GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

BOMBYX MORİ KOZALARINDAN PROTEİN İZOLASYONU, HİBRİT NANOÇİÇEKLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE TAYİNİ

Gökşen Dilşat DURBİLMEZ

DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KASIM 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gökşen Dilşat DURBİLMEZ
06.10.2021

BOMBYX MORİ KOZALARINDAN PROTEİN İZOLASYONU, HİBRİT NANOÇİÇEKLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE TAYİNİ

(Doktora Tezi)

Gökşen Dilşat DURBİLMEZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2021

ÖZET

Bombyx mori Linn kozalarından elde edilen ipek proteini fibroin ve serisin proteinlerinden oluşmaktadır. Fibroin, mekanik özellikleri ve kontrol edilebilir biyobozunurluk özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda kullanılmakta, serisin ise nemlendirici etkisiyle özellikle kozmetik ve gıda sanayisinde ve antikoagülan, antikanser özelliklerinden dolayı ilaç sistemlerinde biyouyumlu madde olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra biyoteknolojik sentez ürünleri olan yeni geliştirilmiş çiçek benzeri hibrit nanoparçacık sınıfından organik-inorganik hibrit nanoçiçekler, basit sentezleri, yüksek verimlilikleri, enzim stabilize etme ve enzim aktivitesini yükseltme yetenekleri nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmamızda Türkiye'de yetiştirilen ipek kozalarından izole edilen ve ticari olarak temin edilen proteinler ile bu proteinlerin hibrit nanoçiçeklerini sentezleyerek antioksidan, hyaluronidaz, tirozinaz enzim inhibisyonu ve güneş koruyucu aktivitelerin *in vitro* analizlerini karşılaştırmayı amaçlanmıştır. Eş zamanlı olarak yurtdışından temin edilen ipek proteinleri ile izole ettiğimiz protein ve hibrit nanoçiçeklerinin aktiviteleri de karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ipek proteinlerinden ilk kez çinko hibrit nanoçiçeklerinin sentezlenmesi açısından özgün bir tez niteliğindedir.

Bilim Kodu : 1017

Anahtar Kelimeler : İpek proteini, serisin, fibroin, nanoçiçek, izolasyon, biyoteknoloji, *in vitro*

Sayfa Adedi : 121

Danışman : Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

PROTEIN ISOLATION, SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HYBRID NANOFLOWERS FROM *BOMBYX MORI* COCOONS BY *IN VITRO* METHODS

(Ph. D. Thesis)

Gökşen Dilşat DURBİLMEZ

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

November 2021

ABSTRACT

The silk protein obtained from *Bombyx mori* Linn cocoons consists of fibroin and sericin proteins. Fibroin is used in biomedical applications due to its mechanical properties and controllable biodegradability properties, while sericin is used as a biocompatible substance in the cosmetics and food industry, especially in the cosmetics and food industry, and in pharmaceutical systems due to its anticoagulant and anticancer properties. In addition to these, organic-inorganic hybrid nanoflowers from the newly developed flower-like hybrid nanoparticle class, which are biotechnological synthesis products, have attracted attention in recent years due to their simple synthesis, high efficiency, enzyme stabilization and enzyme activity-enhancing abilities. In this thesis, we aimed to compare the in vitro analyzes of antioxidant, hyaluronidase, tyrosinase enzyme inhibition and sunscreen activities by synthesizing commercially available proteins and hybrid nanoflowers of these proteins isolated from silk cocoons grown in Turkey. Simultaneously, the activities of the protein and hybrid nanoflowers that we isolated with the silk proteins obtained from abroad were also compared. This study is a unique thesis in terms of synthesizing zinc hybrid nanoflowers from silk proteins for the first time.

Science Code : 1017

Key Words : Silk protein, sericin, fibroin, nanoflower, isolation, biotechnology, *in vitro*

Page Number : 121

Supervisor : Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca hem akademik yönden hem de insani yönden emeklerini, desteklerini, bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN'a,

Tezim sırasında her zaman kapılarını çaldığım ve sabırla sorularımı yanıtlayan doktora tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL'a ve Aksaray Üniversitesi Kimya / Biyokimya Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na,

Destekleri için Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanlığına ve değerli öğretim üyelerine,

Yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Tuğba GÜNBATAN, Arş. Gör. Dr. Hasya Nazlı GÖK'e,

