



**LAKTOPEROKSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İÇİN  
NİŞASTA@METAL OKSİT  
BİYONANOFİLMLERİNİN SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU VE LAKTOPEROKSİDAZ  
İMMOBİLİZE NİŞASTA@METAL OKSİT  
BİYONANOFİLMLERİNİN ANTİBAKTERİYAL  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Songül BAYRAK**

**Doktora Tezi  
Kimya Ana Bilim Dalı  
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR  
2024  
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI

**LAKTOPEROKSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İÇİN NİŞASTA@METAL OKSİT  
BİYONANOFİMLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE  
LAKTOPEROKSİDAZ İMMOBİLİZE NİŞASTA@METAL OKSİT  
BİYONANOFİMLERİNİN ANTİBAKTERİYAL POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

(Synthesis and Characterization of Starch@metal Oxide Bionanofilms for Immobilization of  
Lactoperoxidase and Investigation of the Antibacterial Potential of Lactoperoxidase  
Immobilized Starch@metal Oxide Bionanofilms)

DOKTORA TEZİ

Songül BAYRAK

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Erzurum  
Nisan, 2024

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Songül BAYRAK tarafından hazırlanan “LAKTOPEROKSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İÇİN NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİMLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE LAKTOPEROKSİDAZ İMMOBİLİZE NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİMLERİNİN ANTİBAKTERİYAL POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı çalışması 24/04/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

|               |                                                                             |                      |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Jüri Başkanı: | Prof. Dr. Abdul Kadir ÇOBAN<br><i>Erzincan Binalı Yıldırım Üniversitesi</i> | Aslı ıslak imzalıdır |
| Danışman:     | Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                      | Aslı ıslak imzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                   | Aslı ıslak imzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Doç. Dr. Mine AKSOY<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                          | Aslı ıslak imzalıdır |
| Jüri Üyesi:   | Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN<br><i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>            | Aslı ıslak imzalıdır |

Enstitü Yönetim Kurulunun  
.../.../.... tarih ve ..... sayılı  
kararı.

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

**Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**

**Enstitü Müdürü**

Aslı ıslak imzalıdır

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: FDK-2022-10424

**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

Doktora Tezi olarak **Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR** danışmanlığında sunulan “LAKTOPEROKSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İÇİN NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİLMLEMLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE LAKTOPEROKSİDAZ İMMOBİLİZE NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİLMLEMLERİNİN ANTİBAKTERİYAL POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI” 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                           | 25                        | 30                |
| Kuramsal Temeller               | 21                        | 30                |
| Materyal ve Metot               | 18                        | 35                |
| Araştırma Bulguları ve Tartışma | 8                         | 20                |
| Sonuç ve Öneriler               | 6                         | 20                |
| Tezin Geneli                    | 15                        | 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)       | Tez Danışmanı              |
|----------------------------|----------------------------|
| Songül BAYRAK              | Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR    |
| 24.4.2024                  | 24.4.2024                  |
| İmza: Aslı ıslak imzalıdır | İmza: Aslı ıslak imzalıdır |

\* 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

Doktora tezi olarak sunduğum çalışmamın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarında her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin bütün imkânlarını esirgemeyen Fen Fakültesi Dekanlığına, Kimya Bölümüne ve Biyokimya Anabilim Dalına, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine (DAYTAM),

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Sayın Doç. Dr. Mine AKSOY'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Çalışmalarım esnasında her türlü yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mine AKSOY'a, öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTAÇI'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif ÖMEROĞLU'a Sayın Dr. Arş. Gör. Sümeyye ARSLAN'a, Iğdır Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bingül KURT URHAN'a,

Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Nurgül ABUL'a Sayın Dr. Serpil GERNİ, Sayın Dr. Cansu ÖZTÜRK, başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini, sevgisini ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, eşim Doçent Dr. Çetin BAYRAK'a ve sevgili kızım Defne'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamı FDK-2022-10424 nolu proje kapsamında destekleyen BAP'a teşekkür ederim.

Songül BAYRAK

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

# LAKTOPEROKSİDAZIN İMMOBİLİZASYONU İÇİN NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİLMLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE LAKTOPEROKSİDAZ İMMOBİLİZE NİŞASTA@METAL OKSİT BİYONANOFİLMLERİNİN ANTİBAKTERİYAL POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Songül BAYRAK

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

**Amaç:** Laktoperoksidaz (LPO), antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve antitümör ajan olarak işlev gören bir peroksidaz enzimidir. LPO'nun stabilizasyonunun sağlanması endüstriyel uygulamalarda oldukça önemlidir. LPO'nun kararlılığını ve antimikrobiyal aktivitesini artırmak için kolay ve etkili bir yöntem geliştirmek amaçlandı. Bu nedenle, bu çalışmada, Nişasta, Nişasta@MgO, Nişasta@ZnO, Nişasta@CuO filmleri hazırlanarak, bu filmler üzerine LPO enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi.

**Yöntem:** ZnO ve CuO NP'ü çöktürme yöntemi ile sentezlenirken MgO NP'ü Taguchi yöntemi ile sentezlendi ve daha sonra nişasta filmleri hazırlandı. Hazırlanan filmlere afinite kromatografisi ile saflaştırılan LPO enzimi tutuklama ve yüzey adsorbsiyonu olmak üzere iki farklı yöntemle immobilize edildi. Elde edilen Nişasta@(CuO, MgO, ZnO) Nişasta@(CuO, MgO, ZnO)/LPO filmlerin yüzey kimyasal yapı analizi, morfolojik incelemeleri ve kristal yapı analizlerini karakterize etmek için XRD, F-TIR ve SEM cihazları kullanıldı. Ayrıca hazırlanan filmlerin optimum pH, optimum sıcaklık ve termal kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı belirlendi. Son olarak filmlerin antibakteriyel etkisi incelenerek potansiyel olarak kullanılabilirliği belirlendi.

**Sonuç:** Laktoperoksidaz (LPO) enziminin Nişasta ve Nişasta@ (CuO, MgO, ZnO) filmlerine immobilizasyonu, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışını difraksiyonu (XRD) ve alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak doğrulandı. Immobilize edilen LPO'nun optimum sıcaklığı, pH 6'da serbest LPO'ya göre yaklaşık 20 °C artarak 60 °C olarak gözlemlendi.

Filmlere immobilize edilen LPO, 4°C ve 25 °C'de 21 gün boyunca aktivitesini korurken, serbest enzim bu süre içerisinde ilk aktivitesinin %95'ini kaybettiği gözlemlendi. Ayrıca, filmlere immobilize edilen LPO'nun 60 °C'de 60 dakika sonra başlangıç aktivitesini, yaklaşık %16,5-%19 arasında koruduğu belirlenirken, serbest enzimin 5 dakika sonra aktivitesini kaybettiği gözlemlendi. Immobilize edilen LPO'nun, aktivite kaybı olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilir özellikte olduğu gösterildi. Hazırlanan filmlere LPO enzimi immobilize edildikten sonra antibakteriyel etkisi gözlemlendi ve bu sentezlenen filmler arasında Nişasta@ZnO/LPO filminin en etkili antibakteriyel özellik gösterdiği belirlendi.

Nisan 2024, 98 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Laktoperoksidaz (LPO), Immobilizasyon, Nişasta, Nanopartikül (NP), Antibakteriyel

## ABSTRACT

### DOCTORAL DISSERTATION

#### SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF STARCH@METAL OXIDE BIONANOFILMS FOR IMMOBILIZATION OF LACTOPEROXIDASE AND INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF LACTOPEROXIDASE IMMOBILIZED STARCH@METAL OXIDE BIONANOFILMS

Songül BAYRAK

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

**Purpose** Lactoperoxidase (LPO) is a peroxidase enzyme that is a natural antibacterial, antiviral, antioxidant, and antitumor agent. The stabilization of LPO is a key factor in its industrial applications. Therefore, in this study, we aimed to develop an easy and effective method to increase the stability and antimicrobial activity of LPO by using the immobilization of LPO enzyme on the prepared Starch, Starch@MgO, Starch@ZnO, Starch@CuO films.

**Method:** While ZnO and CuO NPs were synthesized by the precipitation method, MgO NPs were synthesized by the Taguchi method, and starch films were prepared. LPO enzyme was immobilized in the prepared films by two different methods: entrapment and surface adsorption. XRD, F-TIR, and SEM were used to characterize the surface chemical structure analysis, morphological examinations, and crystal structure analyses of the obtained Starch@(CuO, MgO, ZnO) Starch@(CuO, MgO, ZnO)/LPO films. In addition, the optimum pH, optimum temperature and thermal stability, reusability, and storage stability of the prepared films were determined. Finally, the antibacterial effect of the films was examined and their potential usability was determined.

**Results:** Successful immobilization of Lactoperoxidase (LPO) enzyme to Starch and Starch@(CuO, MgO, ZnO) films were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), and field emission scanning electron microscopy (SEM) was verified using. The optimal temperature for the immobilized LPO was identified at 60 °C, exhibiting an elevation of approximately 20 °C under pH 6 conditions.

While the enzyme immobilized on the films maintained its absolute activity for 21 days at 4°C and 25°C, the native enzyme lost 95% of its initial activity. Additionally, it was determined that the LPO immobilized on the films retained its initial activity, approximately 16.5%-19%, after 60 minutes at 60 °C, while the free enzyme lost its activity after 5 minutes. The immobilized enzyme can be used repeatedly without loss of activity.

In this study, an antibacterial effect was observed after immobilizing the LPO enzyme in the prepared films. Among these films, the Starch@ZnO/LPO film exhibited the highest antibacterial properties.

**April 2024, 98 pages**

**Keywords:** Lactoperoxidase (LPO), Immobilization, Starch, Nanoparticle (NP), Antibacterial

## İÇİNDEKİLER

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....                                                   | i   |
| ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....                                    | ii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                | iii |
| ÖZET .....                                                                    | iv  |
| ABSTRACT .....                                                                | v   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                              | i   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                          | iii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                         | iv  |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                          | vii |
| GİRİŞ.....                                                                    | 8   |
| Enzim İmmobilizasyonu .....                                                   | 8   |
| Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                                         | 9   |
| Kimyasal Yöntemler .....                                                      | 10  |
| Kovalent bağlama .....                                                        | 10  |
| Çapraz bağlama.....                                                           | 10  |
| Fiziksel Yöntemler .....                                                      | 10  |
| Adsorbsiyon .....                                                             | 10  |
| Tutuklama .....                                                               | 10  |
| Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri .....                 | 12  |
| Laktoperoksidaz (LPO) Enzimi .....                                            | 18  |
| Laktoperoksidaz sistem.....                                                   | 18  |
| Laktoperoksidaz enziminin (LPO) uygulama alanları .....                       | 19  |
| Çalışmanın Amacı.....                                                         | 20  |
| KURAMSAL TEMELLER.....                                                        | 22  |
| MATERYAL ve YÖNTEM .....                                                      | 30  |
| Materyal .....                                                                | 30  |
| Kullanılan kimyasal maddeler .....                                            | 30  |
| Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler.....                                  | 30  |
| Bradford Metodunda Kullanılan Protein Belirleme Çözeltisi.....                | 30  |
| Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Detaylı Tanımı ve Hazırlanışı..... | 31  |
| Nanopartikül (metal-oksit) sentezinde kullanılan çözeltiler .....             | 31  |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Yöntemler.....                                                                                                                      | 32 |
| Laktoperoksidaz enzim saflaştırma çalışmaları .....                                                                                 | 32 |
| Protein ve enzim aktivitesi tayini.....                                                                                             | 32 |
| SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kapsamlı Değerlendirilmesi .....                                                              | 33 |
| Nanopartikül sentezi .....                                                                                                          | 33 |
| Kompozit filmlerin hazırlanması .....                                                                                               | 34 |
| Hazırlanan filmlerin farklı yöntemler kullanılarak karakterizasyonu.....                                                            | 34 |
| Nişasta ve Nişasta@(CuO, MgO, ZnO) biyonanofilmlerine LPO'nun yüzey<br>adsorbsiyonu ve tutuklama yöntemleriyle immobilizasyonu..... | 35 |
| Hazırlanan nişasta@metal-oksit/LPO biyonanofilmlerinin karakterizasyon çalışmaları                                                  | 36 |
| Antibakteriyel özelliklerin araştırılması.....                                                                                      | 36 |
| ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                                                                                               | 38 |
| Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....                                                                      | 38 |
| LPO Enziminin Saflaştırılması .....                                                                                                 | 38 |
| Sığır Sütünden Saflaştırılan LPO Enziminin SDS-PAGE Sonucu .....                                                                    | 39 |
| Nanopartikül Sentezleri.....                                                                                                        | 39 |
| Magnezyum oksit (MgO) nanopartikül sentezi .....                                                                                    | 39 |
| Bakır oksit (CuO) nanopartikül sentezi .....                                                                                        | 40 |
| Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezi.....                                                                                         | 41 |
| Kompozit Filmlerin Hazırlanması .....                                                                                               | 42 |
| Nişasta@metal-oksit biyonanofilmlerine LPO'nun yüzey adsorbsiyonu yöntemi ile<br>immobilizasyonu.....                               | 43 |
| Nişasta@metal-oksit biyonanofilmlerine LPO'nun tutuklama yöntemiyle<br>immobilizasyonu.....                                         | 43 |
| Hazırlanan Filmlerin Farklı Yöntemler Kullanılarak Karakterizasyonu .....                                                           | 44 |
| Yüzey kimyasal yapı analizi .....                                                                                                   | 44 |
| Morfolojik incelemeler .....                                                                                                        | 52 |
| Kristal yapı analizi .....                                                                                                          | 67 |
| Hazırlanan nişasta@metal-oksit/LPO biyonanofilmlerinin karakterizasyon<br>çalışmaları .....                                         | 71 |
| Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO<br>filmlerinin Antibakteriyel Sonuçları .....                        | 76 |
| SONUÇLAR.....                                                                                                                       | 81 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                                      | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                                       | 91 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> – LPO, Serbest LPO nun Km ve Vmax değerlerinin sonuçları .....                                                                                                                                  | 28 |
| <b>Tablo 2.</b> LPO Enziminin Saflaştırma Tablosu.....                                                                                                                                                                                         | 39 |
| <b>Tablo 3.</b> Yüzey adsorbsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan Nişasta/LPO,<br>Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin aktivite,<br>Protein miktarı, Spesifik aktivite ve İmmobilizasyon verimliliği sonuçları ..... | 43 |
| <b>Tablo 4.</b> Tutuklama yöntemi kullanılarak hazırlanan Nişasta/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin aktivite, Protein miktarı,<br>Spesifik aktivite ve İmmobilizasyon verimliliği sonuçları. ....          | 43 |
| <b>Tablo 5.</b> Hazırlanan Filmlerin Antibakteriyel Sonuçları .....                                                                                                                                                                            | 79 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Enzim immobilizasyonunun temel ve alt yöntemleri.....                                                                                                                                                                      | 9  |
| Şekil 2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyallerinin sahip olması<br>gereken özellikler .....                                                                                                                        | 12 |
| Şekil 3. a) Amiloz, b) Amilopektin yapısı .....                                                                                                                                                                                     | 15 |
| Şekil 4. LPO'nun immobilizasyonunu çoklu biyoteknolojik uygulamalarına genel bakış<br>şeması (El-Fakharany 2021). ....                                                                                                              | 19 |
| Şekil 5. Enzim immobilizasyon sisteminin grafiksel özeti .....                                                                                                                                                                      | 21 |
| Şekil 6. Çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler) içeren aktif kompozit nişasta filmleri<br>çalışması.....                                                                                                                          | 23 |
| Şekil 7. Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) içeren aktif kompozit nişasta filmlerinin<br>çalışması.....                                                                                                                               | 23 |
| Şekil 8. (a) Kontrol filmi, (b) CNC filmi, (c) P. acidilactici'den bakteriyosin, (d) E.<br>faecium'dan bakteriyosin (e) BIN (P. acidilactici'den) (e) ve (f) BIN (E.<br>faecium'dan) .....                                          | 24 |
| Şekil 9. Patates nişastası ve TiO <sub>2</sub> nanoparçacıklarından elde edilen yeni bir nanokompozit<br>nişasta filmlerinin XRD ve FT-IR spektrumu.....                                                                            | 25 |
| Şekil 10. Laktoperoksidaz sistemi, çeşitli mantar suşlarına karşı kitosan filmlerin<br>antifungal aktivitesi.....                                                                                                                   | 26 |
| Şekil 11. a) Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı, b) Serbest ve immobilize<br>enzimin termal stabilitesi, c) Serbest ve immobilize enzimin optimum pH 'sı d)<br>Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığı..... | 27 |
| Şekil 12. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> – LPO, Serbest LPO' nun FT-IR ve FE-SEM görüntüleri .....                                                                                                                                  | 28 |
| Şekil 13. Bradford yöntemiyle kantitatif tayin için kullanılan standart grafik.....                                                                                                                                                 | 38 |
| Şekil 14. Sülfail amid kolonundan saflaştırılan sığır LPO enziminin gümüş boyama SDS-<br>PAGE fotoğrafı .....                                                                                                                       | 39 |
| Şekil 15. Magnezyum oksit (MgO) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi.....                                                                                                                                                      | 40 |
| Şekil 16. Bakır oksit (CuO) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi .....                                                                                                                                                         | 41 |
| Şekil 17. Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi .....                                                                                                                                                         | 41 |
| Şekil 18. Nişasta filmi, Nişasta@ZnO filmi, Nişasta@MgO, Nişasta@CuO filmlerinin<br>sentezinin şematik gösterimi .....                                                                                                              | 42 |
| Şekil 19. Hazırlanan Nişasta, Nişasta@ZnO, Nişasta@MgO, Nişasta@CuO filmlerin son<br>hali.....                                                                                                                                      | 43 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 20.</b> Saf nişasta (toz), nişasta film ve nişasta/LPO film için kaydedilen Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) Spektrumları..... | 45 |
| <b>Şekil 21.</b> CuO nanoparçacık, Nişasta@CuO ve Nişasta@CuO/LPO modifiye filmlere ait FT-IR spektrumları .....                                           | 46 |
| <b>Şekil 22.</b> MgO nanoparçacık, Nişasta@MgO ve Nişasta@MgO/LPO modifiye filmlere ait FT-IR spektrumları .....                                           | 47 |
| <b>Şekil 23.</b> ZnO nanoparçacık, Nişasta@ZnO ve Nişasta@ZnO/LPO modifiye filmlerin FT-IR spektrumları .....                                              | 48 |
| <b>Şekil 24.</b> Nişasta toz, Nişasta film, Nişasta/LPO ait Raman Spektrum .....                                                                           | 49 |
| <b>Şekil 25.</b> CuO NP, Nişasta@CuO film, Nişasta@CuO /LPO ait Raman Spektrum.....                                                                        | 50 |
| <b>Şekil 26.</b> MgO NP, Nişasta@MgO film, Nişasta@MgO /LPO ait Raman Spektrum .....                                                                       | 51 |
| <b>Şekil 27.</b> ZnO NP, Nişasta@ZnO film, Nişasta@ZnO /LPO ait Raman Spektrum .....                                                                       | 52 |
| <b>Şekil 28.</b> Nişasta tozuna ait SEM görüntüleri .....                                                                                                  | 53 |
| <b>Şekil 29.</b> Nişasta toz ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                                 | 53 |
| <b>Şekil 30.</b> Nişasta film ait SEM görüntüleri .....                                                                                                    | 54 |
| <b>Şekil 31.</b> Nişasta film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                                | 55 |
| <b>Şekil 32.</b> a Nişasta film ve b-d Nişasta/LPO film ait SEM görüntüleri .....                                                                          | 56 |
| <b>Şekil 33.</b> Nişasta/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı.....                                                                             | 56 |
| <b>Şekil 34.</b> CuO Nanopartikül ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 57 |
| <b>Şekil 35.</b> CuO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 57 |
| <b>Şekil 36.</b> Nişasta@CuO film ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 58 |
| <b>Şekil 37.</b> Nişasta@CuO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 58 |
| <b>Şekil 38.</b> a Nişasta@CuO film ve b-d Nişasta@CuO/LPO film ait SEM görüntüleri.....                                                                   | 59 |
| <b>Şekil 39.</b> Nişasta@CuO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                        | 60 |
| <b>Şekil 40.</b> MgO Nanopartikül ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 60 |
| <b>Şekil 41.</b> MgO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 61 |
| <b>Şekil 42.</b> Nişasta@MgO film ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 62 |
| <b>Şekil 43.</b> Nişasta@MgO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 62 |
| <b>Şekil 44.</b> a Nişasta@MgO film ve b-d Nişasta@MgO/LPO film ait SEM görüntüleri.....                                                                   | 63 |
| <b>Şekil 45.</b> Nişasta@MgO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                        | 63 |
| <b>Şekil 46.</b> ZnO Nanopartikül ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 64 |
| <b>Şekil 47.</b> ZnO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 64 |
| <b>Şekil 48.</b> Nişasta@ZnO film ait SEM görüntüleri .....                                                                                                | 65 |
| <b>Şekil 49.</b> Nişasta@ZnO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                            | 66 |
| <b>Şekil 50.</b> a Nişasta@ZnO film ve b-d Nişasta@ZnO/LPO film ait SEM görüntüleri .....                                                                  | 67 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 51.</b> Nişasta@ZnO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 67 |
| <b>Şekil 52.</b> Nişasta toz, Nişasta Filmi, Nişasta/LPO Filmine ait XRD spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 68 |
| <b>Şekil 53.</b> MgO NP, Nişasta@MgO Film, Nişasta@MgO/LPO Filmine ait XRD spektrumu .                                                                                                                                                                                                                                                                   | 69 |
| <b>Şekil 54.</b> ZnO NP, Nişasta@ZnO Film, Nişasta@ZnO/LPO Filmine ait XRD spektrumu.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 70 |
| <b>Şekil 55.</b> CuO NP, Nişasta@CuO Film, Nişasta@CuO/LPO Filmine ait XRD spektrumu ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 71 |
| <b>Şekil 56.</b> LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum pH'sı.....                                                                                                                                                                                                                          | 72 |
| <b>Şekil 57.</b> LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum sıcaklığı.....                                                                                                                                                                                                                      | 73 |
| <b>Şekil 58.</b> LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@CuO/LPO filmlerinin termal kararlılığı .....                                                                                                                                                                                                                    | 74 |
| <b>Şekil 59.</b> LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@CuO/LPO filmlerinin yeniden kullanılabirliği .....                                                                                                                                                                                                              | 75 |
| <b>Şekil 60.</b> LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO,<br>Nişasta@CuO/LPO filmlerinin yeniden depolama kararlılığı.....                                                                                                                                                                                                           | 76 |
| <b>Şekil 61.</b> A: Nişasta, Nişasta/LPO filmi, B: Nişasta @MgO, Nişasta @MgO/LPO film, C:<br>Nişasta @CuO, Nişasta @CuO/LPO film, D: Nişasta @ZnO, Nişasta @ZnO/LPO<br>filmlerinin <i>Salmonella spp</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>S. aureus</i> ve<br><i>E. coli</i> 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi..... | 80 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|       |                                                     |
|-------|-----------------------------------------------------|
| ABTS  | 2,2'- azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic asit |
| CuNPs | Bakır nanopartiküller                               |
| EC    | Enzim kod numarası                                  |
| LPO   | Laktoperoksidaz                                     |
| MgNPs | Magnezyum nanopartiküller                           |
| ZnNPs | Çinko nanopartikül                                  |
| MO    | Metal -oksit                                        |
| NPs   | Nanopartikül                                        |
| PAGE  | Poliakrilamid jel elektroforezi                     |
| PEG   | Polietilenglikol                                    |
| POD   | Peroksidaz                                          |
| S     | Nişasta                                             |
| SDS   | Sodyum dodesilsülfat                                |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin                   |
| Tris  | Trihidroksimetil aminometan                         |
| WS    | Su geçirgenliği                                     |

## GİRİŞ

### Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon “hareketi sınırlandırma” anlamına gelmektedir. Örneğin, bir aracın hareketini durdurma eylemi immobilizasyon benzetilir. Bu amaçla, İmmobilizasyon yöntemi, doğru destek materyali kullanarak bir maddeyi sabitleme tekniği olarak kabul edilebilir ( Liu *et al.* 2012).

Enzimler, ortam sıcaklığı, fizyolojik pH ve sulu ortam vb. gibi hafif reaksiyon koşulları altında çok sayıda biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonu katalize eden çok verimli (biyo)katalizörlerdir. Olağanüstü kemo-, regio- veya stereospesifiklikleri sayesinde çok hassas reaksiyonlar gerçekleştirirler (Asgher *et al.* 2014; Bilal *et al.* 2018). Bununla birlikte, enzimlerde istenen bu özellikler düşük stabilite ve kısa ömürlü olması nedeniyle endüstriyel uygulamaları ciddi bir şekilde kısıtlamaktadır (Bilal *et al.* 2018). Enzim immobilizasyonu, yukarıda belirtilen engellerin aşılmasında ve farklı uygulamalı amaçlar için enzim katalitik stabilizesinin geliştirilmesinde tercih edilen bir stratejidir.

Serbest enzimler, endüstriyel uygulamalarda birçok zorlukla karşı karşıyadır. Düşük operasyonel ve kimyasal stabilite, depolama problemleri, zor geri kazanım ve yeniden kullanılabilirlik, substrat ve ürün inhibisyonları ve yüksek üretim maliyetleri, serbest enzimlerin yaygın kullanımını engelleyen temel faktörlerdir (Cui and Jia 2017; Cui *et al.* 2018; Nadar and Rathod 2018). Bu dezavantajlar, serbest enzimlerin ekonomik açıdan elverişsiz olmasına neden olur. Katı desteğe immobilize edilen enzimler, serbest enzimlere kıyasla birçok önemli avantaja sahiptir. Immobilize enzimler, daha yüksek stabilite ve çevresel değişikliklere karşı direnç gösterir. Bu onları endüstriyel uygulamalar için daha uygun hale getirir. Immobilize enzimler, yüksek katma değerli ürünler elde etmek için önemli araçlardır (Brady and Jordaan 2009; Goncalves *et al.* 2019).

Heterojen enzim immobilizasyonu, enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, kolay geri kazanımı, sürekli üretim, reaksiyonun kolay sonlandırılması ve çeşitli reaktör tasarımlarına olanak tanıyan bir sistem oluşturur. İmmobilizasyon ayrıca ürün inhibisyonunu da önler ve enzimlerin daha iyi fonksiyonel özellikler göstermesini sağlar (Krajewska 2004).

Sonuç olarak, katı desteğe immobilize edilen enzimler, serbest enzimlere kıyasla birçok avantaj sunar ve endüstriyel uygulamalar için daha uygun bir seçenektir. İmmobilizasyon, enzimlerin stabilite, aktivite ve geri kazanılabilirlik gibi önemli özelliklerini optimize ederek,

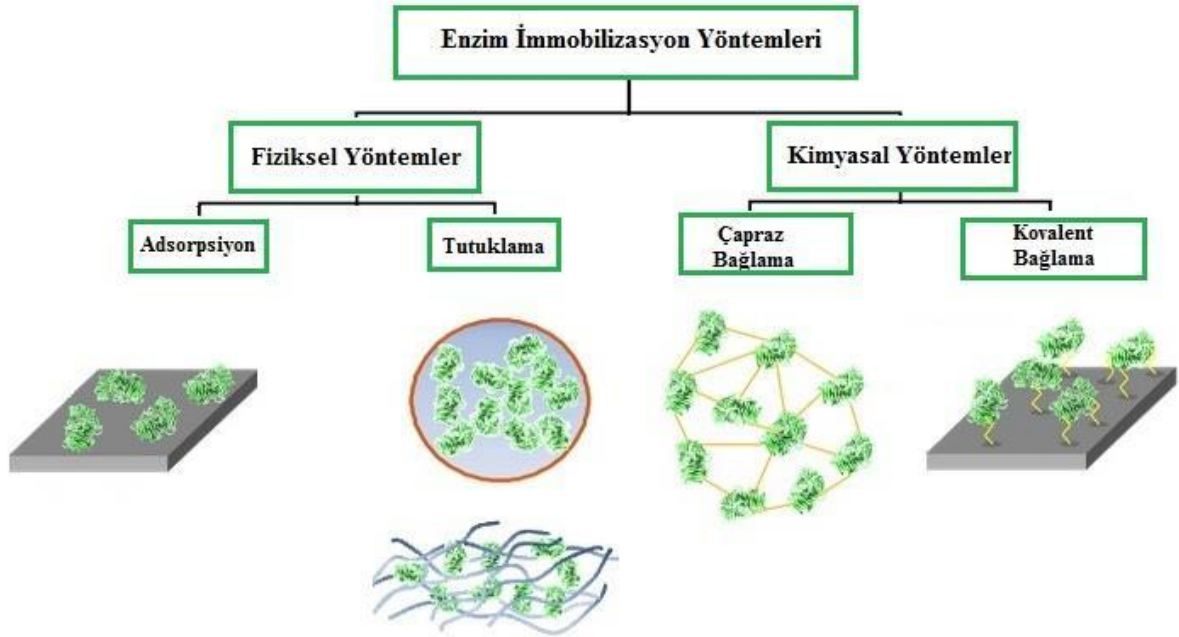
enzimlerin endüstriyel ölçekte kullanımının önündeki engelleri ortadan kaldırmaya yardımcı olur (Voberkova et al. 2018). Ek olarak immobilizasyon, enzim ayırma ve bir reaksiyon ortamında protein kontaminasyonunu önler veya en aza indirir (Nadar and Rathod 2018).

Enzim immobilizasyonunun temel hedefi, enzimlerin bir dizi reaksiyon döngüsünde ve biyoteknolojik uygulamalarda uzun süre boyunca tekrar kullanılabilir hale getirilmesidir, zira bu, daha yüksek katalitik verimlilik sağlayarak kayda değer bir avantaj sunmaktadır (Voberkova et al. 2018).

## Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Bir reaksiyondaki enzim aktivitesinin belirlenmesinde uygun bir immobilizasyon yönteminin seçimi son derece kritiktir. İmmobilizasyon yöntemleri kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak ikiye ayrılır. Fiziksel yöntemler, hidrofobik etkileşimler gibi daha zayıf ve kovalent olmayan bağlar, hidrojen bağları, bir enzimin matrise iyonik bağlanması ve van der Waals kuvvetleri gibi mekanik tutulumları içerir. Kimyasal yöntemlerde ise enzim ve matris arasındaki bağlantılar, eter, tiyoeter, amid veya karbamat bağları gibi kovalent bağlar aracılığıyla oluşturulmaktadır (Chiou and Wu 2004; Voberkova et al. 2018).

Temel olarak, üç geleneksel enzim İmmobilizasyon yöntemi vardır; bir desteğe (taşıyıcıya) bağlama, tutuklama (tuzaklama) ve çapraz bağlama (Sheldon 2017). **Şekil 1**'de enzim immobilizasyonu için uygulanabilecek yöntemler şematize edilmiştir.



**Şekil 1.** Enzim immobilizasyonunun temel ve alt yöntemleri (Sheldon 2017)

## **Kimyasal Yöntemler**

### **Kovalent bağlama**

Kovalent bağlama İmmobilizasyonunda kimyasal yöntemlerden biri olup, immobilizasyonda geleneksel bir metottur (Nisha *et al.* 2012). Enzimin karboksil, hidroksil, amino gibi fonksiyonel grup içeren desteğe kovalent bağlanması ile immobilizasyon gerçekleşir (Alagöz2007). Genellikle sulu ortamda ve gerçekleşmesi zor olduğundan ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı, nötral pH) meydana gelir. Enzim ve destek arasındaki etkileşim güçlü olup, bazen enzim aktivitesini artırabilmesi açısından önemlidir (Koçatürk2008). Yöntemin avantajları yanı sıra dezavantajları da mevcuttur. Güçlü bağlar içermesi, enzim sızıntısının çok az olması, enzimin stabil olması immobilizasyon yönteminin avantajlarıdır. Enzimde sterik modifikasyonların oluşabilmesi, enzim aktivitesinde azalma olabilmesi, geri dönüşümsüz bağlanma nedeniyle desteğin yeniden kullanılamaması kovalent bağlanma ile immobilizasyonunun dezavantajıdır.

### **Çapraz bağlama**

Çapraz bağlama ile İmmobilizasyon yönteminde küçük moleküllü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinlerdir. Çapraz bağlamada genellikle karşılaşılan düşük aktivite, tekrar kullanılabilirliğin düşük olması dezavantajlarından biridir (Sheldon *et al.* 2006).

## **Fiziksel Yöntemler**

### **Adsorbsiyon**

Adsorbsiyon genellikle destek maddesinin enzim çözeltisi ile temas ettirilmesi ve bir süre inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Adsorbsiyon geri dönüşümlü bir işlemdir. Adsorbsiyon, immobilizasyon için kolay ve kullanışlı bir tekniktir. Enzimler katı destek malzemeleri üzerine van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler tarafından adsorbe edilir (Bastida ve diğerleri 1998; Quilles Junior ve diğerleri 2016) veya mezogözenekli malzemelerin gözeneklerinde hareketsiz hale getirilir (Fan ve diğerleri 2003; Pang ve diğerleri 2016).

### **Tutuklama**

Enzimlerin zar gözeneklerine "fiziksel olarak hapsolması" olarak ifade edilir. Özellikle aşırı koşullarda (yani sıcaklık, pH, sert reaktifler) bozulabilen veya aktivitesini kaybedebilen

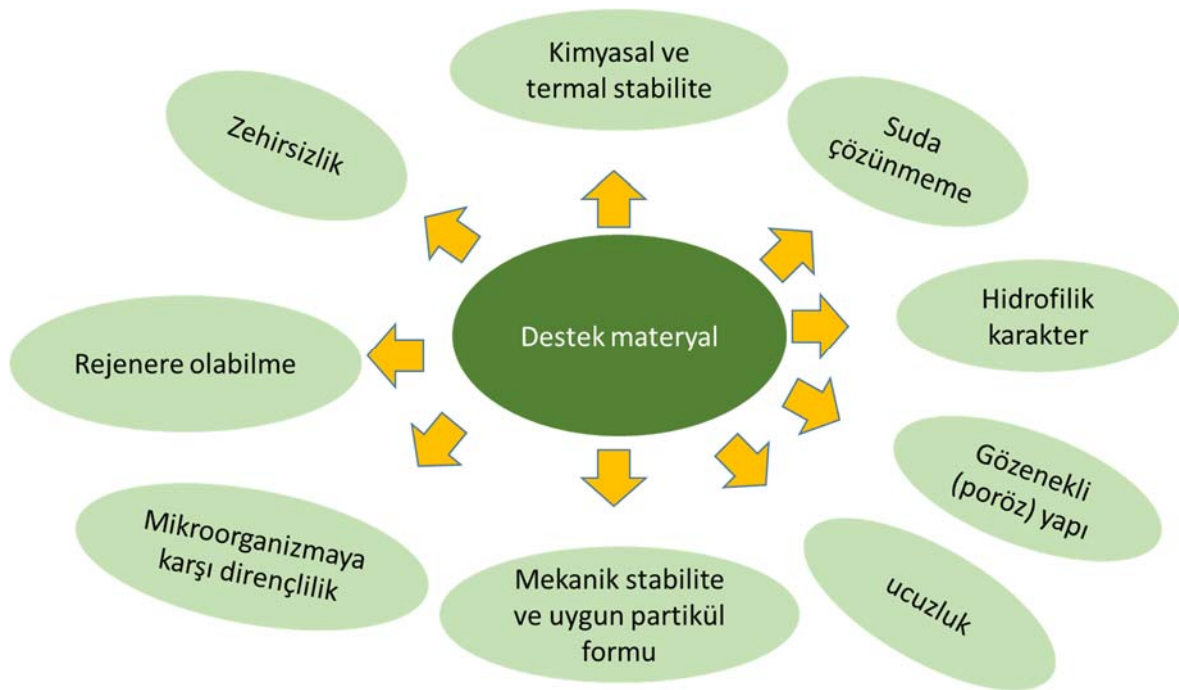
çok değişken biyomoleköl benzeri enzimler için geçerlidir. Tutuklama yoluyla enzim immobilizasyonu, enzimleri gözenekler içinde tutan ve substrat/ürün difüzyonunu sağlayan zarın gözenekliliğine dayanır. Kapana kısıtılmış /kapsüllenmiş enzimler çözelti içinde serbesttir ancak hareketleri desteğin yapısı tarafından kısıtlanmıştır ( Bhushan et al. 2008) .

Enzimlerin tutulması, zar matrisinin doğasına bağlıdır. Gözenek yüzeye açıksa, dış kuvvet eklemekten enzim tutmanın uygulanabilirliği vardır, ancak yüzeyden kolay ayrılma olasılığı vardır. Gözeneklerin/kanalların ince, yoğun bir tabaka ile kaplandığı asimetrik membran için, enzimlerin membran matrisine hapsolması, basınçlı koşullar ile yapılabilir. Enzim molekülleri yeterince sıkı, ince kontrollü gözenekli bir yapı içinde tutulduğu için, enzimin çevreleyen ortama sızması en aza indirilir. Ayrıca, aktif bölgelere erişilebilirlik ve substratın içeri ve dışarı hareketi gözeneklerde gerçekleşir ( Wang et al. 2007 ).

Tutuklama yöntemi kimyasaldan bağımsız olduğundan enzim aktivitesi etkilenmez. Basit olanıdır ve yüksek protein yüklenmesi mümkündür. Ayrıca, enzimin gözeneklerde paketlenmesi, kısıtlayıcı yapılar enzimlerin denatüre edici faktörlerden (pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi) korunmasına yardımcı olduğundan enzim stabilizesini artırır.

## Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri

Bir İmmobilize enzim sisteminin en önemli üç bileşeni enzim, destek materyal ve immobilizasyonda kullanılan yöntemdir. İmmobilizasyon için seçilecek desteğin özellikleri İmmobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Uygun destek materyali seçerken enzimin kimyasal yapısı, özellikleri ve kullanım amacı dikkate alınması gerekir. Bununla birlikte, birden fazla yaklaşımı denemek ve ardından belirlediğin yöntemi koşullara uyarlamak gerekir. O yüzden destek materyalin özellikleri, İmmobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde büyük önem taşır. İdeal taşıyıcı özellikleri arasında genel olarak bir taşıyıcının sahip olması gereken özellikler aşağıda gösterilen **Şekil 2**'de verilmektedir. (Brena and Batista-Viera 2006).



**Şekil 2.** Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyallerinin sahip olması gereken özellikler

Destek materyalleri kimyasal bileşimlerine göre organik ve inorganik olarak; ayrıca doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilir (Datta *et al.* 2013) Tablo 1’de enzim immobilizasyonu için kullanılabilecek bazı destek materyaller verilmiştir.

