ATIK CEVİZ KABUĞU ORTAMINDA BÜYÜTÜLEN *Caldibacillus thermoamylovorans*'dan LİGNİN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ İLE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVRE DOSTU SENTEZİ

Sefa Nur AKKAYA

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2025
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

ATIK CEVİZ KABUĞU ORTAMINDA BÜYÜTÜLEN *Caldibacillus thermoamylovorans*'dan LİGNİN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ İLE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVRE DOSTU SENTEZİ

(Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using lignin peroxidase produced from *Caldibacillus thermoamylovorans* and cultivated on waste walnut shell)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sefa Nur AKKAYA

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Haziran, 2025

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Sefa Nur AKKAYA tarafından hazırlanan "Atık Ceviz Kabuğu Ortamında Büyütülen *Caldibacillus thermoamylovorans'dan* Lignin Peroksidaz Enziminin Üretimi ile Gümüş Nanopartiküllerin Çevre Dostu Sentezi" başlıklı çalışması 27/06/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan *"*Atık Ceviz Kabuğu Ortamında Büyütülen *Caldibacillus thermoamylovorans'dan* Lignin Peroksidaz Enziminin Üretimi ile Gümüş Nanopartiküllerin Çevre Dostu Sentezi*"* başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	**Tezin Benzerlik Oranı (%)**	**Maksimum Oran (%)**
Giriş	0	**30**
Kuramsal Temeller	8	**30**
Materyal ve Yöntem	11	**35**
Bulgular ve Tartışma	13	**20**
Sonuç ve Öneriler	0	**20**
Tezin Geneli	10	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)
Sefa Nur AKKAYA
27.6.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
27.6.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

***** Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum çalışmamda, danışmanlığımı üstlenen çalışmamın yürütülmesinden, tezin yazım sürecine kadar her türlü yardımını, bilgi ve deneyimini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tez sürecinde fikirlerini benimle paylaşan, eleştirileriyle çalışmamı daha nitelikli bir hale getirmeme yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na ve tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum ve yardımları başta olmak üzere güler yüzünü esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI ve Dr. Öğr. Mehmet Akif ÖMEROĞLU'na,

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeden paylaşan, yeri geldiğinde bir dost, yeri geldiğinde bir yol arkadaşı olan çok kıymetli ekip arkadaşım Ammar ALMANSOUR'a

Bu tezin hazırlanma sürecinde bana verdikleri manevi ve maddi desteklerinin yanında evlatları olmaktan gurur duyduğum babam Hasan AKKAYA, annem Hüsniye AKKAYA, abim Samet AKKAYA, sevgili ablalarım Nursena AKAR ve Esra AKKAYA YURT'a ve son olarak her koşulda yanımda olan sevgili ikiz kardeşim Merve AKKAYA'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Sefa Nur AKKAYA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATIK CEVİZ KABUĞU ORTAMINDA BÜYÜTÜLEN *Caldibacillus thermoamylovorans*'dan LİGNİN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ İLE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVRE DOSTU SENTEZİ

Sefa Nur AKKAYA

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Çevrede oluşan biyokütle atıkları arasında lignin önemli bir yer tutmaktadır. Lignini parçalayabilme özelliğine sahip olan enzimlerden biri de lignin peroksidazdır (LiP). Bu çalışmada, farklı bir karbon kaynağı olarak atık ceviz kabuğu kullanılarak, LiP enziminin üretimi hedeflenerek yeşil sentez yöntemi ile de gümüş nanoparçacıkların (AgNP'lerin) çevre dostu sentezi gerçekleştirilmiştir. Termofilik bir bakteri olan *Caldibacillus thermoamylovorans*'ın atık ceviz kabukları ortamında büyütülmesiyle, enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Böylece, çevresel bir atık olan ceviz kabuğu değerlendirilerek, LiP enzimi üretimiş ve elde edilen enzim daha sonra AgNP'lerin sentezinde kullanılarak bu nanoparçacıkların bazı patojenik bakteriler üzerinde ki antibakteriyel etkisine bakılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Erzurum Ilıca termal kaplıcasından alınan sıcak su örneklerinden bakteri izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen bakterilerin lignin peroksidaz (LiP) enzim üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla, ilk olarak %0,1 oranında veratril alkol içeren katı besiyerinde kültürleme yapılmış ve zon oluşturan izolatlar seçilmiştir. Katı ortamda açık zon oluşumu gözlemlendikten sonra, aynı izolatlar %0,1 veratril alkol içeren sıvı besiyerinde de test edilerek, enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Hem katı hem de sıvı ortamda en iyi sonucu veren izolat seçilmiş ve moleküler analiz için gönderilmiştir. Tanılaması yapılan bu izolat ile LiP enziminin üretimini artırmak amacıyla, atık ceviz kabuğu içeren sıvı ortamda çeşitli besiyeri optimizasyonları yapılmıştır. Bu kapsamda inkübasyon süresi, ceviz kabuğu miktarı, pH, sıcaklık ve çalkalama hızı (rpm) gibi parametreler optimize edilmiştir. En uygun koşullarda üretilen LiP enzimi, daha sonra gümüş nanoparçacık (AgNP) sentezinde kullanılmıştır. Sentezlenen nanoparçacıklar; SEM, FTIR ve XRD analizleri ile karakterize edilmiştir. Son aşamada ise bu nanoparçacıkların bazı patojenik bakterilere karşı antibakteriyel etkileri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tez çalışmasında, 9 adet bakteri, termal kaplıcadan izole edildi. İzole edilen bakteriler önce %1'lik veratril alkollü katı agarda oluşturdukları zonlar incelendi ve 4 bakterinin LiP enzim yeteneğine sahip olduğu katı agarda belirlendi. Zon oluşturan 4 bakteri daha sonra, %1 veratril alkollü sıvı ortamda da incelendi ve her iki ortamda da en iyi sonucu veren izolatın SA1 kodlu suş olduğu tespit edildi. SA1 izolatının morfolojik ve biyokimyasal özelliğini belirlemek için, belirli karakterizasyon işlemleri yapıldı. İzolatın gram, katalaz ve oksidaz pozitif olduğu belirlendi. Ardından izolat tanılamaya gönderildi ve SA1 kodlu suşun %99,7 oranında *Caldibacillus thermoamylovorans*'a benzerlik gösterdiği tespit edildi. Tanılamanın ardından SA1 izolatının en iyi LiP enzim üretimini gerçekleştirmek için çeşitli besiyeri optimizasyonları yapıldı. Araştırma kapsamında lignin açısından zengin olduğu düşünülen atık ceviz kabukları, bu çalışmada substrat olarak kullanıldı ve inkübasyon süresi (24-144), pH (5-8,5), sıcaklık (50°C-65°C) rpm (130-160) ve atık miktarı (0-90) optimize edildi. Optimizasyonun ardından en iyi LiP enzim üretiminin 96. saat, pH 8, 140 rpm, 60°C ve 50 g/L kabuk miktarında olduğu belirlendi. Enzim aktivitesinin (435,0 U/mL) artışına paralel olarak, bakteri hücre yoğunluğuda da ($OD_{600} \approx 2,09$) artış gözlemlendi. Enzim üretimi için en iyi ortam belirlendikten sonra, AgNP sentezine geçildi ve ortama eklenen $AgNO_3$ çözeltisi ile en verimli NP üretiminin 50°C-60°C'de ve 4 saatin ardından gerçekleştirildiği tespit edildi. Sentezlenen AgNP'ler ardından UV-Vis spektroskopisi, X-ışını kırınımı (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) dahil olmak üzere bir dizi analitik teknik kullanılarak karakterize edildi. Sentezlenen AgNP'lerin biyolojik etkinliği, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Bacillus cereus* patojenik bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildi, en yüksek etkinliğin *Bacillus cereus*'a (15 mm) karşı olduğu gözlemlendi.

Sonuçlar: Elde edilen veriler neticesinde; tanılama işlemi yapılan SA1 izolatından çevre dostu yeşil sentez yöntemi ile AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilmiş ve çeşitli patojenlere karşı antibakteriyel etkisinin olduğu görülerek, sürdürülebilir bir çevre açısından umut verici bir çözüm sunacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Caldibacillus thermoamylovorans* SA1, LiP Enzimi, Atık Ceviz Kabuğu ve AgNP'ler

Haziran 2025, 59 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

ECO-FRIENDLY SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING LIGNIN PEROXIDASE PRODUCED FROM *Caldibacillus thermoamylovorans* AND CULTIVATED ON WASTE WALNUT SHELL

Sefa Nur AKKAYA

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: Lignin has an important place among biomass wastes in the environment. One of the enzymes capable of degrading lignin is lignin peroxidase (LiP). In this study, environmentally friendly synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was realized using the green synthesis method, which targeted the production of LiP enzyme using waste walnut shells as a different carbon source. Enzyme production was realized by growing Caldibacillus thermoamylovorans, a thermophilic bacterium, on waste walnut shells. Thus, LiP enzyme production was realized by utilizing walnut shells, an environmental waste, and the enzyme obtained was then used to synthesize AgNPs to investigate the antibacterial effect of these nanoparticles on some pathogenic bacteria.

Method: Bacteria were isolated from hot water samples taken from Erzurum Ilıca thermal spring. To determine the ability of the isolated bacteria to produce lignin peroxidase (LiP) enzyme, the isolates were first cultured on solid medium containing 0,1% veratryl alcohol, and the isolates that formed a zone were selected. After observation of open zone formation in solid medium, the same isolates were tested in liquid medium containing 0,1% veratryl alcohol, and their enzyme activities were determined. The isolate with the best results in both solid and liquid media was sent for molecular analysis for identification. To increase the production of LiP enzyme with this isolate, various medium optimizations were made in the fluid medium containing waste walnut shells. In this context, parameters such as incubation time, walnut shell amount, pH, temperature, and shaking speed (rpm) were optimized. The LiP enzyme produced under optimal conditions was then used to synthesize silver nanoparticles (AgNP). The synthesized nanoparticles were characterized by SEM, FTIR, and XRD analysis. In the last step, the antibacterial effects of these nanoparticles against some pathogenic bacteria were evaluated.

Findings: In the thesis study, 9 bacteria were isolated from thermal springs. The isolated bacteria were first analyzed for the zones they formed on solid agar with 1% veratryl alcohol, and it was determined that 4 bacteria had LiP enzyme activity on solid agar. The 4 bacteria that formed zones were then examined in liquid medium with 1% veratryl alcohol, and the isolate that gave the best results in both media was identified as isolate SA1. Certain characterization procedures were performed to determine the biochemical and morphological properties of the SA1 isolate. The isolate was found to be gram-positive, catalase and oxidase-positive. The isolate was then sent for diagnostics. The SA1 coded isolate was found to be 99,7% similar to Caldibacillus thermoamylovorans. After identification, various medium optimizations were performed to achieve the best LiP enzyme production of the SA1 isolate. Waste walnut shells, which are considered to be rich in lignin, were used as substrate in this study, and incubation time (24-144), pH (5-8,5), temperature (50°C -60°C), rpm (130-160), and waste amount (0-90) were optimized. After optimization, the best LiP enzyme production was determined at 96th hour, pH 8, 140 rpm, 60°C, and 50 g/L of shell. In parallel with the increase in enzyme activity (435,0 U/mL), bacterial cell density (OD600 ≈ 2,09) also increased. After determining the best environment for enzyme production, AgNP synthesis was started, and the most efficient NP production was realized after 4 hours at 50°C-60°C with $AgNO_3$ solution added to the medium. The synthesized AgNPs were then characterized using a range of analytical techniques, including X-ray diffraction (XRD), UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). The biological activity of the synthesized AgNPs was evaluated for their antibacterial activity against pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Bacillus cereus*, and the highest activity was observed against *Bacillus cereus* (15 mm).

Results: As a result of the data obtained, AgNPs were synthesized from the identified SA1 isolate by the environmentally friendly green synthesis method, and it was seen that it has an antibacterial effect against various pathogens and offer a promising solution in terms of a sustainable environment.

Keywords: *Caldibacillus thermoamylovorans* SA1, LiP Enzyme, Waste Walnut Shell and AgNPs

January 2025, 59 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 3
Peroksidazlar 3
Lignin 4
Lignin Peroksidaz (LiP) 6
Nanopartiküller (NP) 8
Gümüş Nanopartiküller 9
Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) sentezi/üretimi 9
Biyolojik Yöntemlerle Gümüş Nanopartiküllerinin Sentezi/Üretimi 10
Bakterilerde Üretim 10
Mantarlarada Üretim 11
Alglerde Üretim 11
Mayada Üretim 11
Bitkide Üretim 12
MATERYAL VE METOD 14
Materyal 14
Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar 14
Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 15
Çalışmada Kullanılan Çözeltiler 16
Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması 16
Metot 17
Ceviz Kabuklarının Toplanaması ve Hazırlanması 17

Bakteri İzolasyonu 17
LiP Enzim Üreten Bakterilerin Taranması 17
Seçilen Bakterilerin Tanımlanması 18
Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi 18
Gram Boyama 18
KOH Testi 18
Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 19
Katalaz Testi 19
Oksidaz Testi 19
İzolasyon Aşamaları 19
16S rRNA PCR İşlemi ve PCR Döngüsü 20
16S rRNA PCR Elektroforez İşlemi 21
DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Ağaç Çizimi 22
LiP Aktivite Deneyi 22
LiP Üretiminin Karakterizasyonu 22
AgNP'lerin Yeşil Hidrotermal Sentezi 22
AgNP'lerin Karakterizasyonu 23
Sentezlenen AgNP'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin İncelenmesi 23
İstatistiksel Analiz 23
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 25
Bakteri İzolasyonu ve LiP Enzim İçeriğinin Belirlenmesi 25
SA1 Suşunun Tanılanması 26
LiP Üretiminin Karakterizasyonu 26
İnkübasyon Süresinin LiP Enzim Üretimindeki Etkisi 27
pH'ın LiP Enzim Üretimindeki Etkisi 27
Çalkalama Hızının LiP Enzim Üretimindeki Etkisi 28
Sıcaklığın LiP Enzim Üretimindeki Etkisi 29
Kabuk Miktarının LiP Enzim Üretimindeki Etkisi 30
LiP Enzim Homojenatı Kullanılarak AgNP'lerin Yeşil Sentezi ve Karakterizasyonu 31
AgNP'lerin Karakterizasyonu 31
UV Görünür Spektroskopi 31
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) 32
X-Işını Kırınım Analizi (XRD) 33
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 34
Sentezlenen AgNP'lerin Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması 35

SONUÇ VE ÖNERİLER 38
KAYNAKÇA 39
ÖZGEÇMİŞ 45

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çeşitli lignoselülozik maddelerin kimyasal bileşimi.....5
Tablo 2. LiP enzim aktivitesine sahip bakteri ve mantar türü örnekleri 7
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.....14
Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları.....15
Tablo 5. PCR'ın hazılanışı ve PCR döngüsü.....21
Tablo 6. Seçilen bakterilerin zon çapları ve LiP aktivite değerleri.....25
Tablo 7. AgNP'lerin aktiviteleri ve zon çapları pozitif ve negatif kontroller kullanılarak analiz edilmiştir 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. $2S + H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2S_{ox} + 2H_2O$ 3
Şekil 2. Odunsu bitki materyalinin yapısı 6
Şekil 3. Nanopartiküllerin sentezi 8
Sekil 4. SA1'in katı ortam üzerindeki berrak bölgesi (66 ±0,81 mm)..... 25
Şekil 5. *C. thermoamylovorans* SA1 ve Bacillus cinsinin birkaç yakın akrabası arasındaki ilişkileri gösteren 16S rRNA gen dizilerine dayalı olarak oluşturulan komşu birleştirme filogenetik ağacıdır. Ölçek çubuğu 0.05'lik bir sapmayı temsil etmektedir..... 26
Şekil 6. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için inkübasyon süresinin etkisi 27
Şekil 7. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için pH'nın etkisi..... 28
Şekil 8. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için çalkalama hızının etkisi..... 29
Şekil 9. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için sıcaklığın etkisi……30
Şekil 10. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için ceviz kabuğu miktarının etkisi 31
Şekil 11. AgNP'lerin UV-görünür spektrumu 32
Şekil 12. LiP kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezinin FTIR spektrumu 33
Şekil 13. LiP enzimi kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezinin XRD deseni 34
Şekil 14. AgNP'lerin SEM görüntüsü 34
Şekil 15. AgNP'lerin elementel bileşiminin enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi .. 35
Şekil 16. AgNP'lerin disk difüzyon yöntemi ile patojen bakterilere (*B. cereus, K. pneumonia, E. coli, S. pyogenes* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel aktivite sonuçları..... 36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

% :Yüzde

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

°C: Santigrat derece

dk: Dakika

g: Gram

mm: Milimetre

mM: Milimolar

mL: Mililitre

mg: Miligram

M: Molarite

nm: Nanometre

rpm: Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

Ag: Gümüş

LiP: Lignin Peroksidaz

AgNP: Gümüş Nanopartikül

NaOH: Sodyum hidroksit

HCl: Hidrojen Klorür

Au: Altın

NP: Nanopartikül

$AgNO_3$: Gümüş Nitrat

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DNA: Deoksiribonükleik Asit

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HCI: Hidroklorik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

NaCl: Sodyum Klorür

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CO_2: Karbondioksit

UV: Ultraviolet

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür

TSA: Tryptone Soya Agar

TSB: Tryptone Soya Broth

NaCl: Sodyum Klorür

KOH: Potasyum Hidroksit

EtBr: Etidyum Bromür

TAE: Tris-asetat-EDTA

IPTG: Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometrisi

XRD: X-Işını Kırınımı

GİRİŞ

Nanoteknoloji, atomik yapıların moleküler düzeyde kontrol edildiği nano ölçekteki malzemelerin manipülasyonu ve uygulamasını içerir (Sarsar vd., 2013). Nanoteknoloji, malzeme bilimi içinde çok yönlü bir alandır. Nanoparçacıkların (NP'lerin) sentezi dünya çapında önemli bir ilgi görmekte ve bu küçük parçacıklar, boyut (1-100 nm), şekil ve yapılarından etkilenen benzersiz özellikler sergilemektedir (Slawson vd., 1992; Jahn 1999). NP'ler, inorganik ve organik NP'ler olarak sınıflandırılabilir. İnorganik NP'ler yarı iletkenleri (çinko oksit, çinko sülfit ve kadmiyum sülfit gibi), metalleri (gümüş, altın, bakır ve alüminyum gibi) ve manyetik malzemeleri (demir, kobalt ve nikel gibi) içerirler. Organik NP'ler ise fullerenler, kuantum noktaları ve karbon nanotüp gibi karbon bazlı materyalleri içerirler. Bahsi geçen bu NP'ler arasında altın NP'ler (AuNP'ler) ve gümüş NP'ler (AgNP'ler) en çok bilinen metallerdendir. Benzersiz özellikleri ve çok yönlülükleri nedeniyle ilgi çekicidirler (Vadlapudi ve Kaladhar 2014).