Doktora sürecim boyunca her zaman arkadaşlıklarından mutluluk duyduğum Arş. Gör. Dr. Semih BULUT, Arş. Gör. Sultan PEKACAR ve Arş. Gör. Esra Gizem TÜRKCANOĞLU'na,

Doktora öğrenim sürecim boyunca "Farmasötik Biyoteknoloji ve İlaç Tasarımı "alanında almış olduğum YÖK 100/2000 burs imkânını veren Yüksek Öğretim Kurumu'na,

Doktora sırasında almaya hak kazanmış olduğum TÜBİTAK 2211-A bursu için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Tezim kapsamındaki araştırmalarıma 02/2020-02 proje kodu ile maddi destek veren Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Liseden dönem arkadaşım Sevgi BALTACIOĞLU'na, kuzenim Hilal DUYAR'a, hayatım boyunca her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

RESİMLERİN LİSTESİ x

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xiii

GRAFİKLERİN LİSTESİ xv

SİMGELER VE KISALTMALAR xvi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. *Bombyx mori* 3

2.2. İpek Böcekçiliğinin Tarihçesi 5

2.3. İpek Proteinleri 6

2.3.1. Serisin 7

2.3.2. Fibroin 10

2.4. İpek Proteinlerinin Aktivite Çalışmaları 11

2.4.1. Alzheimer hastalığında etkisi 11

2.4.2. Antibakteriyel aktivite 12

2.4.3. Antifungal aktivite 13

2.4.4. Antihiperlipidemik aktivite 13

2.4.5. Anti-tümör aktivite 13

2.4.6. Diyet materyali olarak ipek proteinleri 14

2.4.7. Doku mühendisliği 15

Sayfa

2.4.8. Hücre büyümesi için matrix 15

2.4.9. Kritik boyuttaki kemik defektlerinin iyileşmesi için ipek bazlı implantlar 15

2.4.10. Yara iyileştirici aktivite 16

2.5. İpek Proteinlerinin Kozmetikte Kullanımı 17

2.5.1. Antioksidan aktivite 17

2.5.2. UVB'ye karşı koruyucu etki 18

2.5.3. Serisinin yaşlanma karşıtı etkisinin *in vitro* araştırılması 18

2.6. Diğer *in vitro* ve *in vivo* Çalışmalar 19

2.7. Organik (Protein) – İnorganik (Çinko) Hibrit Nanoçiçek Yapıları 21

2.7.1. Potansiyel uygulama alanları 23

2.7.2. Hibrit nanoçiçeklerle ilgili yapılan çalışmalar 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM 29

3.1. Gereç 29

3.2. Yöntem 30

3.2.1. İpek proteinlerinin izolasyonu 30

3.3. İpek Proteini-Çinko Nanoçiçek Sentezi 34

3.3.1. Çinko hibrit nanoçiçek sentezlenmesi 34

3.4. *İn vitro* Aktivite Deneyleri 38

3.4.1. Antioksidan aktivite 38

3.4.2. Hyaluronidaz enzim inhibisyonu aktivitesi 39

3.4.3. Tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi 40

3.4.4. Güneş koruyucu aktivitenin *in vitro* analizi 41

4. BULGULAR 43

4.1. İzole Edilen Proteinlerin UV Spektrofotometre ile Analizleri 43

4.1.1. Serisin 43

Sayfa

4.1.2. Fibroin içeren total protein 44

4.2. Ticari ve İzole Edilen Proteinlerin Fizikokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonu 45

4.2.1. SEM ile karakterizasyon 45

4.2.2. FT-IR ile karakterizasyon 55

4.2.3. XRD ile karakterizasyon 59

4.2.4. EDX ile Karakterizasyon 62

4.3. *İn vitro* Aktivite Sonuçları 67

4.3.1.Antioksidan aktivite sonuçları 67

4.3.2. Hyaluronidaz enzim inhibisyon sonuçları 68

4.3.3. Tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları 70

4.3.4. Güneş koruyucu aktivite sonuçları 72

5. TARTIŞMA 99

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 107

KAYNAKLAR 109

ÖZGEÇMİŞ 119

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Tez kapsamında çalışılan *B. mori* kozası örnekleri 29

Resim 3.2. İzole edilen serisin ve fibroin içeren total ipek proteinlerinin Liyofilizatör'de kurutulması 34