**Tablo 1.** Enzim İmmobilizasyonu İçin Kullanılan Bazı Destek Materyalleri (Zdarta *et al.* 2018).

| Doğal Materyaller                                                                        | Sentetik Materyaller                                                                              |                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Kitin<br>Aljinat<br><b>Nişasta</b><br>Agaroz<br>Selüloz<br>Keratin<br>Kitosan<br>Kolajen | Polistiren<br>Polianilin<br>Polipropilen<br>Poliakrilamid<br>Polivinil Alkol<br>Poliakrilik Asit  | <b>Organik<br/>Destekler</b>   |
| Silika<br>Zeolit<br>Bentonit<br>Diatomit<br>Hidroksiapatit<br>Montmorillonit             | Metal<br>Seramik<br>Aktif Kömür<br>Aktif Karbon<br>Titanyum Dioksit<br>Çinko Oksit<br>Bakır Oksit | <b>İnorganik<br/>Destekler</b> |

### ***Biyopolimer***

Biyopolimer, canlı organizmalarda bulunan doğal olarak oluşan organik maddelerdir. Geleneksel polimerler petrol kaynaklı olduğundan ve kullanılmaya başladıktan uzun bir süre toprağa karışmamalarından dolayı biyopolimerler, son zamanlarda bilim insanları tarafından daha sık araştırılmaya başlanmıştır. Ayrıca biyopolimerlerin farklı alanlarda kullanılmasıyla ilgili olarak üzerinde birçok araştırmanın yapıldığı çevreci (yeşil) ve biyobozunur malzemeler olduğu unutulmamalıdır (Yoruç ve Uğraşkan 2017).

### **Biyobozunur polimerler, elde edildikleri kaynağa göre;**

Biyobozunur polimerler, doğal ve sentetik olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu gruplar da kendi içlerinde kaynağına göre dört alt gruba ayrılır (Yoruç ve Uğraşkan 2017):

#### **1. Biyokütle ve Tarımsal Kaynaklı Polimerler:**

- **Polisakkaritler ve proteinler:** Selüloz ve türevleri, kitin, nişasta ve türevleri, lignin, pektin, dekstran, hyaluronik asit, alginat, agar, kollajen, jelatin, kazein, albümin, fibrin, fibrinojen, ipek, glüten, soya proteini

#### **2. Mikroorganizmalardan Elde Edilen Polimerler:**

- **Poliesterler:** Polihidroksi alkanoatlar (PHA), Polihidroksibutirat (PHB) ve Polihidroksibutirat-kovalerat (PHBV)

#### **3. Biyokaynaklı Monomerlerden Elde Edilen Polimerler:**

- **Poliesterler:** Polilaktidler (PLA), Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA), Polilaktik-koglikolik asit (PLGA)

#### 4. Petrol Kaynaklı Polimerler:

- Alifatik ve aromatik polimerler: Polikaprolakton (PCL), Poliesteramid (PEA), Poliüretan (PU), Poli(ortoesteramid) (POEA), Polibütlen süksinat (PBS), Polibütlen adipat tereftalat (PBAT)

#### Biyobozunur Polimerler ile Petrol Türevli Polimerler Karşılaştırılması;

Petrol türevli polimerler çevre kirliliğine, toksik madde birikimine sebep olma gibi bir çok dezavantajlarına sahip olmasına rağmen; elastikiyet, kolay şekil alma, fiziksel ve mekanik özelliklerinin katkı ve dolgu maddeleriyle iyileştirilebilmesi, laboratuvar şartlarında istenilen özelliklerin geliştirilmesindeki sınırsızlık, hijyen ve nem almama, iletkenlik, yalıtkanlık ve ucuzluk gibi nedenlerden dolayı tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Ancak laboratuvar şartlarında elde ettiğimiz petrol türevli polimerler kısa zaman içinde doğada bozunmayıp uzun sürelerde bozundukları için çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı biyobozunur yenilebilir polimerlerin üretimi son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Petrol kaynaklı polimerlerin yerine doğal bitkilerden yararlanılan biyobozunur polimerlere yönelik araştırmalar ve çalışmalar artmıştır. Petrol türevli polimerler, organik ve anorganik maddelere kıyasla daha sağlam malzemeler olarak bilinmektedir. Biyobozunur polimerlerin çoğu yenilenebilir kaynaklardan elde edilmektedir. Günümüzde fosil tabanlı üretilen plastiklerin ve diğer plastik malzemelerin yerini biyobozunur polimerler almaktadır.

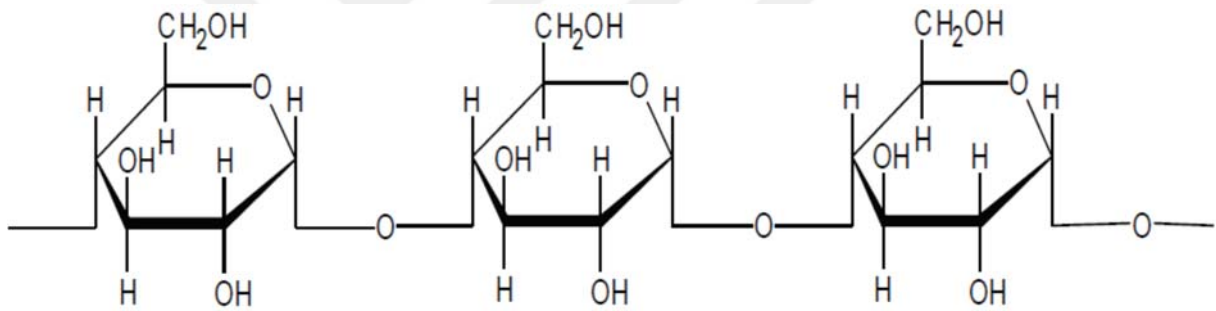
Biyobozunur polimerlerin geleneksel plastıklere göre avantajları aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

1. Petrol türevli polimerlere oranla, biyobozunur polimerlerin üretiminde daha az enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır.
2. Petrol türevli polimerlere göre doğada daha kolay ve daha kısa sürede biyo bozunma gerçekleşmektedir.
3. Petrol gibi fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmakta ve daha çevre dostu, daha sağlıklı ürün sağlamaktadır (Felix *et al.* 2017).

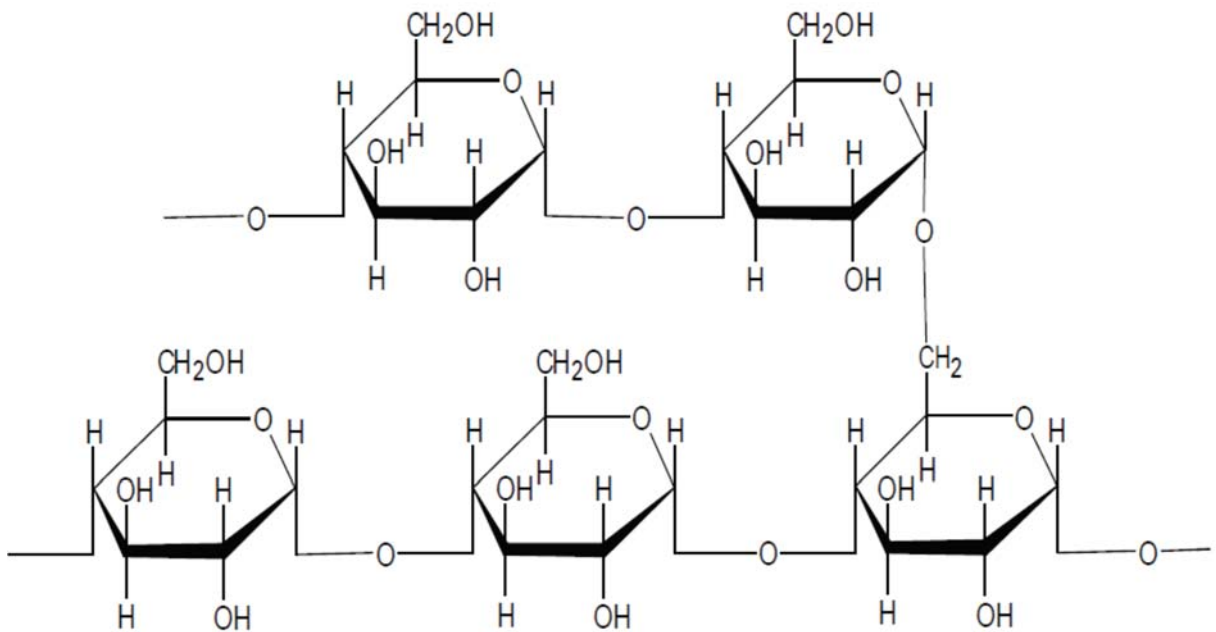
## Nişasta

Biyopolimer olarak nişasta, çok çeşitli mahsullerden elde edilen doğal yenilebilir bir karbonhidrat polimeridir ve biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin etimi için en çok çalışılan ve gelecek vaat eden hammaddelerden biridir. Nişasta, çoğu sentetik plastiğe kıyasla düşük maliyetli bir malzemedir ve kolayca temin edilebilir. Nişasta, deterjanlar ve böcek öldürücüler için suda çözünür poşetler, yıkanabilir astarlar, torbalar, tıbbi dağıtım sistemleri ve cihazları gibi ürünlerin potansiyel etimi için geniş çapta araştırılmıştır (Fishman *et al.* 2000). Nişasta, esas olarak sırasıyla amilopektin ve amiloz olmak üzere glikoz moleküllerinin dallı ve lineer zincirlerinden oluşur. Amiloz lineer bir moleküldür, Amilopektin ise oldukça dallı bir yapıya sahiptir. Amiloz birimlerinin fazla olduğu nişasta yapıları daha gl filmler verir. Amilopektinin dallı yapısı, genel olarak çekme geriliminin azaltılması gibi farklı mekanik özelliklere sahip filmlere yol açar (Tharanathan 2003). Amiloz ve amilopektinin yapısı şematik olarak **şekil 3**'de gösterilmiştir.

a)



b)



**şekil 3.** a) Amiloz, b) Amilopektin yapısı (Yoruç ve Uğraşkan 2017)

Nişasta, sürekli bir matris oluşturma kabiliyetine sahip olduğu ve yenilenebilir ve bol bir kaynak olduğu için biyolojik olarak parçalanabilen filmler geliştirmek için kullanılan en önemli polisakarit polimeridir ( Lourdine *et al.* 1995). Bununla birlikte, nişasta, geleneksel sentetik polimerlere kıyasla güçlü bir hidrofilitik karakter (suya duyarlılık) ve zayıf mekanik özellikler gibi çeşitli dezavantajlar sergiler ( Averous and Boquillon, 2004), bu da onu (gıda, plastik ambalaj, ilaç tekstil...) bazı endüstriyel uygulamalar için yetersiz kılar.

Son zamanlarda, nanoteknoloji bu sorunların çözülmesine yardımcı olmuştur. Polimerler ve nanopartiküller içeren kompozit malzemeler, gıda paketleme gibi birçok endüstriyel alanda uygulama bulan yüksek performanslı yeni malzemeler sağlayabilir. Nanodolgu maddeleri geniş spesifik yüzey alanına ve yüksek yüzey enerjisine sahiptir, bu nedenle polimerde mükemmel ara yüzey etkileşimlerine sahiptirler ve mekanik, termal ve bariyer özellikleri gibi polimer özelliklerini önemli ölçüde geliştirirler (Oleyaei *et al.* 2010).

#### ***Nanopartikül (metal -oksit)***

Biyofilmlere nanopartiküllerin katılması fizikokimyasal özellikleri iyileştirilmiş filmler elde etmeye olanak sağlar. Nanometre boyutlarında dolgu maddeleri içeren biyopolimer nanokompozitlerin üretimi, biyopolimer filmlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için en yeni yöntemlerden biridir. Biyofilmlere nanopartikül olarak kullanılan inorganik malzemelerden biri de metal oksitlerdir. Titanyum dioksit gibi nanoaltın, nanogmş ve metal oksitler ve metal atomlarından türetilen kuantum noktaları gibi yakından paketlenmiş yarı iletkenler metal bazlı nanoparçacıklardır. Metalik nanopartiküller genellikle katı kolloidal zeltileler olarak oluşturulur. Ayrıca, geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olduklarından, hedef işlevselliğe ulaşmak için yüzey modifikasyonuna müsaittirler. ubuk, nokta veya kp gibi farklı formlarda sentezlenebilirler ve genellikle floresan veya yüzey geliştirilmiş rezonans gibi özel optik özellikler sergileyerek düşük konsantrasyonlarda kolay algılamaya ve dolayısıyla görüntüleme uygulamalarına izin verirler. Biyofilmlere dâhil edilen bu metal oksitler, yüzey malzemeleri ile etkileşime girerek biyomalzemelerin mekanik mukavemetini arttırmak için kullanılabilirler (Pandit and Gayatri 2020).

#### ***Hibrit ve kompozit malzemeler (İşlevselleştirilmiş polimer/biyopolimer)***

Nanometre boyutlarında dolgu maddeleri içeren biyopolimer nanokompozitlerin üretimi, biyopolimer filmlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için son yıllarda ilgi gören yenilikçi bir yöntemdir. Biyofilmlerde nano dolgu maddelerinin kullanımı, daha geniş bir uygulama yelpazesine sahip yeni ve gelişmiş özelliklere sahip biyokatalitik sistemlerin geliştirilmesine olanak tanır (Liu *et al.* 2016). Hibrit ve kompozit malzemeler, tek

bileşenlerinde bulunmayan özellikler gösterebilir. Bu tür malzemeler, enzim ve destek arasındaki etkileşimleri stabilize ederek biyokatalizörleri reaksiyon koşullarına karşı mekanik olarak daha dirençli ve kararlı hale getirebilir. Ayrıca hibrit desteklerin, biyomoleküller için yüksek katalitik aktiviteyi koruyan uygun bir ortam sağladığı da bilinmektedir.

Nanokompozitlerin kullanımı, biyopolimer filmlerin aşağıdakiler gibi birçok önemli özelliğini geliştirmeye yardımcı olabilir:

- Mekanik mukavemet
- Gaz geçirgenliği
- Bariyer özellikleri
- Termal stabilite
- Antibakteriyel aktivite
- Biyokatalitik aktivite

Bu gelişmiş özellikler, biyopolimer filmlerin gıda ambalajı, biyomedikal cihazlar, doku mühendisliği ve diğer birçok alandaki uygulama alanlarını genişletmeye yardımcı olabilir (Liu et al. 2016).

Kompozit desteklerin kullanımı, enzim immobilizasyonu için birçok önemli avantaj sunar. Bu avantajlar, geniş katalitik sınıflara ait enzimlere uyumluluğu da kapsar. Bu nedenle, enzim immobilizasyonu için ideal destek materyalleri arayışında, aşağıdaki hibrit veya kompozit materyallere özel dikkat gösterilmelidir:

### ***Organik-inorganik kompozit malzemeler***

Hem organik hem de inorganik kökenli çok çeşitli materyaller, enzimlerin immobilizasyonu için hibrit veya kompozit destekler oluşturmak üzere birleştirilebilir.

Organik-inorganik melezler, enzimler için son derece umut vadeden bir destek malzemesi sınıfıdır. Bu melezler, biyolojik moleküllere karşı yüksek afinite ve stabilite ile mekanik direnç sunma yeteneğine sahiptir. Bu özellikler, inorganik bileşenlerin yüksek stabilitesinden ve kimyasal inertliğinden ve organik bileşenlerin (sentetik polimerler ve biyopolimerler) enzimleri bağlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Organik bileşenlerin yapısında, biyokatalizörlerin kimyasal gruplarıyla etkileşime girebilen birçok fonksiyonel grup bulunur. İşlevselleştirilmiş polimerler ve biyopolimerler son yıllarda yoğun araştırma konusu olmuştur ve madencilikten mikroelektronığa, deiyonizasyondan dekontaminasyona, sentezden

ilaç dağıtımına kadar geniş bir yelpazede uygulama alanı bulmuştur. Bu malzemelerin enzim immobilizasyonu için kullanımı da oldukça ilgi çekicidir. (Zhang et al. 2015).

Bir biyopolimer olarak nişasta ZnO NP, CuO NP, Ag NP ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NP gibi metal/metal oksit NP ile fonksiyonel biyopolimerler geliştirmek için kullanılmıştır. (Hannon *et al.* 2015; Maleki and Kamalzare 2014). Nişasta, yüzeyindeki büyük hidroksil grupları sayesinde yüzey modifikasyonu yoluyla kolayca işlevselleştirilebilir. Fonksiyonel biyopolimerler hazırlamak için nişastayı şablon olarak kullanarak Ag NP, ZnO NP, CuO NP ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NP gibi metal NP ile bir hibrit oluşturmak önemli bir yaklaşımdır (Shankar *et al.* 2018). Hibrit nişasta/metal veya metal oksit NP bileşikler yüksek antibakteriyel aktivite, mükemmel katalitik performans ve elektriksel iletkenlik gösterir (Khandanlou *et al.* 2016) ve mekanik özellikleri, UV- biyopolimer filmlerin bariyeri, termal stabilitesi ve antimikrobiyal aktivitesi (Fortunati *et al.* 2013) ve ayrıca fonksiyonel hidrojel ve aerojel (Dong *et al.* 2013) ve emici pedler hazırlamak için oldukça uygundur.

### **Laktopeksidaz (LPO) Enzimi**

Laktopeksidaz (LPO) enzimi, hidrojen peroksit oksidoredüktaz olarak sınıflandırılan EC 1.1.11.7 numaralı enzim grubuna ait olup, sığır sütünde bolluğu ile bilinen önemli bir enzimdir. 612 aminoasit zincirinden oluşan LPO, yaklaşık 78-80 kDa molekül ağırlığına sahip, glikozile globüler, demir ve kalsiyum içeren bir glikoproteindir. İlk kez 1943'te sığır sütünde tanımlanan LPO, daha sonra tükürük, gözyaşı ve solunum yolları gibi çeşitli ekzokrin salgılarda bulunmuştur (Özdemir *et al.* 2001, 2002).

LPO'nun izoelektrik pH değeri yaklaşık olarak 9,2'dir; bu enzim, bazik bir proteindir, ancak asidik pH'da da etkinliğini sürdürebilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında, LPO enzimi, psödohalojenürleri ve halojenürleri dönüştüren peroksidadlar ailesine aittir. LPO'nun biyosidal aktiviteleri, patojenik virüslere ve mikroplara karşı etkili olan hipohalöz ve hipotiyosiyanoz asitleri içerir (Wever *et al.* 1982).

Laktopeksidaz, hidrojen peroksit varlığında tiyosiyanat anyonun oksidasyonunu antibakteriyel hipotiyosiyanata katalize etmektedir (Morimoto *et al.* 2012) ve oluşan hipotiyosiyanat ve diğer ürünler bakteriyel metabolik enzimlerin işlevini bozmaktadır (Mazri *et al.* 2011).

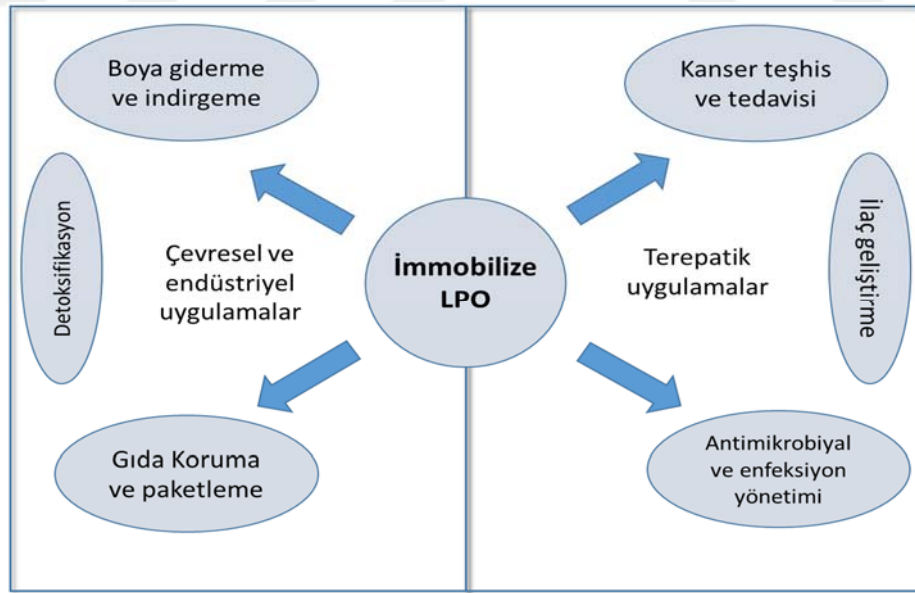
### **Laktopeksidaz sistem**

Laktopeksidaz sistemi (LPOS), geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu için patojenik mikroorganizmalarla savaşmak için mükemmel bir sistem olarak tanımlanmıştır. Bu enzim sistemi, Gram-negatif bakteriler üzerinde bakterisidal bir etki ve Gram-pozitif bakteriler

üzerinde bir bakteriyostatik etki göstermiştir (Seacheol *et al.* 2005). Laktoperoksidaz sistem, *Listeria monocytogenes* ve *S. aureus*'un ısı hassasiyetini artırır ve aynı zamanda anti-kanserojen ve anti-fungal özelliklere sahiptir (Panwar 2014). Ek olarak, mantar önleyici (Jacob *et al.* 2000) ve antiviral aktiviteye sahip olduğu da gözükmiştir (Pakkanen and Aalto 1997; Seifu *et al.* 2005). Bu sistem, hipotiyosiyanat (OSCN<sup>-</sup>) ve hipotiyosiyanik asit (HOSCN) gibi ara antimikrobiyal ürünler üretir. Bu oldukça reaktif ürünler, mikrobiyal enzimlerin sülfhidril gruplarının oksidasyonu ile mikroorganizmaları inhibe eder (Martínez-Camacho *et al.* 2010). Tiyosiyanata ek olarak iyodun varlığı, *Candida albicans*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroplara karşı mantar öldürücü ve bakteri öldürücü etkiyi artırır (Bosch *et al.* 2000).

### Laktoperoksidaz enziminin (LPO) uygulama alanları

LPO, başta ilaç ve gıda endüstrileri olmak üzere farklı endüstrilerde geniş uygulamalara sahiptir. Bu nedenle, gıda endüstrisi, kozmetik, tümör tedavisi ve ilgili ürünlerin yanı sıra ilaçlarda, antiviral ajanlarda ve geliştirilmekte olan diş macunlarında koruyucu madde olarak kullanılır (Kussendrager and van Hooijdonk 2000; Flemmig *et al.* 2016). Hareketsizleştirme, absorpsiyon veya tutuklama yoluyla matris polimerlerine dahil edilen LPO, biyoteknolojik alanlarda faaliyet göstermektedir.



**Şekil 4.** LPO'nun immobilizasyonunu çoklu biyoteknolojik uygulamalarına genel bakış şeması (El-Fakharany 2021).

## Çalışmanın Amacı

Laktoperoksidaz (LPO), inorganik ve organik substratların hidrojen peroksit tarafından oksidasyonunu katalize eden ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip bir enzim olup bu tez kapsamında, sığır sütünden afinite kromatografisi tekniği kullanarak saflaştırılması ve nişasta ve metal oksit (NiO, MgO, ZnO) içeren biyonanofilmlere immobilizasyonu için yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlandı.

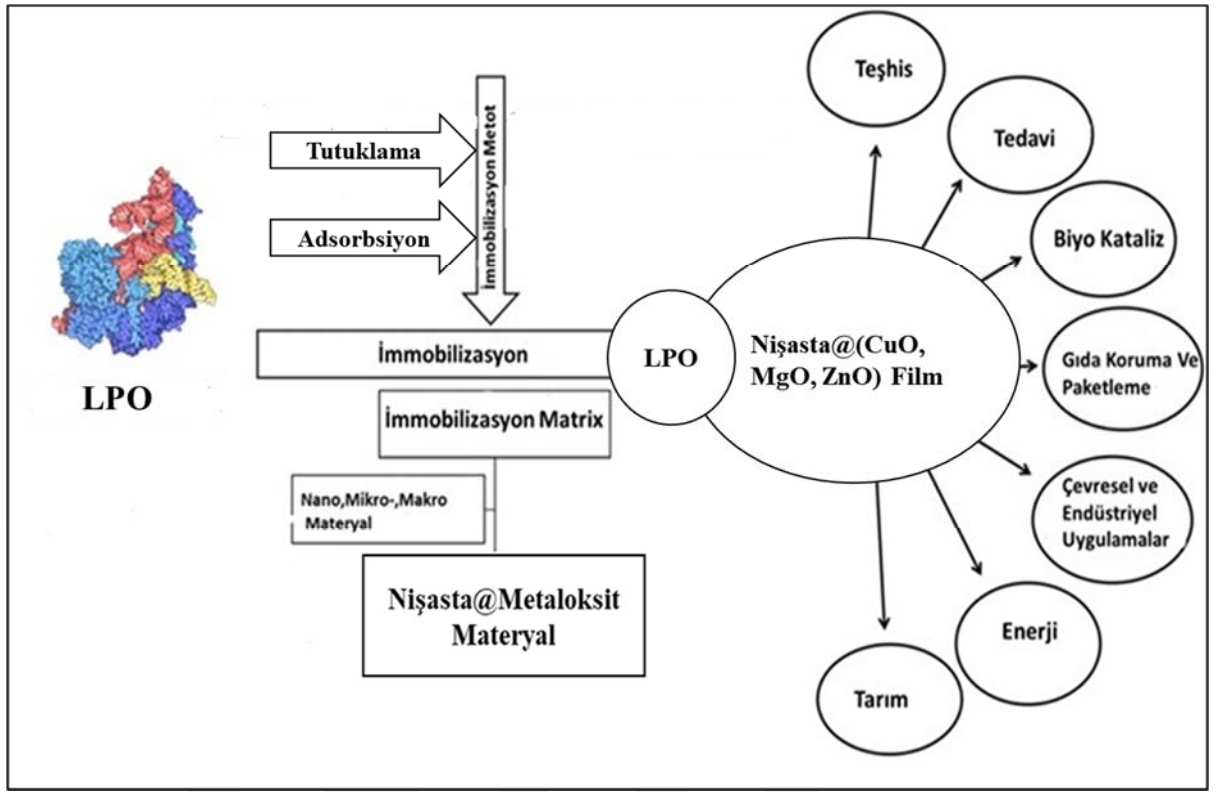
Bu amaçla, süttten laktoperoksidaz (LPO) enzimi afinite kromatografisi tekniği kullanarak saflaştırıldı ve elde edilen saf enzim, farklı yöntemler kullanılarak immobilize edildi. İmmobilizasyon için nişasta ve MgO, ZnO ve CuO nanopartiküllerinden oluşan nişasta@metal oksit biyonanofilmleri sentezlendi. Sentezlenen biyonanofilmlere LPO enzimi tutuklama ve yüzey adsorbsiyonu olmak üzere iki farklı yöntemle immobilize edildi.

Sentezlenen biyonanofilmlerin karakterizasyonu için yüzey kimyasal yapı analizi, yüzey morfolojik incelemeler ve kristal yapı analizi yapıldı. Ayrıca, hazırlanan biyonanofilmlerin optimum pH, optimum sıcaklık ve termal kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı da incelendi.

Son aşamada, nişasta@metal oksit ve nişasta@metal oksit/LPO biyonanofilmlerinin antibakteriyel etkisi çeşitli bakteri türlerine karşı test edildi. Elde edilen sonuçlar, LPO immobilizasyonu için geliştirilen yeni yöntemin antibakteriyel uygulamalarda potansiyelini ve etkinliğini gösterdi.

Bu çalışmanın tamamlanmasıyla, LPO enziminin immobilizasyonu için yeni bir yöntem geliştirilerek bu yöntemin antibakteriyel uygulamalarda potansiyeli değerlendirildi.

Bu amaçla hedeflerimiz aşağıdaki grafikte özetlenmiştir:



Şekil 5. Enzim immobilizasyon sisteminin grafiksel özeti

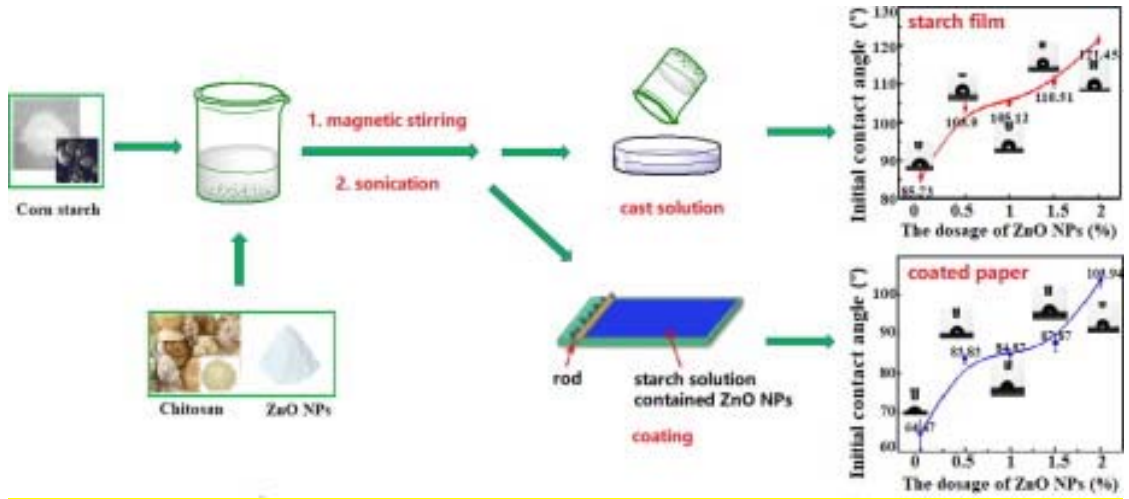
## KURAMSAL TEMELLER

İmmobilizasyon tekniklerini ele alan enzim mühendisliği, enzim fonksiyonlarını ve stabilitesini geliştirmek için kimyasal veya biyolojik yaklaşımları iyi bir şekilde kullanan son yılların önemli alanlarından biridir. Farklı yöntemlerle birçok farklı destek materyali kullanılarak geliştirilen immobilize enzim sistemleri serbest enzimlere göre çeşitli üstünlükler sağladığından yoğun olarak çalışılmaktadır.

Yenilebilir film ve kaplamaların kullanımı yeni bir uygulama olmamakla birlikte, son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır. Çin’de limon ve portakallarda nem kayıplarını azaltmak amacıyla mumla kaplanması bu konudaki ilk bulgulardır. Aynı amaçla 16. yüzyılda Avrupa’da etlerin yüzeyi yağlarla kaplanmış, yağlarla beraber jelatin kaplamaların kullanılmaya başlanması 19. yüzyılda gerçekleşmiştir (Krochta and Johnston 1997).

Önceden pişirilmiş et ürünlerinin ana sorunlarından biri, buzdolabında saklama sırasında acı bir tada neden olan lipit oksidasyonuna duyarlı olmalarıdır (St. Angelo et al. 1987). Antioksidan içeren yenilebilir kaplamalar, bu ürünlerin kalitesini kontrol etmek için bir alternatif olarak incelenmiştir. Örneğin, nişasta-aljinat, nişasta-aljinat-tokoferol ve nişasta-aljinat-biberiye kaplamalarının, önceden pişirilmiş, soğutulmuş domuz pirzolası ve sığır köftesindeki kötü tatları azalttığı rapor edilmiştir. Tokoferol içeren filmlerin tokoferol içermeyen kontrollerden daha etkili olduğu belirtilmiştir (Hargens-Madsen et al. 1995; Handley et al. 1996).

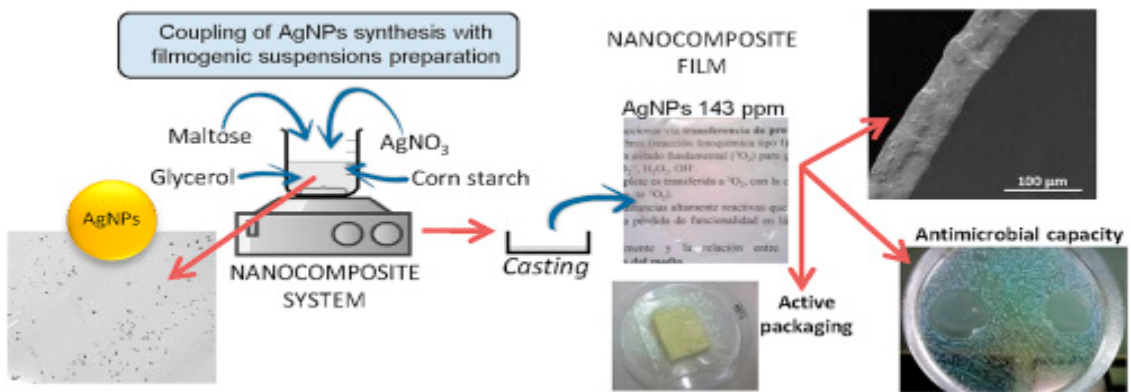
Ni ve grubu, hidrofobikliğin nemli malzemelerin kullanılabilirliğini ve işlevselliğini geliştirebileceğinden, nişasta filmlerinin veya kâğıtlarının hidrofobik davranışını geliştirmeye yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada, ZnO nanoparçacıkları (NP'ler), ultrasonik ve manyetik karıştırma altında nişasta çözeltisine dâhil edilmesi, nişasta filminin hidrofobikliğini önemli ölçüde arttırmıştır. Elde edilen filmin ve %2 (ağırlık) NP içeren kuşe kâğıdın temas açıları sırasıyla 85,73°'den 121,45°'ye, 64,47°'den 103,94°'ye yükseltilmiştir (Şekil 6). Kapsamlı karakterizasyonlardan elde edilen sonuçlar, nişasta filminin yüzeyinde ZnO nanoparçacıkları tarafından oluşturulan hiyerarşik yapının yanı sıra kaplanmış kâğıt üzerinde bozulmamış katmanların oluşumunu doğrulanmıştır (Ni et al. 2018).



**Şekil 6.** Çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler) içeren aktif kompozit nişasta filmleri çalışması

Florencia Ortega ve arkadaşları nişasta filmlerine belirli konsantrasyonlarda Ag NP ilave etti. Ayrıca, AgNP'ler matris takviyesine izin vererek daha dayanıklı ve tok bir malzeme geliştirildi. SEM görüntüleri pürüzsüz ve homojen yüzeylere sahip olduğunu gösterdi. 71.5 ppm'den daha yüksek Ag NP konsantrasyonları içeren nanokompozit filmler gıda kaynaklı hastalıkların çoğundan sorumlu olan (*E. coli* ATCC ve *Salmonella*) mikrobiyal saldırılara karşı bütünlüklerini daha iyi korudukları için seçmişlerdir. Filmlerin taze peynir numunelerinin raf ömrünü 21 gün uzatmayı başardığı tespit edilmiştir. Bu makalede mısır nişastasına Ag NP'ler ilave edilerek antimikrobiyal özellik kazandırılmıştır (Ortega et al. 2017).

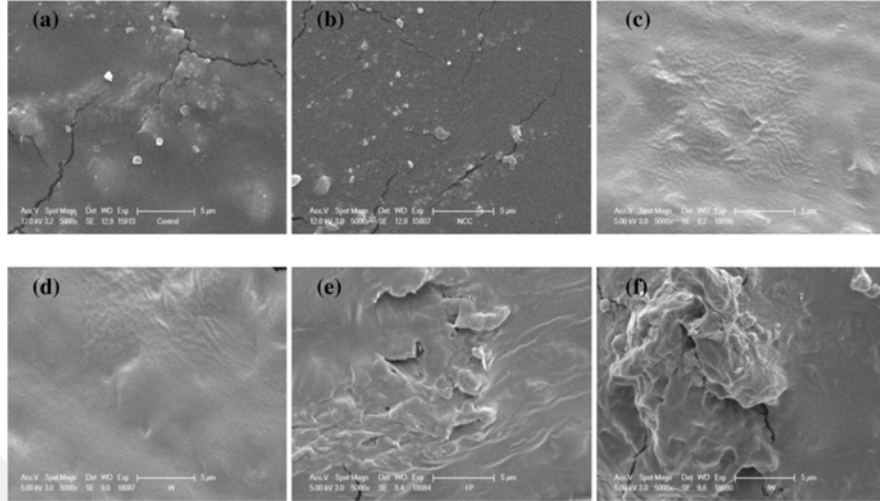
Florencia Ortega ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar Şekil 7'de grafize edilmiştir.



**Şekil 7.** Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) içeren aktif kompozit nişasta filmlerinin çalışması

Diğer bir çalışmada mısır nişastasını ve gliserolden esnek bir film geliştirilmiştir. Mekanik ve geçirgenlik özelliklerini geliştirmek için filme kristalli nanoselüloz (CNC) eklenmiştir. Antibakteriyel ambalaj yapmak için laktik asit bakterilerinden izole edilen bakteriyosin nişasta filmine katılmıştır. Hareketsizleştirilmiş kristalli nanoselüloz (BIN) nişasta filmlerine

antibakteriyel ajanlar olarak dâhil edilmiştir. BIN'in dahil edilmesi ile gelişmiş gerilme mukavemeti, antibakteriyel aktivite ve biyolojik olarak parçalanabilirliği göstermiştir. Mısır nişastası filminde farklı dolgu maddelerinin düzgün dağılımına ait SEM görüntüleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



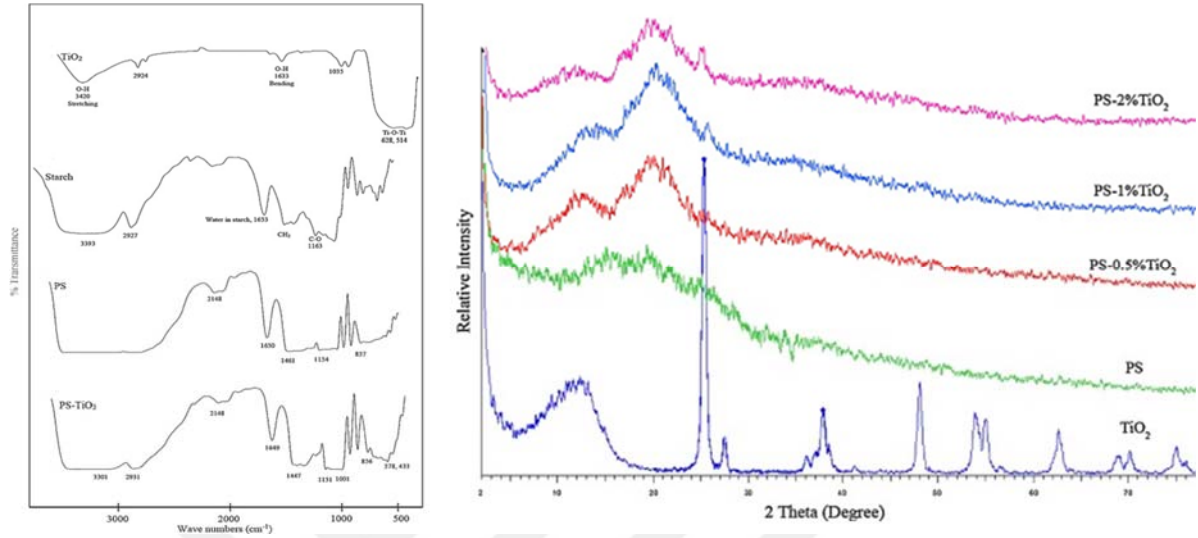
**Şekil 8.** (a) Kontrol filmi, (b) CNC filmi, (c) *P. acidilactici*'den bakteriyosin, (d) *E. faecium*'dan bakteriyosin (e) BIN (*P. acidilactici*'den) (e) ve (f) BIN (*E. faecium*'dan)

Mısır nişastası filminde farklı dolgu maddelerinin düzgün dağılımı SEM çalışması ile gösterilmiştir. Nişasta filmlerinin suda çözünürlüğü CNC ile birleştirildikten sonra %36 BIN ile birleştirildiğinde ise %41-46 arasında artış meydana gelmiştir, ancak bakteriyosinlerin eklenmesi nedeniyle %19-23 arasında bir azalma meydana gelmiştir. AFM tarafından analiz edilen BIN ile birleştirilmiş filmlerin yapısı oldukça iyi görüntülere sahiptir. Ayrıca bakteriyosin içeren filmler 2 hafta içinde bozulurken, BIN eklenen filmler 4 hafta boyunca bozulmadan kalmıştır (Bagde and Nadanathangam 2019).