AgNP'ler, geniş uygulama alanları ve farklı kimyasal, biyolojik ve fiziksel özellikleri nedeniyle önemli bir konuma sahiptir (Devi vd., 2015). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik (yeşil) sentez (bakteri, mantar, bitki ve bitki özleri) yöntemleriyle üretilebilirler. AgNP'lerin geleneksel yöntemler ile sentezi, tehlikeli kimyasalların ve toksik çözücülerin kullanımı nedeniyle önemli çevresel ve sağlık riskleri oluşturmaktadır. Ayrıca çevre kirliliğine ve insan sağlığına potansiyel olarak yol açmaktadır. Bu nedenle, daha güvenli ve çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Rahman vd., 2023). AgNP'lerin mikroorganizmalar kullanılarak yeşil sentezi, hızlı büyümeleri ve yüksek verimlilikleri nedeniyle daha az maliyetli ve çevre dostudur. Mikroorganizmalar arasında bakteriler, en yaygın kullanılan mikroorganizmalardır. Bakteri kullanımı, benzersiz özelliklere sahip AgNP'lerin üretilmesinde etkilidir (Rafique vd., 2017). Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'ler *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus cereus* gibi çeşitli *Bacillus* türlerinde görülmüştür (Kalimuthu vd., 2008; Ganesh Babu ve Gunasekaran 2009).

AgNP'ler antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra yanık sargılarında, gıda ambalajlarında, su arıtma sistemlerinde, elektronikte, tekstilde ve tıbbi cihazlarda da kullanılmaktadır (Alam vd., 2009; Alavi ve Karimi 2017; Alabdallah ve Hasan 2021). Yeşil olarak sentezlenen AgNP'ler antikanser ve antibakteriyel özellikler sergilemektedir. Bunlara ek olarak, özellikle verimli, çevre dostu ve sürdürülebilir oldukları bildirilmektedir (R. Singh ve ark. 2017).

Sürdürülebilirlik, gelecek için ekosistem sağlığını korumaya odaklanmaktadır. Ancak, son yıllarda artan nüfus ve gelişen teknoloji, atık üretimini artırarak sürdürülebilirliği olumsuz yönde etkilemiştir (Can ve Keskin 2025; Gałazka vd., 2025). Bu bağlamda, çevre dostu uygulamalar, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı ve doğal kaynakların verimli yönetimi sürdürülebilir bir gelecek için önemli adımlardır (Jahanban-Esfahlan ve Amarowicz 2018a; Morales vd., 2022a). Ceviz çekirdeği üretiminin bir yan ürünü olan ceviz kabukları genellikle atık olarak kabul edilmekte veya yakma işlemlerinde yakıt olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalar, hem çevre kirliliğine neden olmakta hemde ceviz kabuklarının potansiyel faydalarını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, %30 selüloz, %25 hemiselüloz ve %35 ligninden oluşan bileşimleri, bu malzemeler için alternatif ve sürdürülebilir kullanımlara yönelik araştırmalara yol açmıştır (Jahanban-Esfahlan ve Amarowicz 2018a;Morales vd., 2022a). Çeşitli çevresel atık malzemelerin lignin içeriği niceliksel olarak belirlenmiş ve çok sayıda çalışma bunların lignin peroksidaz (LiP) enzimi üretiminde kullanılmasını desteklemektedir (Morales vd, 2022a; Gałazka vd., 2025) Düşük maliyetli atıkların fermentasyon substratı olarak kullanılması hem yenilenebilir kaynak kullanımı hem de sürdürülebilirlik açısından önemlidir (Gałazka vd., 2025; Singh vd., 2024).

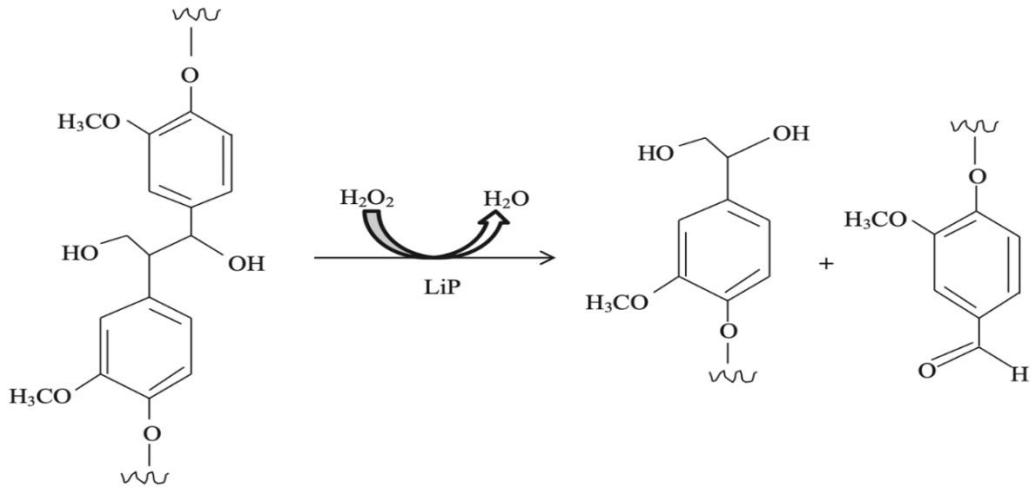
LiP, çeşitli fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri indirgemesinde ve organik bileşiklerin C-C ve C-O-C bağlarının oksidasyonunu katalize etmesinde benzersiz yeteneğe sahiptir. Bu neden ile AgNP'lerin sentezinde önemli bir rol oynamaktadır (R. Singh vd., 2017; Steven Taniwan 2020). LiP enzimi yoluyla AgNP'lerin biyosentezi birçok çalışmayla desteklenmiştir (Sharma vd., 2007; Chaurasia vd., 2022). Mevcut çalışma, *Caldibacillus thermoamylovorans* tarafından biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lere ilişkin ilk çalışmadır. Gümüş nanopartiküllere (AgNP'ler) yönelik artan talep, çevresel etkiyi en aza indiren sürdürülebilir ve ölçeklenebilir üretim yöntemlerinin geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Bu araştırma, atık ceviz kabukları üzerinde yetiştirilen *C. thermoamylovorans'*dan elde edilen LiP kullanılarak çevre dostu AgNP'ler için yeni bir hidrotermal sentez süreci oluşturarak bu kritik süreçteki artan talep ihtiyacını karşılamayı amaçlamaktır.

KURAMSAL TEMELLER

Biyoteknolojik öneme sahip enzimler, endüstriyel biyoteknoloji, gıda, tekstil, deterjan, kağıt, hayvan yemi, biyoyakıt ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimler, bakteri ve fungusların fermentasyonu sonucunda büyük ölçekte üretilerek pazarlama ihtiyaçlarımızın çoğunu karşılar. (Sellami vd., 2022). Özellikle bakteriler, funguslara kıyasla kolay dağılımları, daha kısa sürede gelişebilmeleri, metabolik çok yönlülükleri, küçük boyutta olmaları, olumsuz koşulları tolere etme yetenekleri, geniş bir besin yelpazesi kullanma yetenekleri ve yüksek genetik manipülasyon özellikleri nedeni ile daha fazla tercih edilmektedir (Arya M vd., 2015; Falade vd., 2019). Jeotermal kaynaklardan sıcak çöllere kadar ekstrem çevresel koşullarında gelişen bakteriler bulunmaktadır. Özellikle de kaplıcalar mikrobiyal çeşitlilik açısından zengin olup çeşitli termofilik bakterileri içerisinde bulundurmaktadır. Termofilik bakterilerin taksonomisi son yıllarda büyük ilgi uyandırmıştır. Termofilik bakteriler, proteazlar, amilazlar, ksilanazlar, lipazlar, glikoz izomerazlar ve peroksidazlar gibi birçok endüstriyel enzimin kaynağıdır. (Arya M vd., 2015).

Peroksidazlar

Peroksidazlar, peroksidi indirgeyen ve hidrojen peroksit kullanarak çok çeşitli organik veya inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden çok büyük bir enzim grubudur (Conesa vd., 2002; Passardi vd., 2007). Tipik bir reaksiyon, elektronların substrattan hidrojen peroksite transferini içerir ve substrat oksidasyonuna yol açar (Falade vd., 2016). **Şekil 1**'de reaksiyon gösterilmiştir.



Şekil.1 $2S + H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2S_{ox} + 2H_2O$

S: substrat (elektron donörü), **S_{ox}**: oksitlenmiş substrat (Falade vd., 2016).

Peroksidazlar doğada yaygın olarak bulunur ve bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır (Sola vd., 2010). Yapısal olarak üç peroksidaz sınıfı vardır (I, II ve III). Sınıf I bitkilerde, funguslarda ve prokaryotlarda bulunmuştur. Sitokrom c peroksidazlar (CcP), katalaz peroksidazlar (CP) ve askorbat peroksidazlar (APx) bu sınıfa dahildir. Sınıf II, bir mantar türü olan *Homobasidiomycetes* tarafından salgılanır ve bitki kaynaklı lignini parçalayan bir enzim sınıfıdır. Lignin peroksidazlar (LiP) ve manganez peroksidazlar (MnP) bu sınıfa dahildir. Son olarak, bitkilerde sınıf III bulunur. Üç boyutlu yapıları sınıf II'ye daha çok benzer (Passardi vd., 2007). Sınıf II'de yer alan lignin peroksidaz (LiP) enzimi; Çok çeşitli substratlara sahip olmasına rağmen, ölü bitki materyallerinin parçalanması için kullanılır (Passardi vd., 2007).

Lignin

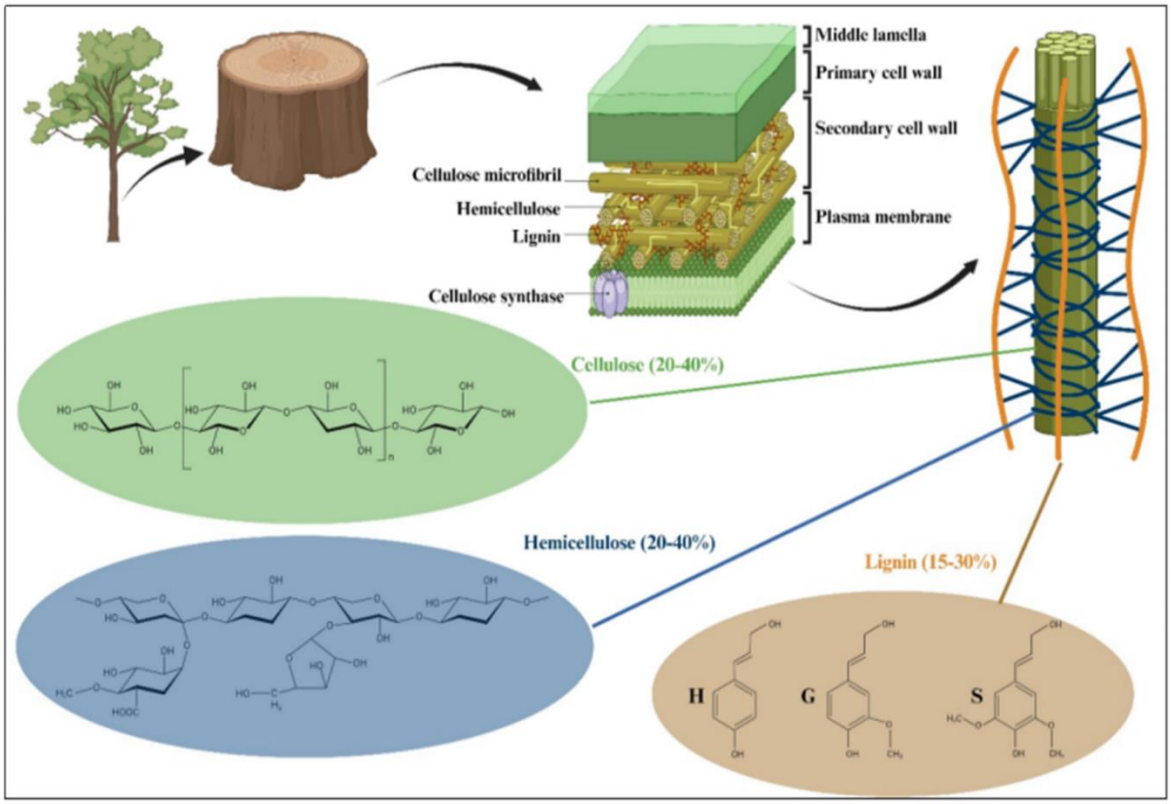
Lignin; Bitkilerde selüloz ve hemiselüloz liflerini güçlendiren bitki hücre duvarlarında bulunan yapıdır ve selülozdan sonra dünyada en çok bulunan karbon kaynaklarından biridir (Wong vd., 2008). Çoğu karasal bitkinin %15 ila %40'ı arasında kuru ağırlık aralığına sahip bir polimerdir (Ragauskas vd., 2014). Bitki materyalinin yaklaşık %15-30'unu oluşturur **(Şekil 2)**. Selüloz (%30-50) ve hemiselüloz (%15-30) ile birlikte bitkinin ikincil hücre duvarının önemli bir parçasıdır. Çeşitli tarımsal bitki biyokütle kaynaklarının lignin içeriğine örnek olarak; buğday samanında %19-27, çamda %28-35, mısır koçanında %18-23, antep fıstığında %32,12, yer fıstığı kabuğunda %41,3 ve ceviz kabuğunda %29,9 oranında lignin bulunduğu bildirilmiştir (Fang vd., 2014; Dönmez vd. 2016; Chaves., 2019; Queiros vd., 2020).

Ceviz kabuğu (WS), selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenlerinden oluşur ve ceviz içi üretiminden sonra bol miktarda elde edilir. Bu kabuklar yakıldığında çevre kirliliğine neden olur ve kabuğun değerini düşürür. Biyoetanol, pirolignöz asit, aktif karbon ve kömür üretiminde kullanılmıştır (Esfahlan, A.J & Amarowicz, R., 2018). Aynı zamanda ksiloz üretme kapasitesine sahip tarımsal bir atıktır (Ahorsu vd., 2019). Cevizin kabuğunda, %47,67 karbon (C), %5,67 hidrojen (H), %46,32 oksijen (O), %0,34 azot (N) ve %0,69 ash (kül) bulunmaktadır (Yuan, H.R & Liu, R.H., 2007). **Tablo 1**'de çeşitli substrat atıkların selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri verilmiştir.

Tablo 1. Çeşitli lignoselülozik maddelerin kimyasal bileşimi (Yuan, H.R & Liu, R.H. 2007; Dönmez vd., 2016; Chaves vd., 2019;).

Lignoselülozik substratlar	%Selüloz	%Hemiselüloz	%Lignin
Pirinç Samanı	32.1	24	18
Mısır Koçanı	45	35	15
Buğday Samanı	30	50	15
Arpa Samanı	33-40	20-35	8-17
Mısır Sapı	39-42	22-28	18-22
Fındık Kabukları	25-30	25-30	30-40
Yapraklar	15-20	80-85	-
Yumuşak Ağaç Gövdeleri	45-50	25-30	25-35
Sert Ağaç Gövdeleri	40-55	24-40	18-25

Lignin, selüloz, hemiselüloz ve pektin tarafından oluşturulan matrisin mukavemetinin ve uyumunun korunmasında önemli bir rol oynar (Beorjan vd., 2003). Lignin, fenolik bileşiklerden oluşan karmaşık, oldukça dallanmış, üç boyutlu bir yapıdır. Esas olarak üç temel monolignollü fenol bazlı moleküller olan p-kumaril alkol (M1H), koniferil alkol (M1G) ve sinapil alkolden (M1S) oluşur. Bu yapı taşları neredeyse tüm lignin formları için ortaktır (Vanholme vd., 2008). Ligninin moleküler ağırlığı değişkenlik gösterir çünkü yapısı fenolik grupların rastgele çapraz bağlanmasıyla oluşur. Bu bağlantılar, fenolik radikaller arasındaki radikal birleştirme reaksiyonlarından kaynaklanır (Beorjan vd., 2003). Lignin, fenolik hidroksil, metoksil, karboksil ve alifatik hidroksil grupları gibi kimyasal olarak nasıl reaksiyona girdiğini etkileyen çeşitli fonksiyonel gruplar içerir (Christopher vd., 2014). Lignin, reaktif radikaller oluşturmak için hidrojen atomlarını uzaklaştıran peroksidaz enzimleri tarafından yönlendirilen bir süreçte monolignol birimlerinin polimerizasyonu yoluyla oluşur. Bu radikaller daha sonra birbirine bağlanarak karbon-karbon (C-C) bağları ve aril-gliserol ve β-aril eter bağlantıları da dahil olmak üzere çeşitli aril eter bağlantıları ile bağlanmış yapılar oluşturur.



Şekil 2. Odunsu bitki materyalinin yapısı (Ali vd., 2024).

Karbon-karbon bağları en güçlü ve kırılması en zor bağlardandır (Christopher vd., 2014). Monolignoller, polisakkaritler ve proteinler de dahil olmak üzere diğer hücre duvarı bileşenleriyle bağlantı kurarak karmaşık bir üç boyutlu ağ oluşturur (Calvo-Flores vd., 2010). Bu yapı, vasküler bitki dokularına ve hücre duvarlarına sertlik, mekanik güç ve mikrobiyal bozulmaya karşı direnç kazandırır (Fisher vd., 2014).