Resim 3.3. Nanoçiçeklerin sentezlenmesi 35

Resim 3.4. Sentezlenen çinko nanoçiçek 35

Resim 3.5. SEM ve EDX analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz (ERÜ-TAUM)..... 36

Resim 3.6. XRD analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz (ERÜ, TAUM)..... 37

Resim 3.7. FT-IR analizlerinin gerçekleştiği cihaz (ERÜ-TAUM)..... 38

Resim 3.8. İzole edilen ipek proteinleri 41

Resim 3.9. UVA ve UVB ölçümünün yapıldığı cihaz..... 41

Resim 3.10. Analizler için hazırlanan kremler 42

Resim 4.1. 1 nolu numune / Negatif Kontrol (Hiçbir şey uygulanmayacak, baz krem). 73

Resim 4.2. 1 nolu numunenin analiz sonuçları 73

Resim 4.3. 2 nolu numune / Pozitif Kontrol (Therasilk isimli ürününün ipek proteini içermeyen güneş kremi 75

Resim 4.4. 2 nolu numunenin analiz sonuçları 75

Resim 4.5. 3 nolu numune: Referans Madde (Therasilk güneş kremi %1 lik) 77

Resim 4.6. 3 nolu numunenin analiz sonuçları 77

Resim 4.7. 4 nolu numune /Total ipek proteini + Güneş kremi (%1'lik) 79

Resim 4.8. 4 nolu numunenin analiz sonuçları 79

Resim 4.9. 5 nolu numune/ Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%1'lik) 81

Resim 4.10. 5 nolu numunenin analiz sonuçları 81

Resim 4.11. 6 nolu numune: Serisin + Güneş kremi (%1'lik)..... 83

Resim 4.12. 6 nolu numunenin analiz sonuçları 83

Resim **Sayfa**

Resim 4.13. 7 nolu numune: Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%1'lik)..... 85

Resim 4.14. 7 nolu numunenin analiz sonuçları 85

Resim 4.15. 8 nolu numune: Total ipek proteini + Güneş kremi (%2'lik) 87

Resim 4.16. 8 nolu numunenin analiz sonuçları 87

Resim 4.17. 9 nolu numune: Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik) 89

Resim 4.18. 9 nolu numunenin analiz sonuçları 89

Resim 4.19. 10 nolu numune / Serisin + Güneş kremi (%2'lik)..... 91

Resim 4.20. 10 nolu numunenin analiz sonuçları 91

Resim 4.21. 11 nolu numune / Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik)..... 93

Resim 4.22. 11 nolu numunenin analiz sonuçları 93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. İpek proteini serisinin % aminoasit içeriği 9

Çizelge 2.2. İpek proteini fibroinin % aminoasit içeriği 11

Çizelge 4.1. Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri .....…… 46

Çizelge 4.2. İzole edilen ipek proteinlerinin SEM görüntüleri 53

Çizelge 4.3. Sentezlenen çinko nanoçiçeklerinin boyut analizleri 54

Çizelge 4.4. SN-ZnNç'nin elementel analiz sonucu 63

Çizelge 4.5. TP-ZnNç'nin elementel analiz sonucu 64

Çizelge 4.6. iSN- ZnNç'nin elementel analiz sonucu 65

Çizelge 4.7. TP-ZnNç'nin elementel analiz sonucu 66

Çizelge 4.8. Ticari olarak temin edilen proteinlerin ve çinko nanoçiçeklerinin DPPH sonuçları 67

Çizelge 4.9. Hyaluronidaz enzim inhibisyon sonuçları 69

Çizelge 4.10. Tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları 71

Çizelge 4.11. Referans krem formülasyonu (Therasilk'e ait) 95

Çizelge 4.12. Güneş koruyucu aktivite sonuçları 96

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. *B. mori* koza oluşum döngüsü 4

Şekil 2.2. İpek proteinlerinin fiziksel yapısı 7

Şekil 2.3. İpek proteini serisinin kimyasal yapısı 9

Şekil 2.4. Fibroinin tekrarlanan aminoasit dizilimi 10

Şekil 2.5. İpek proteini türevlerinin uygulama alanları 21

Şekil 2.6. Organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerin oluşum aşamaları 23