Ghanbarzadeha ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada döküm yöntemiyle, değişen konsantrasyonlarda (%0-20, W/W) sitrik asit (CA) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren bir dizi mısır nişastası filmi üretmişlerdir. Sitrik asit (CA) ve karboksimetil selüloz (CMC)'nin nişasta filmi üzerinde su buharı geçirgenliği (WVP), çözünürlük ve çekme özellikleri araştırılmıştır. Su buharı bariyer özelliği ve nihai gerilme mukavemeti (UTS) önemli ölçüde iyileştirilmiştir ( $p < 0.05$ ). CA yüzdesi 0'dan %10'a (W/W) yükseldikçe 6.57 MPa'ya %20 CMC içerenler için 16.11 MPa yükseldi. %15 (W/W) CMC seviyesinde, nişasta filmleri en düşük WVP değerlerini ( $2,34 \times 10^{-7} \text{ g Pa}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) göstermiştir. (Ghanbarzadeha *et al.* 2011).

Oleyaei ve arkadaşları,  $\text{TiO}_2$  nanopartiküller (ağırlıkça %0,5, 1 ve 2) içeren patates nişastası filmleri geliştirmişlerdir. Farklı  $\text{TiO}_2$  içeren nanokompozit filmlerin su ile ilgili özellikler, mekanik özellikler ve UV geçirgenliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Filmlerin

morfolojisini ve termal özelliklerini karakterize etmek için XRD ve FTIR analizleri kullanılmıştır (Şekil 9). Sonuçlar,  $\text{TiO}_2$  nanoparçacıklarının su ile ilgili özelliklerin değerlerini önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur (su buharı geçirgenliği: %11–34; suda çözünürlük: %1,88–9,26; nem alımı: %2,15–11,18).

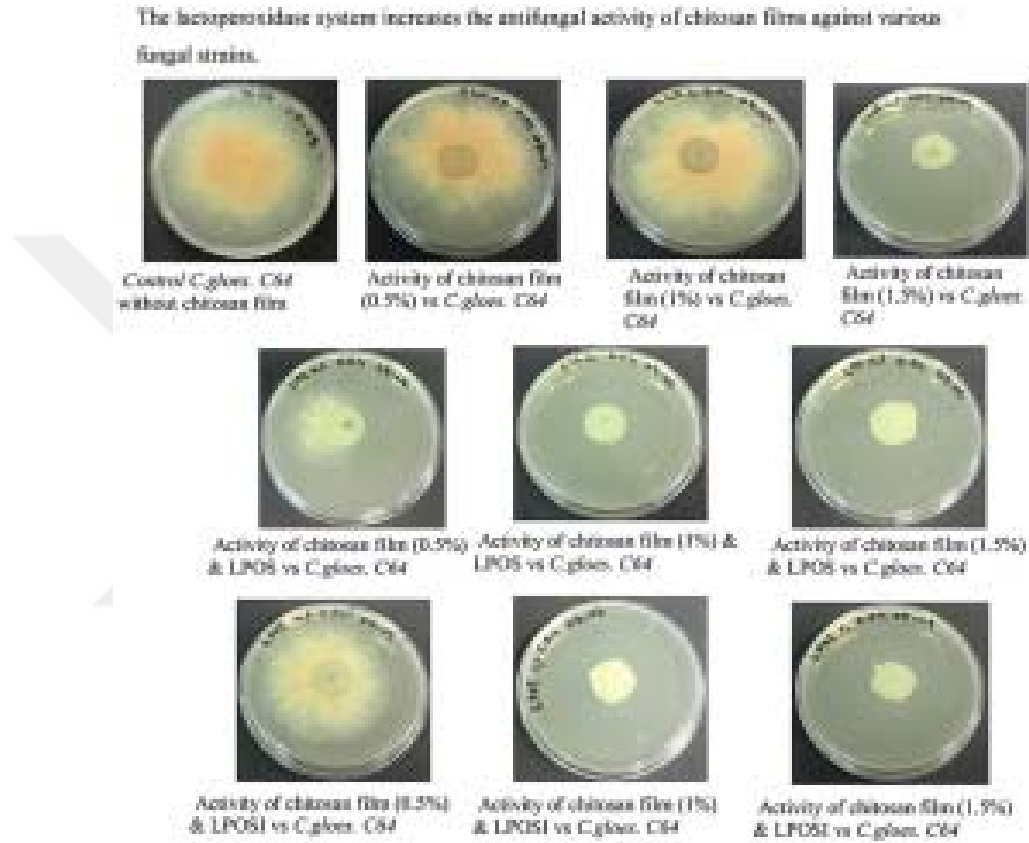


**Şekil 9.** Patates nişastası ve  $\text{TiO}_2$  nanoparçacıklarından elde edilen yeni bir nanokompozit nişasta filmlerinin XRD ve FT-IR spektrumu

Şekil 9’da XRD çalışmasının sonucu,  $\text{TiO}_2$  nanoparçacıklarının sınırlı topaklaşması nedeniyle,  $\text{TiO}_2$ ’nin ortalama kristal boyutunun arttığını göstermişlerdir. Nişasta ve nanoparçacıkların hidroksil grupları arasında yeni hidrojen bağlarının oluşumu FTIR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak,  $\text{TiO}_2$  nanopartiküller, patates nişastası filminin fonksiyonel özelliklerini iyileştirmiş ve gıda paketlenme uygulamaları için potansiyeli genişlettiği söylenmiştir (Oleyaei *et al.* 2016).

Peighambardoust ve grubu nişasta (St) bazlı (Ag, ZnO, CuO) nanopartikülleri içeren nanokompozit filmler sentezlemişlerdir. Sonuçlar, St-ZnO filminin, her bir NP’nin ağırlıkça %2’sinde St/Ag ve St/CuO filmlerinden daha yüksek gerilme mukavemetine sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Ag-ZnO-CuO NP’lerin bir kombinasyonunu içeren film, St/Ag filmkinden daha yüksek bir gerilme mukavemeti ve Young modülünü göstermişlerdir. Kontrol (saf nişasta) filminin kırılma %’sindeki uzama en yüksek olduğu belirtilmiştir. Bunu diğer nanokompozit filmler izlemiştir. St-ZnO (%3) filminin suda en düşük çözünürlüğe Ultraviyole spektroskopisinde de en yüksek UV absorbansına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hazırlanan (St-Ag) ve (St-CuO) filmleri yüksek antibakteriyel özellik göstermiştir. Sırasıyla E. coli ve S. aureus NP konsantrasyonunun ağırlıkça %1’den %3’e çıkarılmasıyla bu etki daha da artmıştır. (Peighambardoust *et al.* 2019).

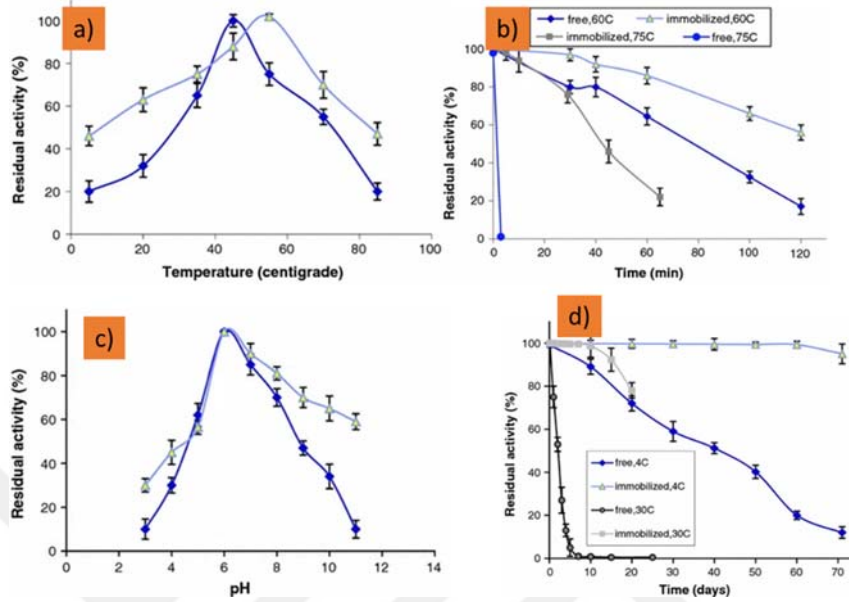
Mohamed ve grubu farklı konsantrasyonlarda (%0,5, 1 ve 1,5) doğrudan kitosan filmlerine Laktoperoksidaz enzimini dahil ederek laktoperoksidaz sisteminin (LPOS) etkileri incelenmiştir. Disk çapı tekniği ile elde edilen antibakteriyel etki, LPOS ile birleştirilmiş ve/veya iyot içermeyen %1 ve %1,5 (ağırlık/ağırlık) kitosan konsantrasyonunun daha yüksek *X. campestris* pv. *M. Indica* tek başına veya LPOS ile dahil edilen %0,5'lik düşük konsantrasyonda kitosan filminden daha fazla olduğu bulunmuştur. **Şekil 10**'da antifungal çalışmalar gösterilmiştir (Mohamed *et al.* 2012).



**Şekil 10.** Laktoperoksidaz sistemi, çeşitli mantar suşlarına karşı kitosan filmlerin antifungal aktivitesi

Mecitoglu and Yemenicioglu (2006) tarafından toyopearl-SP katyon değişim kromatografisi ile sığır peynir altı suyundan doğrudan saflaştırılan ve destek maddesi olarak dekstran kullanılarak liyofilize edilen laktoperoksidaz (LPS), -18 °C'de yaklaşık 15 ve 30 günlük depolamadan sonra aktivitesinin yaklaşık %70 'ını koruduğu belirtilmiştir. Sırasıyla hazırlanan LPS'nin 0,08 ve 0,69 mg/cm<sup>2</sup> (516–4325 U/cm<sup>2</sup>) arasındaki aljinat filmlere dâhil edilmesi enzimin çoğunun immobilizasyonuna neden olduğunu bulmuştur. İmmobilize edilmiş LPS'nin optimum pH 6.0'da gözlenmiştir, ancak enzim aktivitesinin %30-85'ini pH 3,0 ile 7,0 arasında devam etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, farklı gıdalarda doğal bir antimikrobiyal mekanizma oluşturmada LPS içeren aljinat filmlerin iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Mecitoglu and Yemenicioglu 2006).

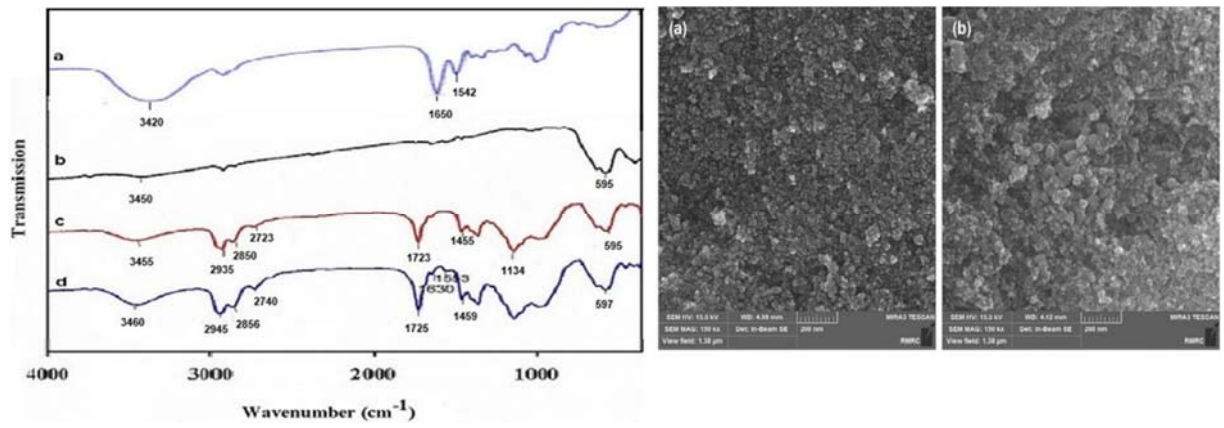
Bu çalışmada laktoperoksidaz, enzim özelliklerini iyileştirmek için iki işlevli bir ajan olarak glutaraldehit ile aktive edilmiş Polianilin polimeri üzerine immobilize edilmiştir. Polianilin polimeri, benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı Laktoperoksidaz (LPO) enzimini immobilize etmek için kullanılmıştır.



**Şekil 11.** a) Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklığı, b) Serbest ve immobilize enzimin termal stabilitesi, c) Serbest ve immobilize enzimin optimum pH 'sı d) Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığı

Şekil 11'de gösterildiği gibi immobilize LPO'nun optimum aktivitesi, immobilize enzim için yaklaşık 10 °C artırılan pH 6 ve 55 °C'de gözlemlenmiştir. İmmobilize edilen enzim 60 gün boyunca mutlak aktifliğini korurken, doğal enzim bu süre içerisinde ilk aktivitesinin %80'ini kaybetmiştir. Ayrıca immobilize enzim aktivite kaybı olmaksızın birkaç kez tekrar kullanılabilir olduğu bulunmuştur. Kinetik parametre çalışmaları, serbest ve immobilize enzimler arasında küçük farklılıklar göstermiştir (Jafary *et al.* 2012).

Bu araştırmada kovalent yöntemle Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNP'ler üzerinde LPO immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> üzerine LPO enziminin tutunduğu Şekil 12'de görüldüğü FT-IR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) FE-SEM kullanılarak doğrulanmıştır.



**Şekil 12.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – LPO, Serbest LPO’ nun FT-IR ve FE-SEM görüntüleri

**Tablo 1.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – LPO, Serbest LPO nun Km ve Vmax değerlerinin sonuçları

|                                          | K <sub>m</sub> değerleri | V <sub>max</sub> değerleri |
|------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - LPO</b> | 53.19 mM                 | 0.629 µmol/mL              |
| <b>Serbest LPO</b>                       | 72.46 mM                 | 0.576 µmol/mL              |

Genel sonuçlara bakıldığında Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – LPO 'nun stabilizesinin, serbest LPO'ya göre daha iyi olduğunu gösterdi. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ya immobilize edilen LPO'nun 25 °C'de 30 gün içinde başlangıç aktivitesinin %28'ini korurken, serbest enzim, 25 °C'de 7 gün sonra aktivitesini kaybetmiştir. Termal kararlılığına bakıldığında 75 °C'deki 60 dakikadan sonra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>– LPO numunesinde LPO enziminin başlangıç aktivitesinin %19'unun korunduğunu belirlenirken, serbest enzimin 5 dakikadan sonra aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir (Shariat *et al.* 2019).

Bu çalışmada, sığır peynir altı suyundan LPO'nun saflaştırılması ve işlevselleştirilmiş GO-NS'ye immobilizasyonu gerçekleşti. LPO enziminin, 5,78 U/mg proteinin spesifik aktivitesi ile 59,13 kat saflaştırıldı. Genel sonuçlar değerlendirildiğinde GO-NS'ye tutturulmuş LPO'nun stabilitesinin, serbest LPO'ya kıyasla iyileştiğini göstermiştir (Shariat *et al.* 2018).

Bu çalışmada sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi ve bakır iyonlarından (Cu<sup>+2</sup>) oluşan HNF'ler iki farklı sıcaklıkta (+4 °C ve 20 °C) PBS'de (pH 7,4) sentezlenmiştir. LPO-bakır fosfat HNF ve serbest LPO için optimum pH'lar sırasıyla pH 8 ve pH 6 olarak belirlenmiştir. LPO-bakır fosfat HNF'nin, her bir pH değerinde serbest LPO'dan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. LPO-bakır fosfat HNF'nin pH 6'da aktivitesi 70,48 EU/mg iken pH 8'deki aktivitesi 107,23 EU/mg olarak bulunmuştur. Serbest LPO'nun ise sırasıyla 45,78 EU/mg ve 30,12 EU/mg olarak bulunmuştur. LPO-bakır fosfat HNF'ler serbest LPO ile karşılaştırıldığında, pH 6 ve pH 8'de sırasıyla ~%160 ve ~%360 aktivite artışı sergilemiştir. Ek olarak, LPO-bakır fosfat HNF'ler, altı döngüden sonra mükemmel yeniden kullanılabilirlik sergilemiştir. (Altınkaynak *et al.* 2015).

Bu makalede kitre-kitosan nano-biyopolimerler tarafından LPO'yu immobilize etmeye çalışmaktadır. FT-IR ve SEM ile kitre-kitosan nano kompozitleri analiz ettikten sonra LPO yüklemesi yapılmıştır. Nanokompozitlerin uygun boyutunun belirlenmesi, hareketsizleştirilmiş ve serbest LPO'nun depolama sırasındaki stabilitesi, 25 °C ve 4 °C'de 14 günlük depolamadan sonra değerlendirilmiştir. Termal kararlılık ayrıca sabitlenmiş ve serbest LPO'nun 0 ila 80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda saklanmasıyla da tahmin edilmiştir. 356,8 nm boyutunda nanokompozitlerin kullanılmasının, depolama sırasında daha fazla stabilitenin korunmasına yol açacağı bulunmuştur. Hareketsizleştirilmiş enzim daha fazla termal stabiliteye sahip olduğu bulunmuştur. (Nayeri *et al.* 2015).

Shariat ve arkadaşları, Laktoperoksidazın (LPO) grafen oksit nano-tabakaları (GONS) üzerine immobilizasyon yöntemiyle sabitleyerek kinetik özellikleri araştırıldı ve serbest enzimle kıyaslanmıştır. Yöntemler Sığır peynir altı suyundan LPO saflaştırmasının ardından, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak işlevselleştirilmiş GO-NS üzerinde immobilize edilmiştir. LPO, 5,78 U/mg spesifik aktivitesi ile 59,13 kat saflaştırılmıştır. LPO'nun işlevselleştirilmiş GO-NS üzerinde başarılı bir şekilde immobilizasyonu (FT-IR) kullanılarak doğrulanmıştır. Sonuçlar Grafen oksit nano-tabakalar, LPO'nun immobilizasyonu için etkili araçlar olduğu bulunmuştur (Shariat *et al.* 2018).

Bu çalışmada, laktoperoksidaz (LPO) enzimi grafen oksit (GO) ve bakır oksit (CuO) üzerine immobilizasyon yöntemi ile tutturulmuştur. (LPO–GO) ve (LPO–CuO) 25 °C'de 30 gün boyu süresince ilk aktivitelerini sırası ile %35 ve %12'sini korurken 75 °C'deki termal stabilitesinde ilk aktivitesini sırası ile %24 ve %8'inin korunduğunu belirlenmiştir. Herhangi bir yere tutturulmayan doğal enzim 25 °C'de 7 gün sonra aktivitesini kaybetmiştir. Ayrıca, doğal enzimin termal stabilitesine baktığımızda 75 °C'de ilk 5 dakikadan sonra aktivitesini kaybetmiştir (Movahedi *et al.* 2018).

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

#### Kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Maddeler                                                                                                                                                                                                                                      | Üretici<br>Firma             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| L-Tirozin, HCl, Sodyum sülfat, İzoproponal, KSCN                                                                                                                                                                                                       | E. Merk AG                   |
| Triklor asetik asit (TCA), Potasyum hidroksit,                                                                                                                                                                                                         | Riedel de<br>Haen            |
| Magneyzu nitrat, Çinko klorür, Bakır klorür                                                                                                                                                                                                            | Fluka                        |
| Glisin                                                                                                                                                                                                                                                 | ICN<br>Biomedicals.<br>inc.  |
| S. enteritidis ATCC 13076, S. aureus ATCC 25923, E. coli ATCC 25922, B. subtilis ATCC 6633, P. aeruginosa ATCC 27853, K. pneumoniae ATCC 13883, Mueller Hinton Agar, Mueller Hinton Broth, Drilgaski Özese, Potasyum tiyosiyanat, Antibiyotik diskleri | Sigma<br>Chemical<br>Company |

#### Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

##### 1. 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,0):

- 12 g (0,1 mol) fosfat tuzu 950 mL distile suda çözüldü.
- Çözelti 1 M NaOH ile pH 6,0'ya ayarlandı.
- Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

##### 2. 25 mM Fosfat (pH 6,8):

- 1,42 g (1,10-2 mol) fosfat tuzu 350 mL distile suda çözüldü.
- Çözelti 1 N HCl ile pH 6,8'e ayarlandı.
- Son hacim distile su ile 400 mL'ye tamamlandı.

#### Bradford Metodunda Kullanılan Protein Belirleme Çözeltisi

200 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL Et-OH içerisinde çözüldü. Elde edilen çözeltiliye 200 mL fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ilave edilerek hacmi 2 L'ye tamamlandı.

## **Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Detaylı Tanımı ve Hazırlanışı**

Bu çalışmada, enzimatik aktivite ölçümleri için üç farklı çözelti kullanılmıştır:

### 1. 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6,0 Çözeltisi:

- 12 g (0,1 mol) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 950 mL distile suda çözündü.
- Çözelti pH'ı 6,0'a ayarlandı.
- Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

### 2. 1 mM ABTS Çözeltisi:

- 0,055 g ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol) ABTS, 100 mL 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6,0 çözeltisinde çözündü.
- Bu çözelti, LPO aktivitesinin ölçümünde substrat çözeltisi olarak kullanıldı.

### 3. 3,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi:

- %30'luk d: 1,11 g/mL olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 32 µL alındı.
- Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Bu çözelti LPO aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

## **Nanopartikül (metal-oksit) sentezinde kullanılan çözeltiler**

### ***Magnezyum oksit (MgO) nanopartikül sentezinde kullanılan çözeltiler***

1. 0,05M Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 250 mL çözeltisi: 1,85 gram magnezyum nitrat tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 250 mL çözeltisi: 3,7 gram magnezyum nitrat tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
3. 0,2 M Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 250 mL çözeltisi: 7,4 gram magnezyum nitrat tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
4. 0,05 M NaOH 250 mL çözeltisi: 0,5 gram sodyum hidroksit tartılır ve 100 mL saf suda çözünüp son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
5. 0,1 M NaOH 250 mL çözeltisi: 1 gram sodyum hidroksit tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.
6. 0,2 M NaOH 250 mL çözeltisi: 2 gram sodyum hidroksit tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
7. 2 M NaOH 250 mL çözeltisi: 20 gram sodyum hidroksit tartıldı ve 100 mL saf suda çözünüp son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

### ***Bakır oksit (CuO) nanopartikül sentezi kullanılan çözeltiler***

1. 5 M NaOH 60 mL çözeltisi: 10 gram sodyum hidroksit tartıldı ve 30 mL saf suda

çözünüp toplam hacim 60 mL'ye tamamlandı.

### ***Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezi kullanılan çözeltiler***

1. 0,4 M KOH 100 mL çözeltisi: 2,2 gram potasyum hidroksit tartıldı ve 50 mL saf suda çözünüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 0,2 M Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 100 mL çözeltisi: 3,78 gram potasyum hidroksit tartıldı ve 50 mL saf suda çözünüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

## **Yöntemler**

### **Laktoperoksidaz enzim saflaştırma çalışmaları**

#### ***Memeli sütünden homojenat hazırlanması ve LPO enziminin saflaştırılması***

Sığır sütünden yağı uzaklaştırmak için sığır sütü 3000 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı. Daha sonra süte 4,4 g/150 mL oranında Amberlite CG 50 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reçinesi eklendi. Reçine, damıtılmış su ve sodyum asetat çözeltisi (0,5 mM, pH 6,8) ile yıkandı. Bağlı proteinler, sodyum asetat çözeltisi (2 M, pH 6,8) ile yıkandı. Elde edile eluat, saflaştırılmış LPO'yu elde etmek için Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulandı (Koksal et al. 2016).

### **Protein ve enzim aktivitesi tayini**

#### ***Protein tayini***

##### ***Kantitatif protein tayini***

Hazırlanan homojenat ve kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış enzim için kantitatif protein miktarı Bradford 1976 metoduna göre belirlendi. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konularak saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 4,9 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik cam küvetlerde köre karşı absorban değerleri ölçüldü.

##### ***Laktoperoksidaz enzim aktivitesi tayini***

Laktoperoksidaz (LPO) enziminin aktivitesi, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü. Ölçüm için 10 µL enzim çözeltisi, 2,890 mL 1 mM ABTS ve 0,1 mL 3,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) çözelti karışımı kullanıldı. Karışım üç dakika boyunca inkübe edildi ve 60 saniyelik aralıklarla absorbanstaki değişim 412 nm'de ölçüldü. Kör olarak

enzim dışındaki bütün çözeltiler kullanıldı. Elde edilen absorbanstaki değişimler, LPO enziminin aktivitesini hesaplamak için kullanıldı. (Shindler and Bardsley 1975).

### **SDS-PAGE Yöntemi ile Enzim Saflığının Kapsamlı Değerlendirilmesi**

SDS-PAGE, Laemmli'nin prosedürüne göre LPO saflaştırmasından sonra denatüre etme koşulları altında gerçekleştirildi (Laemmli 1970). Yığılma ve ayırma jelleri, sırasıyla %3 (w/v) ve %8 (w/v) akrilamid ve %0,1 (w/v) SDS'den oluşuyordu. Elektrot tamponu, 0.025 M Tris/0,2 M glisin (pH 8,3) idi. 50 µL numune tamponu içine 0,5 mL β-merkaptoetanol, 3,85 mL su ve 20 µg enzim alikotu (50 µL) ilave edildi ve karışım kaynar su banyosunda 3 dakika ısıtıldıktan sonra soğutuldu.

Yığılma jelinin her bir boşluğuna LPO numuneleri yüklendi. LPO, PAGE ile ayrı ayrı analiz edildi. Başlangıçta, bromfenol boya akan jele ulaşana kadar 80 V'luk bir elektrik potansiyeli (Hoefer Scientific Instruments, SE 600) uygulandı. Daha sonra 3-4 saat için 200 V'a çıkarıldı. Jeller, %50 (v/v) metanol ve %10 (v/v) asetik asit içinde %0,1 (a/h) Coomassie Brilliant Blue R-250 içinde 1,5 saat süreyle boyandı ve metanol/asetik asit ile lekeleri giderildi.

### **Nanopartikül sentezi**

#### ***Magnezyum oksit (MgO) nanopartikül sentezi***

Magnezyum oksit nano parçacıklarının sentezi için birlikte Taguchi yöntemi kullanıldı. Optimum sentez koşullarını belirlemek için dokuz deney tasarlandı. Bu amaçla, 0,05, 0,1 ve 0,2 M konsantrasyonlarında magnezyum nitrat ( $Mg(NO_3)_2$ ) ve 0,5, 0,1 ve 0,2 M konsantrasyonlarında sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileri hazırlandı. Taguchi deney planı doğrultusunda, farklı  $Mg(NO_3)_2$  ve NaOH konsantrasyonları 30, 60 ve 90 dakika süreyle karıştırıldı. Elde edilen ürünler santrifüjleme ile ayrıldı, saflaştırıldı ve fırında kurutuldu. Daha sonra, 450°C'de kalsinasyon işlemi uygulanarak MgO NP'den oluşan beyaz bir toz elde edildi. (Imani and Safaei 2019).

#### ***Bakır oksit (CuO) nanopartikül sentezi***

CuO NP'ler, 34.96 g bakır klorürün 1000 mL distile suda çözülmesi ve 30 dakika karıştırılmasıyla hazırlandı. Çözelti 70°C'ye ısıtıldı ve 60 mL 5 M sodyum hidroksit çözeltisi 2 saat boyunca damla damla eklendi. Bu işlem sırasında koyu kahverengi bir çökelti oluştu, bu da CuO NP'lerin oluşumunu gösterdi. Çökelti santrifüj ile toplandı ve üç kez distile su ile yıkandı. Daha sonra iki kez etanol ile yıkanıp 70°C'de bir fırında 6 saat kurutuldu. Elde edilen CuO NP tozu, hava geçirmez şişelerde saklanarak sonraki kullanıma hazır hale getirildi (Shankar *et al.* 2017).

### ***Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezi***

Bu çalışmada, ZnO NP'ler doğrudan çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlendi. Öncüller olarak çinko nitrat ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ve potasyum hidroksit (KOH) kullanıldı. Sentez için sırasıyla deiyonize su, 0,2 M  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  sulu çözeltisi ve 0,4 M KOH sulu çözeltisi hazırlandı. KOH çözeltisi, oda sıcaklığında kuvvetli karıştırma altında  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisine yavaş yavaş eklendi. Bu işlem, beyaz bir süspansiyon oluşumuyla sonuçlandı. Elde edilen süspansiyon 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üç kez distile su ile, son olarak da mutlak alkol ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından ürün 500°C'de 3 saat süreyle fırında kalsine edildi. Kalsinasyon işlemi sonucunda ZnO NP tozu elde edildi (Talam *et al.* 2012).

### **Kompozit filmlerin hazırlanması**

Saf modifiye Nişasta filmi ve nanopartikül (MgO, ZnO, CuO) ile kompozit filmleri hazırlamak için, bir miktar nişasta (0-2 g) 100 ml damıtılmış suda eritildi ve bu çözelti 70 °C'de manyetik bir sıcak plaka aleti (Peco, İran) ile karıştırılarak 20 dakika ısıtıldı. Daha sonra istatistiksel tasarıma göre solüsyona nanopartikül (MgO, ZnO, CuO) (%0–5 w/w) ilave edildi ve solüsyonun karıştırılmasına 20 dakika daha devam edildi. Jelatinize edilmiş modifiye nişasta, hava kabarcıklarını gidermek ve tek tip bir film üretmek için vakum pompasıyla havalandırıldı. Çözelti daha sonra 30 dakika ultrasonik su banyosunda işleme tabi tutuldu. Daha sonra plastikleştirici olarak 2 ml gliserol eklenerek manyetik karıştırıcı ile 5 dakika karıştırıldı. Elde edilen kompozit jel daha sonra polietilen kaplara dökülerek oda sıcaklığında 48 saat kurutuldu. Son olarak kurutulan filmler pedri kaplarından dikkatli bir şekilde çıkarılarak karakterizasyon ve immobilizasyon çalışmaları yapılana kadar polietilen kaplarda saklandı (Hosseini *et al.* 2021).

### **Hazırlanan filmlerin farklı yöntemler kullanılarak karakterizasyonu**

#### ***Yüzey kimyasal yapı analizi***

CuO, MgO ve ZnO NP'leri ve hazırlananan Nişasta, Nişasta@metal-oksit, Nişasta@metal-oksit/LPO filmlerinin kimyasal yapılarının anlaşılması amacıyla fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektroskopisi kullanılarak karakterizasyonları gerçekleştirildi. Hazırlanan nanopartikül ve metal-oksit@nişasta yapılarında kullanılan metal atomlarında ve organik bileşiklerdeki kimyasal farklılıklara bağlı olarak FTIR ve Raman piklerinde farklılıkların oluşması beklenmektedir. FTIR ölçümleri araştırma laboratuvarımızda bulunan FTIR spektrometre ile gerçekleştirildi. Raman spektroskopisi spektrumları ise üniversitemiz bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'da gerçekleştirildi.

### ***Morfolojik incelemeler***

CuO, MgO ve ZnO NP'lerin ve hazırlanan Nişasta, Nişasta@metal-oksit, Nişasta@metal-oksit/LPO film yapılarının morfolojik karakterizasyonlarının taramalı elektron mikroskopisi/enerji dispersif X-ışınları spektroskopisi (SEM/EDS) sistemi ile yapıldı. EDS tekniği ile materyallerin yapısında bulunması muhtemel atomların varlığı belirlenerek metal-oksit@nişasta oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği belirlendi. Hazırlanmış olduğumuz nanopartikül ve nişasta film yapılarının SEM/EDS analizleri için üniversitemiz bünyesinde bulunan DAYTAM'da mevcut olan FE-SEM/EDS sistemi kullanıldı.

### ***Kristal yapı analizi***

CuO, MgO ve ZnO NP'lerin ve hazırlanan Nişasta, Nişasta@metal-oksit, Nişasta@metal-oksit/LPO film yapılarının kristal yapılarının anlaşılması amacıyla toz X-ışınları toz kırınım (XRD) spektrumları oluşturuldu. Toz XRD ölçümleri araştırma laboratuvarımızda bulunan toz XRD sistemi ile gerçekleştirildi.

### **Nişasta ve Nişasta@(CuO, MgO, ZnO) biyonanofilmlerine LPO'nun yüzey adsorbsiyonu ve tutuklama yöntemleriyle immobilizasyonu**

İmmobilizasyon çalışmaları için boş nişasta filmi, Nişasta@metal-oksit filmi kullanılarak hem yüzey adsorsiyonu hem de tutuklama yöntemi ile Nişasta/LPO ve Nişasta@(CuO, MgO, ZnO)/LPO filmleri hazırlandı.

**Yüzey adsorsiyon yöntemi için;** hazırlanan boş nişasta filmi ve nişasta@metal-oksit filmi 48 saat sonunda çıkarılarak enzim çözeltisi içinde bekletildi. İmmobilizasyon optimizasyonu amacıyla uygun immobilizasyon süresi, pH'sı, sıcaklığı ve enzim miktarının belirlenerek farklı bileşimlerde deney setleri kuruldu. Optimizasyon şartları sağlandıktan sonra hazırlanan Nişasta/LPO ve Nişasta@metal-oksit/LPO filmlerinin karakterizasyon ve potansiyel uygulama çalışmaları gerçekleştirildi.

**Tutuklama yöntemi için;** hazırlanan boş nişasta filmi ve metal-oksit@nişasta filmi polietilen kaplara dökmeden önce 2,5 mL enzim çözeltisi (1,8 EU/mL) eklendi. Daha sonra polietilen kaplara dökülerek 48 saat kurumaya bırakıldı. Elde edilen Nişasta/LPO ve Nişasta@metal-oksit/LPO filmlerinin karakterizasyon ve potansiyel uygulama çalışmaları gerçekleştirildi.

## **Hazırlanan nişasta@metal-oksid/LPO biyonanofilmlerinin karakterizasyon çalışmaları**

### ***Serbest ve immobilize LPO'nun Optimum pH***

Serbest ve hareketsizleştirilmiş LPO'nun aktivitesi için optimal pH, enzimin 3 ila 8 arasında değişen pH'da oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübasyonu ile ölçüldü. Farklı pH aralıklarına sahip iki tampon; Serbest ve hareketsiz LPO'nun aktivitesi için optimum pH'ı belirlemek amacıyla farklı analizlerde 30 mM sodyum sitrat (pH =3-5,5) ve 30 mM sodyum fosfat (pH =6-8) kullanıldı. Maksimum aktivite %100 olarak alındı ve enzimin iki formunun bağlı aktivitesi farklı pH'larda hesaplandı.

### ***Serbest ve immobilize LPO'nun optimum sıcaklık ve termal kararlılığı***

Serbest ve immobilize LPO'nun aktivitesi için optimum sıcaklık, enzimin bir su banyosunda 20 ila 80 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilmesiyle belirlendi ve aktiviteleri test edildi. En yüksek aktivite %100 olarak alındı. LPO'lar, immobilize ve serbest LPO'nun termal stabilitesini belirlemek için 60 dakika boyunca bir su banyosunda 75 °C'de inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında, LPO'lar hemen bir buz banyosuna aktarıldı ve aktiviteleri test edildi (Shariat *et al.* 2019)

### ***Serbest ve immobilize LPO'nun yeniden kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı***

Depolama kararlılığını belirlemek için serbest ve immobilize LPO' lar farklı sıcaklıklarda (4 °C ve 25 °C) 21 gün süreyle bekletildi. Serbest ve immobilize LPO'nun başlangıç aktiviteleri %100 olarak alınıp optimum koşullarda bahsedilen analiz kullanılarak her gün filmlerin aktiviteleri belirlendi (Shariat *et al.* 2019).

İmmobilize LPO enzimlerinin yeniden kullanılabilirliğini değerlendirmek için optimal koşullar altında 11 döngü çalışıldı. Her çalışmadan sonra, immobilize LPO'lar saf suda dikkatli bir şekilde yıkandı. İmmobilize LPO'nun başlangıç aktivitesi %100 olarak alınıp her deneyden sonra filmlerin aktiviteleri belirlendi. (Movahedi *et al.* 2018).

### ***Antibakteriyel özelliklerin araştırılması***

Nişasta@(CuO-MgO-ZnO) ve Nişasta@(CuO, MgO, ZnO) /LPO biyonanofilmlerinin anti-bakteriyel özelliğinin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Gram negatif ve gram pozitif özellikte ciddi insan patojenleri olan *Salmonella spp*, *Escherichia coli O157:H7* ATCC® 43895, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883, *Bacillus cereus* ATCC® 14579 ve *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615 Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine inokule edildi ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Bakterilerin saflıkları kontrol

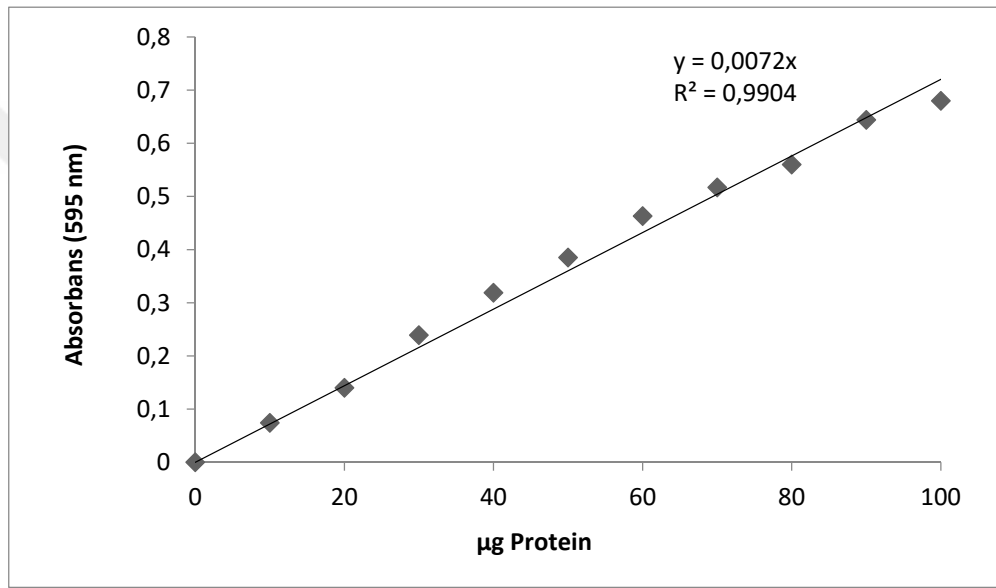
edildikten sonra, her bakteri 100 mL Mueller Hinton Agar içeren besiyerine transfer edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gelişen kültürlerin mcFarland değeri 0,5 olacak şekilde ayarlanarak MHA besiyerine drilgaski özesi ile yayıldı. Daha sonra petrilerin ortasına Nişasta@(CuO, MgO, ZnO) ve Nişasta@(CuO, MgO, ZnO)/LPO biyonanofilmleri yerleştirildi. Bu filmlere 50Mm KSCN 200µL ve 50Mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100µL çözelti karışımından 20 µL eklenerek 37 °C’de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda filmlerin etrafında inhibisyon zonu oluşumu ölçülerek biyonanofilmlerin antimikrobiyal özelliği belirlendi.



## ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemiyle, sığır sütünden hazırlanan homojenat ve saflaştırılmış olan LPO enzimlerinin protein tayini belirlendi. Bu metodda ilk olarak standart grafik çizildi. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu enzim çözeltilerindeki protein miktarı standart grafik yardımıyla belirlendi. Standart çözeltilerin değerleri **Şekil 13**'de gösterildi.



**Şekil 13.** Bradford yöntemiyle kantitatif tayin için kullanılan standart grafik

### LPO Enziminin Saflaştırılması

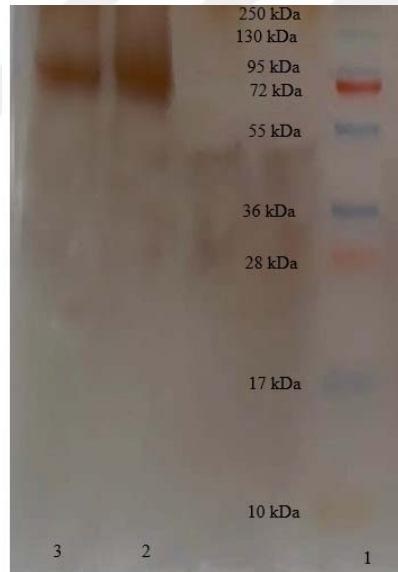
Bu tez kapsamında LPO enzimi saflaştırılmasında sulfanilamid afinite kromatografisi yönteminden faydalanıldı. Bu yöntem ile LPO enzimi sığır ve koyun sütünden %61,3 verim ve 40,9 U/mg spesifik aktivite ile 409 kat saflaştırılmıştır. (Atasever et al. 2013). **Tablo 2**'de görüldüğü gibi LPO enzimi sığır sütünden %14 verim ve 44545,45 U/mg spesifik aktivite ile 404,11 kat saflaştırıldı. Sonuçların literatürle uyumlu olduğu görüldü.

**Tablo 2.** LPO Enziminin Saflaştırma Tablosu

| LPO                              | Toplam hacim (mL) | Aktivite (EÜ/mL) | Protein (mg/mL) | Total aktivite (EÜ) | Total protein miktarı | Spesifik aktivite (EÜ/mg) | Yüzde Verim (%) | Saflaştırma katsayısı |
|----------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| Homojenat                        | 5                 | 140              | 1,27            | 700                 | 6,35                  | 110,23                    | 100             | 1                     |
| Sepharose 4B sulfanilamid kolonu | 2                 | 49,00            | 0,0011          | 98,00               | 0,0022                | 44545,45                  | 14,00           | 404,11                |

### Sığır Sütünden Saflaştırılan LPO Enziminin SDS-PAGE Sonucu

Sığır sütünden LPO'nun tüm saflaştırma adımları, SDS-PAGE kullanılarak moleküler ağırlığı yaklaşık 78 kDa olan tek bir bant bulundu (**Şekil 14**). LPO'nun moleküler ağırlığı daha önce çalışmalar ile de uyumlu bulundu. Literatürde yapılan çalışmalarda LPO'nun molekül kütlesi sırasıyla 78 ve 80 kDa olarak tespit edilmiştir.(Köksal et al. 2019; Atasever et al. 2013).



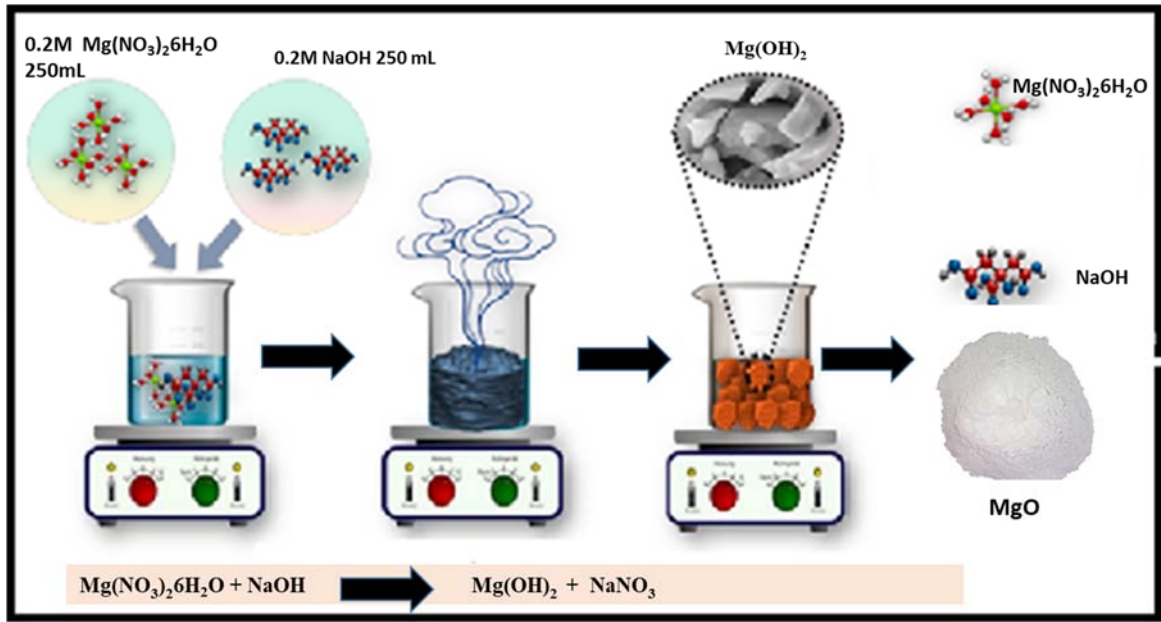
**Şekil 14.** Sülfail amid kolonundan saflaştırılan sığır LPO enziminin gümüş boyama SDS-PAGE fotoğrafı

1: Standart Proteinler 2,3: Sığır LPO enzimi (78 kDa)

### Nanopartikül Sentezleri

#### Magnezyum oksit (MgO) nanopartikül sentezi

Magnezyum oksit nanopartiküllerin sentezi için Taguchi yöntemi kullanıldı. Yöntem kısmında açıklanan deneysel prosedür Şekil 13'te gösterildi.



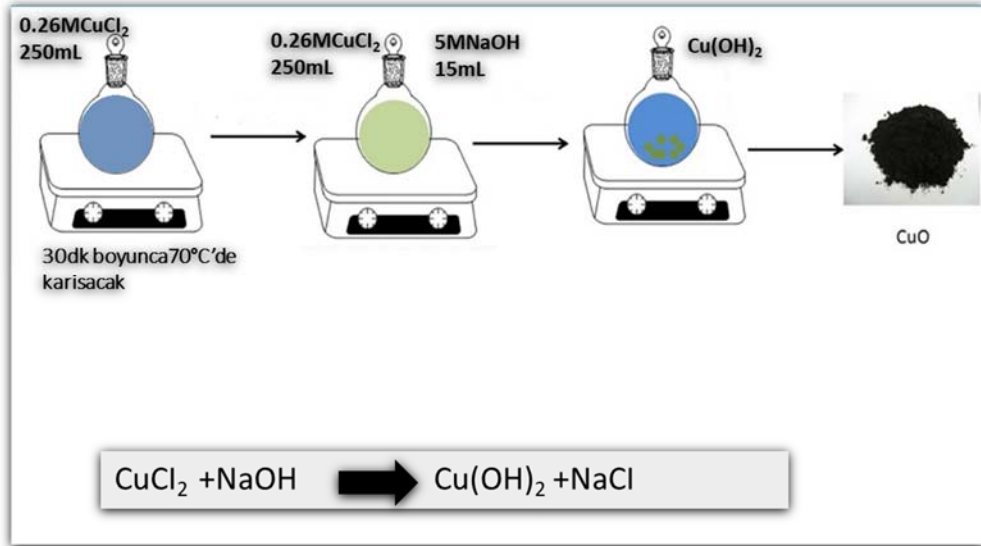
**Şekil 15.** Magnezyum oksit ( $\text{MgO}$ ) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi

Şekil 13’den görüldüğü gibi  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  çözeltisi santrifüjlüme ile ayrıldıktan sonra safsızlıkları gidermek için saf su ile yıkanarak  $80\text{ }^\circ\text{C}$  etüvde kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında magnezyum hidroksit ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) tozu  $450\text{ }^\circ\text{C}$ 'de kül fırınında kalsine edilip magnezyum oksit ( $\text{MgO}$ ) nanopartikül parçacıklarından oluşan beyaz bir toz elde edildi (Imani and Safaei 2019).

$\text{MgO}$  NP’nün sentezi daha önce farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Liu ve arkadaşları, Rani ve arkadaşları  $\text{MgO}$  ‘ü hidrotermal yöntem ile (Liu *et al.* 2011; Rani *et al.* 2020) Zhang ve arkadaşları ise  $\text{MgO}$  ‘ü katı hal kimyasal reaksiyonu ile sentezlediler (Zhang *et al.* 2018).

#### **Bakır oksit ( $\text{CuO}$ ) nanopartikül sentezi**

$\text{CuO}$  nanoparçacıkları, öncü olarak bakır klorür ve NaOH kullanılarak doğrudan çökeltme yöntemiyle sentezlendi. Yöntem kısmında açıklanan deneysel prosedür Şekil 15’de gösterildi.

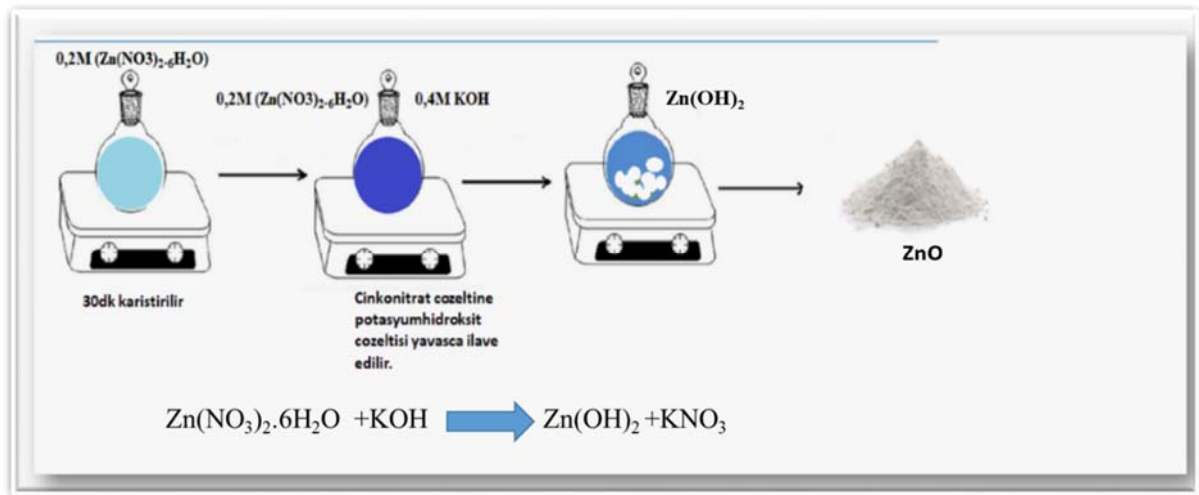


**Şekil 16.** Bakır oksit (CuO) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi

Şekil 15’de elde edilen Cu (OH)<sub>2</sub> çözeltisi santrifüjlüme ile ayrıldıktan sonra safsızlıkları gidermek için saf su ve etanol ile yıkanarak 70°C etüvde 6 saat suresince kurutuldu. Kurutma işlemi sonunda bakır oksit (CuO) nanopartikül parçacıklarından oluşan siyah bir toz elde edildi (Phiwdang *et al.* 2013). Literatürde CuO NP sentezi ile ilgili birçok benzer çalışma vardır. Sahooli ve grubu, El-Tras ve grubu CuO ‘ü çöktürme yöntemi ile sentezledi (Sahooli *et al.* 2012; El-Tras *et al.* 2012). CuO’i Das ve grubu doğrudan termal ayrışma yöntemiyle Pandirayajan ve grubu sol-jel yöntemiyle sentezledi (Das *et al.* 2013; Pandirayajan *et al.* 2020).

### Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezi

ZnO nanoparçacıkları, öncü olarak çinko nitrat ve KOH kullanılarak doğrudan çöktürme yöntemiyle sentezlendi. Deneysel prosedür yöntem kısmında açıklanan deneysel prosedür Şekil 16’da gösterilmiştir.

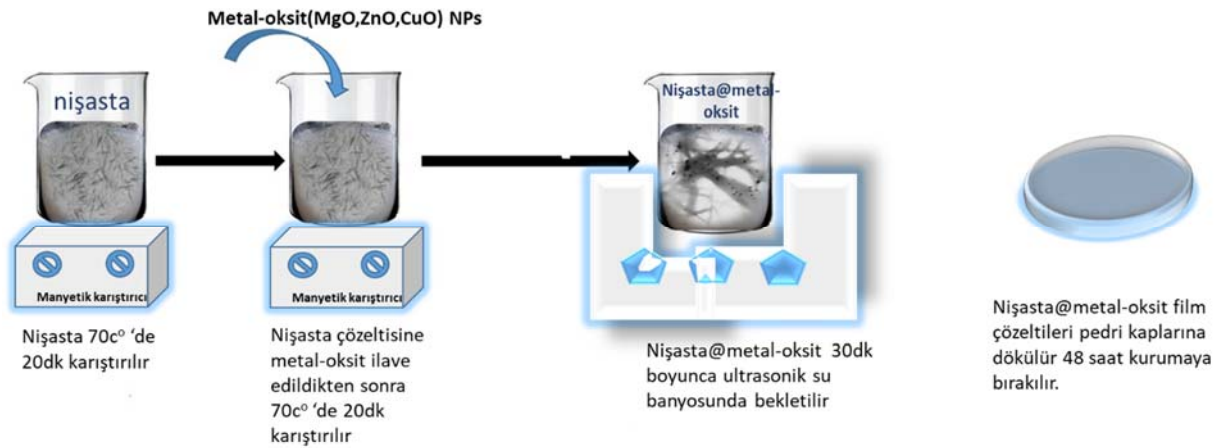


**Şekil 17.** Çinko oksit (ZnO) nanopartikül sentezinin şematik gösterimi

**Şekil 16'da** elde edilen  $Zn(OH)_2$  çözeltisi santrifüjlüme ile ayrıldıktan sonra safsızlıkları gidermek için saf su ve etanol ile yıkanarak  $500^\circ C$  fırında 3 saat süre boyunca kalsine edilip Çinko oksit ( $ZnO$ ) nanopartikül parçacıklarından oluşan beyaz bir toz elde edildi (Talam *et al.* 2012). Benzer şekilde Hong ve grubu da  $ZnO$  NP 'ünü doğrudan çökeltme yöntemi ile (Hong *et al.* 2006), Kassae ve grubunda  $ZnO$  NP 'ünü katı hal reaksiyon yöntemiyle sentezledi (Kassae *et al.* 2010).

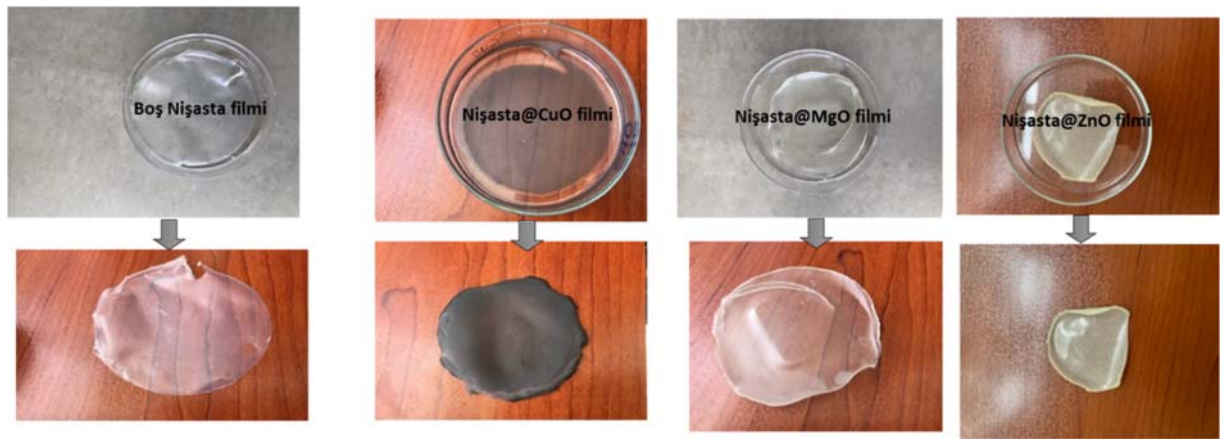
### Kompozit Filmlerin Hazırlanması

Saf modifiye nişasta filmi ve nanopartikül ( $MgO$ ,  $ZnO$ ,  $CuO$ ) ile kompozitleri hazırlamak için, bir miktar nişasta (0-5g) 100 ml damıtılmış suda eritildi ve bu çözelti aşağıda **Şekil 17** 'de gösterildiği gibi  $70^\circ C$ 'de manyetik bir sıcak plaka aleti (Peco, İran) ile karıştırılarak 20 dakika ısıtıldı. Daha sonra istatistiksel tasarıma göre solüsyona nanopartikül ( $MgO$ ,  $ZnO$ ,  $CuO$ ) (%0–5 w/w) ilave edildi ve solüsyonun karıştırılmasına 20 dakika daha devam edildi. Daha sonra elde edilen jelatinize edilmiş modifiye nişasta, 30 dakika ultrasonik su banyosunda işleme tabi tutularak pedri kaplarına döküldü (Hosseini *et al.* 2021).



**Şekil 18.** Nişasta filmi, Nişasta@ZnO filmi, Nişasta@MgO, Nişasta@CuO filmlerinin sentezinin şematik gösterimi

**Şekil 17'deki** gibi hazırlanan Nişasta, Nişasta@ZnO, Nişasta@MgO, Nişasta@CuO filmleri 48 saat kurutulduktan sonra pedri kaplarından dikkatli bir şekilde çıkarılarak karakterizasyon ve İmmobilizasyon işlemleri yapılana kadar polietilen kaplarda saklandı. (Şekil 18'de hazırlanan filmlerin son hali verilmiştir.)



**Şekil 19.** Hazırlanan Nişasta, Nişasta@ZnO, Nişasta@MgO, Nişasta@CuO filmlerin son hali

### Nişasta@metal-oksit biyonanofilmlerine LPO'nun yüzey adsorbsiyonu yöntemi ile immobilizasyonu

**Tablo 3.** Yüzey adsorbsiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan Nişasta/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin aktivite, Protein miktarı, Spesifik aktivite ve İmmobilizasyon verimliliği sonuçları

|                              | Serbest LPO enzim | Nişasta/LPO Filmi | Nişasta@ZnO/LPO Filmi | Nişasta@CuO/LPO Filmi | Nişasta@MgO/LPO Filmi |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Aktivite (EU/mL)             | 1,701             | 1,374             | 1,600                 | 1,480                 | 1,542                 |
| Protein (mg/mL)              | 0,258             | 0,230             | 0,250                 | 0,245                 | 0,250                 |
| Spesifik aktivite (EU/mL)    | 6,59              | 5,97              | 6,6                   | 6,04                  | 6,16                  |
| İmmobilizasyon etkinliği (%) | -                 | 90,6              | 97,1                  | 91,6                  | 93,5                  |

Tablo 3’de dört farklı filmin etkinliğini göstermektedir. Filmlere, LPO enzimi yüzey adsorbsiyon yöntemi ile immbolize edilmiştir. Nişasta Filmler arasında en yüksek verimliliği 6,6 EU/mL spesifik aktivite ile Starch@ZnO/LPO filmi (%97,1) gösterirken, en düşük verimliliği ise, 5,97 EU/mL spesifik aktivite ile Starch@/LPO filmi (%90,6) gösterdi.

### Nişasta@metal-oksit biyonanofilmlerine LPO'nun tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu

**Tablo 4.** Tutuklama yöntemi kullanılarak hazırlanan Nişasta/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin aktivite, Protein miktarı, Spesifik aktivite ve İmmobilizasyon verimliliği sonuçları.

|                                | Serbest LPO enzim | Nişasta/LPO Filmi | Nişasta@ZnO/LPO Filmi | Nişasta@CuO/LPO Filmi | Nişasta@MgO/LPO Filmi |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Aktivite (EU/mL)               | 1,842             | 1,012             | 1,312                 | 1,201                 | 1,104                 |
| Protein (mg/mL)                | 0,346             | 0,264             | 0,284                 | 0,279                 | 0,271                 |
| Spesifik aktivite (EU/mL)      | 5,32              | 3,83              | 4,61                  | 4,30                  | 4,07                  |
| İmmobilizasyon verimliliği (%) |                   | 72,0              | 86,8                  | 80,9                  | 76,6                  |

Tablo 4’de dört farklı filmin etkinliğini göstermektedir. LPO enzimi tutuklama yöntemiyle filmlere immobilize edildi. Nişasta Filmleri arasında en yüksek verimi 4,61 EU/mL spesifik aktiviteyle Nişasta@ZnO/LPO filmi (%83,3) gösterirken en düşük verimi 3,83 EU/mL spesifik aktiviteyle Nişasta/LPO filmi (%72,0) gösterdi.

Bu çalışmada, Nişasta/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@MgO/LPO ve Nişasta@CuO/LPO film yüzeylerine LPO enziminin başarılı bir şekilde immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzey adsorbsiyon ve tutuklama yöntemi kullanılarak yapılan bu immobilizasyon, nişasta filmlerine LPO enziminin ilk defa uygulanması olarak öne çıkmaktadır. Benzer çalışmalar mevcut olsa da, nişasta bazlı film matrisinin kullanımı ve farklı metal oksit katkılarının etkisi bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Elde edilen bulgular, nişasta bazlı LPO immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesi ve biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel kullanım alanlarının araştırılması için önemli bir temel oluşturmaktadır. Literatüre bakıldığında Shariat ve grubu LPO’yu destek materyali olarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNP’üne immobilize ettiğinde 4,06 EU/mL spesifik aktiviteyle % 72,89 verim elde ederken (Shariat *et al.* 2019), grafene immobilize ettiğinde 0,970 EU/mL spesifik aktiviteyle % 86 verim elde etti (Shariat *et al.* 2018). Movahedi ve grubu LPO’ni ZnO NP’üne immobilize ettiğinde 3,95 EU/mL spesifik aktiviteyle % 70,91 verim elde etmiştir (Movahedi *et al.* 2020).

### **Hazırlanan Filmlerin Farklı Yöntemler Kullanılarak Karakterizasyonu**

Hazırlanan filmlerin (Nişasta/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@MgO/LPO ve Nişasta@CuO/LPO) yüzey kimyasal yapı analizi, morfolojik incelemeleri ve kristal yapı analizlerini karakterize etmek XRD, F-TIR, RAMAN ve SEM analizleri yapıldı.

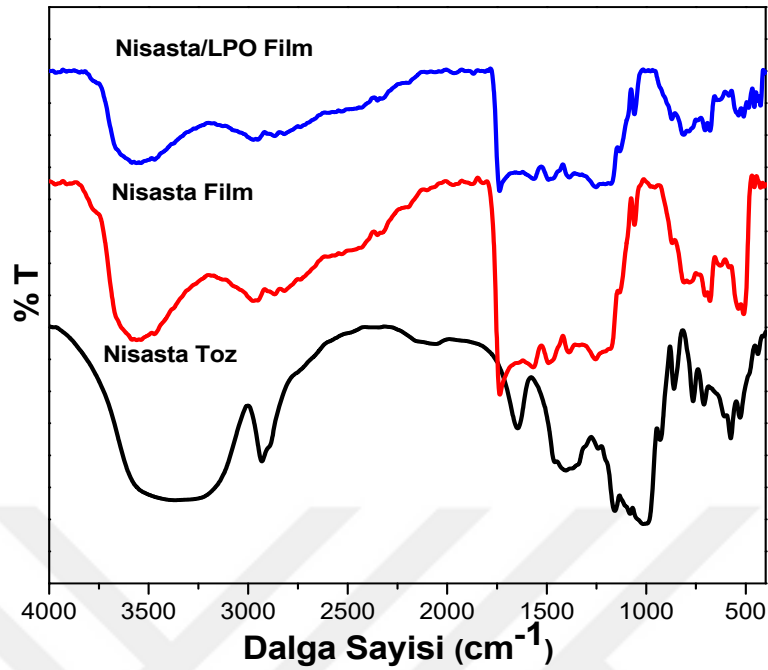
#### **Yüzey kimyasal yapı analizi**

##### ***Nişasta toz, Nişasta film, Nişasta/LPO Film FT-IR spektrum***

Nişasta ile hazırlanan jel filmlerin yüzey yapısını karakterize etmek amacıyla FT-IR analizleri gerçekleştirildi. **Şekil 19’da** saf nişasta (toz), nişasta filmi ve LPO ile modifiye edilmiş kompozit nişasta filmlerinin FT-IR spektrumları görülmektedir. Saf nişasta için kaydedilen spektrum incelendiğinde, 3600-3000 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki belirgin ve geniş pik, nişastada bol miktarda bulunan -OH gerilme titreşimine işaret etmektedir. Aynı zamanda, 3000-2500 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki pikler, nişastanın moleküler iskelet yapısındaki -CH ve -CH<sub>2</sub> gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklandığını göstermektedir.

1800-1500 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki belirgin pik, 1647 cm<sup>-1</sup>’deki su moleküllerinin absorpsiyonunun yanı sıra nişasta molekülündeki -OH gerilmelerine de işaret etmektedir. 1500-1200 cm<sup>-1</sup> bölgesi ise temel olarak -CH<sub>2</sub> ve -C-OH gruplarının deformasyonel titreşimlerini

sergilemektedir (Xie et al. 2021). Bu bulgular, nişasta örneklerinin polisakarit ailesine ait olduğunu gösteren literatürdeki FT-IR spektrum değerleri ile uyumludur.



**Şekil 20.** Saf nişasta (toz), nişasta film ve nişasta/LPO film için kaydedilen Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) Spektrumları

Nişasta temelli hazırlanan nişasta film ve LPO ile modifiye edilmiş kompozit film için alınan spektrumlarda, nişasta molekülüne ait pikler belirgin bir şekilde görülmektedir (**Şekil 19**). Bunun yanı sıra, LPO, nişasta ile benzer fonksiyonel gruplara sahip olduğu için elde edilen spektrumlar benzer bir davranış sergilemektedir (Movahedi *et al.* 2019). Ancak her iki spektrumda gözlenen piklerin saf nişasta (toz) molekülünden daha yüksek dalga sayısına kaydığı açık bir şekilde görülmektedir. Bu durum, jel film yapısına hapsedilmiş nişasta molekülleri ve LPO enziminin, absorplanan infrared ışınları ile birlikte mevcut titreşim hareketlerini yapabilmek için daha yüksek enerjiye ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

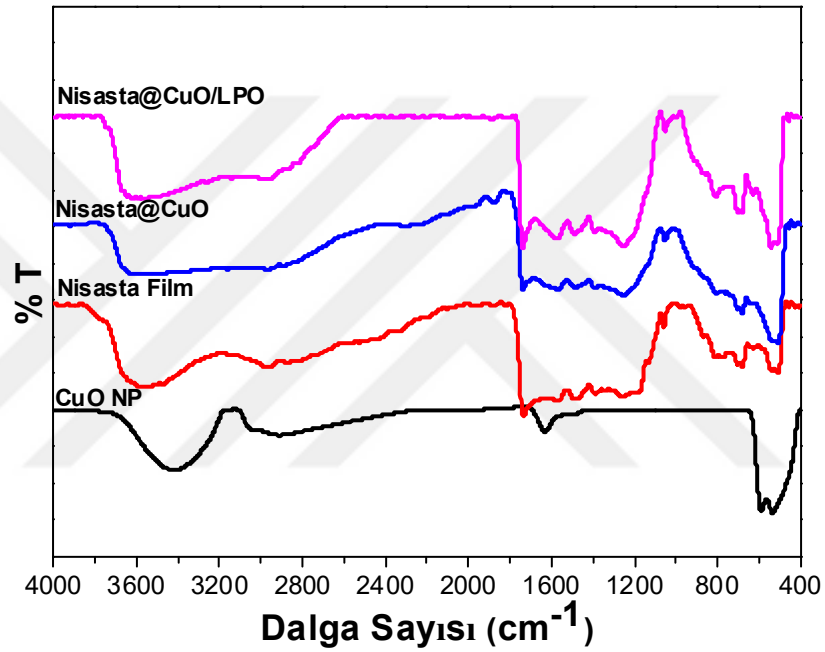
Bununla birlikte, jel film yapısında nişasta moleküllerine ait piklerin varlığı, ısıtılma işlem sonucunda hazırlanan film dokusunda nişastanın bozulmadığını ve ayrıca filme tutturulan LPO'nun başarılı bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, hazırlanan kompozit jel filmlerin kararlı bir yapıda olduğunu göstermiştir.

#### ***CuO NP, Nişasta@CuO Film, Nişasta@CuO/LPO Film FT-IR Spektrum***

Bu çalışmada, CuO nanoparçacıkları, basit çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlendi ve nişasta filmine ilave edildi. Elde edilen modifiye jel filmlere ait FT-IR spektrumları **Şekil 20**'de gösterilmektedir.

Basit çöktürme yöntemi ile hazırlanan CuO nanoparçacıklarının FT-IR spektrumunda, 525 ve 591  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen absorpsiyon bantları, Cu-O fonksiyonel grubunun gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Aynı zamanda, 1631 ve 3405  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarında gözlenen pikler, CuO nanoparçacık yüzeyine adsorbe olmuş suyun hidroksillerinin titreşimsel gerilme moduna karşılık gelmektedir. (Kemary *et al.* 2012).

Nişasta@CuO ve Nişasta@CuO/LPO modifiye filmlere ait FT-IR spektrumlarında ise, CuO nanoparçacıklarının Cu-O fonksiyonel grubuna ait pikler, belirgin bir şekilde görülmektedir.

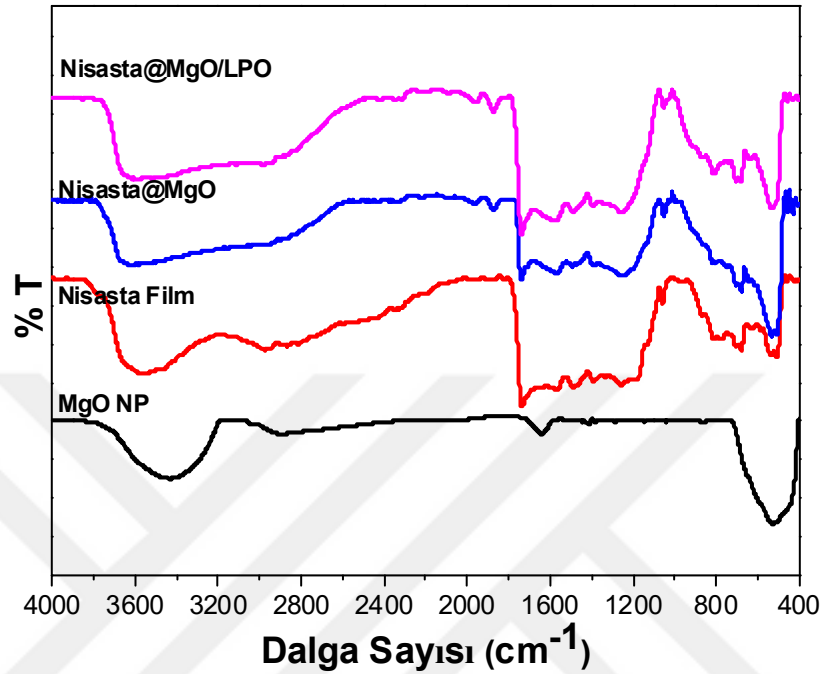


**Şekil 21.** CuO nanoparçacık, Nişasta@CuO ve Nişasta@CuO/LPO modifiye filmlere ait FT-IR spektrumları

#### ***MgO NP, Nişasta@MgO Film, Nişasta@MgO/LPO Film FT-IR Spektrum***

Nişasta filmine eklenen MgO nanoparçacıkları Taguchi yöntemi ile sentezlendi. Sentezlenen MgO nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu incelendiğinde, 3425  $\text{cm}^{-1}$ 'deki geniş pik yüzeyde adsorbe olmuş su moleküllerinin O-H gerilme titreşimleriyle ilişkilendirilirken, 1640  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik bükülme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Ayrıca, 527  $\text{cm}^{-1}$  gibi düşük dalga sayısında gözlenen pik, Mg-O-Mg bağ gerilme titreşimlerine karşılık gelir. (Sushma *et al.* 2016) (**Şekil 21**). Nişasta@MgO ve Nişasta@MgO/LPO modifiye filmlerin FT-IR spektrumlarında, MgO nanoparçacıklarının O-Mg-O fonksiyonel grubuna ait pikler belirgin bir şekilde görülmektedir. Bu pikler, MgO nanoparçacıklarının film matrisine başarılı bir şekilde entegre edildiğini göstermektedir. **Şekil 20'de** gösterilen CuO nanoparçacık katkılı jel

filmlerinde olduğu gibi, MgO nanoparçacıklar ile modifiye edilmiş jel filmlerinde de yaklaşık 3400  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler daha yüksek dalga boyuna kaymıştır. Bu kayma, MgO nanoparçacıklarının film matrisine entegrasyonu sırasında su moleküllerinin filmden uzaklaştırılmasına bağlanabilir.

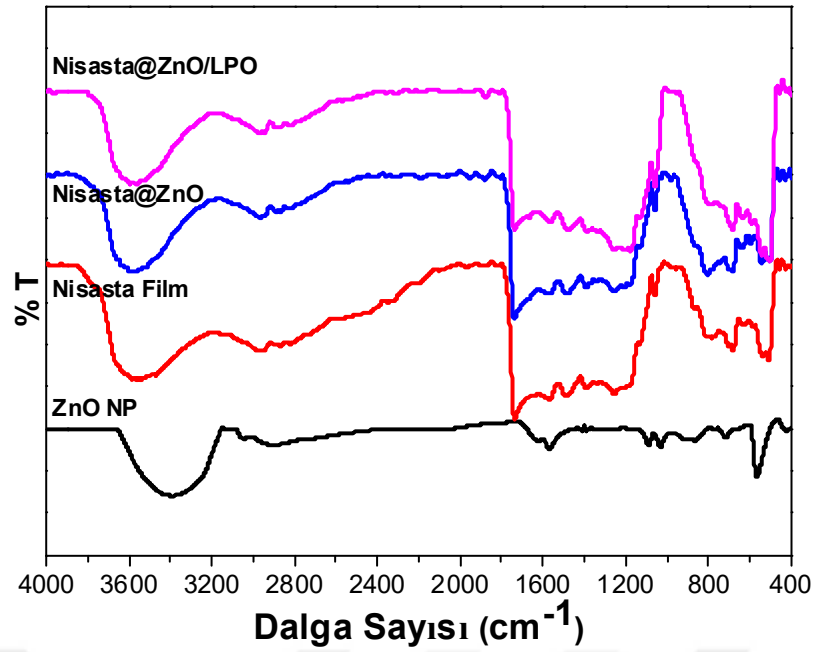


**Şekil 22.** MgO nanoparçacık, Nişasta@MgO ve Nişasta@MgO/LPO modifiye filmlere ait FT-IR spektrumları

#### ***ZnO NP, Nişasta@ZnO Film, Nişasta@ZnO/LPO Film FT-IR Spektrum***

Şekil 22'de, ZnO nanoparçacıkların, nişasta ile katkılı ZnO nanoparçacıkların ve LPO ile modifiye edilmiş nişasta ile katkılı ZnO nanoparçacıkların FT-IR spektrumları gösterilmektedir. ZnO nanoparçacıkların FT-IR spektrumunda, 400-800  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki fonksiyonel gruplar, ZnO'nun Zn-O gerilme titreşimlerine karşılık gelirken, 3446  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik, metal oksit yüzeyine adsorplanmış suyun O-H fonksiyonel grubunun titreşim modundan kaynaklanmaktadır. Bu durum, diğer metal oksit nanoparçacıklarda da gözlenmiştir. ZnO nanoparçacık katkılı jel filmlerde de benzer davranış gözlenmiştir.

Bu durum, ZnO nanoparçacıklar ile nişasta arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanabilir. Bu etkileşimler, LPO enziminin Nişasta@ZnO filmine immobilizasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde tutturulduğu anlamına gelmektedir (Movahedi et al. 2019).



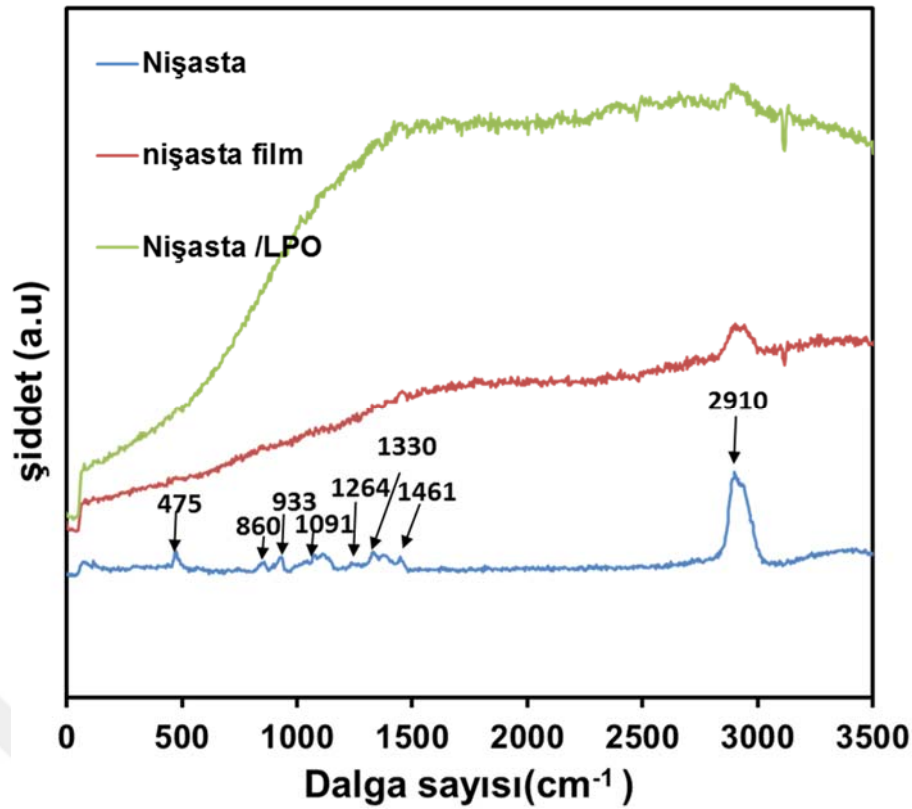
**Şekil 23.** ZnO nanoparçacık, Nişasta@ZnO ve Nişasta@ZnO/LPO modifiye filmlerin FT-IR spektrumları

#### *Nişasta toz, Nişasta film, Nişasta/LPO Film Raman spektrum*

Şekil 22’de Nişasta tozunun raman spektrumunda  $2910\text{ cm}^{-1}$ ’de yoğun bir bant C –H esneme modunu temsil ederken,  $500\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki bir dizi zayıf bant, aşırı ton ve kombinasyon bantlarını temsil eder.  $1461\text{ cm}^{-1}$ ’deki bant, C–H bükülme moduna atfedilir.  $933\text{ cm}^{-1}$ ’deki bant, 1,4-glikosidik bağlardan kaynaklanan titreşimlerden kaynaklanır ve nişastanın amiloz bileşeni için bir parmak izi sağlar (Meena and Sharma 2021).