Lignin Peroksidaz (LiP)

LiP yapı bakımından tek üniteli bir hemoproteindir. LiP içindeki hem grubunun, diğer sınıf II peroksidazlarda olduğu gibi, düz olmayan bir şekle sahip olduğu bilinmektedir. Diaril propan oksijenaz olarak da bilinen lignin peroksidaz (LiP), hidrojen peroksit gerektiren bir oksidasyon reaksiyonu yoluyla lignini parçalayan enzimdir. Ligninaz I benzer bir rol oynar ve diaril propan peroksidaz olarak da adlandırılır. Her iki enzim de peroksidaz-katalaz enzim ailesine aittir (Zamocky & Obinger, 2010). Bu yapısal özellik açıkça gösterilmiştir ve Protein Veri Bankasında (PDB) bulunan çeşitli lignin parçalayıcı peroksidazların kristal yapılarında görülmüştür (Piontek, Glumoff, & Winterhatter, 1993). LiP ilk olarak beyaz çürükçül mantar olan *Phanerochaete chrysosporium*'un hücre dışı ortamında bulunmuş (Glenn vd., 1983; Tien & Kirk, 1983) ve diğer organizmalarda enzimin birkaç farklı formu tanımlanmıştır. Bunlar

arasında *P. chrysosporium* (Farrell vd., 1989), *Trametes versicolor* (Johansson vd., 1993), *Phlebia radiata* (Moilanen vd., 1996) ve *Phanerochaete sordida*'da (Sugiura vd., 2009) yer almaktadır.

P. chrysosporium BKM-F-1767 suşunun hücrelerinin dışındaki kültür sıvısında H1, H2, H6, H7, H8 ve H10 olarak adlandırılan altı farklı LiP formu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Glumoff vd., (1990) *P. chrysosporium*'dan beş LiP izozimi tanımlanmıştır. Şu anda, lignoselülozu parçalayan mantarların genom dizileri düzenli olarak güncellenmekte ve ABD Enerji Bakanlığı'nın Ortak Genom Enstitüsü tarafından kullanıma sunulmaktadır.

Beyaz çürükçül ve kahverengi çürükçül mantarların yanı sıra, bazı bakterilerin de lignini parçaladığı ve lignin parçalayıcı enzimler üretebildiği tespit edilmiştir. Bu bakteriler arasında aktinomiset grubu üyelerinin yanı sıra *α-proteobakteriler* ve *γ-proteobakteriler* de bulunmaktadır (Bugg vd., 2011; Paliwal vd., 2012). **Tablo 2**'de, LiP enzim aktivitesine sahip bakteri ve mantar türü örnekleri verilmiştir (Conesa vd., 2002), (Falade vd., 2019; Fall vd., 2022).

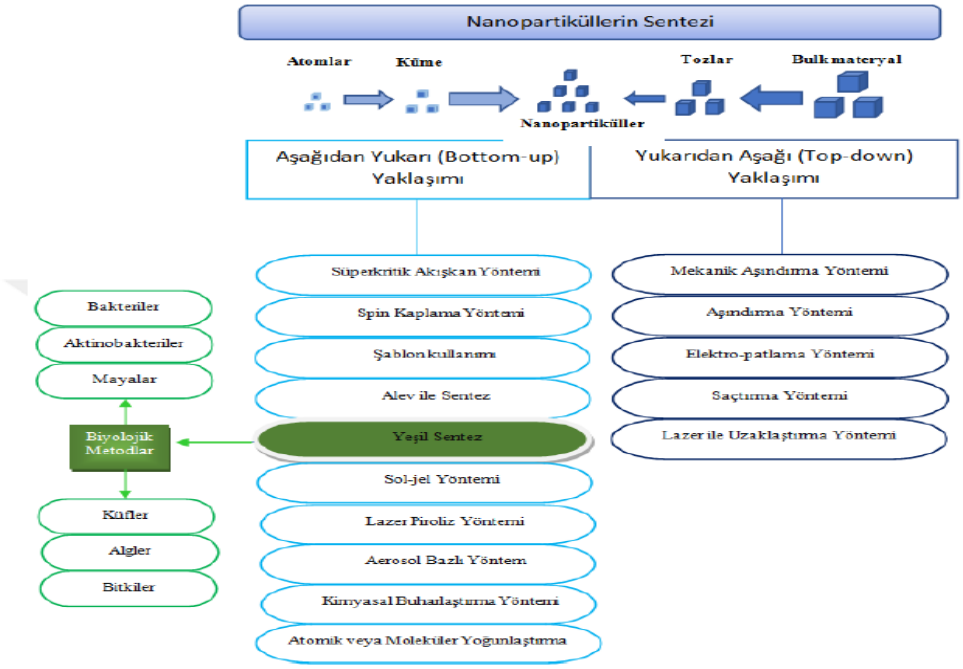
Tablo 2. LiP enzim aktivitesine sahip bakteri ve mantar türü örnekleri

LiP enzim aktivitesine sahip olan birkaç mantar türüne örnek olarak;	LiP enzim aktivitesine sahip olan birkaç bakteri türüne örnek olarak
Trametes versicolor	*Bacillus* sp.
Pleurotus spp.	*Pseudomonas* sp.
Arthromyces ramosus	*Sphingomonas* sp.
Phlebia radiata	*Firmicutes* sp.
Coprinus spp.	*Saccharomonospora viridis*
Bjerkandera adusta	*Rhodococcus jostii*

Bacillus cinsi çok geniş bir ailedir. *Bacillus* cinsinin taksonomisi her geçen gün gelişmekte ve genişlemektedir (Coorevits vd., 2011; Yüzügüllü vd., 2018). Bu cins, antibiyotik, toksin ve enzim üretme gibi metabolik özelliklerine ek olarak kolay üretilebilmeleri ve endüstriyel değere sahip olmaları nedeni ile diğer mikroorganizmalara göre daha dikkat çeken bakterilerdir (Yüzügüllü vd., 2018).

Nanopartiküller (NP)

Nanopartiküllerin (NP) sentezi tüm dünyada önemli ölçüde artmaktadır. (Rafique vd., 2016). Boyutları 1-100 nm arasında değişen küçük malzemelerdir. NP'ler, geniş yüzey alanları ve nano ölçekli boyutları nedeniyle benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. NP'lerin sentezi yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yöntemler kullanılarak yapılabilir (Khan vd., 2019). Bu iki yaklaşımın birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Uygulama maliyetinin fazla olduğu yukarıdan aşağı yaklaşımında, nanopartiküllerde oluşabilen oyuklar ve pürüzlerden dolayı iyi bir yüzey ve kenarlar elde edilemezken; bottom-up yaklaşımıyla mükemmel nanopartikül sentez sonuçları elde edilebilir. Buna ek olarak, aşağıdan yukarı yaklaşımıyla uzaklaştırılması istenen atık materyaller oluşturulmaz ve NP'lerin boyutları daha iyi kontrol edildiği için daha küçük boyutta NP'lerin elde edilmesi sağlanır (Nadaroğlu vd., 2023). NP'lerin yeşil sentezle (bakteri, mantar, bitki ve bitki özleri) üretimi diğer yöntemlere göre daha çevre dostudur (Rafique vd., 2016). Aşağıda **Şekil 3**'de NP'lerin sentez yöntemi gösterilmiştir.



Şekil 3. Nanopartiküllerin sentezi (Nadaroğlu vd., 2023).

Nanopartiküller geniş yüzey alanları nedeniyle oldukça reaktiftir ve biyotıp, biyoanalitik ve kataliz gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Metal nanopartiküller arasında özellikle gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) yanık pansumanlarında, gıda ambalajlarında, su arıtma sistemlerinde, tıbbi cihazlarda ve antimikrobiyal uygulamalarda kullanılmaktadır (Devi vd., 2015).

Gümüş Nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller, boyutları 1 ila 100 nanometre arasında değişen küçük yapılardır ve tıp alanındaki ileri uygulamaları için yaygın olarak çalışılmaktadır. İlaç dağıtım sistemleri, yara iyileştirici malzemeler, doku mühendisliği ve koruyucu kaplamalar gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. En önemli avantajlarından biri, çeşitli moleküllerin bağlanmasına olanak tanıyan ve yüzey modifikasyonu için çok sayıda olasılık sunan geniş yüzey alanlarıdır. Gümüş, antimikrobiyal özellikleri nedeniyle genellikle gümüş nitrat formunda uygulanır. Bununla birlikte, gümüş nanopartiküller, mikroorganizmalarla etkileşimi artıran artan yüzey alanları nedeniyle basit gümüş bileşiklerine göre ek faydalar sunmaktadır. Bu nanopartiküller, çok çeşitli mikroplara karşı etkinlikleri ve geleneksel antibiyotiklere karşı direncin üstesinden gelme potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Hutchison vd., 2008). Şimdiye kadar birçok çalışma gümüş nanopartiküllerin gıda işleme, tarım ve tarımsal ürünlerle ilgili endüstriler dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanımını vurgulamıştır. Ayrıca sağlık ürünleri, tüketim malları, farmasötik ürünler, tıbbi teşhis, ortopedi, ilaç taşıma sistemleri, tıbbi görüntüleme ve filtreleme gibi tıp ve sağlıkla ilgili alanlarda da uygulanmıştır. Ayrıca, tümörlere karşı ajan olarak ve kanserle mücadele ilaçlarının etkinliğini artırmada umut vaat ettiklerini göstermişlerdir (Almatroudi vd., 2020).

Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) sentezi/üretimi

Gümüş nanopartiküller üretmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yaklaşımlar dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Her teknik kendine özgü avantajlar ve sınırlamalar sunmaktadır. Biyolojik yöntemde, canlı organizmalar gümüş iyonlarını (Ag^{+}) elementel gümüşe (Ag^{0}) dönüştüren kapama, indirgeme veya stabilize etme ajanları olarak hizmet ederek sürece yardımcı olurlar (Zewde vd., 2016). Son zamanlarda mikroorganizmalar ve bitkilerden elde edilen NP'lerin, uygun maliyetli olmaları, iyi verim sağlamaları ve genellikle hem insan sağlığı hem de çevre için daha güvenli olmaları nedeniyle daha fazla ilgi görmektedir. Gümüş nanopartiküller, üç ana yöntemle üretilir (Shanmuganathan vd., 2019).

1. **Kimyasal yöntemler**
2. **Fiziksel yöntemler**
3. **Biyolojik yöntemler**

Biyolojik Yöntemlerle Gümüş Nanopartiküllerinin Sentezi/Üretimi

Fiziksel ve kimyasal tekniklerle gümüş nanopartiküller oluşturmak maliyetli, zaman alıcı ve çevreye zararlı olma eğilimindedir. Bu nedenle biyolojik yaklaşımlar bu zorluklara bir çözüm sunmakta ve çeşitli biyolojik süreçleri etkileyerek sağlıkla ilgili alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde bitki materyallerinin yanı sıra mantar, bakteri ve maya gibi organizmalar da kullanılmaktadır. Doğal kökenleri ve güveninirlilikleri nedeniyle bu biyolojik kaynaklar, yöntemi özellikle nanopartiküllerin tıbbi kullanımları için cazip hale getirmiştir (Almatroudi vd., 2020). Mikroorganizma ve bitkilere dayalı nanopartikül üretim yöntemlerinin güvenli, ekonomik ve kimyasal senteze göre çevreye nispeten daha az zararlı olduğu bildirilmiştir (Makarov vd., 2014; Gowramma vd., 2015). Ayrıca, mikroorganizmalar ve bitkiler çevrelerindeki inorganik metalik iyonları absorbe edebilir ve biriktirebilirler (Shah vd., 2015). Gümüş nanopartiküllerin biyolojik üretimi temel olarak mikroorganizmaların ve bitki kaynaklarının kullanımını içerir (Ahmad vd., 2019).

Bakterilerde Üretim

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, farklı bakteri suşlarından elde edilen kültür süpernatantları kullanılarak çözeltideki gümüş iyonlarının (Ag^{+}) indirgenmesiyle gümüş nanopartiküllerin oluşturulması araştırılmıştır. Bu yöntemin hızlı olduğu ve gümüş iyonlarının hücre süzüntüsü ile etkileşime girmesinden sonra gümüş nanopartiküllerin oluştuğu görülmüştür. *Piperitonun enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinde nitro-redüksiyon işlevini engellediği bilinmektedir. Bu doğal bileşiğin, *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı suşların gümüş iyonlarını indirgeme kabiliyetini de sınırlayabileceği göstermiştir (Liu vd., 2000). Bir başka çalışmada Korbekandi ve ekibinin *Lactobacillus casei* subsp. *casei* kullanarak nanopartikül üretimini optimize etmeye çalışmış ve organizmanın gümüş iyonlarını nanopartiküllere indirgeme yeteneğini doğrulamıştır (Korbekandi vd., 2012). Benzer şekilde Das vd., (2014), CS 11 adlı bir *Bacillus* türünün gümüş nitrat ($AgNO_3$) ile muamele edildiğinde hücre dışında nasıl gümüş nanopartiküller ürettiğini tanımlamıştır. *Acinetobacter* sp. kullanılarak lignin peroksidaz üretilmiştir ve üretilen lignin peroksidaz ile AuNP ve SeNP sentezi yapılmıştır (Wadhwani vd., 2018). Yeşil sentez yöntemi ile ceviz kabukları kullanılarak CaONP'ler sentezlenmiş, sentezlenen bu nanopartiküllerin çeşitli fasulye örnekleri üzerinde güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Nadaroglu vd., 2023).

Mantarlarada Üretim

Farklı mantar türlerinin gümüş nanopartiküller üretebildiği tespit edilmiştir (Guilger-Casagrande vd., 2019). Mantarların kullanıldığı bu sürecin hızlı bir şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Çok sayıda çalışma, mantarların gümüş nanopartiküllerin oluşumuna nasıl katkıda bulunduğunu yakından incelemiş ve bu biyolojik yönteme ilişkin ayrıntılı bilgiler sağlamıştır (Iravani vd., 2024). Syed ve ekibi, gümüş nanopartiküllerin *Humicola* sp. mantarı tarafından üretilebileceğini bildirdi. *Humicola* sp. gümüş iyonlarıyla (Ag^{+}) etkileşime girdiğinde, öncü çözeltinin indirgendiğini ve mantar hücrelerinin dışında nanopartikül oluşumuna yol açtığını göstermiştir (Syed vd., 2013). Owaid ve arkadaşları, *Pleurotus cornucopiae* özütü ile indüklenen gümüş nitratın biyoredüksiyonu yoluyla gümüş nanopartiküller üretilebildiğini bildirmişlerdir (Owaid vd., 2015). Ayrıca, *Phanerochaete chrysosporium* miselyumunun gümüş nitrat çözeltisi ile inkübasyonu sonucunda gümüş nanopartiküller oluşturduğu rapor edilmiştir (Vigneshwaran vd., 2006).

Alglerde Üretim

Bu yöntem, ekonomik ve çevre dostu olması nedeniyle nanopartiküllerin üretiminde fiziksel ve kimyasal yöntemlere uygun bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Hamouda vd., 2019). Ayrıca, alglerin metal tutma kapasitesi yüksektir. Deniz algleri gibi biyolojik kaynakların belirli reaksiyonları katalize etme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu yetenek, günümüz ve gelecekteki biyosentetik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır (Govindaraju vd., 2019). Alg özütü kullanılarak yapılan bir çalışmada, sarı renkten kahverengiye olan değişimin gümüş iyonlarının gümüş nanopartiküllere dönüşümünü gösterebileceği belirtilmiştir. Ayrıca, Rajeshkumar ve arkadaşları, 32 saatlik inkübasyon süresinde gümüş nanopartiküllerin koyu kahverengi rengini fark etmişler ve renk yoğunluğunun inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak arttığını gözlemlemişlerdir (Rajeshkumar vd., 2014). Salari ve arkadaşları, *Spirogyra varians* tarafından indüklenen gümüş iyonlarının biyoredüksiyonu yoluyla gümüş nanopartiküllerin üretildiğini bildirmiştir (Salari vd., 2016).

Mayada Üretim

Mayaların gümüş nanopartikülüretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, maya temelli gümüş nanoparçacık üretim yöntemleri hem ekonomik hem de çevre dostudur. Bu doğrultuda, Niknejad ve arkadaşları *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak bir çalışma gerçekleştirmiştir. Ag^{+} iyonları maya kültürüne eklendikten sonra, inkübasyon süresi arttıkça renksiz örneğin yavaşça kırmızımsı kahverengiye döndüğü gözlemlenmiştir. Zamanla bu renk güçlü bir kırmızımsı kahverengiye dönüşmüştür (Niknejad vd., 2015). Ayrıca, Kowshik ve

arkadaşları, log fazındaki gümüşe dayanıklı bir mayanın çözünmüş gümüşle etkileşimi sonucunda hücre dışı nanopartikül sentezini rapor etmiştir (Kowshik vd., 2002).