Şekil 2.7. Organik-inorganik nanoçiçeklerin biyoteknolojik uygulama alanları 24

Şekil 3.1. Serisin proteini izolasyon aşamaları 32

Şekil 3.2. Fibroin içeren total protein izolasyon aşamaları 33

Şekil 4.1. Serisin proteininin UV absorbansı 43

Şekil 4.2. Total ipek proteinin UV absorbansı 44

Şekil 4.3. Ticari serisinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları 55

Şekil 4.4. Ticari ipek proteinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları 56

Şekil 4.5. İzole serisinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları 57

Şekil 4.6. Fibroin içeren total ipek proteinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonucu 58

Şekil 4.7. SN-ZnNç'nin XRD analiz sonucu 59

Şekil 4.8. TP-ZnNç'nin XRD analiz sonucu 60

Şekil 4.9. iSN-ZnNç'nin XRD analiz sonucu 61

Şekil 4.10. iTP-ZnNç'nin XRD analiz sonucu 62

Şekil 4.11. SN-ZnNç'nin EDX analiz sonucu 63

Şekil 4.12. TP-ZnNç'nin EDX analiz sonucu 64

Şekil 4.13. iSN- ZnNç'nin EDX analiz sonucu 65

Şekil 4.14. TP-ZnNç'nin EDX sonucu 66

Şekil 4.15. 1 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 74

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.16. 2 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 76

Şekil 4.17. 3 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 78

Şekil 4.18. 4 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 80

Şekil 4.19. 5 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 82

Şekil 4.20. 6 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 84

Şekil 4.21. 7 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 86

Şekil 4.22. 8 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 88

Şekil 4.23. 9 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 90

Şekil 4.24. 10 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 92

Şekil 4.25. 11 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi 94

GRAFİKLERİN LİSTESİ

Grafik **Sayfa**

Grafik 4.1. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %antioksidan değerleri..... 68

Grafik 4.2. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %hyaluronidaz enzim inhibisyon değerleri 70

Grafik 4.3. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %tirozinaz enzim inhibisyonu değerleri 72

Grafik 4.4. Konsantrasyonlara göre kremlerin SPF değerleri..... 97

Grafik 5.1. 1mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması..... 100

Grafik 5.2. 1 mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % hyaluronidaz enzim inhibisyonlarının karşılaştırılması..... 102

Grafik 5.3. 1 mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % tirozinaz enzim inhibisyonlarının karşılaştırılması..... 103

Grafik 5.4. %1'lik güneş kremlerinin negatif kontrol, pozitif kontrol ve referans madde ile kıyaslanması..... 105

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
Mm	Mikrometre
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
kDa	Kilodalton
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin Esteraz
COX-2	Siklooksijenaz-2
DMBA	7,12-dimetilbenz [a] antrasen
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2-difenil 1-pikrilhidrazil
EDX	Enerji Dağılımlı X- Işınları Yöntemi
ERÜ – TAUM	Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama merkezi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
LiBr	Lityum Bromür
MeOH	Metanol

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
M.Ö.	Milattan Önce
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
PBS	Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PMMA	Polimetilmetakrilat
PVA	Poli Vinil Alkol
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPF	Güneş Koruma Faktörü
UV	Ultraviyole
UVA	Ultraviyole A
UVB	Ultraviyole B
XRD	X-Işını Kırınım/ X-Işını Difraktometresi
Zn	Çinko

1. GİRİŞ

İpek, 4000 yıldan beri insanlığın yaşamında önemli bir yere sahiptir. Doğal ipek, tekstil alanında önemli bir yere sahip olmaya günümüzde de devam etmektedir. İpek lifi, Bombycidae familyasına ait özel böceklerin bir ürünüdür. En yaygın şekilde karakterize edilen ipekler evcil ipekböceği, *Bombyx mori* Linn ve örümceklerdir (*Nephila clavipes* ve *Araneus diadematus*) (Vollrath, 1999). İpek lifleri/iplikleri, böcekler tarafından iplik haline gelmiş lifli proteinlerdir (Komatsu ve diğerleri 1975). İpek bezi hücreleri, kozanın temel bir bileşeni olan ipek proteinlerini üretir ve bu proteinler ipek bezlerinin lümeninde depolanır. *Bombyx mori* (*B. mori*) kozasından elde edilen ipek, en az iki majör fibroin protein: sırasıyla 25 ve 325 kDa hafif ve ağır zincirler içerir ve bu iki fibroin lifini bir arada tutan serisin ile birbirine yapışmıştır. Serisin, 3 kısma ayrılır, Serisin A, en dıştaki tabakadır ve sıcak suda çözünmez. Serisin B orta tabakadır. Serisin C, fibroine bitişik en içteki katmandır (Padamwar ve diğerleri, 2004). Serisinin sudaki çözünürlüğü, β yaprak yapısına dönüştürüldüğünde azalır (Wu ve diğerleri 1996). Fibroin bir glikoproteindir ve disülfür bağlarıyla kovalent olarak bağlanmış iki eş molar protein alt biriminden oluşur. Fibroin filamentleri, kristalli alanlardan oluşmaktadır. Amorf bölgeler, aminoasitlerin varlığı ile karakterize edilirken, kristalin alanlar, yüksek oranda alanin, glisin ve serin ile karakterize edilir (Magoshi, 1996; Lesile, 2003).