Nişasta filminin raman spektrumunda,  $2910\text{ cm}^{-1}$  civarında C-H gerilme modunu gösterdi. İkili modifikasyona sahip nişasta filmindeki bandın yoğunluğunda bir değişiklik gözlemlendi bu amilazdaki varyasyonlara ve hidrolizin neden olduğu amilopektin etkileşimi atfedilebilir. Açıkça, amiloz ve amilopektinin hidroliz işleminden kaynaklanan bir yeniden düzenlemesi, granül yüzeyinde nişastanın yüksek oranda yapısının bozulmasına, nişasta tozunda var olan piklerin çıkmamasına neden oldu. Bu sonuçlar, nişastanın modifikasyonu sonucu, nişasta granülünün yapısını değiştirdiğini ve daha önce diğer yazarlar tarafından bildirildiği gibi, modifiye edilmiş bir nişasta ürettiğini doğruladı.

Nişasta/LPO filminde  $2910\text{ cm}^{-1}$  ikili modifikasyona sahip nişastada gözlenen en yoğun bant nişastadaki kısa menzilli moleküler düzenin bozulmasının kanıtı olarak bildirilmiştir. Kısa menzilli moleküler düzenin bu bozulmasının etkisi LPO enziminin immobilizasyonundan kaynaklanmaktadır. İşlenmiş mısır nişastasında kısa menzilli moleküler düzenin bozulmasını artırmasından kaynaklandığını belirtmektedir (Basilio-Cortés *et al.* 2019).



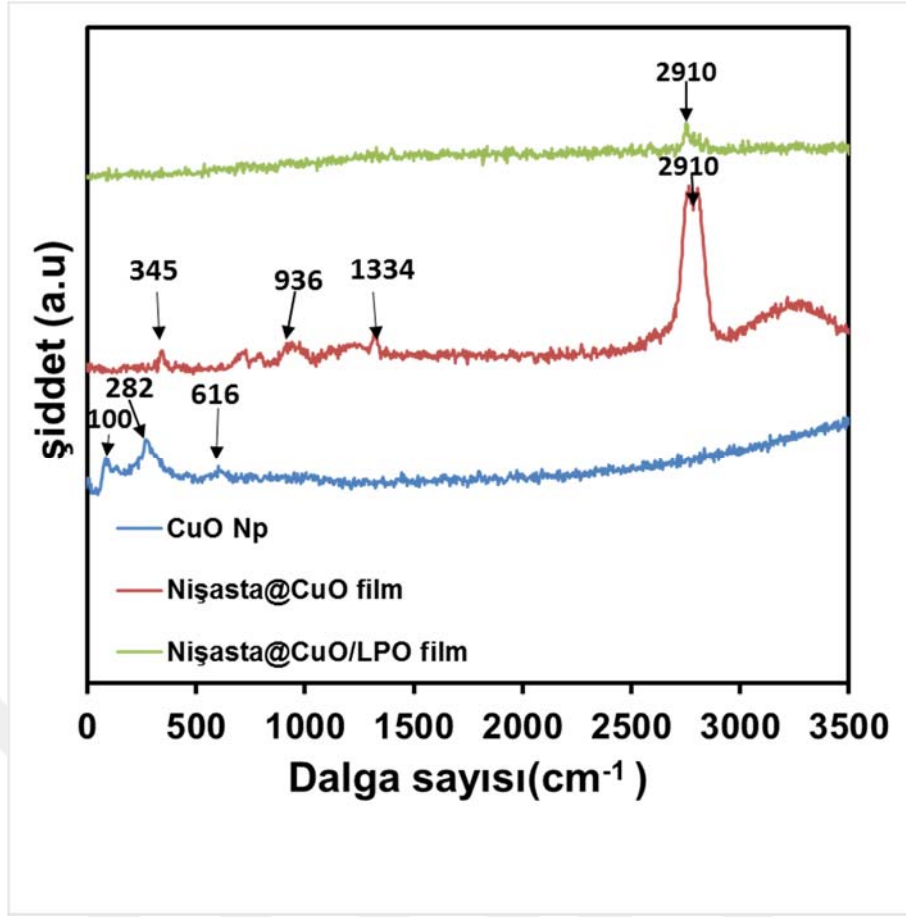
**Şekil 24.** Nişasta toz, Nişasta film, Nişasta/LPO ait Raman Spektrum

#### ***CuO NP, Nişasta@CuO Film, Nişasta@CuO/LPO Film Raman Spektrum***

CuO nanopartikülünün raman spektrumları **Şekil 23'**de gösterilmektedir. CuO 'in 100, 282 ve 620  $\text{cm}^{-1}$ 'de üç Raman tepe noktası olduğu görülmektedir. CuO nanopartikülün titreşim spektrumları ile 282  $\text{cm}^{-1}$ 'deki zirveyi Ag'ye ve 330 ve 616  $\text{cm}^{-1}$ 'dekileride Bg modlarına atayabiliriz. Bu dalga sayılarının literatürde bildirilenlere yakın olduğu bilinmektedir. (Rashad *et al.* 2013).

Nişasta@CuO filmin raman spektrumlarının incelenmesi, nişasta tozu ile kıyasla üretilen piklerde farka sahip olduğunu göstermektedir. Buda CuO NP'nun yüzeye bağlandığını doğrulamaktadır. Saf modifiye nişasta filmi ve nişasta tozunda olduğu gibi raman spektrumunda, 2910  $\text{cm}^{-1}$  civarında C-H gerilme bağı gösterdi. Nişasta@CuO filmindeki bu bantlar, nişastanın karakteristik tepe noktalarıdır. Filmin içindeki CuO NP ait pikler nişasta tarafından perdelenmediği için gözükmediği düşünülmektedir. Piklerin gözükmemesinin bir diğer sebebi ise filmin içindeki nanopartiküller homojen şekilde dağıldığında yüzey miktarı, CuO NP' üne göre daha azdır.

Nişasta@CuO/LPO filminde 2910  $\text{cm}^{-1}$  ikili modifikasyona sahip nişastada gözlenen en yoğun bant gözlemlendi. 500–1500  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki bir dizi zayıf bant LPO enziminin Nişasta@CuO filminin yüzeyine bağlanmasından dolayı pikler gözükmediği düşünülmektedir. CuO NP ait piklerin gözükmemesinin nedenlerini yukarıda belirtilmişti.

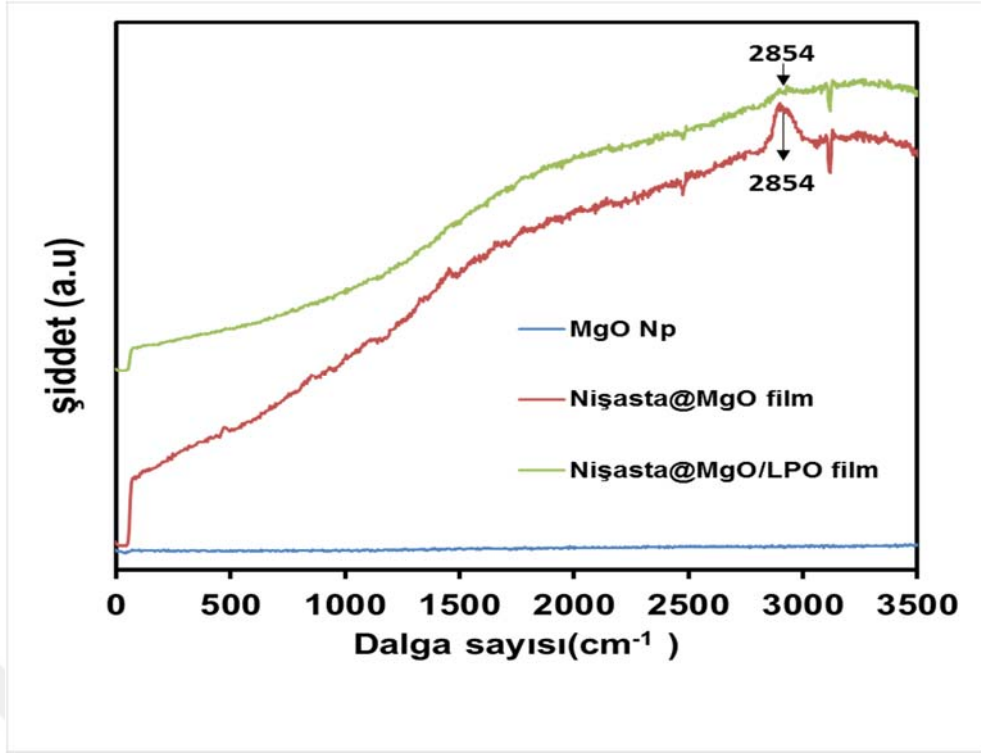


**Şekil 25.** CuO NP, Nişasta@CuO film, Nişasta@CuO /LPO ait Raman Spektrum

#### ***MgO NP, Nişasta@MgO Film, Nişasta@MgO/LPO Film Raman Spektrum***

MgO nanopartikülünün raman spektrumları **Şekil 24**'de gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi MgO ait pikler görülmedi.

Nişasta@MgO ve Nişasta@MgO/LPO filminin raman spektrumunu incelediğimizde, nişasta filmlere (**Şekil 23**) magnezyum oksit nanoparçacıklarının eklenmesiyle, 2910  $\text{cm}^{-1}$ 'daki en yoğun bantlarda kaymalar oldu. Ayrıca nişasta filmindeki 500–1500  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki bir dizi zayıf bantlar perdelediği için gözükmedi.

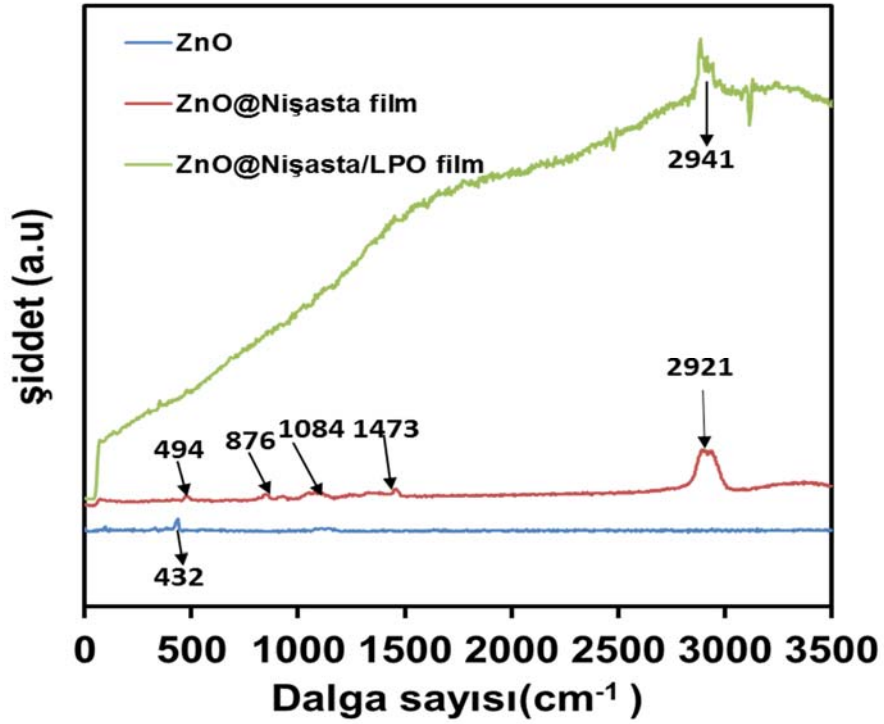


**Şekil 26.** MgO NP, Nişasta@MgO film, Nişasta@MgO /LPO ait Raman Spektrum

***ZnO NP, Nişasta@ZnO Film, Nişasta@ZnO/LPO Film Raman Spektrum***

Şekil 25 ‘de 532 nm uyarımı altında ölçülen ZnO nanoparçacıklarının Raman spektrumunu göstermektedir. 307 ve 603  $\text{cm}^{-1}$  civarında bulunan zayıf pikler gözlenmedi. Bir tek 432  $\text{cm}^{-1}$ ’de bulunan pik gözlemlendi. Bu pik altıgen wurtzite ZnO’nun tipik bir özelliği olan ikinci dereceden Raman ( $E_{2H}$ ) moduna atanır (Pandey *et al.* 2016).

Nişasta@ZnO ve Nişasta@ZnO/LPO filmlerinin raman spektrumlarını incelediğinde, nişasta filmlerine (Şekil 25) çinko oksit nanoparçacıklarının eklenmesiyle, filme ait bantlarda kaymalar gözlemlendi.

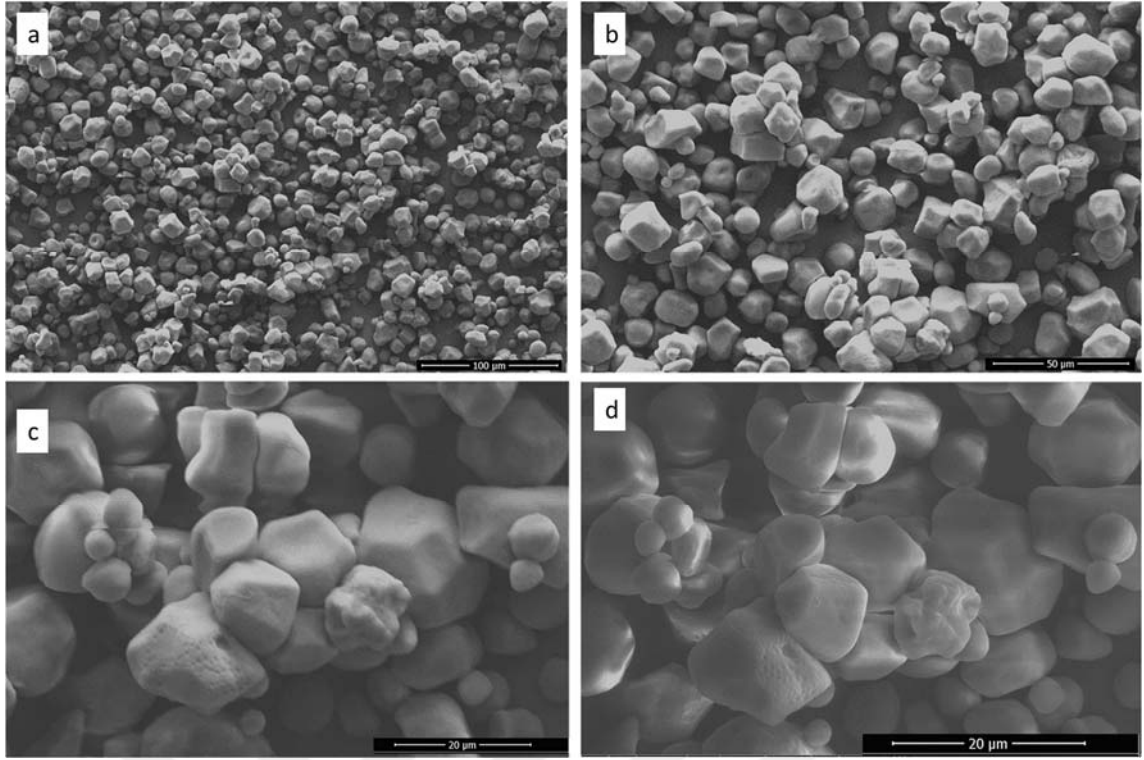


**Şekil 27.** ZnO NP, Nişasta@ZnO film, Nişasta@ZnO /LPO ait Raman Spektrum

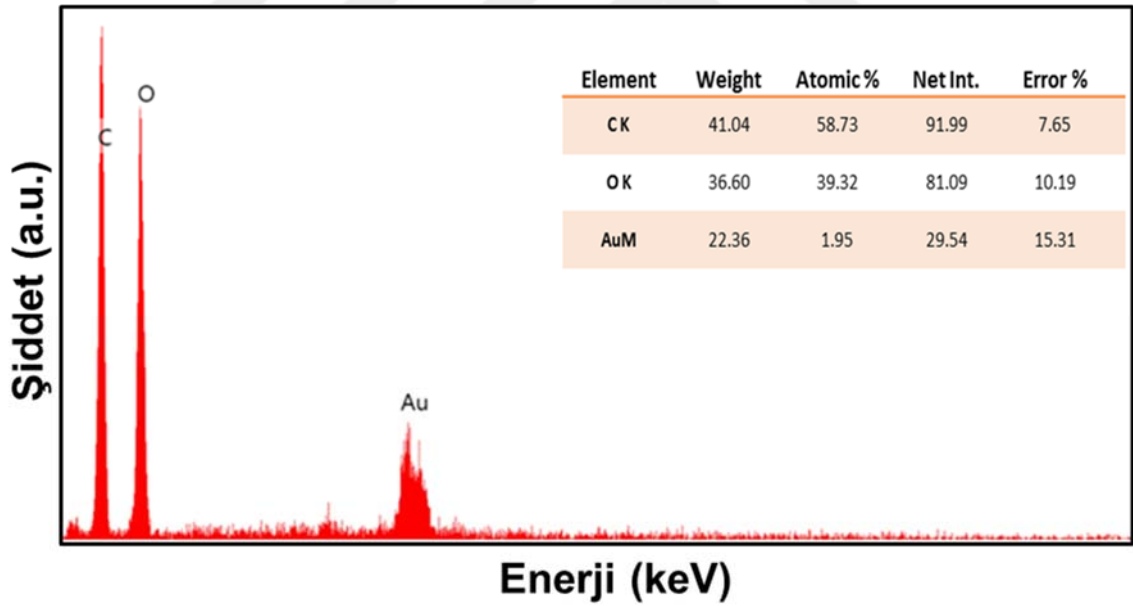
### Morfolojik incelemeler

#### *Nişasta toz EDS analizi ve SEM görüntüleri*

Mısır nişastasının yüzey morfolojisi SEM cihazı ile incelendi. **Şekil 26** (a-d)'da, mısır nişastasının katı top ve çokgen şekilde olduğu yüzeylerinin de kompakt ve kaygan olduğu gözlemlendi. (Ziegler-Borowska *et al.* 2018). Filmlerin elementel analizi **Şekil 27**'de verilen EDS spektrumu ile gerçekleştirildi. Alınan EDS spektrumunda C ve O'dan kaynaklanan oldukça keskin pikler gözlemlendi. Bu piklere ilaveten Au pikleri, numune yüzeyinin yüklenmesini önlemek için numunenin altınla kaplanmasından kaynaklanmaktadır. EDS spektrumundan elde edilen elementel dağılımda nişasta da % 58,73 oranında C ve % 39,32 oranında O bulunduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 28.** Nişasta tozuna ait SEM görüntüleri

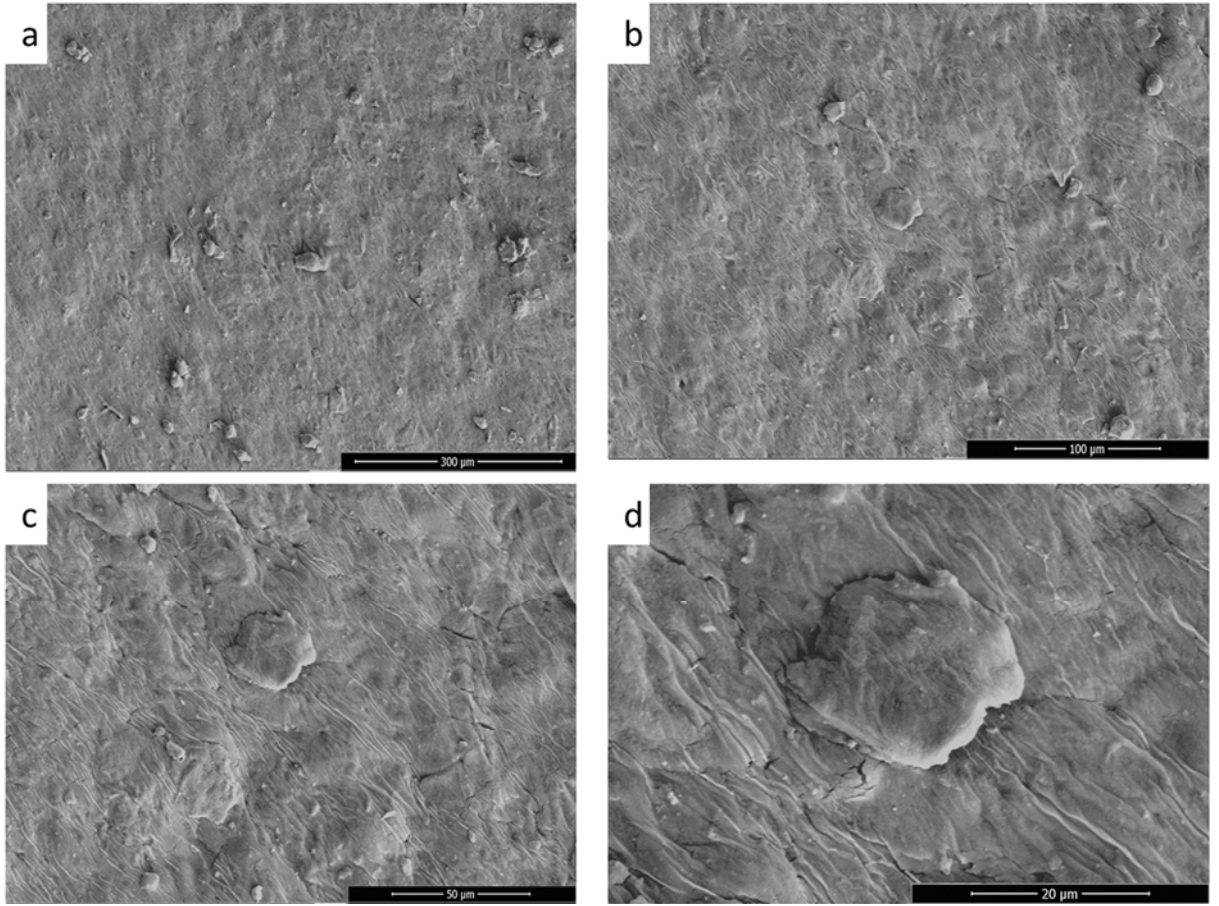


**Şekil 29.** Nişasta toz ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

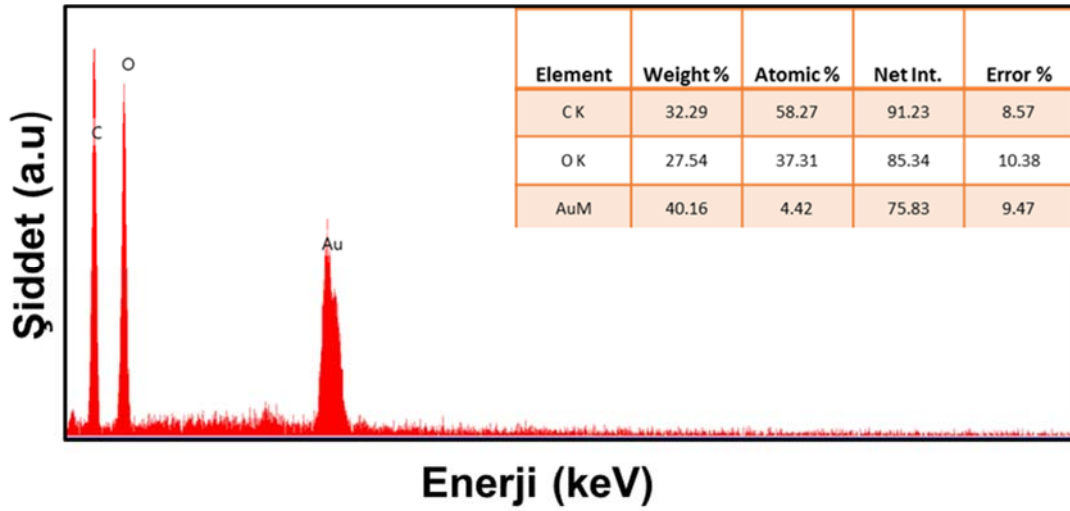
#### *Nişasta film EDS analizi ve SEM görüntüleri*

Katkı maddelerinin nişasta üzerindeki plastikleştirici veya takviye edici etkisini doğrulamak için numunenin enine kesit morfolojisi SEM cihazı ile görüntülendi. Elde edilen görüntüler **Şekil 28**'te gösterilmektedir. Gliserol içerikli ekstrüzyondan sonra, nispeten pürüzsüz enine kesitler gözlemlendi (**Şekil 29** a-d). Bu sonuçlar nişasta granüllerinin büyük

deformasyona uğradığını, yüksek sıcaklık ve güçlü kesme altında ekstrüzyondan sonra birleştiğini gösterdi. Ayrıca plastikleştirilmiş nişastanın iyi işlenebilirliğini doğruladı (Liu *et al.* 2020). Bu filmlerin elementel analizi **Şekil 29**'de verilen EDS spektrumu ile gerçekleştirildi. Alınan EDS spektrumunda C ve O'dan kaynaklanan oldukça keskin pikler gözlemlendi. Bu piklere ilaveten Au pikleri, numune yüzeyinin yüklenmesini önlemek için numunenin altınla kaplanmasından kaynaklanmaktadır. EDS spektrumundan elde edilen elementel dağılımda Nişasta filminde % 58, 27 oranında C ve % 37, 31 oranında O bulunduğu tespit edildi.



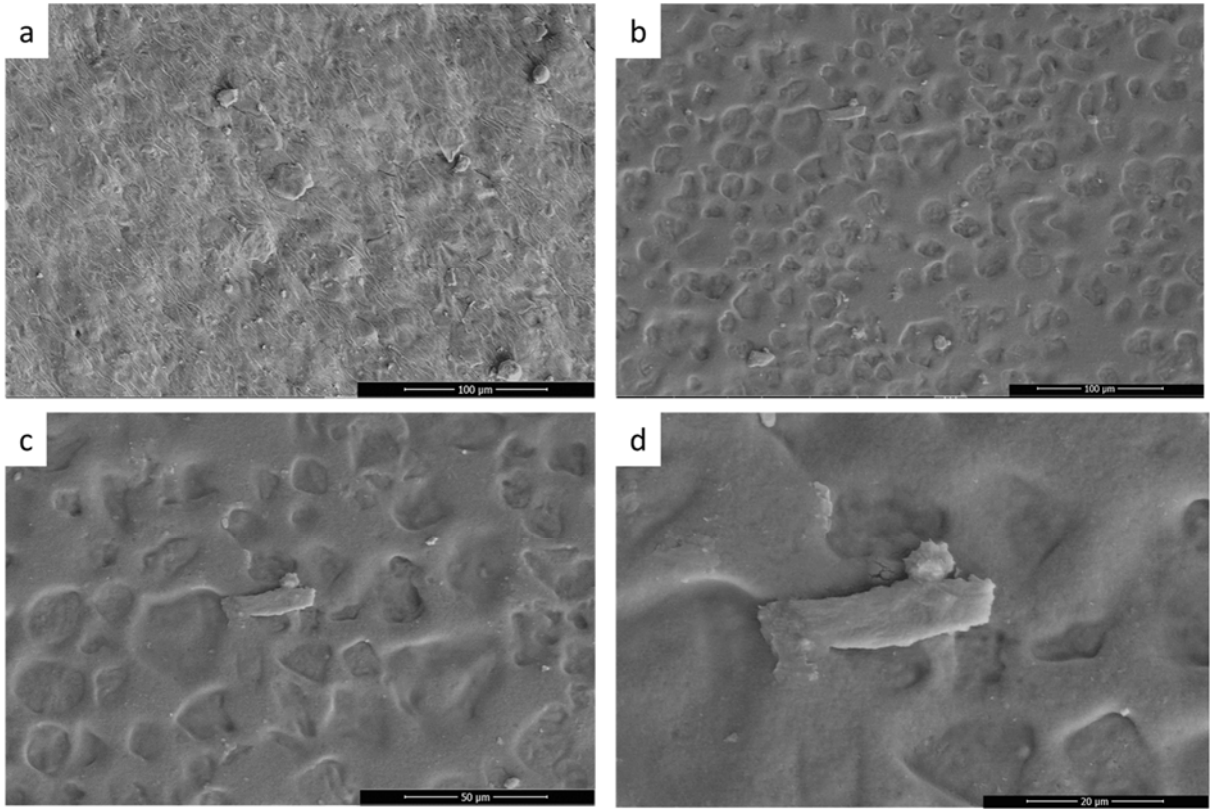
**Şekil 30.** Nişasta film ait SEM görüntüleri



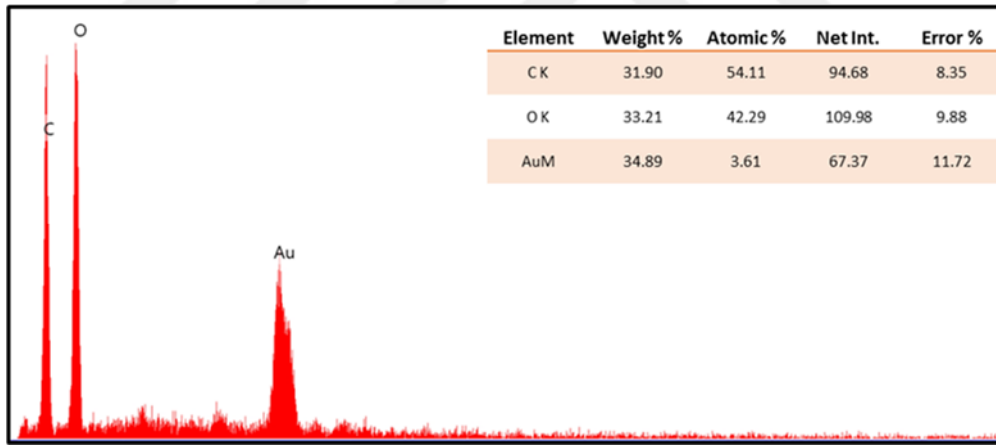
**Şekil 31.** Nişasta film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

#### *Nişasta/LPO film Filmi EDS analizi ve SEM görüntüleri*

SEM cihazı ile nişasta filminde nispeten homojen ve pürüzsüz kesitler görüldüğü yukarda belirtilmiştir (**Şekil 30'a**). Nişasta/LPO filminin elde edilen SEM görüntüleri **Şekil 30 (b-d)**' da incelendi. Nişasta filmindeki nispeten pürüzsüz enine kesitler, üzerine LPO yüklemesi yapıldıktan sonra yüzeyin bozulduğu ve küresel dairelere benzeyen çukurlar görüldü. Nişasta filmlerine LPO enziminin eklenmesinden sonra yüzey morfolojisindeki değişiklik immobilizasyon sürecini doğruladı. Nişasta/LPO filmlerinin elementel analizi **Şekil 31**'de verilen EDS spektrumu ile gerçekleştirildi. Alınan EDS spektrumunda C ve O'dan kaynaklanan oldukça keskin pikler gözlemlendi. Bu piklere ilaveten Au pikleri, numune yüzeyinin yüklenmesini önlemek için numunenin altınla kaplanmasından kaynaklanmaktadır. EDS spektrumunda elde edilen elementel dağılım **Şekil 31**'i içinde verilmiştir.



**Şekil 32.** a Nişasta film ve b-d Nişasta/LPO film ait SEM görüntüleri

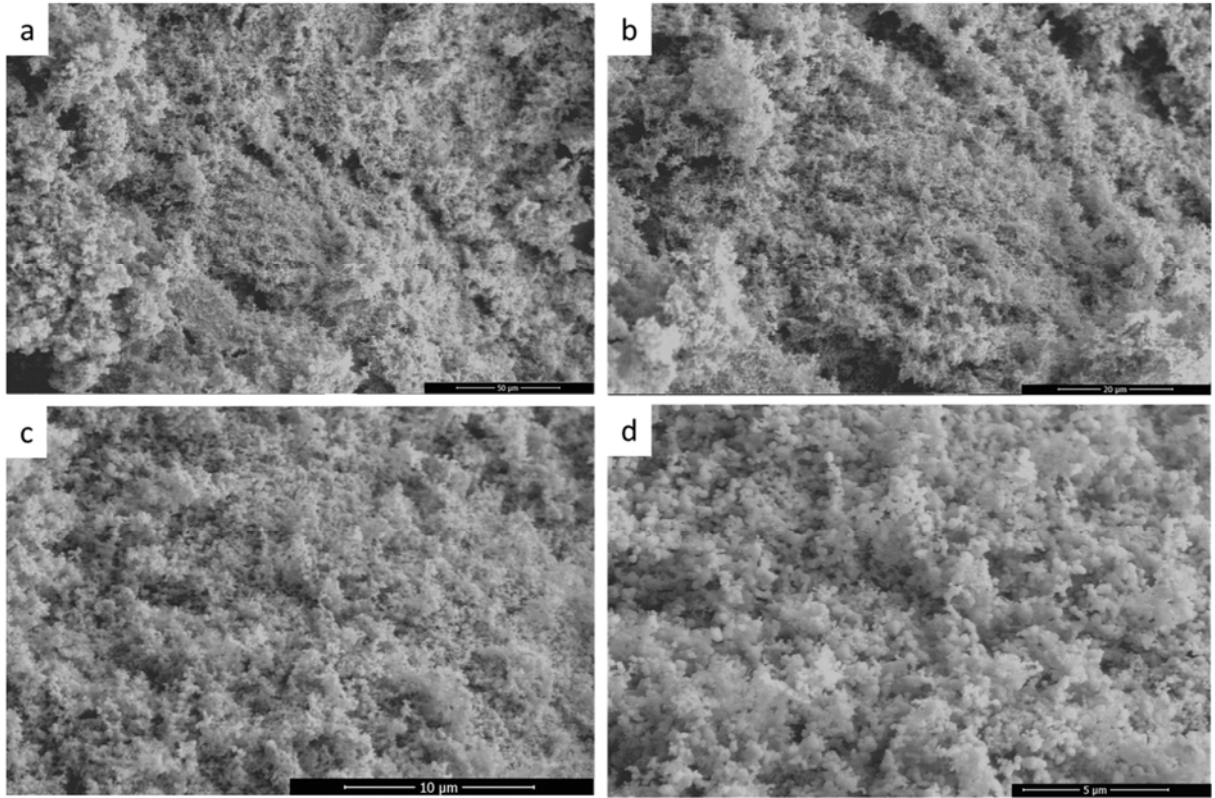


**Şekil 33.** Nişasta/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

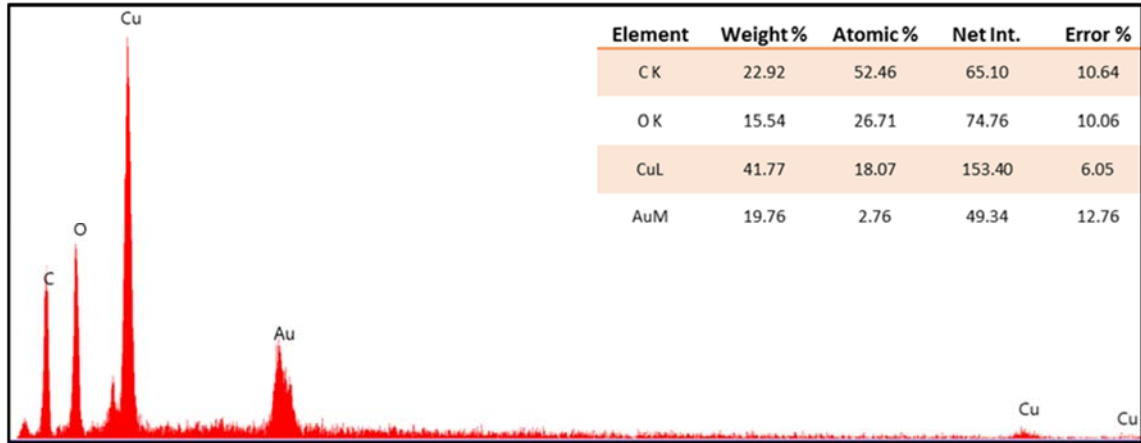
#### ***CuO Nanopartikül EDS analizi ve SEM görüntüleri***

CuO nanoparçacıklarının SEM görüntüleri Şekil 32'(a-d) de verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde nanoparçacıkların kümeleşmiş küçük parçacıklardan oluştuğu görülmektedir. Bu küçük parçacıklar çiçek şekline benzetilebilir (Manyasree *et al.*2017). Nanoparçacıklar çözeltiden çökeltme yöntemi ile sentezlendi. SEM görüntülerinde, yüksek yüzey alanına sahip nanopartikül tanelerinin topaklanması net bir şekilde görülmektedir (Hussain *et al.*201). Sentezlenen malzemelerin saflığını ve kimyasal bileşimini incelemek için numunenin enerji dağılım spektrumlarına bakıldı. Şekil 33'de, EDS spektruma bakıldığında

elemental karbon (C), bakır (Cu) ve oksijen (O) içerdiği ve başka elementel safsızlık içermediği görülmektedir(Manyasree *etal.*2017).