Bitkide Üretim

Diğer biyolojik yöntemlerde olduğu gibi, bitkilerle yapılan üretim de kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre daha avantajlıdır çünkü yüksek sıcaklık, fazla enerji veya zararlı kimyasallar gerektirmez; ayrıca ekonomik ve çevre dostudur (Saxena vd., 2012). Aloe vera yapraklarında birçok etkili bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenler arasında lignin, pektin ve hemiselüloz yer almakta olup, bu maddelerin gümüş iyonlarının indirgenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Emaga vd., 2008). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Suudi Arabistan menşeli *Origanum vulgare* bitkisinin sulu özütü kullanılarak gümüş nanopartikülleri sentezlenmiştir. Sonuçlar, Ag^{+} iyonlarının indirgenmesiyle nanopartiküllerin oluştuğunu göstermiştir. Bu süreç sırasında, reaksiyon karışımının rengi açık kahverengiden koyu kahverengiye dönüşmüştür. Öte yandan, aynı koşullarda bitki özütü bulunmadığında herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemiştir (Shaik vd., 2018). Başka bir çalışmanın sonuçlarına göre, *Azadirachta indica* bitkisinin farklı derişimlerdeki sulu yaprak özütleri eklendikten sonra, gümüş nitratın sulu çözeltisinin rengi soluk açık tondan sarımsı kahverengiye dönüşmüştür (Ahmed vd., 2016). López-Miranda ve arkadaşları, *Tamarix gallica* bitki özütünü kullanarak gümüş nanopartikülleri hızlı bir şekilde biyolojik yöntemle sentezlemişlerdir (López-Miranda vd., 2016). Chinnappan ve arkadaşları, *Bauhinia purpurea* çiçek özütü kullanarak gümüş nanopartiküllerin hızlı ve basit bir yöntemle sentezlenmesini bildirmişlerdir (Chinnappan vd., 2018). 2016 yılında Ibraheim ve arkadaşları, gümüş nitrat çözeltisinden gümüş nanopartiküllerin, indirgeme ajanı olarak nar suyu özütü kullanılarak sentezlendiğini bildirmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, nar suyunun gümüş nanopartiküllerinin hızlı bir şekilde oluşmasını sağladığını göstermiştir. Mikrodalga ile birkaç dakikalık işlem sonrası, çözeltinin rengi açık sarıdan kırmızımsı kahverengiye dönmüş ve bu değişim, gümüş nanopartiküllerin oluşumunu göstermiştir (Ibraheim vd., 2016). Lakshmanan ve arkadaşları, *Cleome viscosa* bitki özütü kullanarak gümüş nanopartikülleri sentezlemiştir ve çalışmada bu bitki özütünün, gümüş nitratı metalik gümüşe indirgeme konusunda yüksek bir yeteneğe sahip olduğu ortaya konmuştur (Lakshmanan vd., 2018). Prasad ve arkadaşları, *Moringa oleifera* yapraklarının sulu özütlerini kullanarak gümüş nanopartiküllerin biyoredüksiyonunu gerçekleştirmek için basit ve hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmalarının sonuçları, *Moringa oleifera* bitkisinin gümüş iyonlarını hızla indirgeme yeteneği sayesinde gümüş nanopartiküllerinin sentezinde yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Prasad vd., 2011). Bu bağlamda, başka bir çalışma,

Ficus benghalensis yaprak özütü kullanılarak gümüş nanopartiküllerin hızlı ve pratik bir şekilde sentezlenebileceğini göstermiştir. Gümüş iyonlarının nanopartiküllere dönüşümü, sert koşullar uygulanmadan sadece 5 dakikalık kısa bir reaksiyon süresi içinde gerçekleşmiştir (Saxena vd., 2012).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	**Marka**
Buzdolabı (+4/-20 °C)	Vestel
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Çeker Ocak	Fume Hood Mikrotest
Dondurucu (-86 °C)	Glacier Ultralow Freezer
Etüv	Redline by-Bınder
Hassas Terazi	Ohaus Pioneer
İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
Otoklav	Hmc Hiramaya
pH Metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Su Banyosu	Memmert
Vortex	Fisons WhirliMixer
Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) spektrofotometre	BECKMAN COULTER
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss
X-IĢını kırınımı (XRD) cihazı	PANalytical Empyrean
Fourier DönüĢümlü Kızılötesi (FTIR) spektrofotometre	Bruker VERTEX 70v
Jel Görüntüleme Sistemi	Vılber Lourmat-Quantum
Mikro Dalga Fırın	Beko
Kurutma dolabı	DIGITHEAT

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları

Kimyasal	**Üretici Firma**
Agaroz (DNase-RNase-Protease free)	Sigma
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Sigma
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma
Mineral Yağı	Biomerieux
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
$CaCl_2$	Sigma
Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP)	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Etanol	İso-Lab Chemicals
Metanol	İso-Lab Chemicals
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Hidrojen klorür (HCl)	Sigma
Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$)	Sigma
Metanol	Carlo Erba Reagents
Agaroz	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Tryptone Soya Agar	Oxoid
Tryptone Soya Broth	Oxoid
Nutrient Agar (NA)	Sigma
Gliserol	Sigma
Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4)	Sigma
Monopotasyum Fosfat (KH_2PO_4)	Sigma
Magnezyum Sülfat ($MgSO_4$)	Sigma
Amonyum Nitrat (NH_4NO_3)	Sigma
Maya Ekstraktı	Sigma
Veratril Alkol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol)	Sigma
Lügol Solüsyonu	Sigma
Sodyum Potasyum Tartarat ($KNaC_4H_4O_6$)	Sigma
Gümüş Nitrat ($AgNO_3$)	Sigma
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma
Kanamisin Antibiyotiği	Thermo

Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

%0,9'luk NaCl: 0,9 g NaCl tartılıp, 100 mL saf suda çözdürüldü.

%70'lik EtOH: 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2 M HCl: 165 µl HCl alınıp, üzerine 9835 mikrolitre su eklenerek 10 mL'ye tamamlandı.

1X TAE Tamponu: 100 mL 10X TAE alınıp hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

50 mM EDTA: EDTA'dan 1,46 g tartılarak 100 mL suda çözüldü ve pH'sı 8'e ayarlandı.

5M NaOH çözeltisi: 2 g NaOH tartılarak, 8 mL distile suda çözdürüldü.

Sodyum Asetat: 2,72 g sodyum asetat tartılıp, 100 mL suda çözdürülüp, pH'sı 5'e ayarlandı.

Gümüş Nitrat Çözeltisinin Hazırlanması: 100 mL hacminde 0,1 M'lık $AgNO_3$ çözeltisini hazırlamak için; 0,17 g $AgNO_3$ hassas terazide tartılıp oda sıcaklığında 80 mL saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürülmüştür. Son hacim, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

NA Agar: 20 g NA agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek 121 °C sıcaklıkta 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile otoklavlandı.

NB Broth: 20 g NB Broth tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek 121 °C sıcaklıkta 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile otoklavlandı.

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek, 121 °C'de 1 atm basınçta otoklavlandı ve steril petrilere (20 mL) döküldü.

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121 °C sıcaklıkta 1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile otoklavlandı.

Metot

Ceviz Kabuklarının Toplanması ve Hazırlanması

Çalışmada kullanaılan ceviz kabukları Erzurum'un Tortum ilçesinden eylül ayında toplanmıştır. Bu kabuklar selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır (Jahanban-Esfahlan ve Amarowicz, 2018b). Ceviz kabuğunda bulunan lignini açığa çıkarmak için ön muamele işlemi yapılmıştır. İlk olarak ceviz kabuklarının dış kabuğu çıkarılmış ve kabuklar damıtılmış su ile birkaç kez yıkandıktan sonra kabuklar, 105°C'de kurutulmuş ve ardından kuruyan ceviz kabukları öğütülerek 0,25 mm boyutuna getirilmiştir. Hemiselülozun ayrıştırılması için 10 g öğütülmüş ceviz kabuğu tozu alınarak 100 mL damıtılmış suya ilave edilmiştir. Karışım daha sonra %2 NaOH ile muamele edilip 4 saat boyunca 100°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından karışım, 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Çökelek, distile su ile bir kez yıkanarak 60°C'de kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, kurutulmuş örnekler kullanılana kadar +4°C'de saklanmıştır (Zheng vd., 2019).

Bakteri İzolasyonu

Termofilik bakteriler, Erzurum'un Ilıca Kaplıcası'ndan aseptik koşullar altında toplanan su örneklerinden izole edilmiş ve kullanılana kadar +4°C'de saklanmıştır. Toplanan termofilik bakteriler ön zenginleştirilme işlemine tabi tutularak doğrudan TSB'ye inoküle edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 55°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, %0,85 fizyolojik tuz çözeltisi kullanılarak, bir dizi dilüsyon (10^{-1} -10^{-6}) hazırlanmış ve her dilüsyondan 100 µL alınarak, TSA besiyeri üzerine yayılmıştır. TSA ortamı 15 g/L kazein pepton ile desteklenmiştir. Petriler daha sonra 24-48 saat boyunca 55°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petrilerde gelişen bakterilerden, morfolojik olarak farklı olan 9 koloni seçilmiş ve her bir koloniden saf bir kültür elde etmek için, taze TSA petrilerine çizilmiştir. Uzun süreli saklama için tüm saf koloniler -86°C'de, TSB ile hazırlanmış %20 gliserollü stok solüsyonunda muhafaza edilmiştir (Adıgüzel vd., 2020).

LiP Üreten Bakterilerin Taranması

Suşların LiP enzim üretim yeteneğini değerlendirmek için iki besiyeri hazırlanmıştır. Katı besiyeri olarak; 30 g/L TSA, potasyum fosfat tamponları (4,55 g/L K_2HPO_4, 0,53 g/L KH_2PO_4), 0,5 g/L magnezyum sülfat, 5 g/L amonyum nitrat, 0,1 g/L maya ekstraktı ve LiP aktivitesi için substrat olarak %0,1 veratril alkol ile desteklenmiş ve pH 7,0'a ayarlanmıştır. İzole edilen suşlar daha sonra hazırlanan TSA petrilerine inoküle edilmiş ve 55°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere %1'lik lügol solüsyonu eklenmiş ve

kolonilerin etrafında berrak zonların oluşması, veratril alkol hidrolizini göstermiştir (Falade vd., 2017). Katı ortamdan elde edilen sonucu doğrulamak için, Falade'nin yönteminde bazı değişiklikler yapılarak sıvı bir ortam hazırlanmıştır (Falade vd., 2017).

Sıvı besiyeri olarak; potasyum fosfat tamponları (4,55 g/L K_2HPO_4, 0,53 g/L KH_2PO_4), 0,5 g/L magnezyum sülfat, 5 g/L amonyum nitrat, 0,1 g/L maya ekstraktı ve LiP aktivitesi için substrat olarak %0,1 veratril alkol eklenmiş ve pH 7,0'a ayarlandı. Hazırlanan besiyerine 0,1 mL izolat süspansiyonu (OD_{600} nm ≈ 0,4) eklenmiş ve 55°C'de, 120 rpm'de ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür ortamı 4°C'de 15 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant ölçüm için kullanıldı

.

Seçilen Bakterilerin Tanımlanması

Gram boyama, oksidaz testi ve katalaz aktivitesi testi ile bakteriler uygun şekilde tanımlanmıştır (Choi vd., 2011). Moleküler tanımlama için en iyi zona ve en iyi LiP enzim aktivitesine sahip olan izolat seçildikten sonra bir dizi işleme tabi tutulmuştur.

Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Gram Boyama

Bakteri kültürü, steril bir öze ile alınarak bir lam üzerine yayılıp, 1 dakika boyunca kristal viyole ile muamele edilmiştir. Kristal viyole ile muamelede hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler mor renk sergilemiştir. Ardından preparattaki fazla boya, distile su ile uzaklaştırılmış ve preparatın fiksasyonu için lügol eklenerek, 1 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra preparat, %96'lık etanol ile yıkanmıştır. Bu esnada Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakası kalın olduğundan dolayı mor rengini korumuştur; Gram negatif bakterilerin ise dış zarın yapısındaki lipit tabaka kaybolduğundan dolayı renksizleşmiştir. Son olarak safranin ile 20 saniye muamele edilmiş ve bu işlemin ardından yıkama yapılarak preparatlar kurumaya bırakılmıştır. Mikroskop altında mor renkli olan hücrelerin Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli hücrelerin ise Gram negatif bakteriler olduğu değerlendirilmiştir (Adıgüzel, 2008).

KOH Testi

İzolatın Gram özelliklerini doğrulamak için ek olarak KOH testi yapılmıştır. Bakteriler %3'lük KOH ile muamele edilmiştir. Gram negatif bakterilerin duvarları ince olduğu için, sitoplazma bu işlem sırasında dışarı çıkmakta ve sümüksü bir yapı oluşturmaktadır. Ancak

Gram pozitif bakterilerin hücre yapılarını bozamadığı için böyle bir oluşum gözlenmemiştir. KOH testi için, TSA'de büyütülen 1-2 günlük kültürlerden bir öze bakteri örneği alınarak, KOH solüsyonu ile 5 ve 8 saniye arasında homojenize edilmiştir. Öze yukarı aşağı hareket ettirilip, Gram pozitif bakterilerin herhangi birinde uzama oluşmadığı gözlenirken, Gram negatif bakterilerde ise uzayan bir yapının oluştuğu tespit edilmiştir (Baltaci, 2016).

Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Katalaz Testi

Test için, canlandırılan suşdan 1 öze dolusu alınarak, %5'lik H_2O_2 damlatılan lam üzerine yerleştirilip, yavaşça karıştırıldı. Ardından kabarcık oluşturan bakteriler katalaz enzimi yönünden pozitif olurken, oluşturmayan bakteriler ise, negatif olarak değerlendirilmiştir (Choi vd., 2011).

Oksidaz Testi

Oksidaz testi için Kovács reaktifi kullanılmış ve bunun için kitte bulunan diskin üzerine su damlatılarak, diskin yüzeyine bir miktar bakteri bırakılmıştır. Oksidaz pozitif bakterilerde mavi ve mor renk oluşumu gözlenirken, negatif bakterilerde ise herhangi bir renk oluşumu belirlenmiştir (Choi vd., 2011).

Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenen izolat daha sonra tanılama için hazırlanmıştır. Öncelikle bakteri kültüründen alınıp TSB ortamında 55°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından DNA ekstraksiyonu ve saflaştırması için kullanılmıştır. Bu aşamada DNA, Wizard Genomik DNA Saflaştırma Kiti (A2360) kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Choi vd., 2011).

İzolasyon Aşamaları

TSB besiyeri içerisinde gelişen hücreler, tüplere alınarak, santrifüj ile çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası ependorfun dibinde biriken hücrelere 480 µL, pH'ı 8 olan 50 mM EDTA ilave edilerek çözdürülmüştür. Daha sonra üzerine 120 µL ve 10 mg/mL lizozim enzimi eklenerek, karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra 37 °C'de 60 dakik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından karışım, 13,000 rpm'de 120 sn santrifüj edilmiş ve süpernatant çıkartılmıştır. Pelet üzerine 600 µL Nüklei Lizis Solüsyonu eklenerek, dikkatli bir şekilde pipetajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan karışım, 80 °C sıcaklıkta 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından soğumaya bırakılmış ve üzerine 3 µL

RNaseA eklenerek, birkaç kez alt-üst edilmiştir. Alt-üst işleminden sonra tüpler, 37 °C'de yarım saat inkübe edilmiştir. Örnekler etüvden çıkartılarak, oda sıcaklığına gelmesi sağlanıldı. Daha sonra üzerine 200 µL Protein Presipitasyon Solüsyonu eklenmiş ve 20 sn vorteksleme işlemi gerçekleştirilip elde edilen karışım 5 dk buza konulmuştur. Ardından 13,000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak, içerisinde 600 µL izopropanol bulunan yeni tüplere aktarılmıştır. Tüpler, DNA peleti görülünceye kadar yavaşça alt-üst edilmiştir. Pelet oluşumu görülen tüpler, 13,000 rpm'de 2 dk santrifüjlenip, süpernatantları ayrılmıştır. Süpernatantı uzaklaştırılan tüplere, 600 µL %70'lik EtOH eklenmiş ve 13,000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atılmış ve EtOH'ın uzaklaşması için 15 dk kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, tüplere 100 µL DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenmiş ve 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler, kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel, 2008). Ek olarak DNA örneğinin konsantrasyonunu ve saflığını ölçmek için NanoDrop 2000 ultra-mikrospektrofotometresi kullanılmıştır (Thermo Fisher Scientific; USA).

16S rRNA PCR İşlemi ve PCR Döngüsü

İzolata ait 16S rRNA gen bölgesi, laboratuvar ortamında, evrensel primerler 27F (5 -A GAGAGTTGATCCTGGCTCA-3) ve 1492R (5 -GGTTACCTTGTACGACTT-3) kullanılarak, PCR ile çoğaltılmıştır. Bu doğrultuda reaksiyon tüpü totalde 30 µL'dir ve reaksiyon ortamının hazırlanışı **Tablo 5'de** belirtilmiştir. PCR karışımı hazırlandıktan sonra reaksiyon tüplerine karışımdan eklenir ve PCR cihazına uygun şekilde konulur. **Tablo 5**'de belirtilen PCR döngü basamakları verilmiştir (Adıgüzel, 2008).

Tablo 5. PCR'ın hazılanışı ve PCR döngüsü

Reaksiyon Ortamı	
$MgCl_2$	1,8 µL
dH_2O	12,1 µL
dNTP	0,6 µL
10X PCR tamponu	3 µL
DMSO	1,2 µL
(5 µM) evrensel primer 27F (5'-AGAGAGTTGATCCTGGCTCA-3')	3 µL
(5 µM) evrensel primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')	3 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
İzole edilmiş DNA	5 µL

PCR Koşulları	
Ön denatürasyon	95°C'de 5 dk
Denatürasyon	94°C'de 1 dk (33 tekrar)
Bağlanma	50°C'de 1 dk (33 tekrar)
Uzama	72°C'de 1 dk (33 tekrar)
Son uzama	72°C'de 8 dk

16S rRNA PCR Elektroforez İşlemi

PCR işlemi ile çoğalan gen bölgesini doğrulamak için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bu amaçla 1 g agaroz tartılıp, 100 mL 1X TAE ile karıştırılmış ve tamamen eriyene kadar mikrodalgada bırakılmıştır. Ardından mikrodalgadan çıkarılan karışım, bir süre soğumaya bırakılmış ve soğuduktan sonra 3,5 µL etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. EtBr eklenen karışım, hafifçe karıştırılmış ve içinde tarağın takılı olduğu elektroforez küvetine yavaşça dökülmüştür. Jel dondurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve jel, 1X TAE içeren bir elektroforez kabına yerleştirilmiştir. Ardından ilk kuyucuğa 4 µL markır yüklenmiş ve diğer kuyucuklara 6X boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan numuneler yüklenmiştir. Elektroforez jel sisteminin pozitif (+) ve negatif (-) kutup noktaları dikkatli bir şekilde uygun bölmelere takıldıktan sonra numuneler, 90 V'da 50 dk süreyle yürümeye bırakılmıştır. Son olarak DNA bantları bir jel görüntüleme sistemi ile görselleştirilip, bilgisayarda analiz edilmiştir (Baltacı, 2016).

DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Ağaç Çizimi

İzolatının 16S rRNA dizisi NCBI web sitesindeki BLAST programı (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ve EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net) kullanılarak analiz edilmiş ve tanılanmıştır. İzolat ve en yakın akrabalarından elde edilen 16S rRNA gen dizilerinin dizi benzerlik analizine dayalı olarak MEGA11 yazılımında komşu birleştirme yöntemi kullanılarak, bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Adıgüzel vd., 2020; Akkaya vd., 2025).

LiP Aktivite Tayini

Kültür sıvısı 12,000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve LiP içeren süpernatant toplanmıştır. LiP aktivitesi, veratril alkol substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. 2,5 mL reaksiyon karışımı; pH'sı 3 olan 1 mL (125 mM) sodyum potasyum tartrat tamponu ($KNaC_4H_4O_6$), 500 µL (10 mM) veratril alkol, 500 µL (2 mM) hidrojen peroksit çözeltisi (H_2O_2) ve 500 µL kültür süpernatantı kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon, hidrojen peroksit eklenerek başlatılır ve absorbansı 310 nm dalga boyunda ölçülür. Bir birim enzim aktivitesi, 1 dakikada üretilen 1 µmol veratril alkolün oksidasyonunu katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Arora ve Gill, 2001).

LiP Üretiminin Karakterizasyonu

Maksimum LiP enzim üretimi için kültür koşulları, Falade vd., 2019 tarafından bildirilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi 24 saat aralıklar ile (24-144 saat), pH 0,5 birim aralıklar ile (5-8,5), çalkalama hızı 10 birim aralıklar ile (130-160 rpm), sıcaklık 5 birim aralıklar ile (50°C-65°C) ve ceviz kabuğu miktarı 10 g aralıklar ile (0-90 g/L) olmak üzere çeşitli kültür koşullarını optimize edilmiştir. Kültür koşullarının optimizasyonu tek seferde bir faktör (OFAT) deneyi ile gerçekleştirilmiştir. Her optimizasyon adımında, bakteri süspansiyonundan (OD 600 nm ≈ 1,0) alınarak fermantasyon ortamına inoküle edilmiştir.

AgNP'lerin Yeşil Hidrotermal Sentezi

AgNP'lerin sentezi için $AgNO_3$'ün 0,1 M stok çözeltisi 50 ml distile suda karıştırılarak hazırlanmıştır. Ceviz kabuğu ortamında büyütülen bakterilerden elde edilen ekstraselüler ortam daha sonra $AgNO_3$ çözeltisine eklenmiş ve 85°C'de 4 saat boyunca optimum koşullarda karıştırılmıştır. Daha sonra 0,5 M NaOH çözeltisi (25 mL) eklenerek reaksiyon karışımının pH'sı 8-11 aralığına ayarlanmıştır. Daha sonra karışım, teflon kaplı sızdırmaz paslanmaz çelik otoklava aktarılarak (121°C'de 6 saat) steril edilmiştir. Ardından AgNP'ler çöktürülüp, etanol ile yıkanıp süzüldükten sonra 60°C'de kurutulmuştur (Nour El-Dein vd., 2014; Nadaroglu vd.,

2023).

AgNP'lerin Karakterizasyonu

NP'lerin harakterizasyonu Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) gerçekleştirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): Zeiss Sigma 300 cihazı kullanılmıştır. AgNP'lerin partikül boyutu ve morfolojisi analiz edilmiştir.

X-ışını Kırınımı (XRD): Biyolojik olarak hazırlanmış AgNP'lerin X-ışını kristal yapısını araştırmak için bir Panalytical Empyrean cihazı kullanılmıştır. Yapıdaki elementlerin atomik yüzdeleri, Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi ile belirlenmiştir.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR): AgNP'lerin yapısal analizini araştırmak için Bruker Vertex 70 modeli kullanılmıştır. Bu teknikle, IR aktif molekül özelliklerini kullanarak numunelerin kalitatif ve kantitatif analizlerini hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen AgNP'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin İncelenmesi

Sentezlenen AgNP'ler (50 mg/mL), disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC43884), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) ve *Bacillus cereus'a* (ATCC 11778) karşı test edilmiştir (Nadaroğlu vd., 2020). Nutrient Agar (NA), patojenik bakterilerin üremesi için önceden hazırlanmıştır. Ortam ve diskler Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi'ne (NCCLS) göre hazırlanmıştır. Pozitif kontrol (kanamisin) ve negatif kontrol (su) varlığında, sentezlenen AgNP'ler disklere emdirilmiş ve petriler 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Cheon vd., 2019). Her bakteri için üç tekrar gerçekleştirilmiş ve AgNP'lerin antibakteriyel etkisi, her bir diskin etrafındaki bölgelerin ortalama çapı (mm) ölçülerek belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Ortalama ve standart sapma Excel 2016 programı ve GraphPad Prism 8 kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir kantitatif deney üç deney halinde gerçekleştirilmiştir. Ortalama ve ortalamanın standart hatası (SEM), hata çubukları SEM'i gösterecek şekilde sunulmuştur. İki suş arasındaki farkların istatistiksel önemini değerlendirmek için Microsoft Excel ve GraphPad Prism 8 kullanılarak bir ANOVA testi gerçekleştirilmiş ve P-değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bakteri İzolasyonu ve LiP Enzim İçeriğinin Belirlenmesi

Termal kaplıcadan toplamda dokuz bakteriyel suş izole edildi. Dokuz suş, LiP enzim aktivitesi için veratril alkol içeren katı besiyerine ekildi ve besiyerinde dört izolatın zon oluşturduğu görüldü. Zon oluşturan her bir izolata kod (SA1, SA2, SA3 ve SA4) verildi. Katı besiyerinde zon oluşturan izolatlardan en büyük zon çapının (66 mm) SA1 olduğu görüldü **(Şekil 4).**



Şekil 4: SA1'in katı ortam üzerindeki berrak bölgesi (66 ±0,81 mm)

Katı besiyerinde zon oluşturan dört izolat, sıvı besiyerinde de büyütüldü ve enzim aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda en iyi LiP enzim aktivitesinin 165,5 U/mL ile SA1 olduğu görülmüştür **(Tablo 6).**

Tablo 6. Seçilen bakterilerin zon çapları ve LiP aktivite değerleri

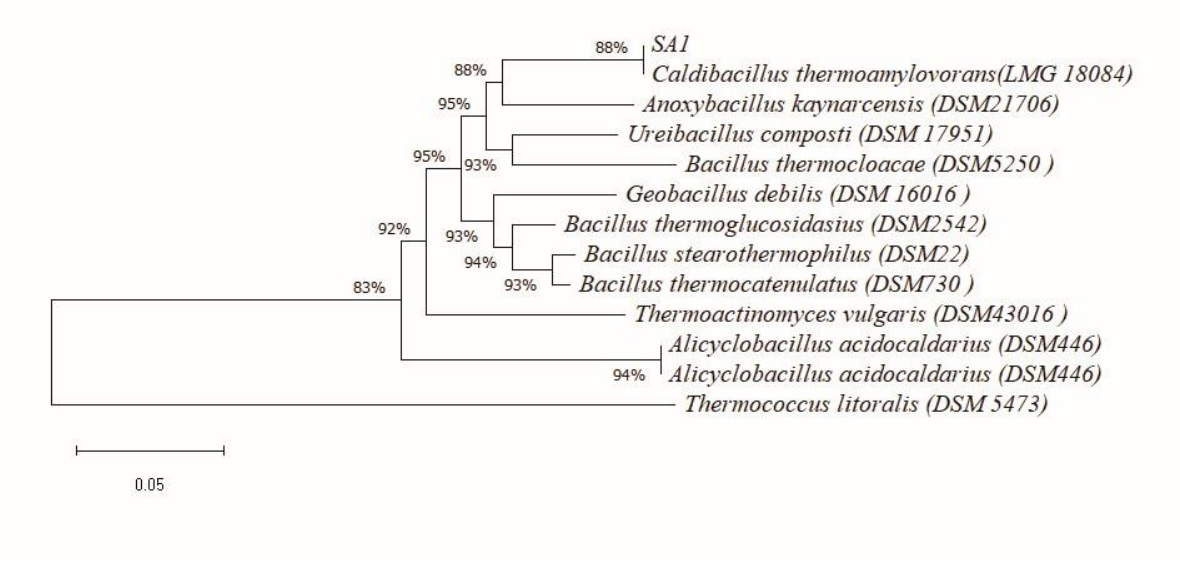
	SA1	**SA2**	**SA3**	**SA4**
Zon Çapı (mm)	66 ±0,81 mm	32 ± 1,24 mm	56 ± 0,72 mm	39 ± 1,63 mm
Enzim Aktivitesi (U/mL)	165,5 ± 0,52	136,2 ± 0,31	158,8 ± 0,70	141,7 ± 0,12

Spesifik Enzim Aktivitesi (U/mg)	9,15 ± 0,21	6,0 ± 0,48	8,475 ± 0,36	7,65 ± 0,12

Katı besiyerinde zon oluşturan dört izolatın hem sıvı besiyerinde de hemde katı besiyerinde oluşturduğu zon ve enzim aktivite değerleri **Tablo 6'da** gösterilmiştir.

SA1 Suşunun Tanılanması

Geleneksel analize göre, SA1 suşu Gram pozitif, oksidaz pozitif ve katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Test suşunun hücreleri *Bacillus* morfolojisine sahip olduğu tespit edildi. Buna ek olarak, moleküler tanımlama SA1 suşunun *C. thermoamylovorans* (GenBank numarası PP434809) (*C. thermoamylovorans* SA1, %99,7 kimlik) olduğunu göstermiştir ve filogenetik ağacı **(Şekil 5)**'de gösterilmiştir.



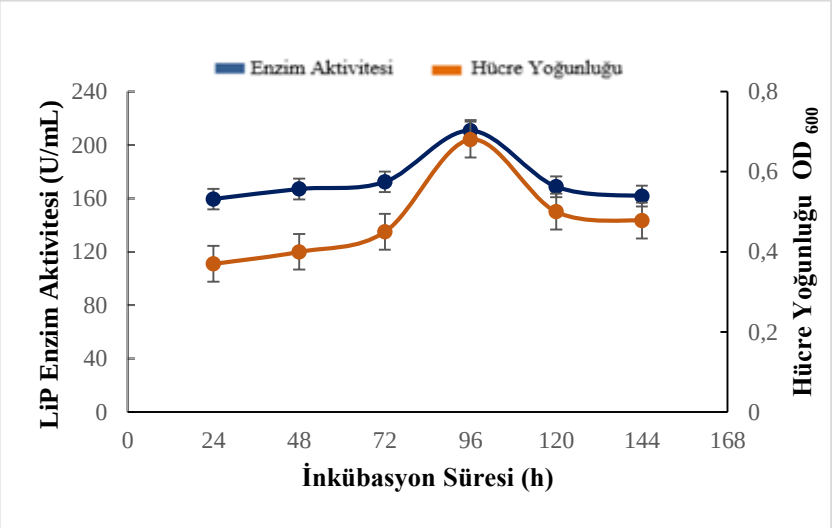
Şekil 5. *C. thermoamylovorans* SA1 ve *Bacillus* cinsinin birkaç yakın akrabası arasındaki ilişkileri gösteren 16S rRNA gen dizilerine dayalı olarak oluşturulan komşu birleştirme filogenetik ağacının görselidir. Ölçek çubuğu 0,05'lik bir sapmayı temsil etmektedir.

LiP Üretiminin Karakterizasyonu

LiP'de dahil olmak üzere mikrobiyal enzimlerin üretimi, kültür parametrelerinden önemli ölçüde etkilenmektedir (Baltacı vd., 2019). *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için inkübasyon süresi, çalkalama hızı, pH, sıcaklık ve kabuk miktarı gibi kültür koşulları Bir Seferde Bir Faktör (OFAT) kullanılarak optimize edilmiştir.

İnkübasyon Süresinin LiP Enzim Üretimindeki Etkisi

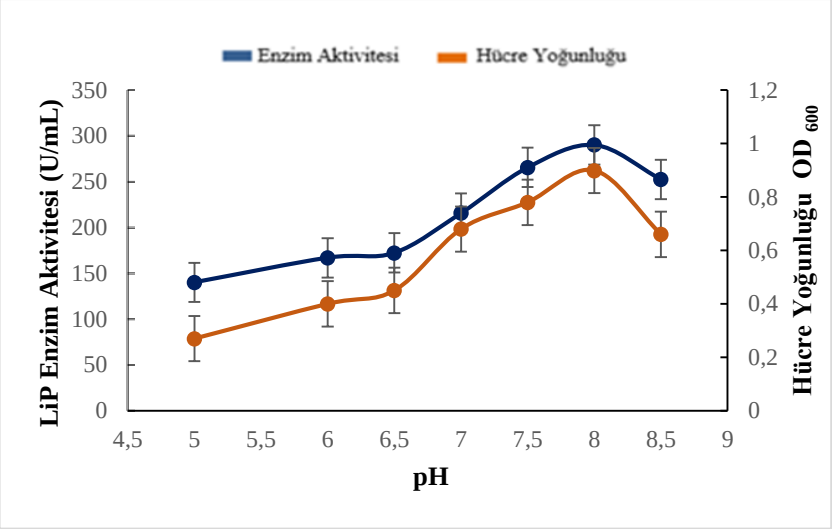
İnkübasyon süresinin LiP üretimi ve *C. thermoamylovorans* SA1'in büyümesi üzerinde farklı etkileri vardır. Bu nedenle, optimum LiP üretimi ve bakteri biyokütlesini sağlayan en uygun inkübasyon süresini bulmak önemlidir. İzolat 96 saatte en yüksek LiP enzim aktivitesi (210,78 U/mL) ile hücre yoğunluğu (OD_{600} ≈ 0,680) göstermiştir **(Şekil 6)**. Falade ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. tarafından optimum LiP üretimi 48 saatte rapor edilmiştir. Ayrıca, Arokiyaraj ve arkadaşları (2024) *Trichoderma homatum* tarafından optimum LiP üretiminin 144 saatte elde edildiğini bildirmiştir.



Şekil 6. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için inkübasyon süresinin etkisi

pH'ın LiP Enzim Üretimindeki Etkisi

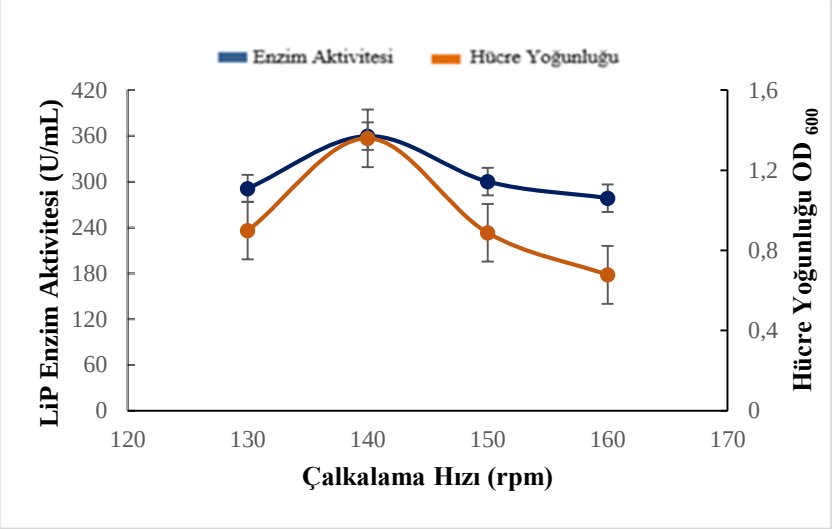
Farklı pH değerleri, *C. thermoamylovorans* SA1'in LiP üretimi ve büyümesi üzerinde farklı bir etki göstermiştir. İzolat pH 8'de yüksek hücre yoğunluğu (OD_{600} ≈ 0,899) ve LiP enzim aktivitesi (290,25 U/mL) göstermiştir **(Şekil 7)**. **Şekil 7**'de bakterinin hem asidik hem de bazik ortamlarda aktivite sergilediğini göstermektedir. Falade ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada *Bacillus* sp. kullanarak optimum LiP üretiminin pH 8'de olduğu kaydedildi ve bu bulgu, yaptığımız çalışma ile uyumludur. Bununla birlikte, Majeke ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada, pH 3'ün maksimum LiP enzim aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Bu da pH'ın LiP üretiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 7. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için pH'nın etkisi

Çalkalama Hızının LiP Enzim Üretimindeki Etkisi

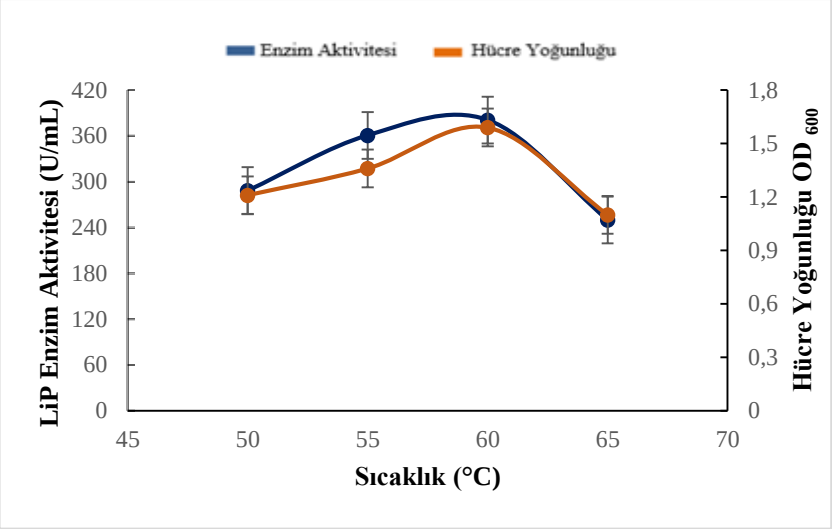
Diğer faktörlere ek olarak çalkalama, fermantasyon süreçlerinde kritik bir faktördür. Havalandırmayı kolaylaştırarak fermentasyon süreci boyunca besinlerin eşit dağılımını teşvik edip mikrobiyal büyümeyi ve hücre dışı enzimlerin sekresyonunu sağlar (Sharma vd., 2007). Bu nedenle, *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP enzim üretimini artırmada en uygun olan optimum çalkalama hızını bulmak önemlidir. Optimum LiP enzim üretimi (359,78 U/mL) ve hücre yoğunluğu ($OD_{600} \approx 1,36$) için optimum çalkalama hızı **Şekil 8**'de gösterilmiştir. En iyi üretimin 140 rpm olduğu bulunmuştur. Falade ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. tarafından optimum LiP aktivitesinin 150 rpm'de olduğu rapor edilmiştir ve bu da sonuçlarımızla büyük ölçüde örtüşmektedir. Buna karşılık, Huy vd., (2017) *Fusarium* sp. tarafından optimum enzim üretiminin 180 rpm'de olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında elde ettiğimiz sonucun, yüksek enzim aktivitesinin düşük hızda dahi gerçekleşebildiğini göstermiştir.