Son yıllarda tüm dünyada ipek proteini hem tekstilde hem de sağlık sektöründe önem kazanmış olup tıbbi alanda biyomedikal dikişlerde ticari olarak kullanılmaktadır. Hücre büyümesi için matriks özelliktedir. Kozmetik olarak; nemlendirici, UV A-B koruyucu ve yaşlanma karşıtı özelliğe sahiptir. Diyabette, gıda takviyelerinde, Alzheimer hastalığında etkileri çalışılmış, antihiperlipidemik etkisi gözlemlenmiştir (Yellamma, 2014; Joseph, 2012; Zhaorigetu, 2003). Bugün ülkemizde ipekböcekçiliği yoğun olarak Bursa, Bilecik, Diyarbakır, Eskişehir, Sakarya ve Antalya illerinde yapılmaktadır. Türkiye'de çeşitli bölgelerde yetişen bu ipekböceklerinin kozasından şimdiye kadar ipek proteinleri üretimi yapılmamıştır. Bu nedenle proteinler ihtiyaç duyulduğunda yurtdışından özellikle Çin ve Kore'den satın alınmaktadır. İpek proteinin izole edilmesi; Türkiye'de üretimi artırmak, dışa bağımlılığı azaltmak, sosyoekonomik gelişim ve sağlık sektöründe kullanım açısından önemlidir.

Çalışmamızda son yıllarda dikkat çeken yüksek verimlilik, immobilizasyon ve yüzey/ hacim oranından dolayı nanobiyoteknolojik bir sentez ürünü olan çinko hibrit nanoçiçek sentezlemesi amaçlanmıştır.

Çinko oksit de güneş koruyucularda UVB ışınlarından korunmak için kullanılagelmektedir. Böylece doğal ipek proteinin güneş koruyucu özelliğine ek olarak çinkonun hibrit nanoçiçeklerinin de güneş koruyucu etkisi karşılaştırmalı olarak incelenecektir. Tezimizin amacı, ipek kozalarından serisin ve fibroin elde etmek, biyoteknolojik öneme sahip çinko hibrit nanoçiçeklerini ilk kez sentezlemek, hibrit nanoçiçeklerin karakterizasyonunu ve nanoçiçeklerin biyolojik aktivitelerini *in vitro* yöntemlerle analiz etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmamız kapsamında *Bombyx mori*, ipek böcekçiliğinin tarihçesi, ipek proteinleri serisin ve fibroinin genel özellikleri, ipek proteinleri üzerinde yapılan *in vitro* aktivite çalışmaları, organik- inorganik hibrit nanoçiçeklerin genel özellikleri ile bu nanoçiçeklerin uygulama alanları hakkında bilgilere yer verilmiştir.

2.1. *Bombyx Mori*

İpek lifi ören böcekler esas olarak Saturnidae ve Bombycidae olmak üzere iki familyaya aittir. Bombycidae'ye ait olan *Bombyx mori*, koruyucu bir serisin kılıfı ile kaplanmış hassas bir ikiz ipek fibroin ipliği üretir. *B. mori* kozası, biyolojik işlevleri için mekanik koruma sağlayan kendine özgü çok katmanlı bir yapıya sahip ipek lifinden yapılmış doğal bir yapıdır. İpek proteini kollajen, elastin, keratin, sporgin gibi bir protein türüdür ve koza filamentinin temel bileşenini oluşturmaktadır (Chen, 2012; Mondal, 2007).