Şekil 34. CuO Nanopartikül ait SEM görüntüleri

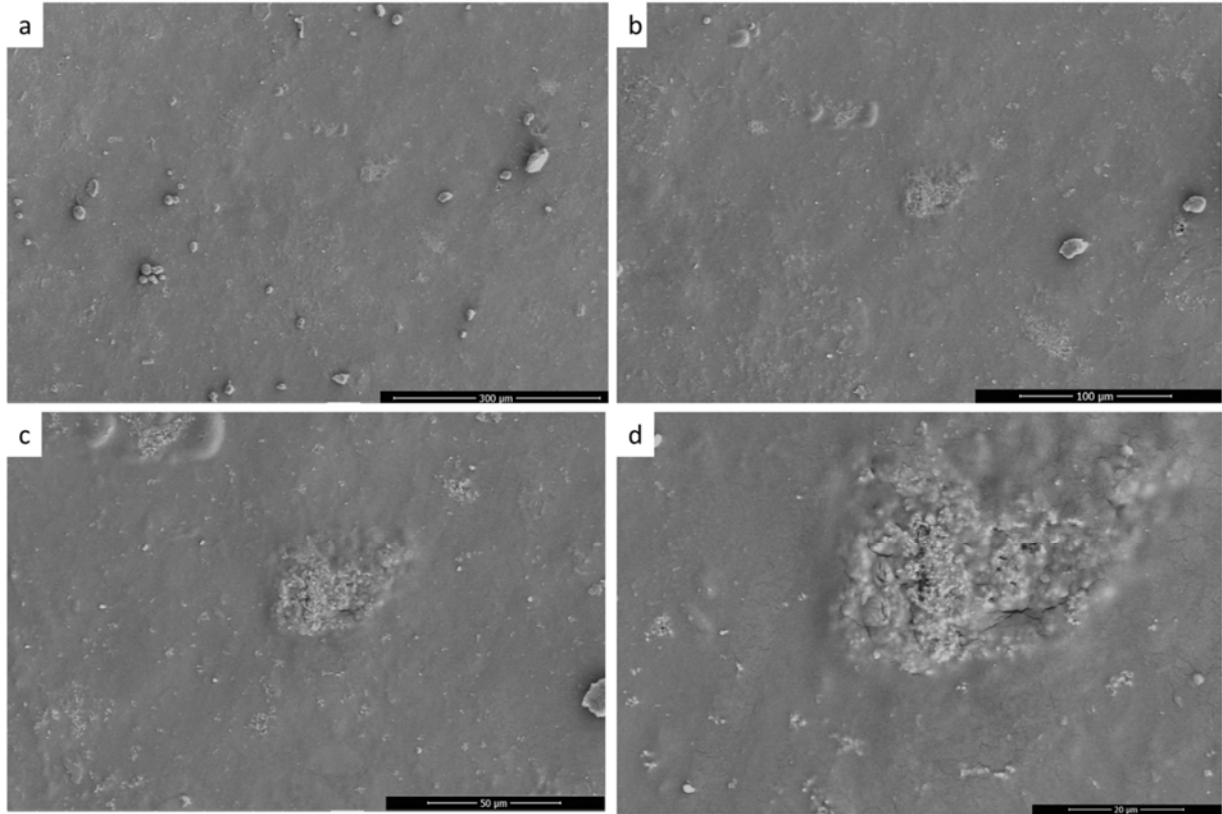


Şekil 35. CuO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

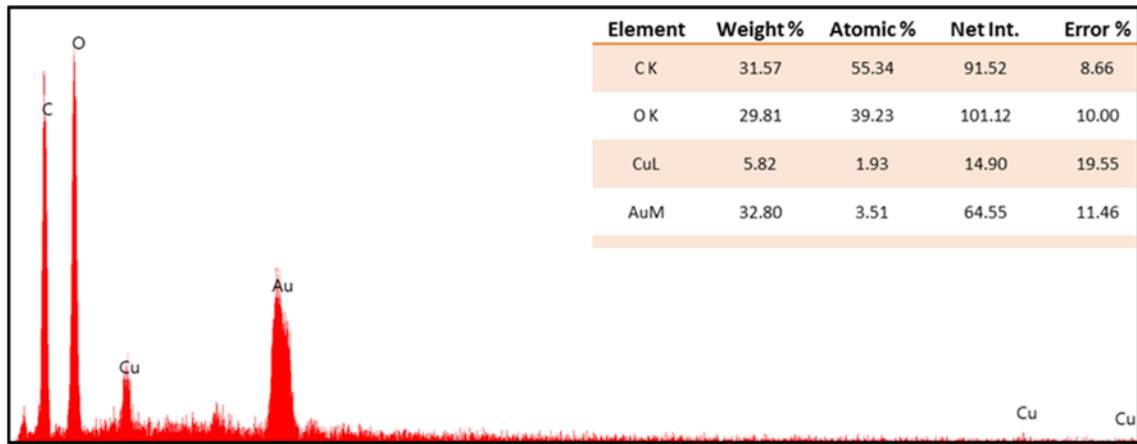
#### *Nişasta@CuO film EDS analizi ve SEM görüntüleri*

Şekil 28 (a-d)'de verilen Nişasta film yüzeylerinin düzgün ve bağımsız olduğunu yukarıda belirtmiştik. Filmlerin mikro yapısındaki farkı kontrol etmek için, Şekil 34(a-d) 'de CuO NP'lerle kompozit film yüzeylerinin SEM görüntüleri verildi. Görüldüğü gibi, Nişasta@CuO filmleri kompakt yapısal bütünlük ve homojen pürüzsüz yüzey yapıları gösterdi. Nişasta@CuO filmlerin SEM görüntüleri, kullanılan Nişasta filmleri arasında önemli bir mikro

yapısal farklılık göstermedi. Nano doldurucular, küçük boyutlarından dolayı yüksek yüzey enerjisine sahiptir ve bu nedenle yüzey enerjilerini en aza indirmek için topaklanma eğilimindedirler. Bu topaklanmaları film matrisi içinde homojen küçük beyaz noktalar şeklinde dağıldığı görüldü. **Şekil 34'**(d) de Nişasta@CuO filminin 20 µm SEM görüntüsünde CuO NP'lün daha yakın bir görüntüsü gösterildi. (Shankar et al.2017). Sentezlenen malzemelerin saflığını ve kimyasal bileşimini incelemek için numunenin EDS yapılmıştır. **Şekil 35** içinde, EDS spektrumunda Nişasta@CuO filminin atomik dağılımı verildi.



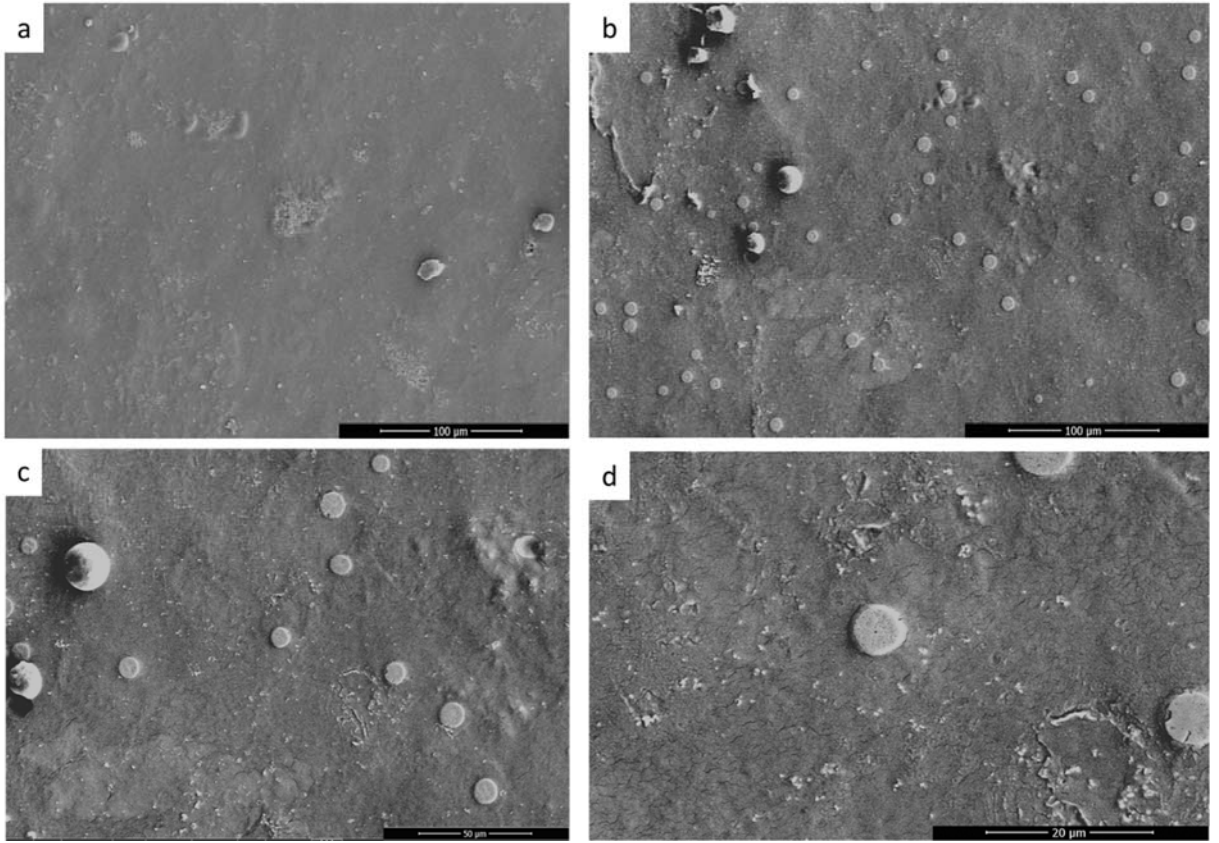
**Şekil 36.** Nişasta@CuO film ait SEM görüntüleri



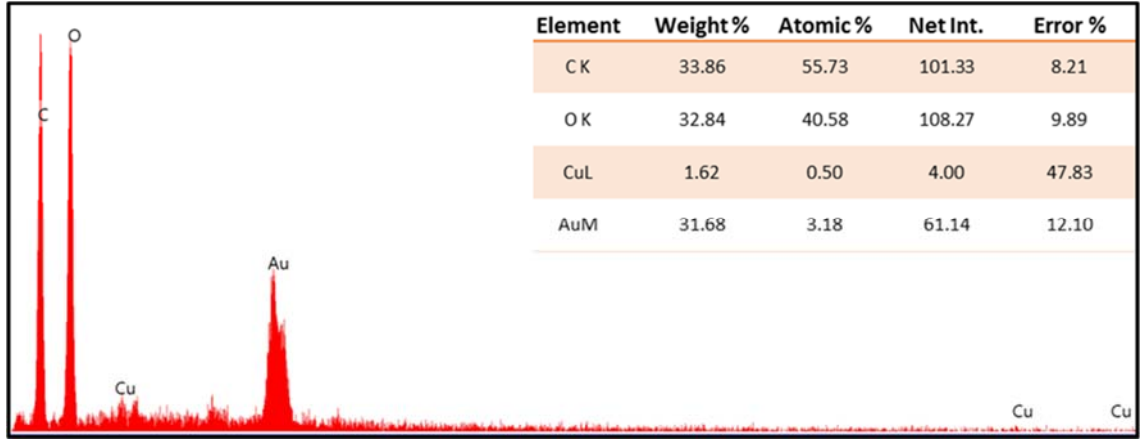
**Şekil 37.** Nişasta@CuO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

### ***Nişasta@CuO/LPO film EDS analizi ve SEM görüntüleri***

**şekil 34'** de Nişasta@CuO filmlerinin, homojen ve pürüzsüz yüzey yapılarını gösteren SEM görüntüleri doğrultusunda, **şekil 36 (a-d)**'de Nişasta@CuO ve Nişasta@CuO/LPO filmlere ait yüzey SEM görüntüleri sunuldu. Nişasta@CuO/LPO filmine ait yüzey SEM görüntüsü (**şekil 36 b-d**) incelendiğinde yüklenen enzimin küçük küresel bir morfolojiye sahip olduğu dikkat çekmektedir. Nişasta@CuO filmlerine LPO enziminin eklenmesinden sonra yüzey morfolojisindeki değişiklik immobilizasyon sürecini doğrulamıştır (Movahedi *et al.*2018). Sentezlenen malzemelerin saflığı ve kimyasal bileşimini incelemek için numunenin Enerji dağılım spektrumları gerçekleştirildi ve **şekil 37** içinde, EDS spektrumunda Nişasta@CuO/LPO filminin atomik dağılımı verildi.



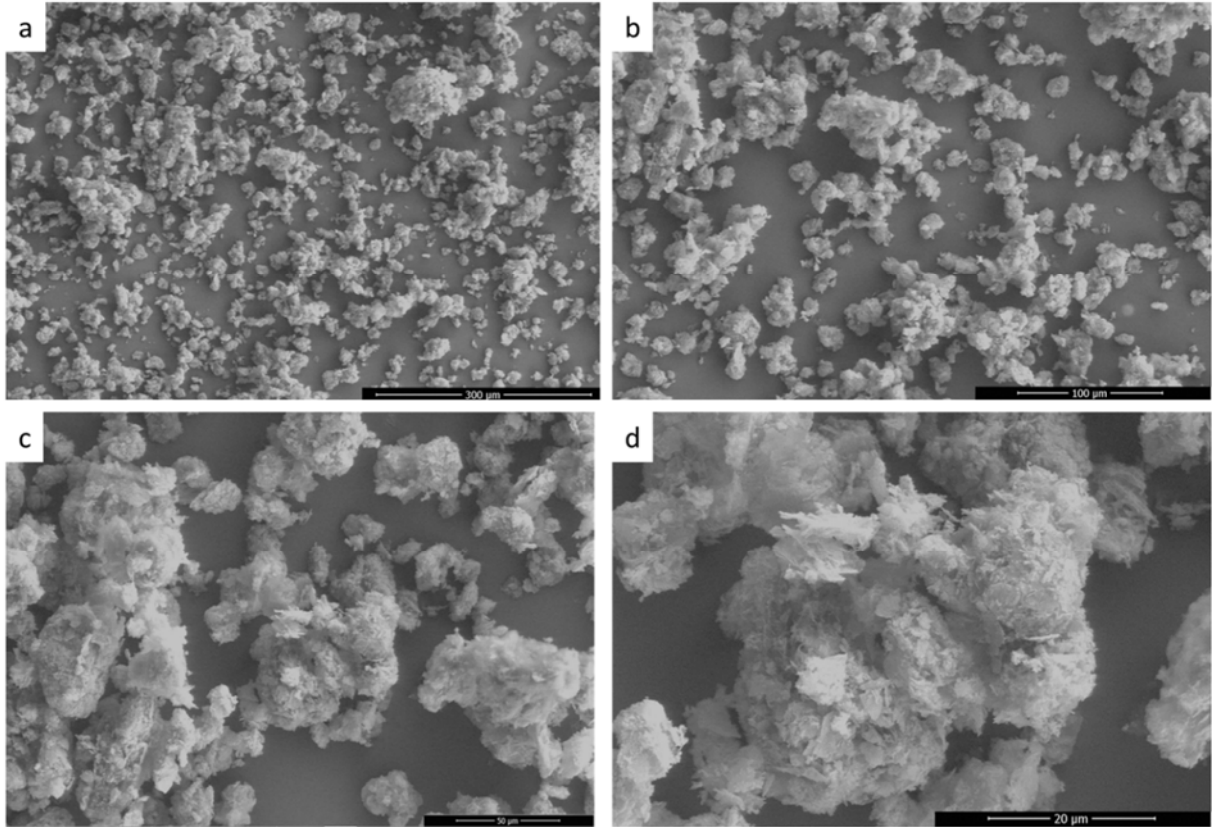
**şekil 38.** a Nişasta@CuO film ve b-d Nişasta@CuO/LPO film ait SEM görüntüleri



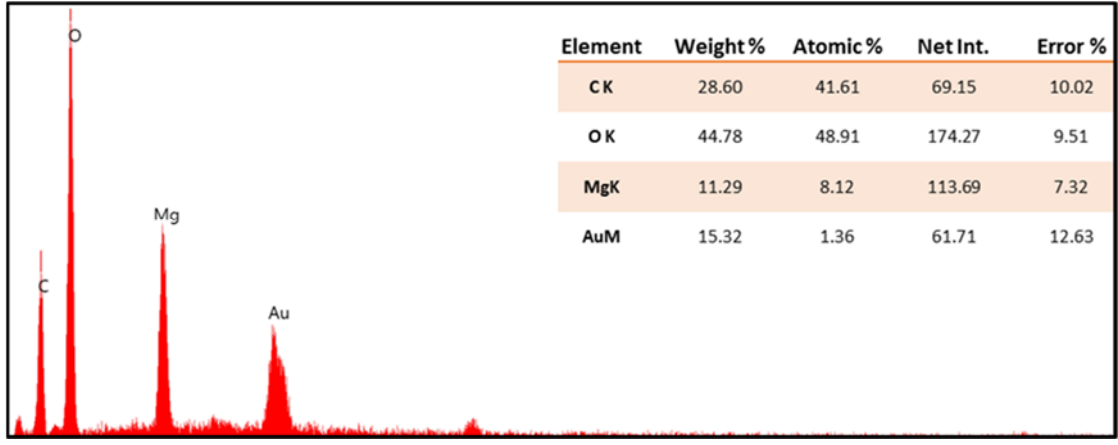
**Şekil 39.** Nişasta@CuO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

### ***MgO Nanopartikül EDS analizi ve SEM görüntüleri***

Şekil 38 'de MgO NP'nün SEM görüntüleri doğrultusunda görüntüler incelendiğinde, MgO NP yüzeylerinin küresel morfolojiye sahip düzenli nanokristallerden oluştuğu görülmektedir. Ayrıca yüzeylerin oldukça pürüzlü bir yapıya sahip olduğu ve nanopartiküllerin topaklanmasını net bir şekilde göstermektedir. Elemental EDS ile kompozisyon analizi yapıldı. Sonuçlar Şekil 39'da EDS spektrumunda verildi. EDS spektruma bakıldığında elemental karbon (C), bakır (Cu) ve oksijen (O) içerdiği ve başka elementel safsızlık içermediği görülmektedir (Somanathan *et al.* 2016).



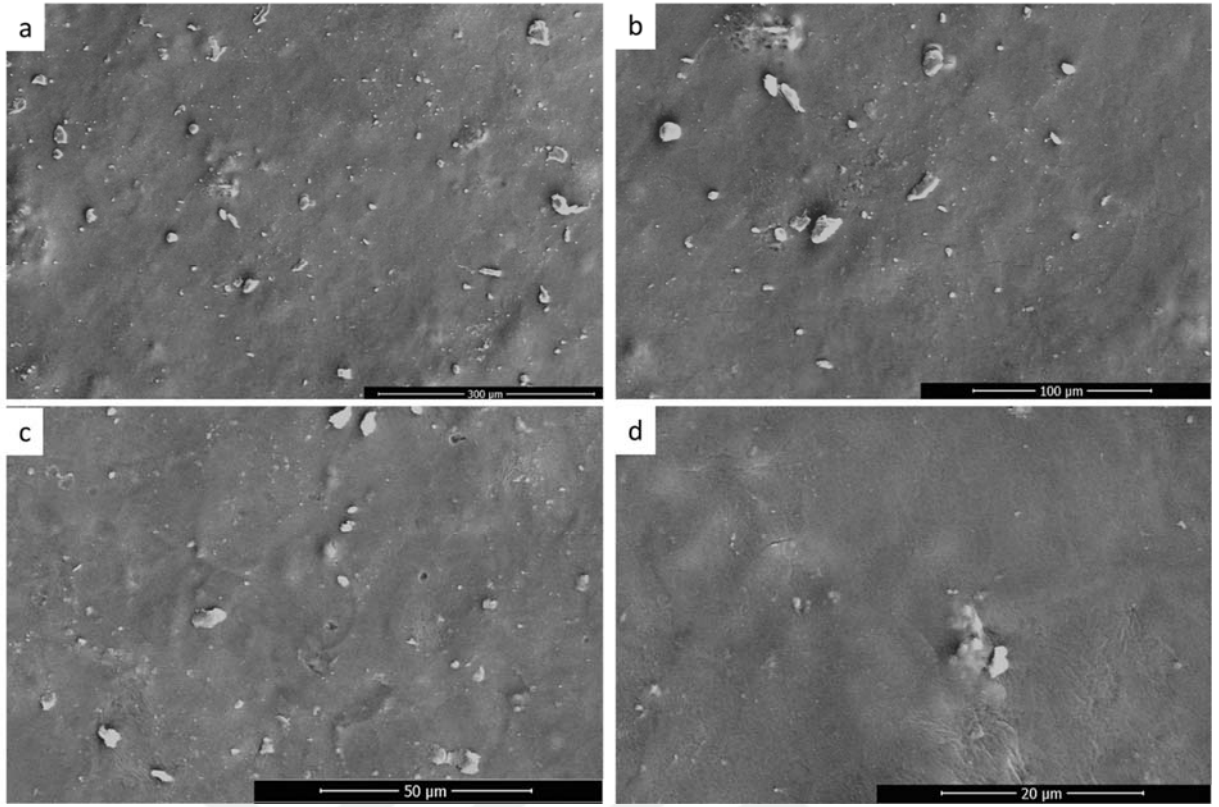
**Şekil 40.** MgO Nanopartikül ait SEM görüntüleri



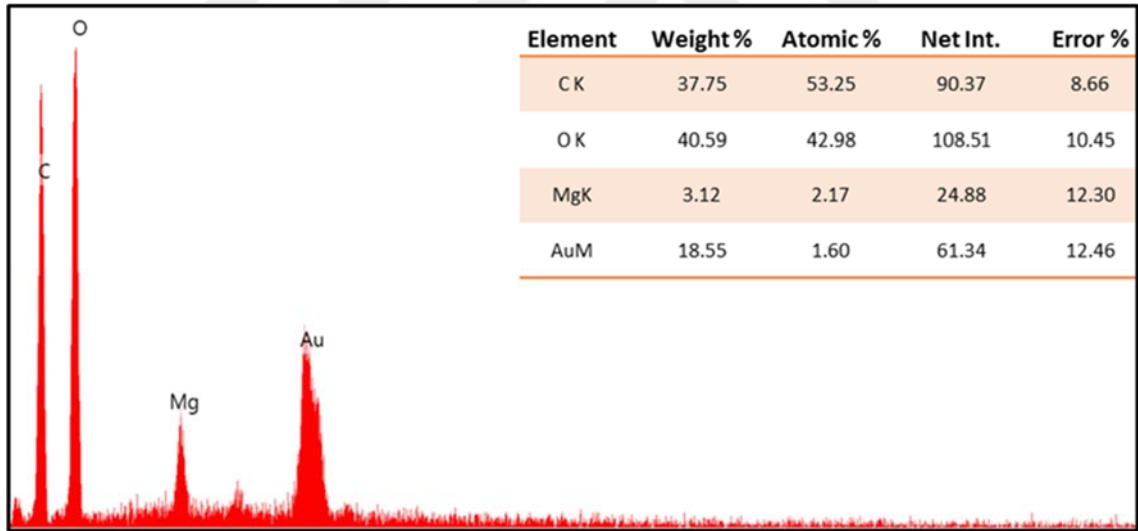
**Şekil 41.** MgO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

#### *Nişasta@MgO film EDS analizi ve SEM görüntüleri*

**Şekil 40** (a-d) 'da filmlerin yüzey araştırması, NP'lerin yüklenmesiyle artan aglomerasyonlar (beyaz noktalar olarak görülen) şeklinde tüm numunede NP'lerin düzgün dağılımını ortaya çıkardı. Film yüzeylerinin incelenmesi ayrıca bozulmamış nişasta filmlerinin pürüzsüz ve kompakt bir yüzeyini göstermiş oldu. Nano doldurucular, küçük boyutlarından dolayı yüksek yüzey enerjisine sahiptir ve bu nedenle yüzey enerjilerini en aza indirmek için topaklanma eğilimindedirler. Bu kümelenmiş parçacıklar SEM analizinde de yakalanan film yüzeyinin pürüzlülüğüne katkıda bulunmuştur. Filmlerin pürüzlülüğü, MgO NP'lerin yüklenmesiyle, esas olarak daha yüksek dolgu maddesi yüklemesinde artan aglomerasyon eğilimi nedeniyle arttı. Filmlerin SEM analizi Nişasta@MgO filmlerinin solvent döküm yöntemiyle başarılı bir şekilde gerçekleştiğini filmlerin yüzeyinde hiçbir fiziksel kusur olmadığını kanıtlamaktadır. Yüzey morfolojisine ek olarak, MgO NP'lerin dağılımı ve biyofilmlerin bileşimi de Enerji Dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizi ile doğrulandı. **Şekil 41** içinde, EDS spektrumunda Nişasta@MgO filminin atomik dağılımı verildi (Swaroop *et al.* 2018).



**Şekil 42.** Nişasta@MgO film ait SEM görüntüleri

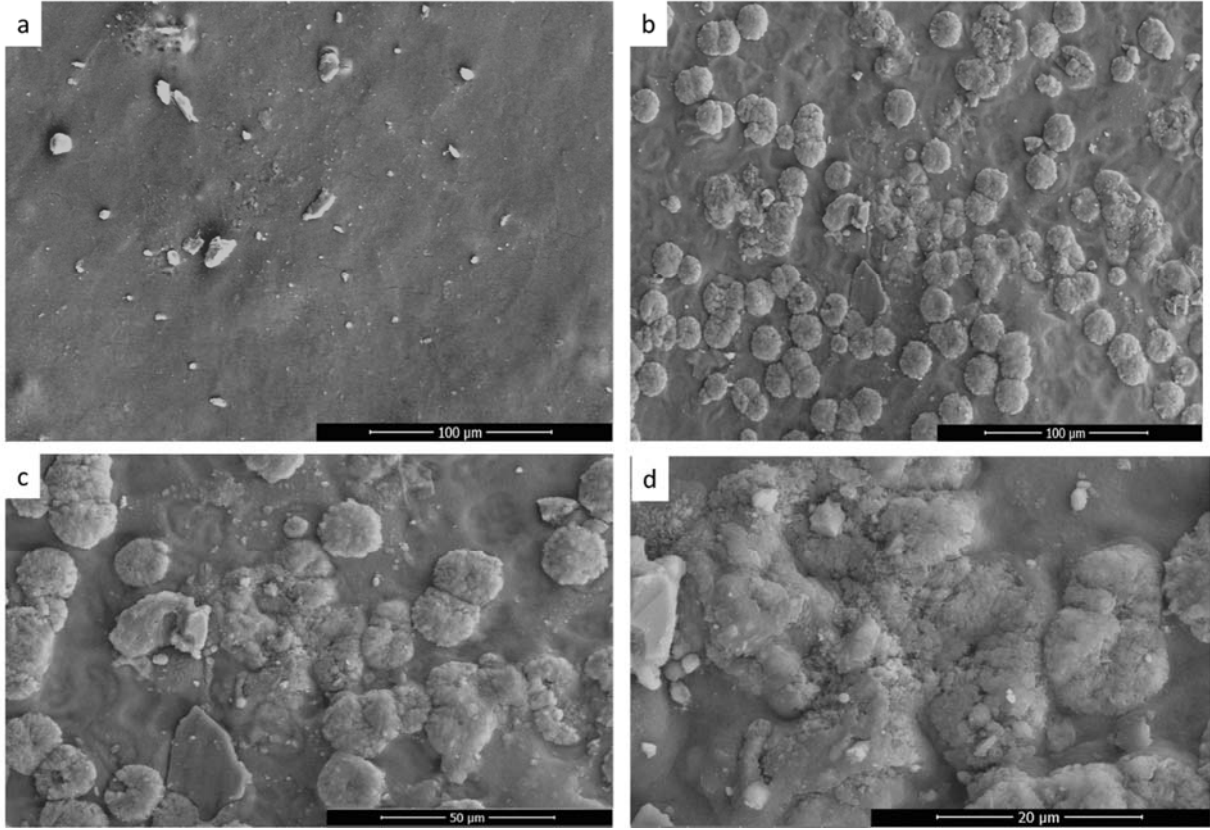


**Şekil 43.** Nişasta@MgO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

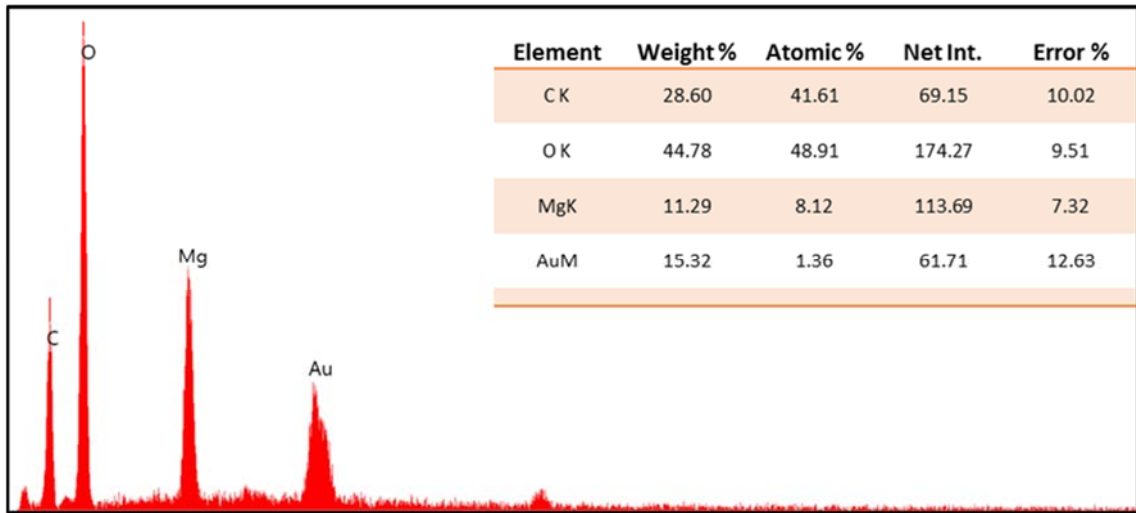
#### *Nişasta@MgO/LPO film EDS analizi ve SEM görüntüleri*

Şekil 42 (a)'da Nişasta@MgO filmi ve Şekil 42 (b-d)'de Nişasta@MgO/LPO filminin SEM görüntüleri kapsamında, Nişasta@MgO filmine (Şekil 42'a) ait görüntü incelendiğinde NP'lerin yüklenmesiyle artan aglomerasyonlar (beyaz noktalar olarak görülen) şeklinde tüm numunede NP'lerin düzgün dağılımını ortaya çıkardı. Film yüzeylerinin incelenmesi ayrıca bozulmamış nişasta filmlerinin pürüzsüz ve kompakt bir yüzeyini göstermiş oldu. Fakat Nişasta@MgO/LPO filmin görüntüsü incelendiğinde pürüzlü yapının bozulduğu ve yüzeyde

LPO enzimine özgü küresel bir yapının oluştuğu gösterildi (Şekil 42 b-d). Bu SEM görüntüleri ile LPO enziminin Nişasta@MgO filmine immobilize olduğu söylenebilir. Yüzey morfolojisine ek olarak, Nişasta@MgO/LPO filmlerin bileşimi Enerji Dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizi ile doğrulandı. Şekil 43 ‘de Nişasta@MgO/LPO filmlerinin elementel haritalaması ve buna karşılık gelen elementel kompozisyon gösterilmektedir (Shariat *et al.* 2019).



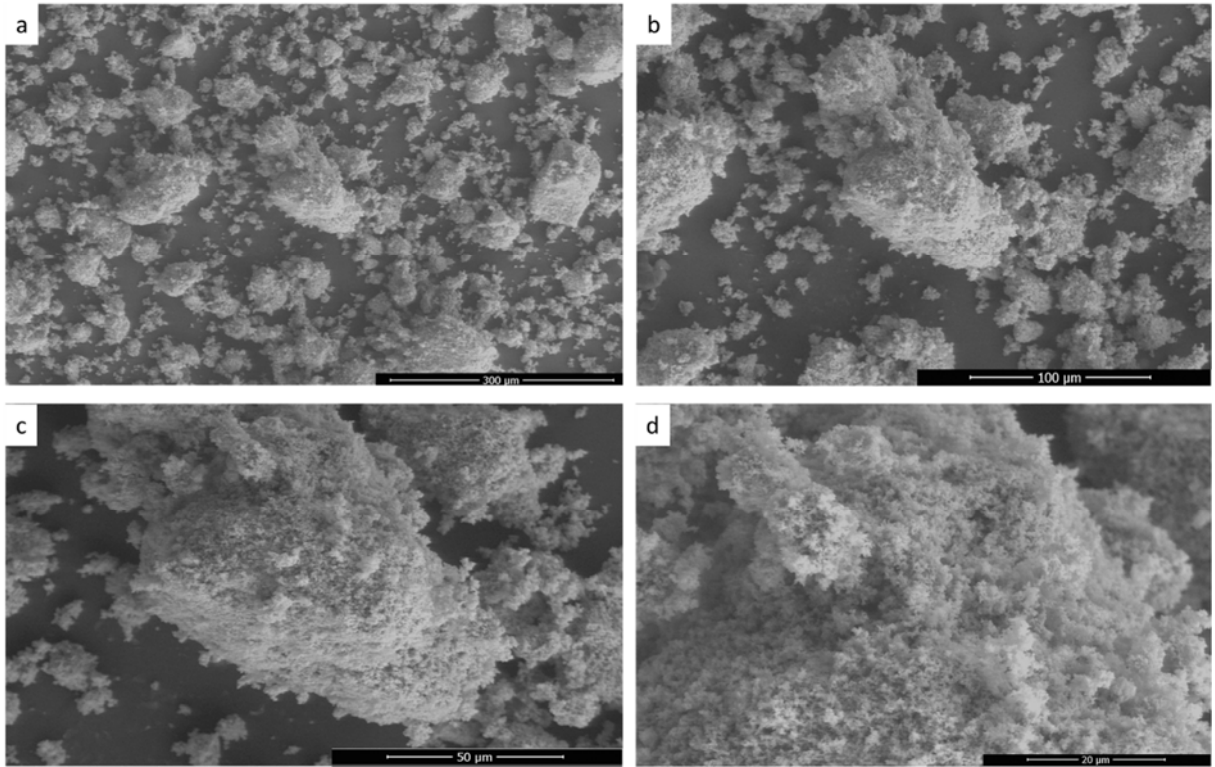
Şekil 44. a Nişasta@MgO film ve b-d Nişasta@MgO/LPO film ait SEM görüntüleri



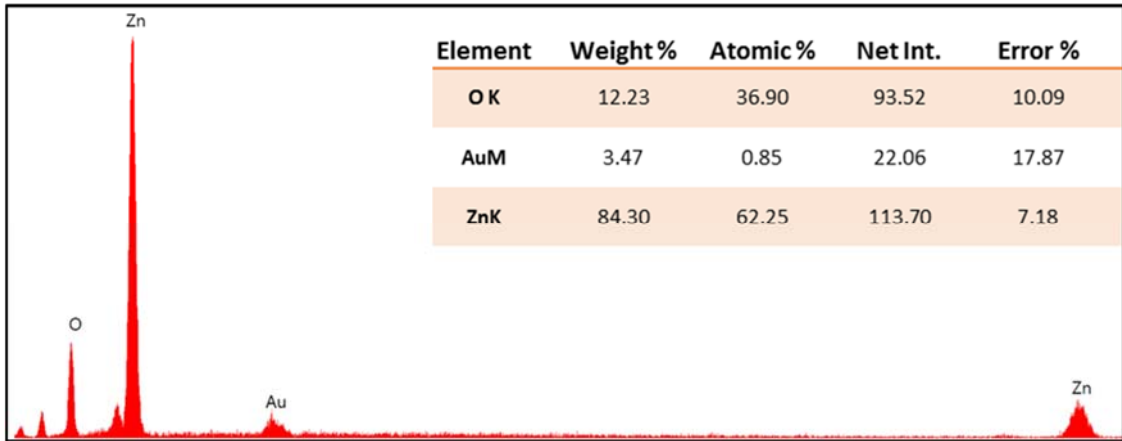
Şekil 45. Nişasta@MgO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

### ***ZnO Nanopartikül EDS analizi ve SEM görüntüleri***

Şekil 44 (a-d) 'de sentezlenen ZnO NP'nun SEM görüntülerini göstermektedir. Ürünlerin ZnO NP'lerin doğası gereği küresel olduğunu ve nanokristallerin topakları olduğunu ortaya koydu Şekil 44 (d) 'de, 20 µm boyutunda sem görüntüsünde mikro küreler daha belirgin görüldü. ZnO nanoparçacıklarının elementel haritalaması ve buna karşılık gelen elemental kompozisyon Şekil 45 'de EDS analizinde gösterilmiştir. Sentezlenmiş ZnO NP'lerde metalik çinko oksit varlığını doğruladığı gözükmemektedir. EDS analizinden elde edilen bileşim Çinko (%62,25), Oksijen (%36,90)'den oluşmuştur (Muhammad *et al.* 2019).



Şekil 46. ZnO Nanopartikül ait SEM görüntüleri

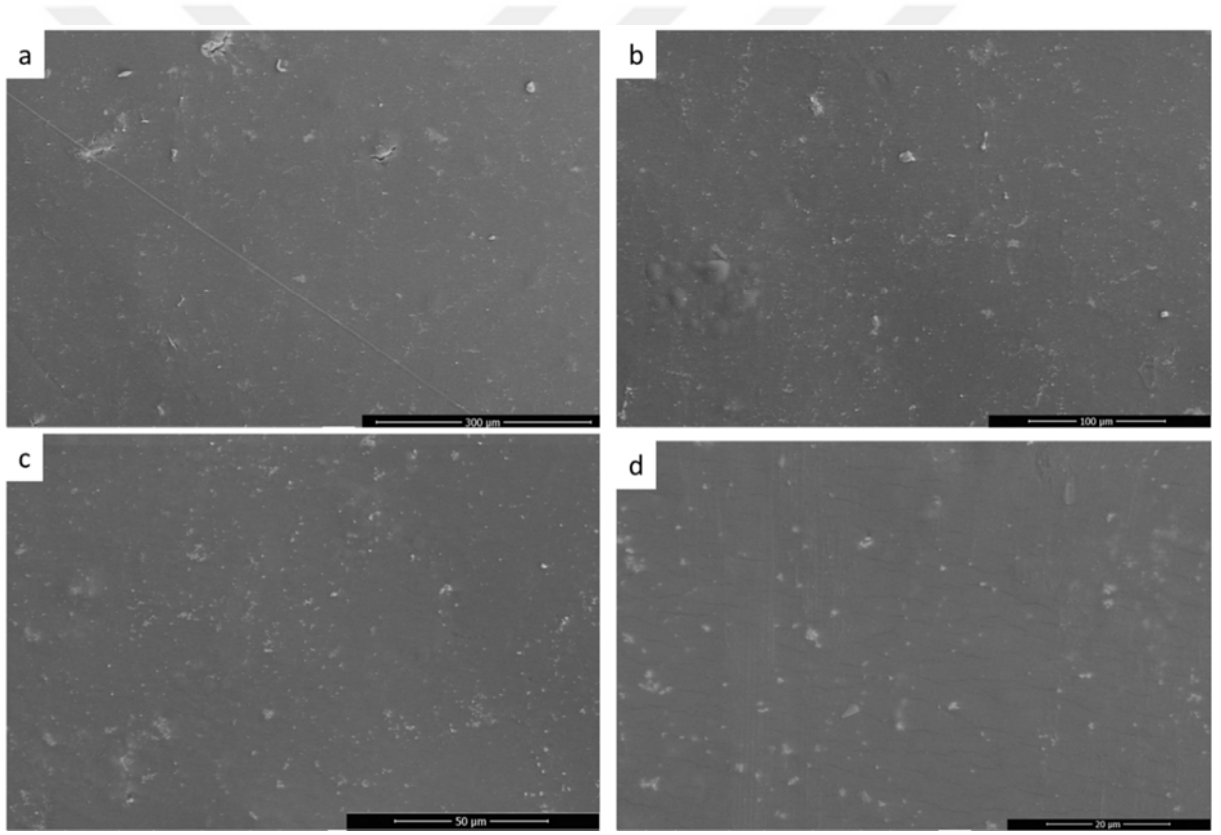


Şekil 47. ZnO Nanopartikül ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

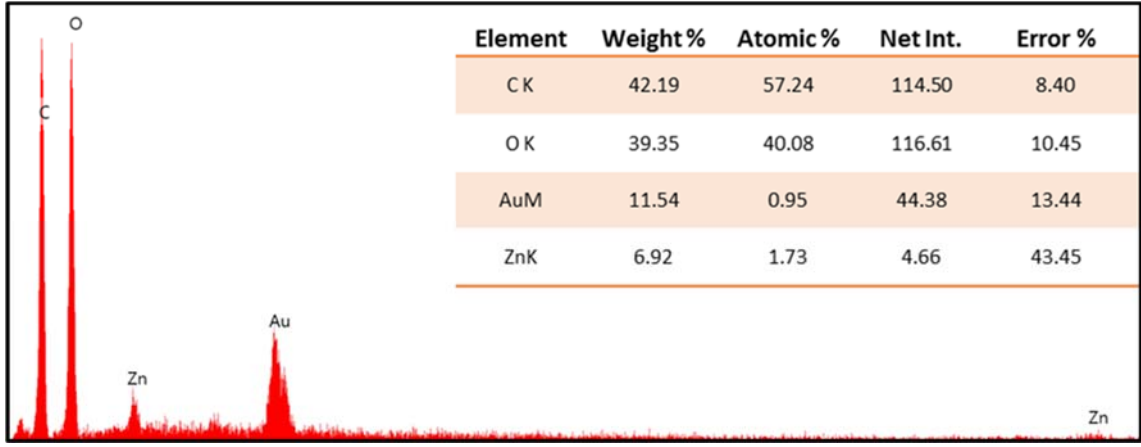
### ***Nişasta@ZnO film EDS analizi ve SEM görüntüleri***

**şekil 46** (a-d)' de Nişasta@ZnO filmin SEM görüntüleri kapsamında görüntüler incelendiğinde , nişasta filmine NP'lerin yüklenmesiyle artan aglomerasyonlar (beyaz noktalar şeklinde görülen) şeklinde tüm numunede NP'lerin düzgün dağılımını ortaya çıkardı. Film yüzeylerinin incelenmesi ayrıca bozulmamış nişasta filmlerinin pürüzsüz ve kompakt bir yüzeyini göstermiş oldu. Nano doldurucular, küçük boyutlarından dolayı yüksek yüzey enerjisine sahiptir ve bu nedenle yüzey enerjilerini en aza indirmek için topaklanma eğilimindedirler.