Şekil 8. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için çalkalama hızının etkisi

Sıcaklığın LiP Enzim Üretimindeki Etkisi

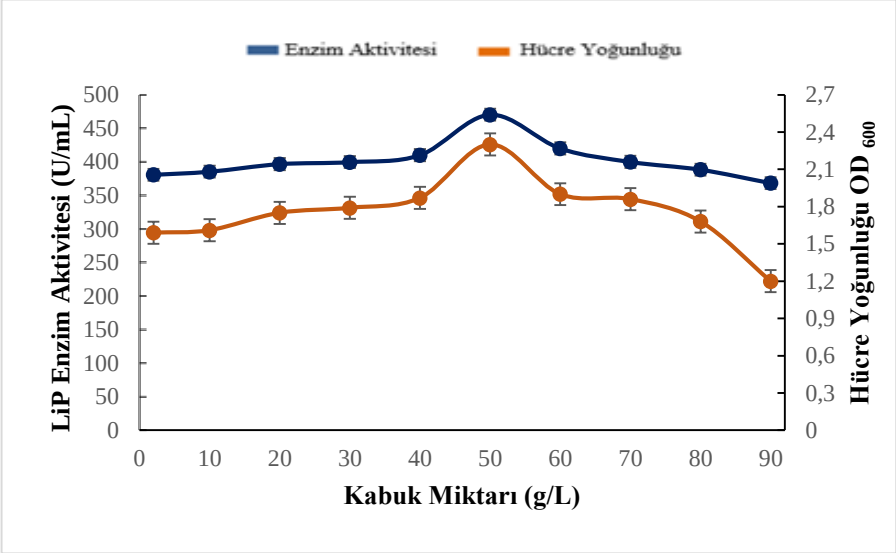
Sıcaklık, fermentasyon süreçlerinde kritik bir rol oynamakta ve büyüme hızını, makromoleküler bileşimi, metabolizmayı ve enzim üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Hem bakteri büyümesini hem de enzim aktivitesini etkileyebileceğinden, bakteri büyümesini ve enzim üretimini destekleyen optimum sıcaklığı bulmak önemlidir. **Şekil 9**'da optimum LiP üretiminin (380,79 U/mL) ve hücre yoğunluğunun (OD_{600} ≈ 1,59) 60°C'de olduğu tespit edilmiştir. Alam ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. chrysosporium* tarafından üretilen en yüksek LiP enzim aktivitesinin 55°C'de olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca, Nour El-Dein vd., (2014) *Streptomyces* sp. tarafından üretilen optimum LiP enzim aktivitesinin 40°C'de olduğunu rapor etmiştir. Sonuçlar, optimum LiP üretimi için sıcaklığın suşa bağlı olarak değişebildiğini düşündürmektedir.



Şekil 9. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için sıcaklığın etkisi

Kabuk Miktarının LiP Enzim Üretimindeki Etkisi

Tarımsal ve endüstriyel uygulamalar sonucunda çevrede oluşan lignin içerikli atıkların mikroorganizmalar tarafından depolimerizasyonu üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Reddy vd., 2003; Huy vd., 2017; Falade vd., 2020). Hem endüstriyel yan ürünler hem de organik ve tarımsal atıklar çevre dostu ve uygun maliyetli alternatifler olarak değerlendirilebilir. Atıklarda bulunan besinler enzim üretimini ve mikrobiyal gelişmeyi desteklemektedir. Bu atık maddeler, çevresel yan etkilerini ortadan kaldırmak ve çevre dostu biyoişlem yöntemleri geliştirmek için biyoteknolojik olarak geri dönüştürülmüştür. Ayrıca, çok sayıda çalışma ceviz kabuklarını potansiyel bir lignin kaynağı olarak değerlendirmiştir (Morales vd., 2022b; Ahorsu vd., 2019; Li vd., 2024). Özellikle kimyasal analiz verileri, ceviz kabuklarının lignoselülozik biyokütle olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Morales et al. 2022b, Jahanban-Esfahlan et al. 2019). Bu nedenle, bu çalışmada LiP üretimini artırmak için ceviz kabukları kullanılmıştır. **Şekil 10**'de en yüksek LiP üretiminin (435,0 U/mL) ve hücre yoğunluğunun (OD_{600} ≈ 2,09) 50 g/L ceviz kabuğunda olduğu tespit edilmiştir. Falade ve arkadaşları (2019, 2020) tarafından yürütülen çalışmalarda, miktar tayini için farklı azot kaynakları ve lignin monomerleri kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada, atık ceviz kabuklarının substrat olarak kullanılması, ek lignin monomerleri veya azot kaynakları olmadan LiPenzim üretiminin gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. Çalışmamız, ilk kez *C. thermoamylovorans* SA1 bakterisi kullanılarak çevresel atık olan ceviz kabuklarından LiP enziminin üretilmesini temsil etmektedir.



Şekil 10. OFAT teorisi kullanılarak *C. thermoamylovorans* SA1 tarafından LiP üretimi için ceviz kabuğu miktarının etkisi

LiP Enzim Homojenatı Kullanılarak AgNP'lerin Yeşil Sentezi ve Karakterizasyonu

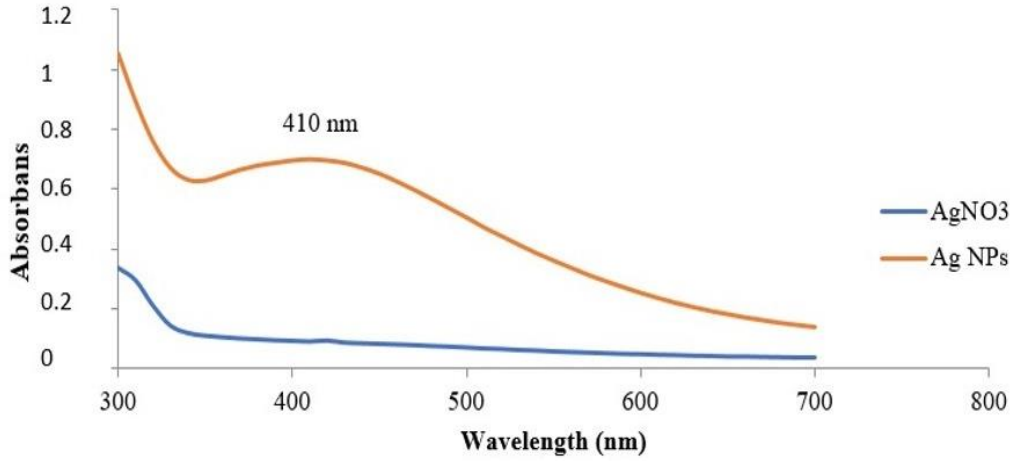
C. thermoamylovorans SA1 bakterisinden yüksek LiP aktivitesi gösteren bir enzim homojenatı üretilmiştir. Bu LiP içeren homojenat daha sonra AgNP'leri sürekli olarak sentezlemek için kullanılmıştır. Gümüş nitrat önce 60°C'de 4 saat boyunca indirgendi. Ardından AgNP'lerin hidrotermal sentezi (200°C'de 8 saat boyunca) gerçekleştirildi. Karıştırma sırasında NP'lerin açık renkten koyu renge dönüşmesi, NP'lerin üretilebildiğini göstermektedir. Çalışmamız, Nadaroğlu tarafından kullanılan 25°C ve Wang tarafından kullanılan 28°C yerine 55°C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildi (Wang vd., 2015; Nadaroğlu vd., 2020). Bu çalışma ile AgNP'lerin yüksek sıcaklıkta üretiminin mümkün olduğunu göstermektedir.

AgNP'lerin Karakterizasyonu

UV Görünür Spektroskopi

Hidrotermal sentezden sonra AgNP'ler termal kabın dibine çöktürülmüştür. AgNP'lerin UV spekturumu alınarak kontrol sağlanmıştır. UV-görünür spektroskopisi, *C. thermoamylovorans*'dan ekstraselüler olarak sentezlenen LiP enziminin AgNP'lerin sentezi sırasında elde edilen kolloidal reaksiyon ortamını incelemek için kullanılmıştır. LiP enzimi

AgNP'lerin sentezine yardımcı olmuştur. Sentezlenen AgNP'lerin optik özelliklerini gösteren UV absorbans grafikleri **Şekil 11**'de gösterilmiştir. Verilen spektrumda, sentezlenen NP'ler için maksimum absorbansını 410 nm'de vermiştir. 300-500 nm aralığında bir pikin varlığı gümüş NP'lerin sentezlendiğini göstermektedir. Oksidoredüktaz grubundaki LiP enzimi AgNP'leri sentezlemiş ve bu durum 300 ila 700 nm arasındaki dalga boylarında UV-görünür spektroskopi kullanılarak doğrulanmıştır. UV-görünür spektroskopi, sulu çözeltilerdeki şekil ve boyut kontrollü NP'lerin analizi için iyi bilinen bir tekniktir. Son olarak, bu spektroskopi NP'ler tarafından emilen ışığın dalga boylarının ölçülmesini sağlar.

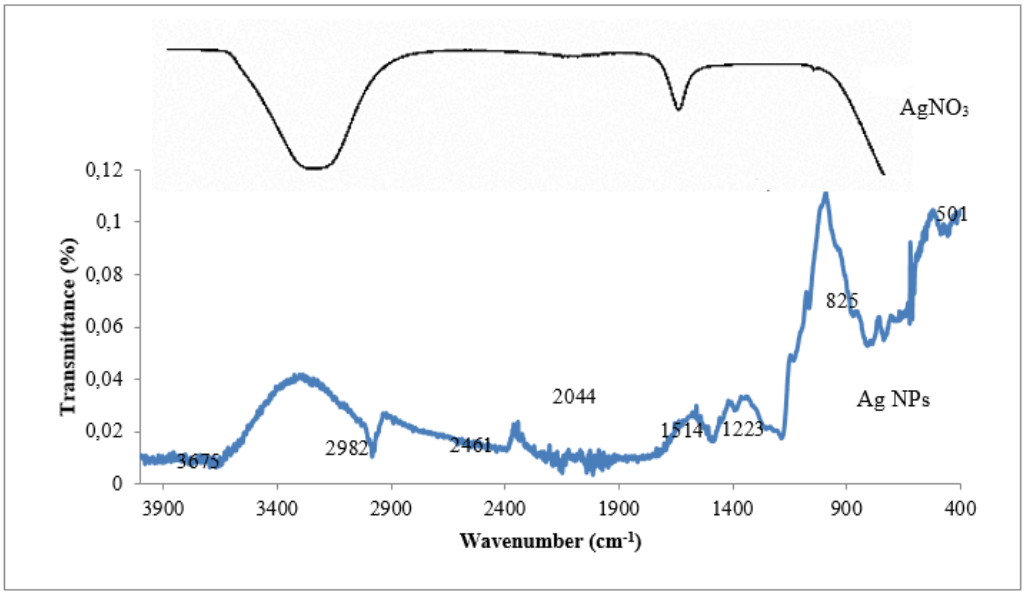


Şekil 11. AgNP'lerin UV-görünür spektrumu

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Sentezlenen AgNP'lerin kimyasal bileşimi ve fonksiyonel grup oluşumu FTIR ile belirlenmiş ve **Şekil 12**'da gösterilmiştir. Sulu AgNP'lerin FTIR'ı, yeşil sentez yoluyla metal NP'lerin sentezinden ve stabilitesinden sorumlu olabilecek molekülleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bantların oluşumu gümüş iyonlarının fonksiyonel gruplar tarafından indirgenmesiyle meydana gelmiştir ve oluşan farklı bantlar çeşitli gerilme modlarına işaret etmektedir. $AgNO_3$'ün FTIR spektroskopisi ve AgNP'lerin FTIR spektrumları incelendiğinde, -NO_3 ve -N=O gruplarına ait bağ titreşimlerinin 3328,09/cm, 2129,12/cm ve 1634,94/cm'de yer aldığı tespit edilmiştir. AgNP'ler sentezlendiğinde bu pikler görülmemiştir. FTIR spektrumunda 2983-3733/cm'deki pik, -O-H grubuna ait bir titreşimdir. 2044/cm ve 2461/cm'deki pikler -C-C- yapısındaki alkil gruplarına atfedilir. Özellikle 1514/cm ve 1223/cm'deki pikler, C=O ve amin (NH) gruplarına atfedilebilir. 680/cm'deki pik, CH gruplarına atfedilirken; 501/cm'deki pik, AgNP'leri gösterir. Yapıda bulunan C=O ve -OH grupları AgNP'lerin indirgenmesinde etkili olduğu gibi indirgeme sonrası AgNP'lerin

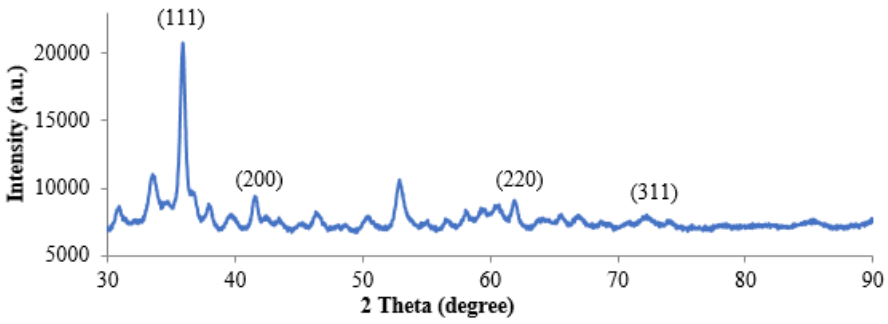
kararlılığının sağlanmasında da etkilidir. Elde edilen bulgular Khan vd., (2022) tarafından elde edilen bulgularla uyumludur.



Şekil 12. LiP kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezinin FTIR spektrumu

X-Işını Kırınım Analizi (XRD)

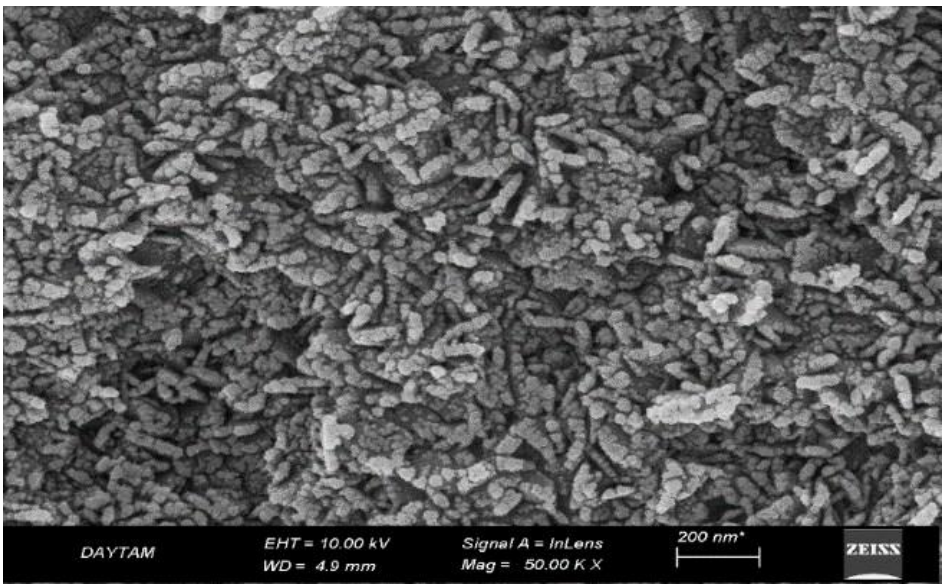
X-ışını toz kırınımı analizi, nano ölçekli malzemelerin amorf veya kristal olup olmadığını belirlemek için kullanılan en iyi ve en hızlı tekniktir. XRD analizi bir malzemenin kristal yapısını ortaya koymada çok etkili bir yöntemdi. Üretilen AgNP'lerin XRD deseni, AgNP'lere atfedilen (111), (200), (220) ve (311) kristal yapıları ile ilişkilidir ve dört ana pik, 35,85°, 41,20°, 61,82° ve 71,62°'de konumlanmış olup, yüz merkezli kübik (fcc) yüzeylere karşılık gelmektedir **(Şekil 13)**. Grafikteki 35,85°'deki pik, AgNP'lerin kübik yapısını göstermektedir. Ayrıca, mevcut sonuçlar Elshazly ve diğerleri (2022), Kanwal vd., (2019) ve Hassan Afandy vd., (2023) tarafından yapılan önceki çalışmalarla uyumludur.