Alem	: Animalia
Bölüm	: Arthropoda
Sınıf	: Insecta/ Hexapoda
Takım	: Lepidoptera
Alt takım	: Macro Lepidoptrea- Heterocera
Üst familya	: Bombycoiden
Familya	: Bombycidae
Cins	: Bombyx
Tür	: *Bombyx mori* (Pugina, 2021; Yilmaz, 2015)

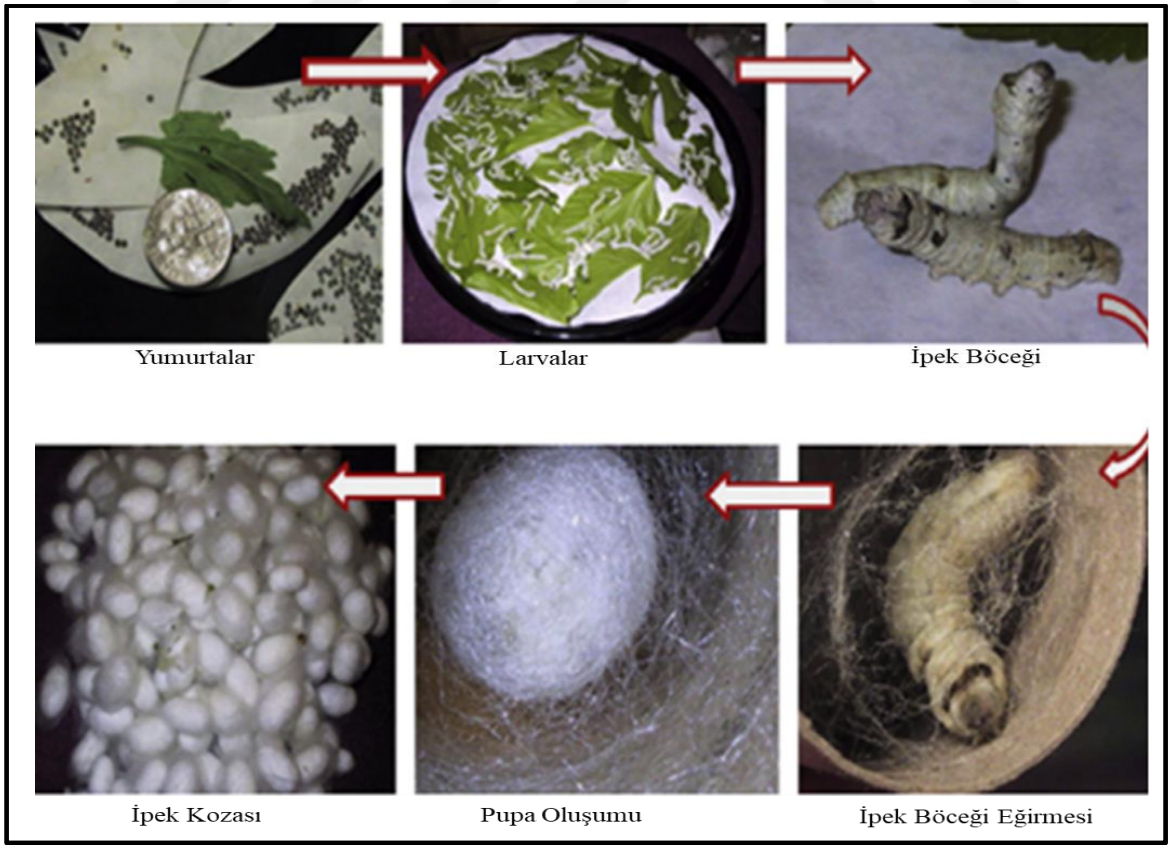
B. mori kozası, uzunluğu 1000-1500 m aralığında olan ve serisin ile yapıştırılmış tek bir ipek iplikten yapılmış doğal bir polimer kompozit kabuktur. Her lif, bir serisin tabakası ile kaplanmış iki fibroinden oluşur. Koza, çoklu katmanlara sahip üç boyutlu (3-D) bir yapıya sahiptir. Serisin, tüm kozadaki çok katmanlı yapıyı korumak için bir yapıştırıcı görevi görür (Chen ve diğerleri, 2012).