Nişasta@ZnO filmlerde NP'lerin dağılımını araştırmak için enerji dağılımlı X-ışını analizi (EDS) kullanıldı. **şekil 47** içinde, EDS spektrumunda Nişasta@ZnO filminin atomik dağılımı verildi (Ni *et al.* 2018).



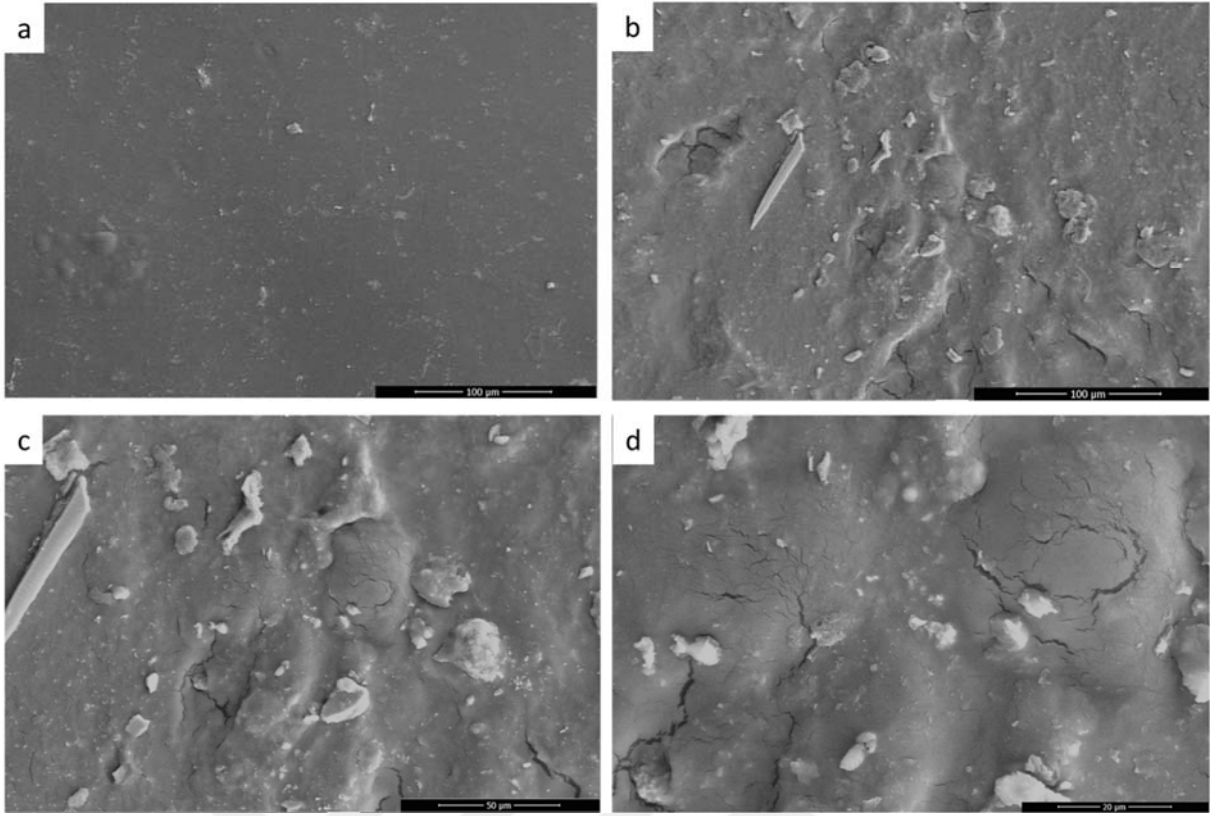
**şekil 48.** Nişasta@ZnO film ait SEM görüntüleri



**Şekil 49.** Nişasta@ZnO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

#### ***Nişasta@ZnO/LPO film EDS analizi ve SEM görüntüleri***

Nişasta@ZnO filmine LPO enzimi yüklenmeden önce, Nişasta@ZnO filmine ait görüntü homojen ve düzgün bir yüzey alanı verdiği gösterilmişti (Şekil 48'a). Bu ZnO NP'lün nişasta matrisi ile iyi uyumlu olduğunu ve nanoparçacıkların nişasta matrisinde homojen olarak dağıldığı SEM görüntüsünde (Şekil 48'a) görülmektedir. Nişasta@ZnO/LPO filminin yüzey SEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 48 b-d) pürüzsüz ve homojen yapının olmadığı ve yüzeyin farklı bir materyal ile modifiye olduğu belirlendi. SEM görüntüsünde (Şekil 48 b-d) LPO'nun eklenmesinden sonra Nişasta@ZnO 'nun yüzey morfolojisindeki değişiklik immobilizasyon sürecini doğruladı. Nişasta@ZnO/LPO filmlerde NP'lerin dağılımını araştırmak için enerji dağılımlı X-ışını analizi (EDS) kullanıldı. Şekil 48 içinde, EDS spektrumunda Nişasta@ZnO/LPO filminin atomik dağılımı verildi.



Şekil 50. a Nişasta@ZnO film ve b-d Nişasta@ZnO/LPO film ait SEM görüntüleri



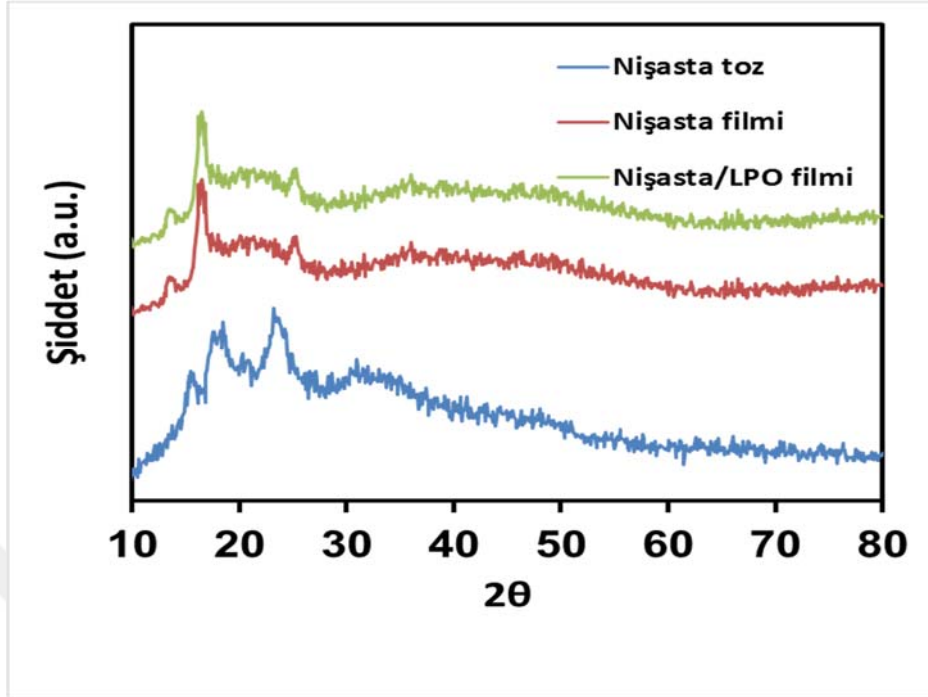
Şekil 51. Nişasta@ZnO/LPO film ait EDS spektrumu ve elementel dağılımı

### Kristal yapı analizi

#### Nişasta toz, Nişasta filmi, Nişasta/LPO Filmi XRD analizi

Şekil 50’de Nişasta granülleri, Nişasta filmi, Nişasta/LPO filmlerinin XRD spektrumu verilmiştir. Şekil 50’de verilen spektrum incelendiğinde nişasta tozunun  $2\theta = 15,08^\circ$ ,  $17,18^\circ$  ve  $23,28^\circ$ ’de B-tipini doğrudan yansıtan üç karakteristik tepe noktası gösterir (Xue et al. 2015). Nişasta filmi, Nişasta/LPO Filmi (nişasta granülleri, gliserol ile plastikleştirilmiş jelatinleştirilmiş nişasta filmler) XRD grafikleri 10 ile 30 derece arasında pikler gösterdi.

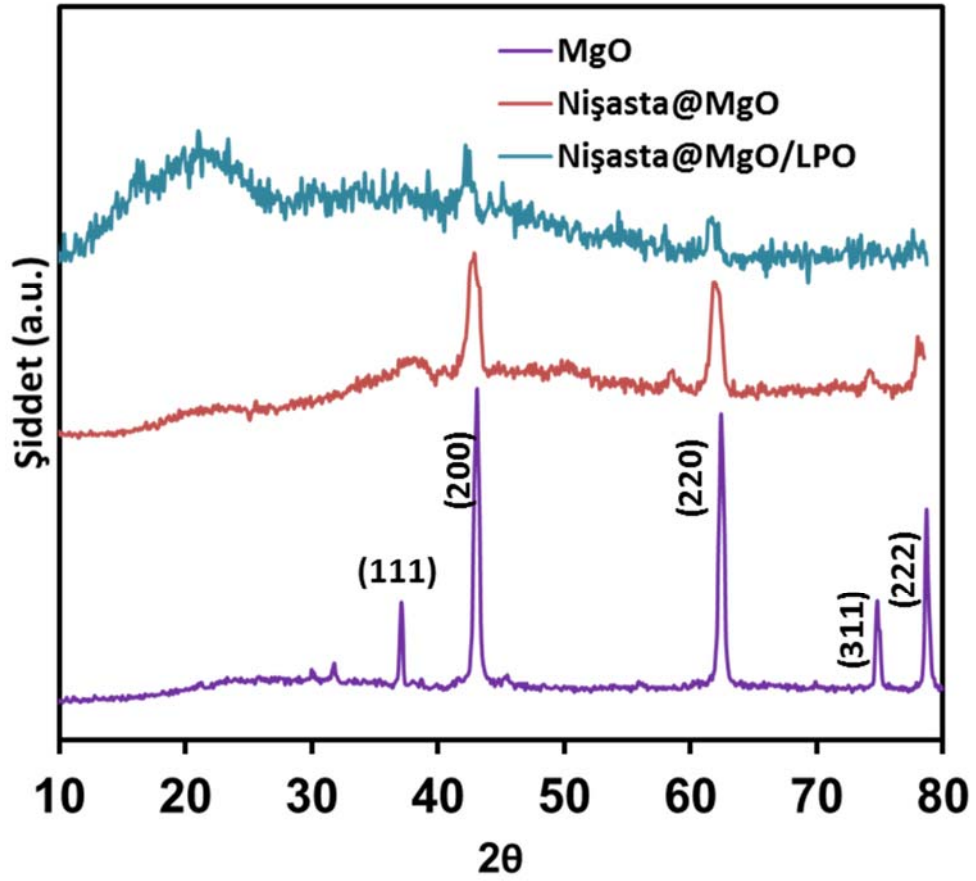
Jelatinleştirilmiş nişasta filmleri için 16,9 ve 25°'de karakteristik kırınım tepe noktaları gözlemlendi (Todica *et al.* 2016).



**Şekil 52.** Nişasta toz, Nişasta Filmi, Nişasta/LPO Filmine ait XRD spektrumu

***MgO NP, Nişasta@MgO Filmi, Nişasta@MgO/LPO Filmi XRD analizi***

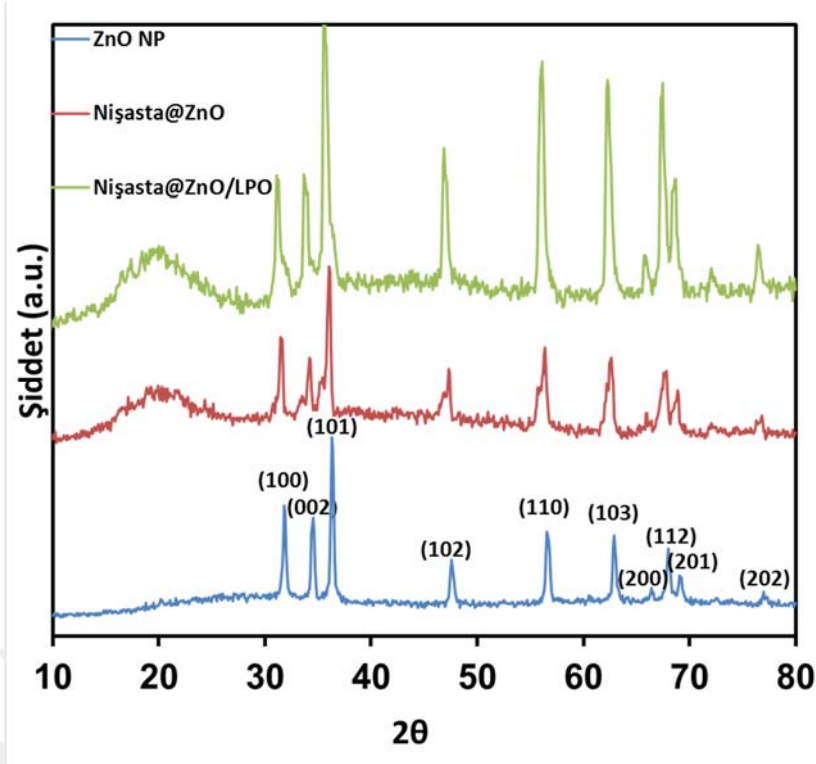
Şekil 51’da MgO NP, Nişasta@MgO filmi, Nişasta@MgO/LPO filmlerinin XRD spektrumu verilmiştir. Şekil 51’da verilen spektrum incelendiğinde MgO NP’nün (111), (200), (220), (311) ve (222) kristal düzlemlerine karşılık gelen kırınım pikleri sırasıyla 36,63°, 42,45°, 61,84°, 74,11° ve 78,04°’de gözlemlendi. Difraksiyon piklerinin pozisyonları ve nispi yoğunlukları, MgO nanopartiküllerinin standart XRD verileriyle uyumludur. (Ansari *et al.* 2018). Bu çalışmada hazırlanan Nişasta@MgO filmi, Nişasta@MgO/LPO filmleri MgO ’un altıgen fazının başarılı oluşumunu ortaya çıkaran piklere sahiptir. Bu filmler MgO NP ile karşılaştırıldığında, Nişasta@MgO Filmi, Nişasta@MgO/LPO Filmlerinin tepe noktaları daha geniştir. Öte yandan, düzgün nişasta filmlerinin difraksiyona mı, esas olarak  $2\theta = 16,5^\circ$  ve  $23^\circ$  civarında da geniş bir tepe şeklinde gösterdi.



**Şekil 53.** MgO NP, Nişasta@MgO Film, Nişasta@MgO/LPO Filmine ait XRD spektrumu

***ZnO NP, Nişasta@ZnO Filmi, Nişasta@ZnO/LPO Filmi XRD analizi***

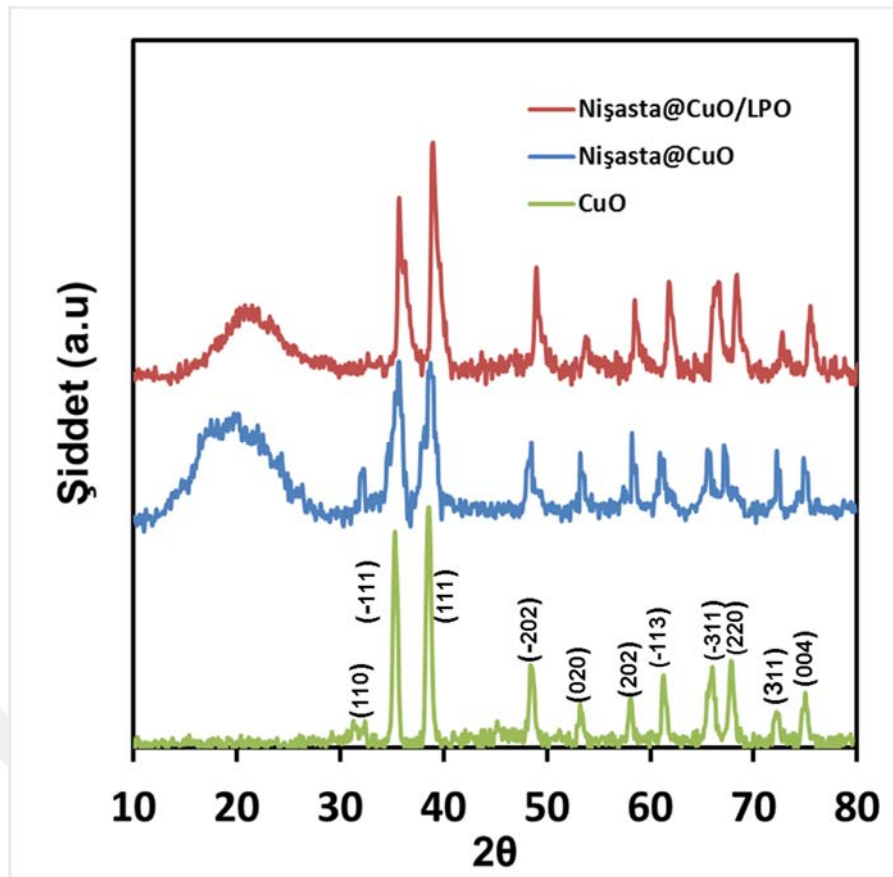
Doğrudan çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş ZnO NP'ler için XRD modeli **Şekil 52'de** gösterilmektedir.  $2\theta = 31,8355^\circ, 34,5207^\circ, 36,2871^\circ, 47,5808^\circ, 56,6487^\circ, 62,8917^\circ, 66,4115^\circ, 67,9331^\circ, 69,1842^\circ$  ve  $77,0106^\circ$ 'deki XRD tepe noktaları sırasıyla (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201) ve (202)'e karşılık gelir. Kristal düzlemleri (JCPSD kart No. 01-007-2551) ile uyumludur. Bu çalışmada hazırlanan Nişasta@ZnO filmi, Nişasta@ZnO/LPO filmleri ZnO 'un altıgen fazının başarılı oluşumunu ortaya çıkaran piklere sahiptir. Nişasta@ZnO filmi, Nişasta@ZnO/LPO filmlerinde nişasta x-ışını kırınımalarını  $2\theta = 16,5^\circ$  ve  $25^\circ$  civarında da geniş bir tepe şeklinde gösterdi.



**Şekil 54.** ZnO NP, Nişasta@ZnO Film, Nişasta@ZnO/LPO Filmine ait XRD spektrumu

#### ***CuO NP, Nişasta@CuO Filmi, Nişasta@CuO/LPO Filmi XRD analizi***

Bakır klorür ve sodyum hidroksitten sentezlenen CuO tozunun X-ışını kırınım (XRD) modeli **Şekil 53**'de göstermektedir. XRD modeli, bakır oksit nanoparçacıklarının oryantasyonunu ve kristal doğasını ortaya çıkardı.  $32.49^\circ$ ,  $35.49^\circ$ ,  $38.96^\circ$ ,  $48.73^\circ$ ,  $53.45^\circ$ ,  $58.34^\circ$ ,  $61.53^\circ$ ,  $65.79^\circ$ ,  $66.25^\circ$ ,  $72.43^\circ$   $75.03^\circ$  'deki XRD tepe noktaları sırasıyla (110), (-111), (111), (-202), (020), (202), (-113), (-311), (220), (311) ve (004) 'e karşılık gelir. Kristal düzlemleri (JCPDS-80-1916) kartı ile iyi bir uyum içindedir. Bu çalışmada hazırlanan Nişasta@CuO filmi, Nişasta@CuO/LPO filmleri CuO 'un altıgen fazının başarılı oluşumunu ortaya çıkaran piklere sahiptir. Nişasta@CuO filmi, Nişasta@CuO/LPO filmlerinde nişasta x-ışını kırınımlarını  $2\theta = 16,5^\circ$  ve  $24^\circ$  civarında da geniş bir tepe şeklinde gösterdi.



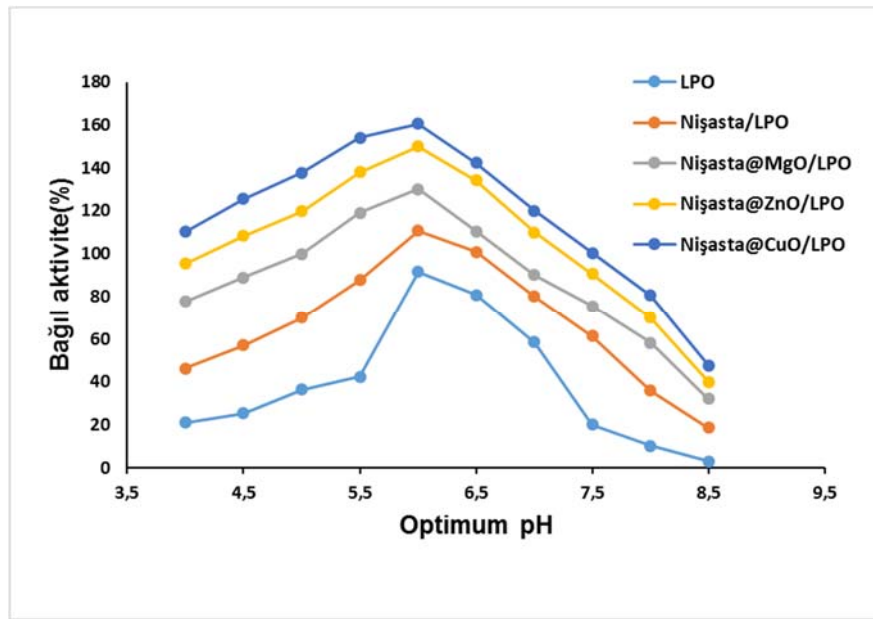
**Şekil 55.** CuO NP, Nişasta@CuO Film, Nişasta@CuO/LPO Filmine ait XRD spektrumu

**Hazırlanan nişasta@metal-oksit/LPO biyonanofilmlerinin karakterizasyon çalışmaları**

***Serbest LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum pH'sı***

LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin aktivitesi için optimal pH, enzimin 3 ila 8 arasında değişen pH'da oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübasyonu ile ölçüldü. Optimum pH'ın serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisi, **Şekil 54'de** gösterilmektedir. Görüldüğü gibi, serbest ve immobilize enzimlerin pH aktivite eğrileri, asidik ve alkali pH 'ta çok benzer özelliktedir. Hem serbest hem de immobilize enzimler pH 6'da maksimum aktiviteye sahiptir. Bu bulgular, Shariat ve arkadaşlarının (2019) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller üzerindeki serbest ve immobilize LPO için en yüksek aktiviteyi sırasıyla pH 6 ve 7'de elde ettiği sonuçlarla da uyumludur (Shariat *et al.* 2019).

Sonuç olarak: LPO enziminin ve nişasta bazlı immobilize sistemlerin optimum pH'ı 6'dır. Bu bulgu, bu sistemlerin biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı için önemli bir parametredir.

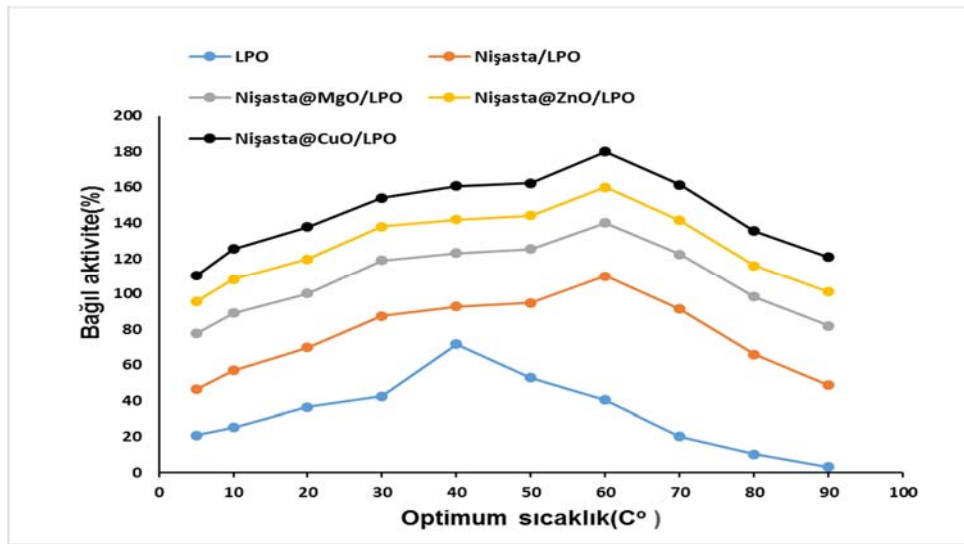


**Şekil 56.** LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum pH'sı

***LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum sıcaklığı ve termal kararlılığı***

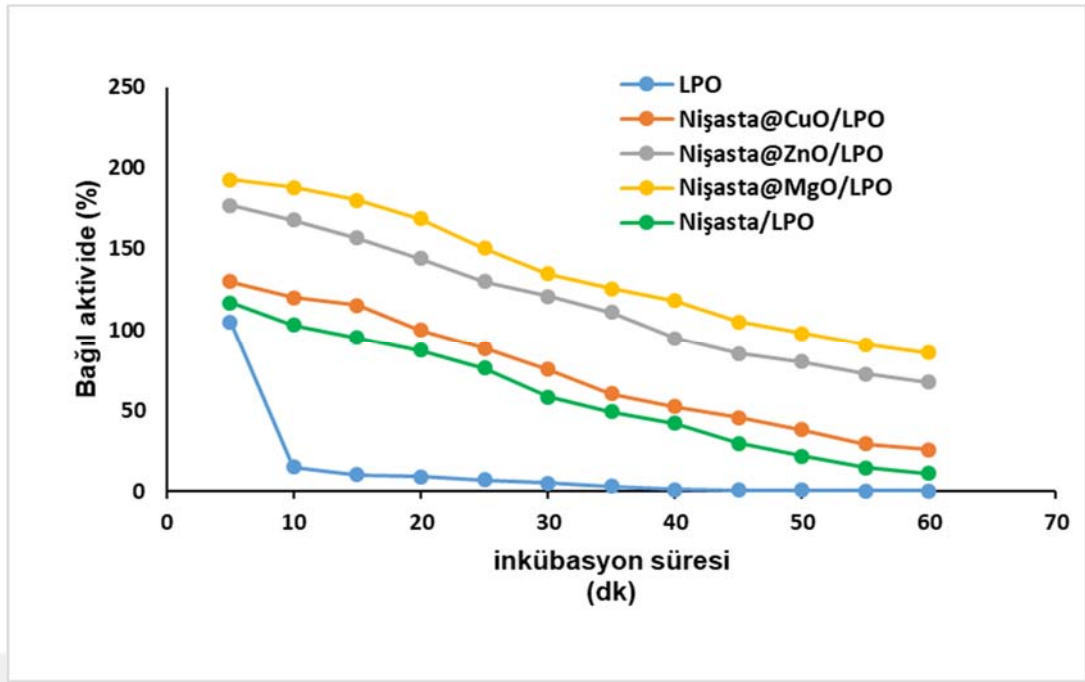
LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum sıcaklığını belirlemek için 5 ile 90 °C aralığında her 10 °C aktivite ölçümü yapıldı. Serbest LPO için optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmişken, filmlere immobilize edilen LPO için optimum sıcaklık 60 °C'ye kadar bir kayma gösterdi (Şekil 55). Optimum sıcaklıkta gözlenen artış, immobilizasyondan sonra LPO'nun serbest hareketindeki kısıtlamadan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Saleh *et al.* 2017 ). Elde edilen optimum sıcaklık değeri, diğer araştırmacılar tarafından da gözlemlenen değerlerle uyumludur. Miroliaei ve ark., serbest LPO ve Con A-Sepharose 4B üzerine immobilize edilmiş LPO için optimum sıcaklığın 45 °C olduğunu göstermiştir (Mirouliaei *et al.* 2019). Tenovuo ve ark. serbest LPO için optimum sıcaklığın 45 ila 50 °C arasında olduğunu belirlerken (Tenovuo *et al.* 1981), Con A-agaroz üzerine immobilize edilmiş LPO'nun maksimum aktivitesinin 50 ila 60 °C arasında olduğunu bulmuştur (Su *et al.* 2012).

Sonuç olarak, immobilizasyon LPO'nun optimum sıcaklığını 20 °C kadar yükseltebilmektedir. Bu durum, LPO'nun immobilizasyon sonucunda farklı bir mikroortama maruz kalmasından ve konformasyonel değişimlerden kaynaklanmaktadır. Bu bulgu, bu sistemlerin biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı için önemli bir parametredir.



**Şekil 57.** LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin optimum sıcaklığı

Serbest ve immobilize LPO'nun termal kararlılığı 60 °C'de her 10 dk'da bir aktivite ölçülerek incelenmiştir (Şekil 56). Nişasta, Nişasta@CuO, Nişasta@ZnO, Nişasta@MgO üzerine immobilize edilmiş LPO, 60 °C'de 60 dakika sonra başlangıç aktivitesini sırasıyla %16,5, %19,8, %16,8, %19'unu koruduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık serbest LPO, 60 °C'de 10 dakikadan sonra tamamen aktivitesini kaybetmiştir. Bulgularımız bütün filmlerde immobilize LPO'nun serbest LPO'dan daha fazla termal kararlılığa sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Immobilize LPO'nun termal kararlılığındaki artışın nedeni nişasta filmlerine ilave edilen nanopartiküllerin enzim için yüksek yükleme kapasitesine sahip olması nedeniyle olabilir. Nanopartikül üzerindeki fonksiyonel gruplar için geniş yüzey alanı, geniş yüzey-hacim oranı ve termal denatürasyondan koruyan işlevselleştirilmiş Nişasta@(CuO, ZnO, MgO) LPO'nun çok noktalı kovalent bağlanmasından kaynaklanıyor olabilir (Tang *et al.* 2014). Benzer şekilde, Saleh ve ark. (2017), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> üzerinde immobilizasyondan sonra yaban turpu peroksidazının termal stabilitesinin iyileştiğini bildirmiştir (Saleh *et al.* 2017). Diğer çalışmalar da immobilizasyondan sonra iyileştirilmiş termal stabiliteye dair kanıtlar sunmuştur (Jafary *et al.* 2012; Dogac and Teke 2013 ). Benzer bir sonuç Shariat ve ark. ( 2018 ), GO üzerinde immobilize edilen Laktoperoksidazın termal stabilitesinin arttığını bildirmiştir (Shariat *et al.* 2018).



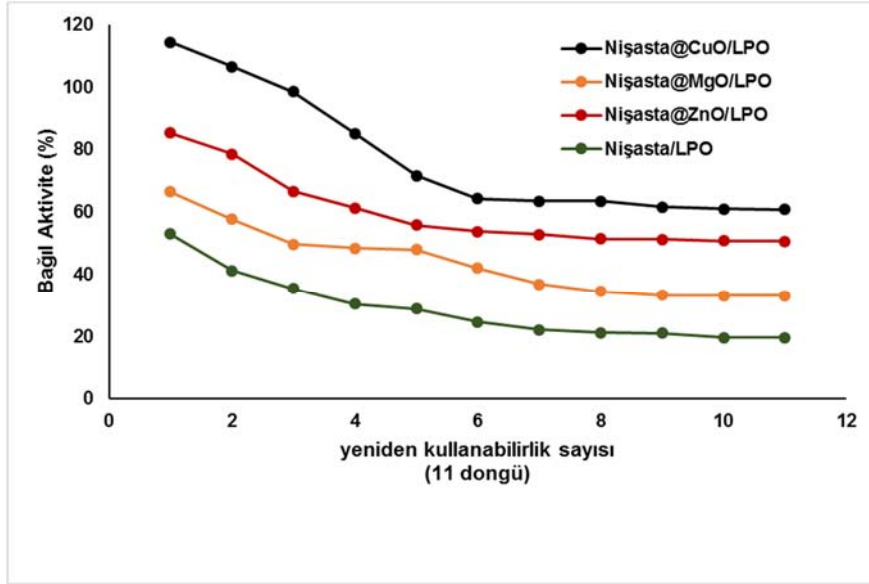
**Şekil 58.** LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin termal karalılığı

***LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin yeniden kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı***

Enzimlerin yüksek oranda yeniden kullanılabilirliği ekonomik açıdan avantajlıdır ve biyosensörlerin geliştirilmesi için de önemlidir ( Kishore *et al.* 2012 ).

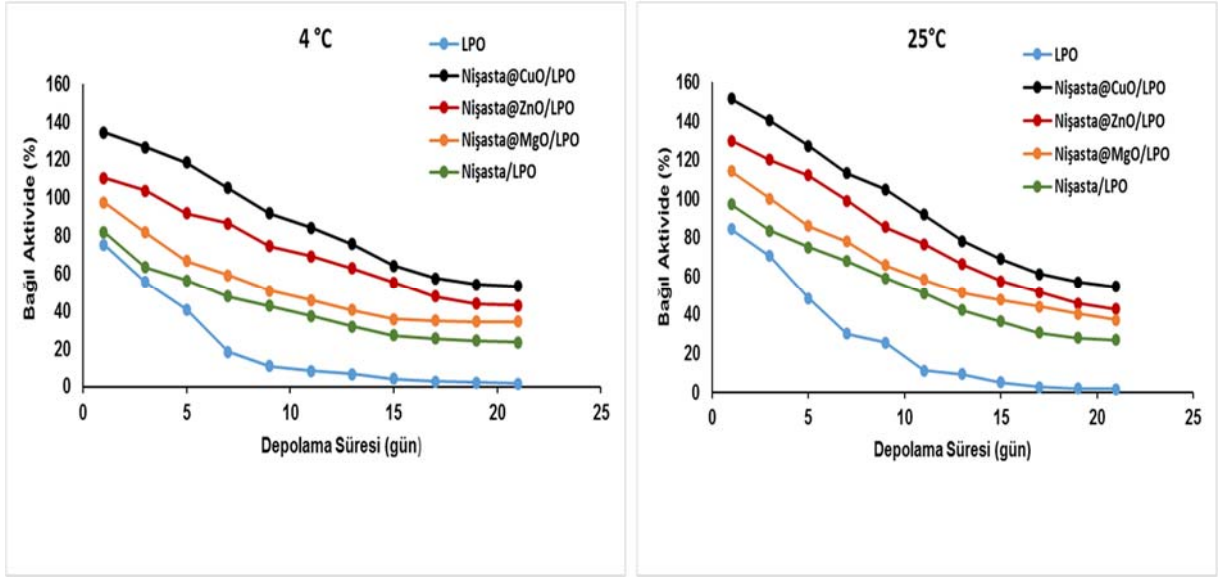
Serbest enzimlerin yeniden kullanım yeteneğinin olmaması, sürekli reaksiyonlardaki uygulamalarına yönelik en büyük sınırlamalardan biridir. Nişasta, Nişasta@CuO, Nişasta@ZnO ve Nişasta@MgO üzerinde hareketsizleştirilmiş LPO'nun yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için 11 döngü olacak şekilde aktiviteye bakılmıştır. **Şekil 57'**de, Nişasta, Nişasta@CuO, Nişasta@ZnO ve Nişasta@MgO üzerinde hareketsizleştirilmiş LPO'nun 11 döngüden sonra başlangıç aktivitesini sırasıyla %36,9, %53,28, %59,36 ve %49,69'unu koruduğunu gösterdi.

Chang ve Tang tarafından hazırlanan bir çalışmada ( 2014), MNP'ler üzerinde sabitlenmiş HRP için 4 tekrar kullanımdan sonra aktivitenin %85'ini korunduğunu göstermiştir (Chang and Tang 2014). Movahedi ve ark. ( 2019 ), on kez kullandıktan sonra CuO nanoparçacıkları üzerinde immobilize LPO için aktivitenin %24 kaldığını bildirmiştir( Movahedi *et al.* 2019).



**Şekil 59.** LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin yeniden kullanılabirliği

4 °C ve 25 °C'de depolama sırasında serbest ve immobilize LPO'nun depolama stabiliteleri her gün aktiviteleri ölçülerek 21 gün boyunca takip edilmiştir. Nişasta, Nişasta@CuO, Nişasta@ZnO ve Nişasta@MgO üzerinde immobilize edilen LPO, 4°C 'de 21 gün sonra başlangıç aktivitesini sırasıyla %28,5, %39,6, %38,92ve %34,96'sını korurken 25 °C'de sırasıyla %27,7, %36,23, %33 ve %32,82 korudu. Serbest LPO, 7 gün sonra aktivitesini kaybetti (**Şekil 58**). Sonuçlar, immobilize enzimlerin, serbest enzime kıyasla daha yüksek bir depolama stabilitesine sahip olduğunu açıkça göstermektedir. İyileştirilmiş depolama stabilitesi, immobilize enzimin denatürasyon hızındaki düşüş ve daha az konformasyonel değişiklikten kaynaklanıyor olduğu düşünülmektedir ( Zhang *et al.* 2010). Benzer şekilde, Fariba Jafary ve ark. ( 2012 ), Polianilin üzerinde immobilize edilen LPO depolama stabilitesini iyileştirdiğini bildirdi (Jafary *et al.* 2012). Başka bir çalışmada Movahedi ve ark. ( 2019 ), LPO-CuO nanoparçacıkları üzerinde immobilizasyonunun enzimin depolama stabilitesini artıracağını göstermiştir ( Movahedi *et al.* 2019).



**Şekil 60.** LPO enzimi ve Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin depolama kararlılığı

#### **Nişasta/LPO, Nişasta@MgO/LPO, Nişasta@ZnO/LPO, Nişasta@CuO/LPO filmlerinin Antibakteriyel Sonuçları**

Nişasta, Nişasta@ (CuO-MgO-ZnO), Nişasta/LPO ve Nişasta@ (CuO-MgO-ZnO)/LPO filmlerinin *Salmonella spp*, *Escherichia coli O157:H7 ATCC® 43895*, *Staphylococcus aureus ATCC® 25923*, *Klebsiella pneumoniae ATCC® 13883*, *Bacillus cereus ATCC® 14579* ve *Streptococcus pyogenes ATCC® 19615* patojen bakterilerine karşı antibakteriyel etkisi araştırıldı. Bahsedilen patojen bakterilerin inhibisyon zon çapı **Tablo 5'de** gösterilmiştir. Ayrıca, filmlerin bakteri üremesi için test edilen numunelerin altında ve çevresindeki inhibisyon zon bölgeleri görsel olarak **Şekil 59'de** gösterildi.

Nişasta/LPO (YA) filmi *S.pyogenes*, *K.pneumonia* ve *S.aureus* patojen bakterilerine karşı antagonistik etki gösterirken; *B.cereus*, *Salmonella* ve *E.coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı gözlemlendi. Nişasta/LPO (YA) filminin *S.pyogenes*, *K.pneumonia* ve *S.aureus* patojen bakterilerine karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin boyutu petride oluşan inhibisyon zon çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Belirtilen türlere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları **Tablo 5'** de verildi.

