [173] S. Pandey, G. K. Goswami, and K. K. Nanda, “Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 4, pp. 583–589, 2012.
- [174] V. S. R. K. Ganduri, U. Mangamuri, V. Muvva, and S. Poda, “Pullulan-stabilized silver nanoparticles -their synthesis, characterization and application as bactericidal agents,” *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 7, pp. 27–37, 2016.
- [175] P. Kanmani and S. T. Lim, “Synthesis and characterization of pullulan-mediated silver nanoparticles and its antimicrobial activities,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 97, no. 2, pp. 421–428, 2013.
- [176] S. Bonde, “A biogenic approach for green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Foeniculum vulgare* and its activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*,” *Nusant. Biosci.*, vol. 3, no. 2, pp. 59–63, 2014.
- [177] J. K. Patra and K. H. Baek, “Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects,” *Front. Microbiol.*, vol.

- 8, no. FEB, pp. 1–14, 2017.
- [178] M. Pérez-Díaz *et al.*, “Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pp. 317–323, 2016.
- [179] L. Yu *et al.*, “The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis,” *PeerJ*, vol. 6, p. e5711, 2018.
- [180] A.-R. Phull *et al.*, “Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*,” *Futur. J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 31–36, 2016.
- [181] S. Bhakya *et al.*, “Antimicrobial, antioxidant and anticancer activity of biogenic silver nanoparticles-an experimental report,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 84, pp. 81436–81446, 2016.
- [182] R. Vivek, R. Thangam, K. Muthuchelian, P. Gunasekaran, K. Kaveri, and S. Kannan, “Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells,” *Process Biochem.*, vol. 47, no. 12, pp. 2405–2410, 2012.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
Biyoloji ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 16/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: Biyolojik Yollar ile Sentezlenen Organik / İnorganik Nanopartiküllerin Bioaktivitelerinin Belirlenmesi ve Tedavi Amaçlı Kullanımları

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 151 sayfalık kısmına ilişkin, 16/07/2019 tarihinde şahsım /tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Hamideh Hammamchi  
Öğrenci No: N14340615  
Anabilim Dalı: Biyoloji  
Programı: Biyoteknoloji  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nilüfer Cihangir  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hamideh HAMMAMCHI  
Doğum yeri : İRAN/ TEBRİZ  
Doğum tarihi : 10.12.1987  
Medeni hali : EVLİ  
Yazışma adresi : hi\_haman@yahoo.com  
Telefon : 0530 489 69 86  
Elektronik posta adresi : hi\_haman@yahoo.com  
Yabancı dili : İNGİLİZCE, FARŞÇA, TÜRKÇE

### EĞİTİM DURUMU

Lisans : AZAD Üniversitesi  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi  
Doktora : Hacettepe Üniversitesi