Şekil 13. LiP enzimi kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezinin XRD deseni

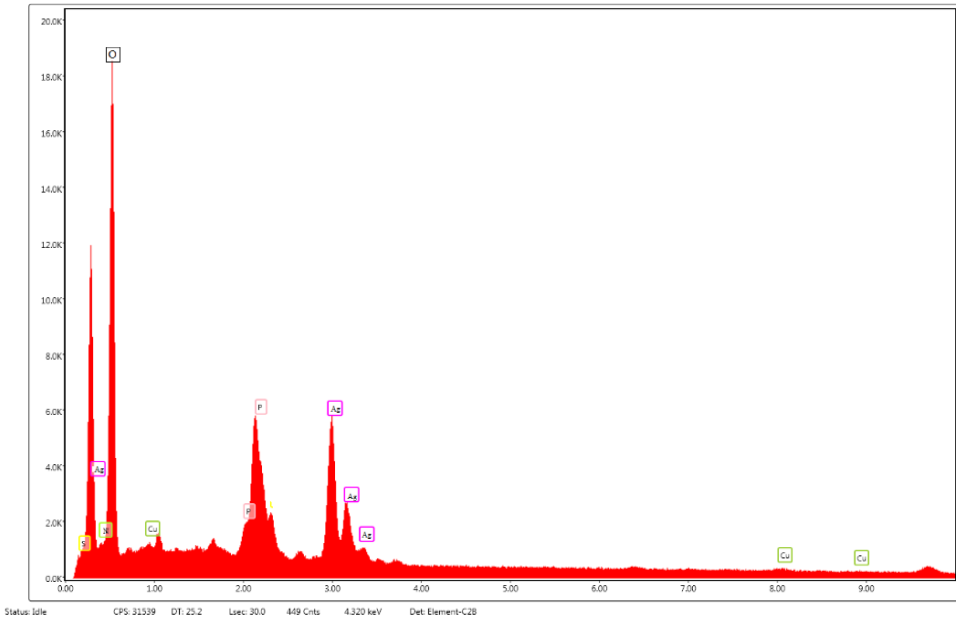
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

LiP enzimi kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP'lerin küresel ve kübik yapıları (**Şekil 14**) 200 nm'ye kadar büyütülmüş SEM görüntüleriyle gösterilmektedir. AgNP'ler 13,33-40 nm aralığında farklı boyutlara sahip olsalar da kübik ve küresel yapıya sahip oldukları **Şekil 14**'de açıkça görülebilmektedir. LiP enziminin indirgenmesiyle sentezlenen AgNP'lerde gözlenen morfolojik farklılıklar, sıcaklık, pH ve Ag^+ iyonlarının oluşum kapasitesi gibi reaksiyon koşullarından etkilenen çekirdeklenme ve büyüme kinetiğindeki değişikliklere bağlanabilir. AgNP'lerin yapısında hem kübik hem de küresel yapıların bulunması, sentez işlemi sırasında birden fazla kristalleşme yolunun aktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 14. AgNP'lerin SEM görüntüsü

Şekil 15'de ise, AgNP'lerin elemental bileşimi enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi ile araştırılmıştır. Sentezlenen AgNP'lerde hangi elementlerin bulunduğunu belirlemek için EDX analizi yapıldı. Nokta profil modunda toplanan EDX spektrumunu göstermek için NP'lerle dolu bir alana odaklanıldı. Biri gümüşe diğeri oksijene karşılık gelen iki pikin varlığı, EDX spektrumunda sadece oksijen ve gümüşün varlığını göstermiştir. AgNP'lerin EDX spektrumu ana bileşen elementlerin %38,08'ini ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçla, AgNP'lerin muazzam saflığı kesin olarak gösterilmiştir ve diğer kirleticilere dair hiçbir kanıt yoktur. Spektrumda gösterilen Ag artışındaki bu tutarlılık, literatürde bildirilen bulgularla tutarlıdır (Alavi ve Karimi 2017; Magazenkova vd., 2023).



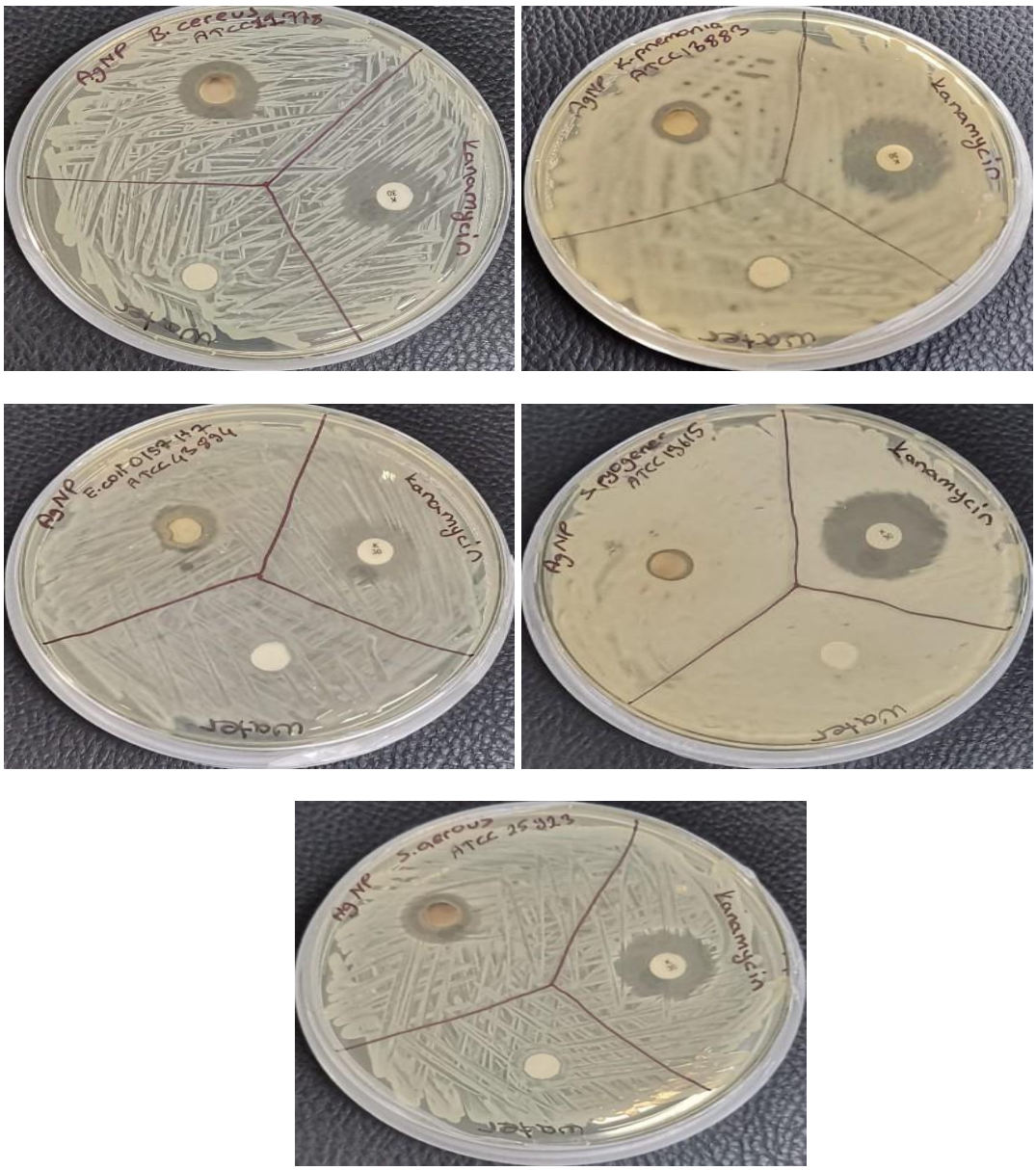
Şekil 15. AgNP'lerin elementel bileşiminin enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi

Sentezlenen AgNP'lerin Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

AgNP'ler hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri etkilemektedir (Hayrunnisa vd., 2020; More vd., 2023). Çalışmamızda, agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes* ve *B. cereus* gibi patojen bakterilere karşı antibakteriyel etkileri araştırılmış ve sonuçlar **Şekil 16** ve **Tablo 7**'de gösterilmiştir. LiP (10 ml) ile sentezlenen AgNP'ler *B. cereus'a* karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir (15,0 mm). Çiçek tarafından yapılan bir çalışmada, yeşil sentez yöntemiyle üretilen AgNP'ler disk difüzyon yöntemiyle bazı patojen bakterilere uygulanmış ve en büyük zon çapı *K. pneumoniae* (19,0 mm) için rapor edilmiştir. Ayrıca *S. aureus*'da 11,0 mm ve *S. pyogenes*'de 17,0 mm çapında bulunmuştur (Cicek vd., 2015). Bir başka çalışmada, AgNP'ler iki farklı bakteriden (*Ochrobactrum anthropi* ve *Bacillus* sp.) sentezlenmiş ve standart kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyel aktivite açısından test edilmiştir. İnhibisyon zonu *S. aureus* için 15,0 mm olarak bildirilmiştir (Thomas vd., 2014). Gümüş metali pozitif yüklü olduğu için hücre zarındaki proteinlerle ve DNA bazlarının ana bileşenleriyle (fosfor ve sülfür gibi) reaksiyona girerek bakterilerin hücre duvarı morfolojisine zarar verir (More vd., 2023).

Buna ek olarak, üretilen AgNP'lerin küçük boyutlu ve geniş yüzey alanı nedeniyle, bakterilerin hücre duvarı bariyerini kolayca aşmalarını ve bu şekilde yüzey alanının yüksek etkileşimi ile antibakteriyel etkiyi artıracağını göstermektedir. Son olarak yaptığımız çalışma sonuçlarımızın literatür türleriyle uyumlu olduğunu göstermektedir (Thomas vd., 2014; Çiçek

vd., 2015; Hayrunnisa vd., 2020; More vd., 2023).



Şekil 16. AgNP'lerin disk difüzyon yöntemi ile patojen bakterilere (*B. cereus, K. pneumonia, E. coli, S. pyogenes ve S. aureus*) karşı antibakteriyel aktivite sonuçları

Tablo 7. AgNP'lerin aktiviteleri ve zon çapları pozitif ve negatif kontroller kullanılarak analiz edilmiştir

Patojen Mikroorganizmalar	**Negatif Kontrol (su)**	**Positif Kontrol (kanamisin)**	**AgNP Zon Çapı (mm)**
Bacillus cereus ATCC 11778	6,0 mm	16,0 mm	15,0 ± 0,47 mm
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	6,0 mm	21,0 mm	10,0 ± 0,32 mm
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	6,0 mm	15,0 mm	13,0 ± 0,45 mm
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	6,0 mm	20,0 mm	8,0 ± 0,38 mm
Staphylococcus aureus ATCC 25923	6,0 mm	16,0 mm	13,0 ± 0,35 mm

AgNP'ler önceki çalışmalarda önemli antibakteriyel aktivite göstermiştir. Lava ve arkadaşları (2021) daha yüksek AgNP konsantrasyonları ile artan antibakteriyel aktivite bulmuşlardır. Bu çalışmada AgNP'ler *E. coli, S. aureus, K. pneumoniae, S. pyogenes* ve *B. cereus* dahil olmak üzere daha geniş bir bakteri suşu yelpazesine karşı incelenmiştir. Bulgular, *B. cereus*'a karşı yüksek etkinlikle birlikte, test edilen tüm suşlarda güçlü antibakteriyel etkiler olduğunu göstermiştir. Bu geniş antibakteriyel spektrum, AgNP'lerin çeşitli patojen bakterilere karşı uygulama potansiyelini ortaya koymakta ve AgNP bazlı antibakteriyel tedavilerin kapsamını genişletmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, lignin peroksidaz (LiP) enzimi kullanılarak, AgNP'lerin yeşil sentezi için yeni bir çevre dostu yöntem sunmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) çevre dostu yeşil bir sentez yöntemiyle hazırlanması, ekolojik açıdan iyileştirici bir alternatif temsil etmektedir. Bu araştırma, AgNP'lere yönelik artan talebi karşılamak için lignin açısından zengin olan atık ceviz kabuklarının kullanımı ile gerçekleşmiştir. Erzurum Termal Ilıca Kaplıcası'ndan toplamda 9 bakteri izole edildi ve en iyi LiP enzim aktivitesi gösteren suşun *Caldibacillus thermoamylovorans* SA1 olduğu belirlenmiştir. *Caldibacillus thermoamylovorans*'dan elde edilen LiP enzimini kullanarak sürdürülebilir ve çevre dostu AgNP'ler sentezlemeden önce kültür ortamının optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda optimum LiP enzimi üretim koşullarının 50 g/L kabuk miktarı, 96 saat, pH 8, 140 rpm ve 60°C olduğu, OFAT faktörü kullanılarak belirlenmiştir. Her optimizasyon basamağında enzim aktivitesindeki artışa paralel olarak bakteriyel büyüme de artmıştır. Optimizasyon sonucunda en yüksek enzim aktivite değerinin 435,0 U/mL'de ve hücre yoğunluğunun ise $OD_{600} \approx 2{,}09$'de olduğu belirlenmiştir. Ceviz kabuğu ortamında büyütülen bakterilerden, hücre dışı ortam alınarak, üzerine $AgNO_3$ çözeltisi eklenmiş ve karışma esnasında rengin açık sarıdan koyu kahveye döndüğü gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, atık biyokütlelerin değerlendirilerek hem çevre dostu hem de ekonomik açıdan sürdürülebilir nanomalzeme üretim süreçlerinin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. Ceviz kabuğu gibi lignoselülozik atıkların hem karbon kaynağı hem de indirgeyici ajan olarak kullanılabilmesi, bu materyalin AgNP sentezinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, *Caldibacillus thermoamylovorans* SA1 suşunun termofilik özellikleri, yüksek sıcaklıklarda stabil LiP enzimi üretimini mümkün kılarak endüstriyel uygulamalar için uygun bir mikrobiyal kaynak olduğunu ortaya koymuştur. AgNP'lerin sentezinde kullanılan geleneksel kimyasal ve fiziksel yöntemlerin çevresel zararları göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmada önerilen biyolojik yöntem, toksik çözücülere gerek duyulmaması, düşük enerji gereksinimi ve yeniden kullanılabilir atıkların değerlendirilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Bunun yanında, renk değişiminin hızlı gözlenmesi, yöntemin pratik uygulanabilirliğini artırmakta ve gerçek zamanlı gözlem imkânı sunmaktadır.

Sentezlenen AgNP'ler ardından FTIR, XRD ve SEM'de dahil olmak üzere bir dizi analitik teknik kullanılarak karakterize edilmiştir. Son olarak sentezlenen AgNP'lerin biyolojik aktivitesini belirlemek için *E. coli, K. pneumoniae, S. aureus, S. pyogenes* ve *B. cereus* gibi patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda

AgNP'lerin, tüm patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergilediğini, en büyük inhibisyon bölgesinin *B. cereus* (15 mm) ve en küçük inhibisyon bölgesinin ise *S. pyogenes* (8 mm) olduğu rapor edilmiştir.

Gelecek çalışmalarda sentezlenen AgNP'lerin morfolojik ve yapısal karakterizasyonları (UV-VIS, SEM, TEM, XRD, FTIR vb.) yapılarak partikül boyut dağılımı, stabilitesi ve antimikrobiyal aktiviteleri gibi fonksiyonel özelliklerinin detaylı bir şekilde incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca farklı lignoselülozik atıklar ve mikrobiyal enzim sistemlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, yeşil sentez yöntemlerinin daha geniş ölçekli üretime uygun hale getirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışma AgNP'lerin sürdürülebilir ve yenilikçi sentezi için yeni bir yaklaşım sunmaktadır ve bu NP'lerin çok yönlü biyolojik aktiviteleri tarım, çevre, tıp ve eczacılık alanlarında çeşitli uygulamalar için yeni yöntemlerin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır. Ceviz kabuğu atıklarının enzim üretimi için bir substrat olarak kullanılması, tarımsal ve endüstriyel yan ürünlerin değerini artıracak ve yenilenebilir ve sürdürülebilir bir tarımın oluşturulmasını destekleyecektir.

KAYNAKÇA

Adiguzel, A., Ay, H., Baltaci, M. O., Akbulut, S., Albayrak, S., & Omeroglu, M. A. (2020). Genome-based classification of Calidifontibacillus erzurumensis gen. nov., sp. nov., isolated from a hot spring in Turkey, with reclassification of Bacillus azotoformans as Calidifontibacillus azotoformans comb. nov. and Bacillus oryziterrae as Calidifontibacillus oryziterrae comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(12), 6418–6427. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004549

Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. Open life sciences, 15(1), 819-839.

Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, et al. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles– an ecofriendly approach. Int J Nanomed. 2019;14:5087–107. doi: 10.2147/IJN.S200254

Adıgüzel, G., Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. 2008.

Ahorsu R , Cintorrino G, Medina F et al. Micro w ave processes: a vi- able technology for obtaining xylose from walnut shell to produce lactic acid by Bacillus coagulans . J Cleaner Prod 2019; 231 :1171–81. https:// doi.org/ 10.1016/ j.jclepro .2019.05.289 .

Akkaya SN , Almansour A, Altintas R et al. Purification, c har acteriza- tion, optimization, and doc king sim ulation of alkaline pr otease produced by Brevibacillus agri SAR25 using fish wastes as a sub- strate . F ood Chem 2025; 471 :142816. https:// doi.org/ 10.1016/ j.food chem.2025.142816

Alabdallah NM , Hasan MM. Plant-based green synthesis of silver nanoparticles and its effectiv e r ole in abiotic str ess toler ance in crop plants. Saud J Biol Sci 2021; 28 :5631–9. https:// doi.org/ 10.101 6/j.sjbs.2021.05.081 .

Alam MZ , Mansor MF, Jalal KCA. Optimization of lignin peroxi- dase production and stability by Phaneroc haete c hrysosporium us- ing se wa ge-tr eatment-plant sludge as substr ate in a stirr ed-tank bioreactor. J Ind Microbiol Biotechnol 2009; 36 :757–64. https://doi.or g/ 10.1007/ s10295- 009- 0548- 5 .

Alavi M , Karimi N. Characterization, antibacterial, total antioxidant, scav enging, r educing po w er and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles us- ing Artemisia haussknechtii leaf extract. Artif Cells Nanomed Biotech- nol 2017; 46 : 1–16. https:// doi.org/ 10.1080/ 21691401.2017.140812 1 .