Nişasta/LPO (T), Nişasta (KI) ve Nişasta (K2) filmleri hiçbir patojen bakteri türlerine karşı antagonistik etki göstermedi. Filmleri kendi aralarında kıyasladığımızda nişasta filmine LPO enzimini immobilize ettikten sonra antibakteriyel etkiye sahip olduğu görüldü. Ancak Nişasta/LPO (T) filmine, enzimi eklenmesine rağmen antibakteriyel etkiye sahip olmadı. Bunun nedeni Nişasta/LPO (T) filminde enzim tutuklama yöntemi(T) ile immobilize edildi. Bu yöntemde LPO enzimi nişasta filmi içinde hapsolmasından dolayı bakteriye ulaşamadığı ve antibakteriyel etki gösteremediği düşünülmektedir.

Literatüre bakıldığında Ortega ve arkadaşları mısır nişastasında 143, 71,5, 28,6 ve 14,3 ppm AgNP içeren filmlerin, *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* ve *Penicillium*'a patojen bakterilerine karşı antibakteriyel etkisi araştırılmış. 71,5 ppm'den daha yüksek AgNP konsantrasyonları içeren nişasta filmlerinde *E.coli* ATCC 25922 ve *Salmonella Spp* bakterilerinin büyümeleri engellenmiştir (Ortega *et al.* 2017). Peighambardoust ve grubu hazırladıkları Ag, ZnO ve CuO nanopartikülleri içeren nişasta (St) bazlı nanokompozit filmlerinden, St-Ag ve St-CuO 'nun *E coli* ve *S.aureus* üzerine en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.( Peighambardoust *et al.* 2019).

Nişasta@ZnO/LPO (YA) filmi, *B.cereus*, *S.pyogenes*, *K.pneumonia* ve *S.aureus* patojen bakterilerine karşı antagonistik etki gösterirken, *Salmonella* ve *E coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı gözlemlendi. Nişasta@ZnO/LPO (T) filmi *B.cereus* ve *S aureus* patojen bakterilerine karşı antagonistik etki gösterirken *S.pyogenes*, *K.pneumonia*, *Salmonella* ve *E coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı görüldü. Nişasta@ZnO (K1) ve Nişasta@ZnO (K2) filmlerinin sadece *S. aureus* patojen bakteri türüne karşı antagonistik etki gösterdi. Çinko oksit içeren nişasta filmlerinin *B. cereus*, *S. pyogenes*, *K.pneumonia* ve *S.aureus* patojen bakterilerine karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin boyutu petride oluşan inhibisyon zon çapının ölçülmesiyle belirlendi. Belirtilen türlere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları **Tablo 5'** te verildi.

Filmleri kendi arasında kıyaslayacak olursak *S. aureus* bakterisinde YA ve T yöntemi ile hazırlanan çinko oksit içeren nişasta filmlerindeki inhibisyon zon çapı K1 ve K2 yöntemi ile hazırlanan inhibisyon zon çapından daha büyüktür (**Tablo 5**). Bu sonuçtan LPO enzimi içeren nişasta filmlerin daha etkili antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu söyleyenebilir. Nişasta (K1) filmi *S.aureus* patojen bakteri türüne karşı antagonistik etki göstermezken Nişasta@ZnO (K1) filmi gösterdi. Bu sonuç, bazı çalışmalarda ZnO NP'nun *S. aureus* bakterisine karşı daha etkili olduğunu bulmuştur (Hu *et al.* 2019). Bu nedenle, hibrit parçacıkların antimikrobiyal aktivitesinin ZnO NP'lüne bağlı olduğu sonucuna varıldı. ZnO nanoparçacıklarının antimikrobiyal aktivitesinin tam mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Antibakteriyel aktivitenin ZnO partiküllerinin fotokatalitik özelliklerinden kaynaklandığı yaygın olarak kabul edilmiştir (Zhang *et al.* 2008).

K1 ve K2 yöntemiyle hazırlanan çinko oksit içeren nişasta filmlerini karşılaştıracak olursak K2 yönteminde filme 50Mm KSCN 200µL ve 50Mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100µL çözelti karışımının eklenmesi ile ZnO NP 'nün antibakteriyel etkisinin azda olsa artırdığı düşünülmektedir. Çünkü K3 yönteminde bu çözelti karışımının herhangi bir bakteri türü üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı **Tablo 5'**te gösterildi.

Literatüre bakıldığında Namazi ve arkadaşları dört farklı ZnO konsantrasyonu içeren nişasta filmleri hazırlamışlardır. Bu filmler *S. aureus* bakterisinde (gram-pozitif) antibakteriyel aktivite göstermezken *E.coli* bakterisinde(gram-negatif) göstermiştir (Namazi *et al.* 2018). Hu ve arkadaşlarıda nişasta filmine ZnO-kitosan nanoparçacıkları dahil edip *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) bakterileri üzerine mikrobiyal test yapmış ve antibakteriyel etki görmüşlerdir. (Hu *et al.* 2019).

Nişasta@MgO/LPO (YA) filmi *K. pneumonia* ve *S. aureus* patojen bakterilerine karşı antagonistik etki gösterirken *B. cereus*, *S. pyogenes*, *Salmonella* ve *E. coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı gözlemlendi. Nişasta@MgO/LPO (T) filmi *S. aureus* patojen bakteri türüne karşı antagonistik etki gösterirken *B. cereus*, *S. pyogenes*, *K. pneumonia*, *Salmonella* ve *E coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı görüldü. Nişasta@MgO (KI) ve Nişasta@MgO (K2) filmleri hiçbir patojen bakteri türüne karşı antagonistik etki gösterdi. Bu sonuçlara bakıldığında LPO enziminin filmlere immobilize edildikten sonra antibakteriyel özellik kazandığı görüldü. Nişasta@MgO/LPO (YA) ve Nişasta@MgO/LPO (T) filmlerinin *K. pneumonia* ve *S. aureus* patojen bakterilerine karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin boyutu petride oluşan inhibisyon zonunun çapının ölçülmesiyle belirlendi. Belirtilen türlere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları **Tablo 5'** te verildi. YA yöntemi ile hazırlanan magnezyumlu nişasta filminin daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu görüldü (**Tablo 5**). Bu sonuca yöntem bazında bakacak olursak yüzey adsorbsiyon yöntemi (YA), tutuklama yönteminden daha etkili olduğu ortaya çıkmaktadır.

Literatür çalışmalarına bakıldığında Hosseini ve arkadaşları nişasta filmine farklı konsantrasyonlarda albümin ve MgO NP ilave ederek *Escherichia coli*(*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) bakterilerine karşı antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Bu bakterilere karşılık yaklaşık 4-6 mm inhibisyon zon çapı oluştuğunu bulmuşlardır (Hosseini *et al.* 2021).

Nişasta@CuO/LPO (YA) ve Nişasta@CuO/LPO (T) filmi *S. pyogenes* patojen bakteri türüne karşı antagonistik etki gösterirken *K. pneumonia*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella* ve *E coli* 'ye karşı herhangi bir antagonistik etki olmadığı gözlemlendi. Nişasta@CuO (KI) ve Nişasta@CuO (K2) filmleri hiçbir patojen bakteri türlerine karşı antagonistik etki görülmedi. YA ve T yöntemi ile hazırlanan bakır oksitli nişasta filmlerinin *S. pyogenes* patojen bakteri türüne karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin boyutu petride oluşan inhibisyon zon çapının ölçülmesiyle belirlendi. Belirtilen türlere karşı ölçülen inhibisyon zon çapları **Tablo 5'** te verildi. YA yöntemi ile hazırlanan bakır oksitli nişasta filminin daha fazla antibakteriyel

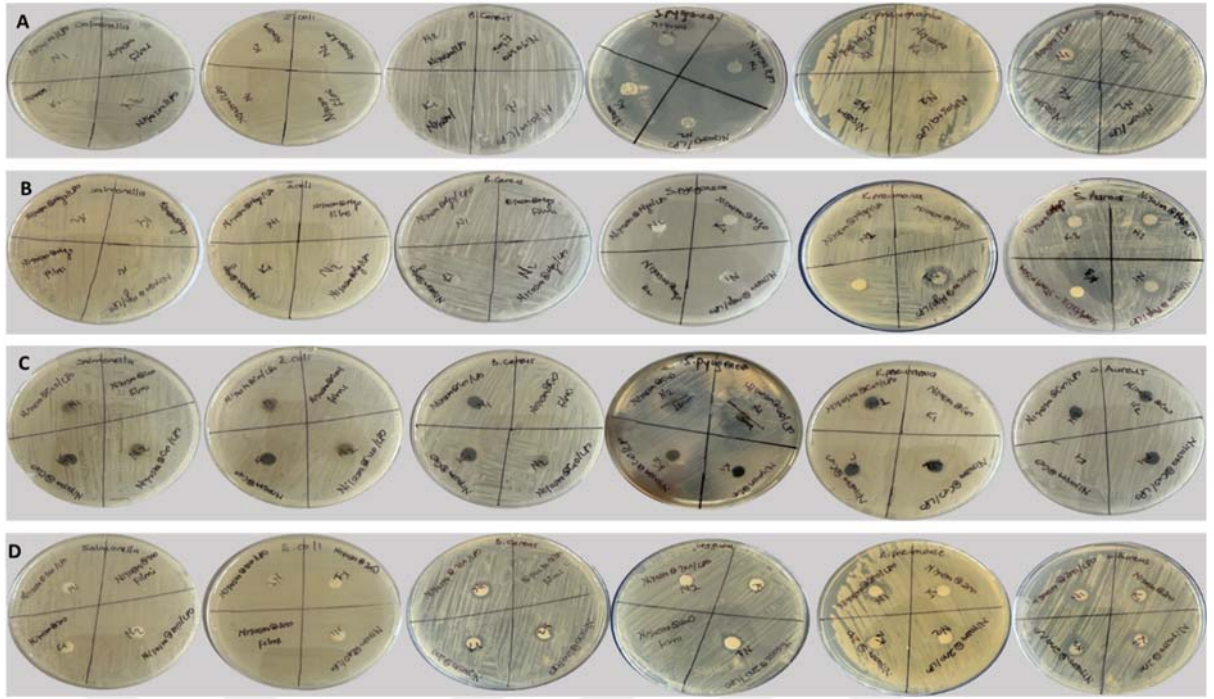
etkiye sahip olduğu görüldü. Bu sonuca yöntem bazında bakacak olursak adsorbsiyon yöntemi tutuklama yönteminden daha etkili olduğu sonucu görüldü.

Literatürle karşılaştırıldığında Gholamali ve arkadaşları oksitlenmiş nişasta/PVA/CuO biyo-nanokompozit hidrojelere, disk difüzyon deneyleri ile Gram-negatif *E. coli* ve Gram-pozitif *S. aureus* üzerine karşı antibakteriyel aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Gholamali *et al.* 2021).

**Tablo 5.** Hazırlanan Filmlerin Antibakteriyel Sonuçları

| Nişasta Filmleri                              | İnhibisyon Zon Çapı (mm) |                         |                        |                               |                              |                              |
|-----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                               | <i>Salmonella</i>        | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 50Mm (KSCN-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) K3 | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta/LPO (YA)                              | -                        | -                       | -                      | 18mm                          | 11mm                         | 14mm                         |
| Nişasta/LPO (T)                               | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta (K1)                                  | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta (K2)                                  | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta@ZnO/LPO (YA)                          | -                        | -                       | 10mm                   | 9mm                           | 11mm                         | 14mm                         |
| Nişasta@ZnO/LPO (T)                           | -                        | -                       | 8mm                    | -                             | -                            | 12mm                         |
| Nişasta@ZnO (K1)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | 7mm                          |
| Nişasta@ZnO (K2)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | 9mm                          |
| Nişasta@MgO/LPO (YA)                          | -                        | -                       | -                      | -                             | 13mm                         | 13mm                         |
| Nişasta@MgO/LPO (T)                           | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | 9mm                          |
| Nişasta@MgO (K1)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta@MgO (K2)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta@CuO/LPO (YA)                          | -                        | -                       | -                      | 25mm                          | -                            | -                            |
| Nişasta@CuO/LPO (T)                           | -                        | -                       | -                      | 11mm                          | -                            | -                            |
| Nişasta@CuO (K1)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |
| Nişasta@CuO (K2)                              | -                        | -                       | -                      | -                             | -                            | -                            |

Filmlerin çapı=5mm, Film etrafındaki çaptaki inhibisyon bölgesi (mm), YA: Yüzey adsorbsiyon yöntemi ile LPO enzimi yüzeye immobilize edilmiştir. T: Tutuklama yöntemi ile LPO enzimi yüzeye immobilize edilmiştir, K1: Nişasta@(MgO, ZnO, CuO) filmi, K2: Nişasta@(MgO, ZnO, CuO) filmine 50mM KSCN 200µL-50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100µL, K3: 50mM KSCN 200µL-50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100µL.



**Şekil 61.** A: Nişasta, Nişasta/LPO filmi, B: Nişasta @MgO, Nişasta @MgO/LPO film, C: Nişasta @CuO, Nişasta @CuO/LPO film, D: Nişasta @ZnO, Nişasta @ZnO/LPO filmlerinin *Salmonella spp.*, *B. cereus*, *S. pyogenes*, *K. pneumonia*, *S. aureus* ve *E. coli* 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, LPO enzimi sığır sütünden saflaştırılarak LPO'nun nişasta filmlerine immobilizasyonu üzerine çalışmalar yapıldı ve LPO immobilizasyonu için yeni ve verimi yüksek bir yöntem bulundu. LPO enziminin nişasta filmlere immobilizasyonu için yüzey adsorpsiyonu ve tutuklama yöntemi (Tablo 3 ve 4) kullanıldı. FT-IR, XRD, Raman ve SEM analizleri yapılarak biyonanofilmlerin sentezlendiği ve LPO enziminin filmler üzerine başarılı bir şekilde immobilize olduğu gösterildi. Elde edilen SEM görüntülerinde, LPO tutuklaması yapılmadan serbest nişasta filmlerinin CuO, MgO ve ZnO nanopartiküllerle (NP) homojen bir şekilde dağıldığı gösterildi. LPO enziminin ilave edilmesi sonrasında LPO immobilizasyonun filmlerin homojen yapısını bozduğu ve LPO'dan kaynaklanan küresel parçacıklar oluştuğu tespit edildi. FT-IR spektrumlarından, metal oksit NP'ler, nişasta ve LPO'ya ait piklerin filmlerde olduğu görüldü. Piklerdeki kaymalar, metal oksit ve nişasta arasındaki elektrostatik etkileşimleri ve LPO'nun immobilizasyonunu doğruladı. XRD analizleri, CuO, MgO ve ZnO NP'lerin nişasta yüzeyinde safsızlık olmadan sentezlendiğini gösterdi.

LPO enziminin nişasta ve nişasta-metal oksit (CuO, MgO, ZnO) filmlere immobilizasyonu için belirlenen optimum pH'da (pH=6) enzim aktivitesi için, optimum sıcaklığın (40°C) serbest enzimle karşılaştırıldığında 40°C'den 60°C'ye yükseldiği görüldü. Bu sonuçlar, hareketsizleştirmeye bağlı olarak LPO'nun kinetik parametrelerinde önemli bir gelişme olduğunu gösterdi. İmmobilize edilen LPO, ticari ve endüstriyel uygulamalarda serbest enzimlere kıyasla artan termal kararlılık, depolama stabilitesi ve yeniden kullanılabilirlik sağlamaktadır.

Sentezlenen nişasta filmlerinin NP içeriği, enzim için yüksek yükleme kapasitesine sahip olduklarını gösteren geniş bir yüzey alanı, büyük yüzey-hacim oranı, hareketlilik ve yüksek kütle aktarımı özelliklerine sahip olduğu görüldü. Elde edilen bulgular, LPO'nun Nişasta ve Nişasta@metaloksit (CuO, MgO, ZnO) filmleri üzerine immobilizasyonunun, daha kararlı enzimlerin geliştirilmesine ve enzimlerin endüstriyel uygulamalarda daha yaygın bir şekilde kullanılmasına katkıda bulunacaktır. Optimal karakterizasyon sonrasında, hazırlanan nişasta filmlerinin antibakteriyal aktivitesine bakıldığında ZnO içeren nişasta filmleri, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerine karşı daha etkili antagonistik etki gösterdiği belirlendi.

## KAYNAKLAR

- Agarwal, S., Greiner, A. and Wendorff, J.H., 2009. Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers-Progress in Techniques, Materials, and Applications. *Advanced Functional Materials*, 19 (18), 2863-2879.
- Agarwal, S., Wendorff, J.H. and Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49 (26), 5603-5621.
- Al-Baarri, A.N.m., Legowo, A.M., Hayakawa, S. and Ogawa, M., 2015. Enhancement Antimicrobial Activity of Hyphothiocyanite Using Carrot Against Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli. *Procedia Food Science*, 3, 473-478.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M. and Asgher, M., 2017. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 974-984.
- Aminabhavi, T.M., Balundgi, R.H. and Cassidy, P.E., 1990. A Review on Biodegradable Plastics. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 29 (3), 235-262.
- Asgher, M., Noreen, S. and Bilal, M., 2017. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 54-62.
- Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S. and Iqbal, H.M.N., 2014. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 101, 56-66.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gülcin, I., Küfrevioğlu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136, 864-870.
- Averous, L. and Boquillon, N., 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56 (2), 111-122.
- Bagde, P. and Nadanathangam, V., 2019. Mechanical, antibacterial and biodegradable properties of starch film containing bacteriocin immobilized crystalline nanocellulose. *Carbohydr Polym*, 222, 115021.
- Basso, A. and Serban, S., 2019. Industrial applications of immobilized enzymes-A review. *Molecular Catalysis*, 479, 35-54.
- Bilal, M. and Iqbal, H.M.N., 2019. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 462-482.
- Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikeda-saito, M. and Caughey, W.S., 1989. Bovine Myeloperoxidase and Lactoperoxidase Each Contain a High-Affinity Site for Calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160 (2), 897-902.
- Boscolo, B., Leal, S.S., Ghibaudi, E.M. and Gomes, C.M., 2007. Lactoperoxidase folding and catalysis relies on the stabilization of the alpha-helix rich core domain: A thermal unfolding study. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1774 (9), 1164-1172.
- Brady, D. and Jordaan, J., 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31 (11), 1639-1650.

- Cankaya, M., Sisecioğlu, M., Yörük, O., Ozdemir, H., 2006. In vitro effects of some antibiotic drugs on bovine lactoperoxidase enzyme. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 36, 301-306.
- Cyras, V.P., Zenklusen, M.C.T. and Vazquez, A., 2006. Relationship between structure and properties of modified potato starch biodegradable films. *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (6), 4313-4319.
- Dawson, P.L., Carl, G.D., Acton, J.C. and Han, I.Y., 2002. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult Sci*, 81 (5), 721-6.
- Dean, J.P. and Zottola, E.A., 1996. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 59 (5), 476-480.
- Deka, J.R., Saikia, D., Lai, Y.S., Tsai, C.H., Chang, W.C. and Kao, H.M., 2015. Roles of nanostructures and carboxylic acid functionalization of ordered cubic mesoporous silicas in lysozyme immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 213, 150-160.
- Dey, A. and Sit, N., 2017. Modification of foxtail millet starch by combining physical, chemical and enzymatic methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 314-320.
- Dumontet, C. and Rousset, B., 1983. Identification, purification, and characterization of a non-heme lactoperoxidase in bovine milk. *Journal of Biological Chemistry*, 258 (23), 14166-14172.
- Fishman, M.L., Coffin, D.R., Konstance, R.P. and Onwulata, C.I., 2000. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, 41 (4), 317-325.
- Flemmig, J., Gau, J., Schlorke, D. and Arnhold, J., 2016. Lactoperoxidase as a potential drug target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20 (4), 447-461.
- Gau, J., Furtmuller, P.G., Obinger, C., Prevost, M., Van Antwerpen, P., Arnhold, J. and Flemmig, J., 2016. Flavonoids as promoters of the (pseudo-)halogenating activity of lactoperoxidase and myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 307-319.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. and Entezami, A.A., 2011. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, 33 (1), 229-235.
- Ghorbani, H., Mehr, F., Pazoki, H. and Rahmani, B., 2015. Synthesis of ZnO Nanoparticles by Precipitation Method. *Oriental Journal of Chemistry*, 31 (2), 1219-1221.
- Hosseini, S.N., Pirs, S. and Farzi, J., 2021. Biodegradable nano composite film based on modified starch-albumin/MgO; antibacterial, antioxidant and structural properties. *Polymer Testing*, 97.
- Imani, M.M. and Safaei, M., 2019. Optimized Synthesis of Magnesium Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Journal of Nanotechnology*, 2019, 1-6.
- Jacob, B.M., Antony, E., Sreekumar, B. and Haridas, M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life Sciences*, 66 (25), 2433-2439.
- Jafary, F., Kashanian, S., Sharieat, Z.S., Jafary, F., Omidfar, K. and Paknejad, M., 2012. Stability improvement of immobilized lactoperoxidase using polyaniline polymer. *Molecular Biology Reports*, 39 (12), 10407-10412.

- Köksal, Z., Usanmaz, H., Bayrak, S., & Ozdemir, H., 2017. Improved chromatographic method for purification of lactoperoxidase from different milk sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2), 129-136.
- Krochta, J.M. and DeMulderJohnston, C., 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-74.
- Kumar, R., Bhatia, K.L., Dauter, Z., Betzel, C. and Singh, T.P., 1995. Purification, Crystallization and Preliminary-X-Ray Crystallographic Analysis of Lactoperoxidase from Buffalo Milk. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 51, 1094-1096.
- Kussendrager, K.D. and van Hooijdonk, A.C.M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, S19-S25.
- Lourdin, D., DellaValle, G. and Colonna, P., 1995. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27 (4), 261-270.
- Lu, X.F., Wang, C. and Wei, Y., 2009. One-Dimensional Composite Nanomaterials: Synthesis by Electrospinning and Their Applications. *Small*, 5 (21), 2349-2370.
- Mecitoğlu, Ç. and Yemenicioğlu, A., 2007. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry*, 104 (2), 726-733.
- Miao, X.X., Pi, L.L., Fang, L., Wu, R. and Xiong, C.H., 2016. Application and characterization of magnetic chitosan microspheres for enhanced immobilization of cellulase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34 (6), 272-282.
- Movahedi, M., Samsam Shariat, S.Z.A. and Nazem, H., 2018. Immobilization of Lactoperoxidase on Graphene Oxide Nanosheets and Copper Oxide Nanoparticles and Evaluation of Their Stability. *Catalysis Letters*, 149 (2), 562-573.
- Nayeri, H., Fattahi, A., Mobarakeh M.I., Nori, P., Agarwal, S., Greiner, A. and Wendorff, J.H., 2009. Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers-Progress in Techniques, Materials, and Applications. *Advanced Functional Materials*, 19 (18), 2863-2879.
- Agarwal, S., Wendorff, J.H. and Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49 (26), 5603-5621.
- Al-Baarri, A.N.m., Legowo, A.M., Hayakawa, S. and Ogawa, M., 2015. Enhancement Antimicrobial Activity of Hyphothiocyanite Using Carrot Against Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli. *Procedia Food Science*, 3, 473-478.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M. and Asgher, M., 2017. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 974-984.
- Aminabhavi, T.M., Balundgi, R.H. and Cassidy, P.E., 1990. A Review on Biodegradable Plastics. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 29 (3), 235-262.
- Asgher, M., Noreen, S. and Bilal, M., 2017. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of Trametes versicolor IBL-04 laccase immobilized on different polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 54-62.
- Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S. and Iqbal, H.M.N., 2014. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 101, 56-66.

- Averous, L. and Boquillon, N., 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56 (2), 111-122.
- Bagde, P. and Nadanathangam, V., 2019. Mechanical, antibacterial and biodegradable properties of starch film containing bacteriocin immobilized crystalline nanocellulose. *Carbohydr Polym*, 222, 115021.
- Basso, A. and Serban, S., 2019. Industrial applications of immobilized enzymes-A review. *Molecular Catalysis*, 479, 35-54.
- Bilal, M. and Iqbal, H.M.N., 2019. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 462-482.
- Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikedasaito, M. and Caughey, W.S., 1989. Bovine Myeloperoxidase and Lactoperoxidase Each Contain a High-Affinity Site for Calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160 (2), 897-902.
- Boscolo, B., Leal, S.S., Ghibaudi, E.M. and Gomes, C.M., 2007. Lactoperoxidase folding and catalysis relies on the stabilization of the alpha-helix rich core domain: A thermal unfolding study. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1774 (9), 1164-1172.
- Brady, D. and Jordaan, J., 2009. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31 (11), 1639-1650.
- Chang, Q., Tang, H., 2014. Immobilization of horseradish peroxidase on NH<sub>2</sub>-modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol. *Molecules* 19:15768–15782.
- Cyras, V.P., Zenklusen, M.C.T. and Vazquez, A., 2006. Relationship between structure and properties of modified potato starch biodegradable films. *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (6), 4313-4319.
- Dawson, P.L., Carl, G.D., Acton, J.C. and Han, I.Y., 2002. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult Sci*, 81 (5), 721-6.
- Das, D., Nath, B. C., Phukon, P., & Dolui, S. K., 2013. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 430-433.
- Dean, J.P. and Zottola, E.A., 1996. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 59 (5), 476-480.
- Deka, J.R., Saikia, D., Lai, Y.S., Tsai, C.H., Chang, W.C. and Kao, H.M., 2015. Roles of nanostructures and carboxylic acid functionalization of ordered cubic mesoporous silicas in lysozyme immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 213, 150-160.
- Dey, A. and Sit, N., 2017. Modification of foxtail millet starch by combining physical, chemical and enzymatic methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 314-320.
- Dogac, Y., Teke, M., 2013. Immobilization of bovine catalase onto magnetic nanoparticles. *Prep Biochem Biotechnol*, 43(8):750–765.
- Dong, H., Snyder, J.F., Tran, D.T. and Leadore, J.L., 2013. Hydrogel, aerogel and film of cellulose nanofibrils functionalized with silver nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 95 (2), 760-7.

- Dumontet, C. and Rousset, B., 1983. Identification, purification, and characterization of a non-heme lactoperoxidase in bovine milk. *Journal of Biological Chemistry*, 258 (23), 14166-14172.
- El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M., 2012. CuO nanoparticles: synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7), 2997-3001.
- Fishman, M.L., Coffin, D.R., Konstance, R.P. and Onwulata, C.I., 2000. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, 41 (4), 317-325.
- Flemmig, J., Gau, J., Schlorke, D. and Arnhold, J., 2016. Lactoperoxidase as a potential drug target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20 (4), 447-461.
- Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Terenzi, A., Vercellino, M., Visai, L., Santulli, C., Torre, L. and Kenny, J.M., 2013. Ternary PVA nanocomposites containing cellulose nanocrystals from different sources and silver particles: Part II. *Carbohydrate Polymers*, 97 (2), 837-848.
- Gau, J., Furtmuller, P.G., Obinger, C., Prevost, M., Van Antwerpen, P., Arnhold, J. and Flemmig, J., 2016. Flavonoids as promoters of the (pseudo-)halogenating activity of lactoperoxidase and myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 307-319.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. and Entezami, A.A., 2011. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, 33 (1), 229-235.
- Ghorbani, H., Mehr, F., Pazoki, H. and Rahmani, B., 2015. Synthesis of ZnO Nanoparticles by Precipitation Method. *Oriental Journal of Chemistry*, 31 (2), 1219-1221.
- Hannon, J.C., Kerry, J., Cruz-Romero, M., Morris, M. and Cummins, E., 2015. Advances and challenges for the use of engineered nanoparticles in food contact materials. *Trends in Food Science & Technology*, 43 (1), 43-62.
- Hong, R., Pan, T., Qian, J., & Li, H., 2006. Synthesis and surface modification of ZnO nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 119(2-3), 71-81.
- Hosseini, S.N., Pirsai, S. and Farzi, J., 2021. Biodegradable nano composite film based on modified starch-albumin/MgO; antibacterial, antioxidant and structural properties. *Polymer Testing*, 97.
- Imani, M.M. and Safaei, M., 2019. Optimized Synthesis of Magnesium Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Journal of Nanotechnology*, 2019, 1-6.
- Jacob, B.M., Antony, E., Sreekumar, B. and Haridas, M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life Sciences*, 66 (25), 2433-2439.
- Jafary, F., Kashanian, S., Sharieat, Z.S., Jafary, F., Omidfar, K. and Paknejad, M., 2012. Stability improvement of immobilized lactoperoxidase using polyaniline polymer. *Molecular Biology Reports*, 39 (12), 10407-10412.
- Kassaei, M. Z., Masrouri, H., & Movahedi, F., 2010. ZnO-nanoparticle-promoted synthesis of polyhydroquinoline derivatives via multicomponent Hantzsch reaction. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 141, 317-322.
- Khandanlou, R., Ngoh, G.C., Chong, W.T., Bayat, S. and Saki, E., 2016. Fabrication of Silver Nanoparticles Supported on Rice Straw: In Vitro Antibacterial Activity and its Heterogeneous Catalysis in the Degradation of 4-Nitrophenol. *Bioresources*, 11 (2), 3691-3708.

- Kishore, D., Talat, M., Srivastava, O.N., Kayastha, A.M., 2012. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications. *PLoS ONE* 7(7):e40708
- Krochta, J.M. and DeMulderJohnston, C., 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-74.
- Kumar, R., Bhatia, K.L., Dauter, Z., Betzel, C. and Singh, T.P., 1995. Purification, Crystallization and Preliminary-X-Ray Crystallographic Analysis of Lactoperoxidase from Buffalo Milk. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 51, 1094-1096.
- Kussendrager, K.D. and van Hooijdonk, A.C.M., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, S19-S25.
- Liu, Y., Li, Q., Gao, S., & Shang, J. K., 2011. Exceptional As (III) sorption capacity by highly porous magnesium oxide nanoflakes made from hydrothermal synthesis. *Journal of the American Ceramic Society*, 94(1), 217-223.
- Lourdin, D., DellaValle, G. and Colonna, P., 1995. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27 (4), 261-270.
- Lu, X.F., Wang, C. and Wei, Y., 2009. One-Dimensional Composite Nanomaterials: Synthesis by Electrospinning and Their Applications. *Small*, 5 (21), 2349-2370.
- Maleki, A. and Kamalzare, M., 2014. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@cellulose composite nanocatalyst: Preparation, characterization and application in the synthesis of benzodiazepines. *Catalysis Communications*, 53, 67-71.
- Mecitoğlu, Ç. and Yemenicioğlu, A., 2007. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry*, 104 (2), 726-733.
- Miao, X.X., Pi, L.L., Fang, L., Wu, R. and Xiong, C.H., 2016. Application and characterization of magnetic chitosan microspheres for enhanced immobilization of cellulase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34 (6), 272-282.
- Mirouliaei, M., Nayyeri, H., Samsam, S.S., Movahedian, A.A., 2007. Biospecific immobilization of lactoperoxidase on Con A-Sepharose 4B. *Sci Iran* 14:303–307.
- Movahedi, M., Samsam Shariat, S.Z.A. and Nazem, H., 2018. Immobilization of Lactoperoxidase on Graphene Oxide Nanosheets and Copper Oxide Nanoparticles and Evaluation of Their Stability. *Catalysis Letters*, 149 (2), 562-573.
- Movahedi, M., Samsam Shariat, S.Z., Nazem, H., 2019. Immobilization of lactoperoxidase on graphene oxide nanosheets and copper oxide nanoparticles and evaluation of their stability. *Catal Lett* 149(2):562–573.
- Oun, A.A., Shankar, S. and Rhim, J.W., 2020. Multifunctional nanocellulose/metal and metal oxide nanoparticle hybrid nanomaterials. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60 (3), 435-460.
- Ozdemir, H., Aygul, I. and Kufrevioglu, O.I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 31 (2), 125-134.
- Ozdemir, H., Hacibeyoglu, H.I. and Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from creek-water buffalo milk and investigation of kinetic and antibacterial properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 32 (2), 143-155.

- Pandiyarajan, T., Udayabhaskar, R., Vignesh, S., James, R. A., & Karthikeyan, B., 2013. Synthesis and concentration dependent antibacterial activities of CuO nanoflakes. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2020-2024.
- Park, S.I., Daeschel, M.A. and Zhao, Y., 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69 (8), M215-M221.
- Petersen, K., Nielsen, P.V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M.B., Nilsson, N.H. and Mortensen, G., 1999. Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (2), 52-68.
- Phiwdang, K., Suphankij, S., Mekprasart, W., & Pecharapa, W., 2013. Synthesis of CuO nanoparticles by precipitation method using different precursors. *Energy procedia*, 34, 740-745.
- Pirouzifard, M., Yorghhanlu, R.A. and Pirs, S., 2020. Production of active film based on potato starch containing Zedo gum and essential oil of *Salvia officinalis* and study of physical, mechanical, and antioxidant properties. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 33 (7), 915-937.
- Pirs, S. and Chavoshizadeh, S., 2018. Design of an optical sensor for ethylene based on nanofiber bacterial cellulose film and its application for determination of banana storage time. *Polymers for Advanced Technologies*, 29 (5), 1385-1393.
- Pirs, S., Farshchi, E. and Roufegarinejad, L., 2020a. Antioxidant/Antimicrobial Film Based on Carboxymethyl Cellulose/Gelatin/TiO<sub>2</sub>-Ag Nano-Composite. *Journal of Polymers and the Environment*, 28 (12), 3154-3163.
- Pirs, S., Sani, I.K. and Khodaeivandi, S., 2018. Design and fabrication of starch-nano clay composite films loaded with methyl orange and bromocresol green for determination of spoilage in milk package. *Polymers for Advanced Technologies*, 29 (11), 2750-2758.
- Pirs, S., Sani, I.K., Pirouzifard, M.K. and Erfani, A., 2020b. Smart film based on chitosan/*Melissa officinalis* essences/ pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 37 (4), 634-648.
- Rani, S. and Nand, K., 1996. Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (1), 23-28.
- Rezaei, M., Pirs, S. and Chavoshizadeh, S., 2020. Photocatalytic/Antimicrobial Active Film Based on Wheat Gluten/ZnO Nanoparticles. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30 (7), 2654-2665.
- Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M. and Ng, P.K.W., 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (16), 5814-5822.
- Romero-Bastida, C.A., Bello-Perez, L.A., Garcia, M.A., Martino, M.N., Solorza-Feria, J. and Zaritzky, N.E., 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*, 60 (2), 235-244.
- Sahooli, M., Sabbaghi, S., & Saboori, R., 2012. Synthesis and characterization of mono sized CuO nanoparticles. *Materials Letters*, 81, 169-172.
- Saleh, A., Majed, H., Yaaser, Q., Ibrahim, H., 2017. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Electron J Biotechnol* 27:84–90

- Samsam Shariat, S.Z.A., Movahedi, M. and Nazem, H., 2019. Immobilization of lactoperoxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles with improved stability. *Biotechnology Letters*, 41 (12), 1373-1382.
- Sartore, L., Vox, G. and Schettini, E., 2013. Preparation and Performance of Novel Biodegradable Polymeric Materials Based on Hydrolyzed Proteins for Agricultural Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 21 (3), 718-725.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B., 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409 (6817), 258-268.
- Seifu, E., Buys, E.M. and Donkin, E.F., 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (4), 137-154.
- Shankar, S., Oun, A.A. and Rhim, J.W., 2018. Preparation of antimicrobial hybrid nanomaterials using regenerated cellulose and metallic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107 (Pt A), 17-27.
- Shankar, S., Wang, L.F. and Rhim, J.W., 2017. Preparation and properties of carbohydrate-based composite films incorporated with CuO nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 169, 264-271.
- Shariat, S., Borzouee, F., Mofid, M.R. and Varshosaz, J., 2018. Immobilization of lactoperoxidase on graphene oxide nanosheets with improved activity and stability. *Biotechnology Letters*, 40 (9-10), 1343-1353.
- Sheikh, I.A., Yasir, M., Khan, I., Khan, S.B., Azum, N., Jiffri, E.H., Kamal, M.A., Ashraf, G.M. and Beg, M.A., 2018. Lactoperoxidase immobilization on silver nanoparticles enhances its antimicrobial activity. *Journal of Dairy Research*, 85 (4), 460-464.
- Sheldon, R.A., 2007. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (8-9), 1289-1307.
- Shen, Q.Y., Yang, R.J., Hua, X., Ye, F.Y., Zhang, W.B. and Zhao, W., 2011. Gelatin-templated biomimetic calcification for beta-galactosidase immobilization. *Process Biochemistry*, 46 (8), 1565-1571.
- Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Singh, S.B., Kaur, P., Bhushan, A., Srinivasan, A. and Singh, T.P., 2008. Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, 376 (4), 1060-1075.
- Su, R., Shi, P., Zhu, M., Hong, F., Li, D., 2012. Studies on the properties of graphene oxide-alkaline protease bio-composites. *Bioresource Technology*, 115, 136-140.
- Talam, S., Karumuri, S. R., & Gunnam, N., 2012. Synthesis, characterization, and spectroscopic properties of ZnO nanoparticles. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Talja, R.A., Helen, H., Roos, Y.H. and Jouppila, K., 2007. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 67 (3), 288-295.
- Tang, W.W., Zeng, G.M., Gong, J.L., Liang, J., Xu, P., Zhang, C., Huang, B.B., 2014. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: a review. *Sci Total Environ* 468:1014-1027.
- Tenovuo, J., Kurkijärvi, K., 1981. Immobilized lactoperoxidase as a biologically active and stable form of an antimicrobial enzyme. *Arch Oral Biol* 26(4):309-314
- Tharanathan, R.N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14 (3), 71-78.

- Weber, C.J., Haugaard, V., Festersen, R. and Bertelsen, G., 2002. Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives and Contaminants*, 19, 172-177.
- Wu, T.-T., Zhao, X.-J., Yang, R.-L., Bilal, M., Wang, Z.-Y., Luo, H.-Z., Xu, N.-N. and Nie, Z.-K., 2020. Catalytic Performance of a Robust Whole-Cell Biocatalyst in the Regioselective Synthesis of Helicid Esters Under Optimized Processing Conditions. *Catalysis Letters*, 150 (7), 1841-1848.
- Zhang, F., Zheng, B., Zhang, J., Huang, X., Liu, H., Guo, S., Zhang, J., 2010. Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal. *J Phys Chem* 114(18):8469–8473
- Zhang, C., Feng, F.Q. and Zhang, H., 2018. Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 175-186.
- Zhang, H., Hu, J., Xie, J., Wang, S., & Cao, Y., 2019. A solid-state chemical method for synthesizing MgO nanoparticles with superior adsorption properties. *RSC advances*, 9(4), 2011-2017.



## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler              |                         |
|-------------------------------|-------------------------|
| Adı Soyadı                    | : Songül BAYRAK         |
| Doğum tarihi                  | :                       |
| Doğum Yeri                    | :                       |
| Uyruğu                        | :                       |
| Adres                         | :                       |
| Tel                           | :                       |
| E-mail                        | :                       |
| Eğitim                        |                         |
| Lise                          | : Atatürk Lisesi        |
| Lisans                        | : Atatürk Üniversirtesi |
| Yüksek lisans                 | : Atatürk Üniversirtesi |
| Doktora                       | : Atatürk Üniversirtesi |
| Yabancı Dil Bilgisi           |                         |
| İngilizce                     | : İyi                   |
| Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar |                         |
|                               |                         |
| Tezden Üretilmiş Yayınlar     |                         |
|                               |                         |