Ali, S., Rani, A., Dar, M. A., Qaisrani, M. M., Noman, M., Yoganathan, K., ... & Zhu, D. (2024). Recent advances in characterization and valorization of lignin and its value-added products: challenges and future perspectives. Biomass, 4(3), 947-977.

Arokiyar aj S , Elshikh MS, Alarjani KM et al. Valorization of rubber tree sawdust biomass for the production of laccase-lignin peroxidase and bioconversion of sawdust. Biomass Conv Bioref 2024. https:// doi.org/ 10.1007/ s13399- 024- 05322- w .

Arora DS, Gill PK. Comparison of two assay pr ocedur es for lignin per- oxidase. Enzyme Microb Technol 2001; 28 :602–5. https:// doi.org/ 10.1 016/S0141- 0229(01)00302- 7 .

Asina, F.; Brzonova, I.; Voeller, K.; Kozliak, E.; Kubátová, A.; Yao, B.; Ji, Y. Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. Bioresour. Technol. 2016, 220, 414–424. Brebu, M.; Vasile, C. Thermal degradation of lignin—A review. Cellul. Chem. Technol. 2010, 44, 353–363.

Baltaci Mö, Tuysuz E, Ozkan H et al. Lipase pr oduction fr om ther- mophilic bacteria using waste frying oil as substrate. Teknik Bil- imler Dergisi 2019; 9 : 23–7. https:// doi.org/ 10.35354/tbed.510140 .

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Singh, R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio- product formation. Current Opinion in Biotechnology, 22, 394–400.

Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 2003, 54, 519–546.

Can M , Keskin M. Green synthesis, characterization, and biochemi- cal properties of w aste w alnut (Juglans regia L.) inner shell-based silver nanoparticles. J Serb Chem Soc 2025; 90 :123–35. https://doi.org/10.2298/ JSC231110023C.

Calvo-Flores, F.G.; Dobado, J.A. Lignin as renewable raw material. ChemSusChem 2010, 3, 1227–1235.

Christopher, L.P.; Yao, B.; Ji, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. Front. Energy Res. 2014, 2, 12.

Chaur asia PK , Bhar ati SL, Yadav a S. Nano-r eduction of gold and sil- ver ions: a perspective on the fate of microbial laccases as po- tential biocatalysts in the synthesis of metals (gold and silver) nano-particles. Curr Res Microb Sci 2022; 3 :100098. https://doi.org/ 10.1016/j.cr micr .2021.100098.

Cheon JY , Kim SJ, Rhee YH et al. Shape-dependent antimicrobial ac- tivities of silver nanoparticles. IJN 2019; 14 :2773–80. https://doi.org/102147/ IJNS196472

Choi SM , Park MH, Jung TS et al. Characterization of Bacillus mojavensis KJS-3 for industrial a pplications. Arc h Pharm Res 2011; 34 :289–98. https:// doi.org/ 10.1007/ s12272- 011- 0215- z .

Cicek S , Gungor AA, Adiguzel A et al. Biochemical evaluation and green synthesis of nano silver using peroxidase from Euphorbia (Euphorbia amygdaloides) and its antibacterial activity. J Chem 2015; 2015 :1–7. https:// doi.org/ 10.1155/ 2015/486948 .

Dass, S. B., & Reddy, C. A. (1990). Characterization of extracellular peroxidases produced by acetate- buffered cultures of the lignin- degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. FEMS Microbiology Letters, 69, 221–224.

Devi GP , Ahmed KBA, Varsha M et al. Sulfidation of silver nanoparticle reduces its toxicity in zebrafish. Aquat Toxicol 2015; 158 :149–56. ht tps:// doi.org/ 10.1016/ j.aquatox.2014.11.007 .

Dick, G. J., Podell, S., Johnson, H. A., et al. (2008). Genomic insights into Mn (II) oxidation by the marine alphaproteobacterium Aurantimonas sp. strain SI85- 9A1. Applied and Environment Microbiology, 74, 2646–2658.

Dhuper S, Panda D, Nayak PL. Green synthesis and characterization of zero valent iron nanoparticles from the leaf extract of Mangifera indica. Nano Trends J Nanotechnol App. 2012;13(2):16–22.

Dunford, H. B. (1999). Heme peroxidases. Chichester.: John Wiley. p. 507. Martins, D., Kathiresan, M., & English, A. M. (2013). Cytochrome c peroxidase is a mitochondrial heme-based H 2 O 2 sensor that modulates antioxidant defense. Free Radical Biology and Medicine, 65, 541–551.

Elshazly EH , Mohamed A, Aboelmagd HA et al. Phytotoxicity and an- timicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles us- ing Nigella sativa seeds on wheat seedlings. J Chem 2022; 2022 :1–9. https:// doi.org/ 10.1155/ 2022/9609559 .

Falade A , Jaouani A, Mabinya L et al. Exoproduction and molecu- lar c har acterization of per oxidase fr om Ensifer adhaerens . A ppl Sci 2019; 9 :3121. https:// doi.org/ 10.3390/ app9153121 .

Falade A O , Eyisi O AL, Mabinya LV et al. Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria Raoultella ornithi- nolytica and Ensifer adhaerens . Biotechnol Rep 2017; 16 :12–17. https: // doi.org/ 10.1016/ j.btre.2017.10.001 .

Falade A O , Mabin ya LV, Ok oh AI et al. Studies on per oxidase pr o- duction and detection of Sporotrichum thermophile-like catalase- peroxidase gene in a Bacillus species isolated fr om Hogsbac k for- est r eserv e, South Africa. Heliyon 2019; 5 :e03012. https://doi.org/ 10.1016/j.heliyon.2019.e03012 .

Falade A O , Mabinya LV, Okoh AI et al. Agroresidues enhanced per- o xidase acti vity expression by Bacillus sp. MABINYA-1 under sub- merged fermentation. Bioresour Bioprocess 2020; 7 :55. https://doi.or g/ 10.1186/ s40643- 020- 00345- 3 .

Fisher, A.B.; Fong, S.S. Lignin biodegradation and industrial implications. AIMS Bioeng. 2014, 1, 92–112.

Gałazka A , Jankiewicz U, Orzechowski S. The role of ligninolytic en- zymes in sustainable a gricultur e: a pplications and challenges. Agronomy 2025; 15 :451. https:// doi.org/ 10.3390/ agronomy15020451.

Ganesh Babu MM, Gunasekaran P. Production and structural charac- terization of crystalline silver nanoparticles from Bacillus cereus isolate. Colloids Surf B 2009; 74 :191–5. https:// doi.org/ 10.1016/ j.co lsurfb.2009.07.016 .

Hassan Afandy H , Sabir DK, Aziz SB. Antibacterial activity of the green synthesized plasmonic silver nanoparticles with crys- talline structure against Gram-positive and Gram-negative bac- teria. Nanomaterials 2023; 13 :1327. https:// doi.org/ 10.3390/ nano13 081327 .

Hayrunnisa N , Azize A, Selcuk C et al. Biosynthesis of silver nanopar- ticles and investigation of genotoxic effects and antimicrobial ac- tivity. Int J Nano Dimen 2020; 11 .

Huy ND , Tien NTT, Huyen LT et al. Screening and production of man- ganese peroxidase from Fusarium sp. on residue materials. Mycobi- ology 2017; 45 :52–56. https:// doi.org/ 10.5941/ MYCO.2017.45.1.52 .

Jahanban-Esfahlan A , Amaro wicz R. Walnut (Juglans regia L.) shell pyr oligneous acid: c hemical constituents and functional a ppli- cations. RSC Adv 2018a; 8 :22376–91. https:// doi.org/ 10.1039/ C8RA 03684E .

Jahanban-Esfahlan A , Amaro wicz R. Walnut (Juglans regia L.) shell pyr oligneous acid: c hemical constituents and functional a ppli- cations. RSC Adv 2018b; 8 :22376–91. https:// doi.org/ 10.1039/ C8RA 03684E .

Jahanban-Esfahlan A , Ostadrahimi A, Tabibiazar M et al. A compre- hensiv e r e vie w on the c hemical constituents and functional uses of Walnut (Juglans spp.) Husk. Int J Mol Sci 2019; 20 :3920. https: // doi.org/ 10.3390/ ijms20163920 .

Jahn W . Re vie w: c hemical aspects of the use of gold clusters in struc- tural biology. J Struct Biol 1999; 127 :106–12. https:// doi.org/ 10.100 6/jsbi.1999.4123 .

Kalimuthu K , Sur esh Babu R, Venkatar aman D et al. Biosynthe- sis of silver nanocrystals by Bacillus licheniformis . Colloids Surf B 2008; 65 :150–3. https:// doi.org/ 10.1016/ j.colsurfb.2008.02.018 .

Kanwal Z , Raza MA, Riaz S et al. Synthesis and c har acterization of sil- v er nanoparticle-decor ated cobalt nanocomposites (Co@AgNPs) and their density-dependent antibacterial activity. R Soc Open Sci 2019; 6 :182135. https:// doi.org/ 10.1098/ rsos.182135 .

Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarni SK, et al. Extracellular synthesis of silver nano- particles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. Nanotechnology. 2002;14:95–100. doi: 10.1088/0957-4484/14/1/321.

Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., & Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enyzme and Microbial Technology, 8, 27–32.

Korbekandi H, Iravani S, Abbasi S. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using Lactobacillus casei subsp. casei. J Chem Technol Biotechnol. 2012;87:932–7. doi: 10.1002/jctb.3702.

Khan M , Karuppiah P, Alkhathlan HZ et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Juniperus procer a extract: their characteriza- tion, and biological activity. Crystals 2022; 12 :420. https://doi.org/ 10.3390/cryst12030420 .

Lava MB , Mudda pur UM, Basav egowda N et al. Char acterization, an- ticancer, antibacterial, anti-diabetic and anti-inflammatory ac- tivities of green synthesized silver nanoparticles using Justica wynaadensis leav es extr act. Mater Tod Proc 2021; 46 :5942–7. https: // doi.org/ 10.1016/ j.matpr.2020.10.048 .

Li H , Liang J, Kong F et al. Pr epar ation of lignin-containing cellu- lose nanofibers from walnut shell using deep eutectic solvent for nanotube conductive film. Ind Crops Prod 2024; 207 :117737. https:// doi.org/ 10.1016/ j.indcrop .2023.117737 .

Liu Y, Fu J, Chen P, Yu X, Yang P. Studies on biosorption of Au3+ by Bacillus megaterium. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2000;40:425–9.

Magazenkova DN , Sk omor okhov a EA, Farr oukh MA et al. Influence of silver nanoparticles on the growth of ascitic and solid ehrlich adenocarcinoma: focus on copper metabolism. Pharmaceutics 2023; 15 :1099. https:// doi.org/ 10.3390/ pharmaceutics15041099 .

Majeke BM , García-Aparicio M, Biko OD et al. Synergistic codon op- timization and bior eactor cultiv ation to w ar d enhanced secre- tion of fungal lignin peroxidase in Pichia pastoris : enzymatic val- orization of technical (industrial) lignins. Enzyme Microb Technol 2020; 139 :109593. https:// doi.org/ 10.1016/ j.enzmictec.2020.10959 3 .

Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., & Chapman, J. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78. Nature Biotechnology, 22, 695–700.

Moilanen, A. M., Lundell, T., Vares, T., & Hatakka, A. (1996). Manganese and malonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and in the degradation of lignin by Phlebia radiata. Applied Microbiology and Biotechnology, 45, 792–799.

Morgenstern, I., Klopman, S., & Hibbett, D. S. (2008). Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. Journal of Molecular Evolution, 66, 243–257.

Morales A , Labidi J, Gullón P. Integral valorisation of walnut shells based on a three-step sequential delignification. J Environ Manage 2022; 310 :114730. https:// doi.org/ 10.1016/ j.jenvman.2022.114730 .

More PR , P andit S, Filippis AD et al. Silv er nanoparticles: bacterici- dal and mechanistic approach against drug resistant pathogens. Microorganisms 2023; 11 :369. https:// doi.org/ 10.3390/ microorganis ms11020369 .

Nadaroglu H , Kaymak HC, Alayli A et al. Investigation of potential an- tio xidati ve effects of CaO nanoparticles on bean seeds (Phaseolus vulgaris L.). Gesunde Pflanzen 2023; 75 :289–301. https:// doi.org/ 10.1 007/s10343- 022- 00700- 8 .

Nour El-Dein MM , Shereif AEA, Mansour FA et al. Optimization of xylanase and peroxidase production from Streptomyces sp. K37. J BioSci Biotechnol 2014.

Rafique M , Sadaf I, Rafique MS et al. A r e vie w on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2017; 45 :1272–91. https:// doi.org/ 10.1080/ 21691401.201 6.1241792 .

Guilger-Casagrande M, de Lima R. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7:287. doi: 10.3389/fbioe.2019.00287.

Syed A, Saraswati S, Kundu GC, Ahmad A. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Humicola sp. and evaluation of their cytoxicity using normal and cancer cell lines. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013;114:144–7. doi: 10.1016/j.saa.2013.05.030.

Owaid MN, Raman J, Lakshmanan H, Al-Saeedi SSS, Sabaratnam V, Abed IA. Mycosynthesis of silver nanoparticles by Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus and its inhibitory effects against Candida sp. Mater Lett. 2015;153:186–90. doi: 10.1016/j.matlet.2015.04.023

Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, Phaenerochaete chrysosporium. Colloids Surf B Biointerfaces. 2006;53:55–9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.07.014.

Hamouda RA, Hussein MH, Abo-elmagd RA, Bawazir SS. Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium Oscillatoria limnetica. Sci Rep. 2019;9:13071. doi: 10.1038/s41598-019-49444-y.

Govindaraju K, Kiruthiga V, Kumar VG, Singaravelu G. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a Marine Alga, Sargassum Wightii Grevilli and their antibacterial effects. J Nanosci Nanotechnol. 2009;9:5497–501. doi: 10.1166/jnn.2009.1199.

Rahman H , Rauf A, Khan SA et al. Green synthesis of silver nanopar- ticles using Rhazya stricta decne extracts and their anti-microbial and anti-o xidant acti vities. Crystals 2023; 13 :398. https://doi.org/ 10.3390/cryst13030398 .

Reddy GV , Ravindra Babu P, Komaraiah P et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two Pleurotus species (P. os- treatus and P. sajor-caju). Process Biochem 2003; 38 :1457–62. https: // doi.org/ 10.1016/ S0032- 9592(03)00025- 6 .

Sarsar V , Selwal KK, Selwal MK. Green synthesis of silver nanoparti- cles using leaf extract of Mangifera indica and e v aluation of their antimicr obial activity. J Microbiol Biotec hnol Res 2013; 3 :100125. ht tp://scholarsr esearc hlibrary.com/arc hive.html .

Sharma A , Adhikari S, Saty anaray ana T. Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme ther- mophile Geobacillus thermoleovorans . World J Microbiol Biotechnol 2007; 23 :483–90. https:// doi.org/ 10.1007/ s11274- 006- 9250- 1 .

Singh AK , Fernandez-Lafuente R, Schmidt JE et al. Biocatalytic func- tionalities of lignin peroxidase-based systems in lignin depoly- merization and pollutants r emov al fr om envir onmental matri- ces. Curr Pollut Rep 2024; 10 :345–61. https:// doi.org/ 10.1007/ s40726 - 024- 00310- 0 .

Singh R , Shedbalkar UU, Nadhe SB et al. Lignin peroxidase medi- ated silver nanoparticle synthesis in Acinetobacter sp. AMB Expr 2017; 7 :226. https:// doi.org/ 10.1186/ s13568- 017- 0528- 5 .

Slawson RM , Tr e vors JT, Lee H. Silv er accum ulation and resistance in Pseudomonas stutzeri . Arch Microbiol 1992; 158 . https:// doi.org/ 10 .1007/BF00276299 .

Steven T . Expr ession and localization of the P abPrx86 per oxidase from Norway Spruce (Picea abies (L.) Karst.) in tobacco (Nicotiana benthamiana L.). Helsinki: University of Helsinki, 2020.

Sugiura, T., Yamagishi, K., Kimura, T., Nishida, T., Kawagishi, H., & Hirai, H. (2009). Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white- rot fungus Phanerochaete sordida YK- 624. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 1793–1798.

Glumoff, T., Harvey, P., Molinari, S., Goble, M., Frank, G., Palmer, J. M., et al. (1990). Lignin peroxidase from Phanerochaete chrysosporium molecular and kinetic characterization of isozymes. European Journal of Biochemistry, 187, 515–520.

Thomas R , J anar dhanan A, Varghese R T et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine Ochrobactrum sp. Braz J Microbiol 2014; 45 :1221–7. https:// doi.org/ 10.1590/ S1517-83 822014000400012 .

Vadlapudi V , Kaladhar D. Review: green synthesis of silver and gold nanoparticles. Mid East J Sci Res 2014; 19 :834–42. https:// doi.org/ 10 .5829/idosi.mejsr.2014.19.6.11585 .

Vanholme, R.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin engineering. Curr. Opin. Plant Biol. 2008, 11, 278–285.

Wang C , Kim YJ, Singh P et al. Green synthesis of silver nanoparticles b y Bacillus meth ylotrophicus , and their antimicrobial activity. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2015; 44 : 1–6. https:// doi.org/ 10.3109/ 21 691401.2015.1011805 .

Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology, 2, 388–393.

Zamocky, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., … Obinger, C. (2015). Independent evolution of four hemeperoxidase superfamilies. Archives of Biochemistry and Biophysics, 574, 108–119.

Zewde B, Ambaye A, Stubbs Iii J, Raghavan D. A review of stabilized silver nanoparticles–synthesis, biological properties, characterization, and potential areas of applications. Nanomedicine. 2016;4(1043):1–4.

Zheng D , Zhang Y, Guo Y et al. Isolation and c har acterization of nanocellulose with a novel shape from walnut (Juglans Regia L.) shell a gricultur al w aste. P olymers 2019; 11 :1130. https:// doi.org/ 10 .3390/polym11071130 .

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: **Doğum tarihi:** **Doğum Yeri:** **Uyruğu:** **Adres:** **Tel:** **E-mail:**	Sefa Nur AKKAYA
Eğitim	
Lise: **Lisans:** **Yüksek lisans:**	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	