Dut ipek güvesi olan *B. mori* ipek filamenti üretmek için farklı aşamalardan geçmektedir. İpek üretiminin ilk aşaması ipekböceği yumurtalarının üretilmesidir. Bu kontrollü bir

ortamda yapılır, dişi bir seferde 300-400 yumurta bırakır. Dişi yumurtaları bıraktıktan hemen sonra ve erkek bundan kısa bir süre sonra ölür. İkinci aşamada, yumurtalar, larvalar (tırtıllar) olana kadar yaklaşık on gün kuluçkaya yatırılır. Üçüncü aşama beslenme dönemidir; larvalar yaklaşık altı hafta boyunca dut yapraklarıyla beslenir (Zhao ve diğerleri, 2005). İpekböcekleri beslenmeyi bırakır bırakmaz ipek kozası örmeye hazırdır.

Dut yaprakları üzerindeki tırtıllar yeterli büyüklüğe geldiğinde üst dudaklarından iplik halinde yapışkan bir salgı çıkararak koza yapmaya başlar. Tırtıl önce kozanın dış kısmını sonra kendi etrafını örmeye devam eder (Özdoğan, 2021). Kozalar, pupaları mikrobiyal bozulmadan korur ve metamorfoz sırasında dehidrasyonu önler (Akai, 1997; Gauthier, 2004; Weisman, 2008).

Şekil 2.1. *B. mori* koza oluşum döngüsünün resimli diyagramını göstermektedir. İpekböcekleri koza elde etmek için ipek liflerini döndürürler. Sadece birkaç gram ağırlığındaki bir koza, uzunluğu 700-1500 m arasında değişen ipek ipliğinden oluşmaktadır (Ude ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.1. *B. mori* koza oluşum döngüsü (Ude ve diğerleri, 2014'ten modifiye edilmiştir.)

2.2. İpek Böcekçiliğinin Tarihçesi

İpek liflerinin keşfi ile ilgili çok farklı görüşler olmakla birlikte Çinli düşünür ve filozof Konfüçyüs'ün (M.Ö. 571-479) anlatımı bugüne kadar en çok kabul gören görüştür. İpek lifi, Xia'dan önce Çin'i M.Ö. 2697'den 2597'ye kadar yönettiği düşünülen İmparator Huang Di'nin (veya Huang-Ti) eşi Çin İmparatoriçesi Hsi-Ling Shi tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Efsaneye göre, İmparatoriçe dut ağacının altında çay içerken fincana bir koza düşmüş ve sıcak suyla temas ettiğinde parçalanarak ipekböceğinin ürettiği lif ortaya çıkmıştır (Papavero, 2011; Pugina, 2021). Merakla hareket eden Hsi-Ling-Shi, bu malzemeyle bugünkü tekstil alanının başlangıcını sağlamıştır. Tekstil endüstrisi o dönemde kurulmuş olmasına rağmen, Shang hanedanlığı döneminde M.Ö. 1500 civarında zirveye ulaşmıştır. Sonraki iki bin yılda, Çinliler ipek liflerinin tek üreticisi ve ihracatçısı olup, kumaşın ticari değerinin farkında olan Çin hükümeti, dut tohumlarının ve ipekböceği yumurtalarının ihraç edilmesini yasaklamış ve yasağa saygısızlık edenleri ölüm cezasıyla tehdit etmiştir. (Liu, 1952; Pugina 2021). Bununla birlikte, yasak, Roma İmparatoru Justinian'ın kılık değiştirmiş keşişleri Çin'e, ipek böceği yumurtalarını saklamaları ve bambu çubukların içinde kendi ülkelerine götürmeleri için Çin'e göndermesiyle, farklı bir döneme geçilmiştir. Sonuç olarak, o dönemde Roma imparatorluğunun başkenti olan bugünkü İstanbul, Avrupa'nın ilk ipek merkezi haline gelmiştir. Bu olay, ipekçiliğin Batı Dünyasına gelişine ve sonraki yüzyıllarda tüm kıtalara yayılmasının başlangıcına işaret etmektedir. Hafifliği, parlaklığı ve güzelliği nedeniyle ipek, değerli taşlar ve altın gibi her zaman değerli bir nesne olarak ele alınmıştır. İpek lifine ve tekstiline olan yüksek ticari ilgi, büyük medeniyetlerin kurulmasına yol açan dünyanın en büyük ticari yolunun, “İpek Yolu”nun oluşmasına neden olmuştur (Liu, 1952; Pugina 2021). Yüzlerce yıldır Batı ile Doğu arasındaki en önemli kültürel ve ticari bağlantı olan bu yol, ancak 19. yüzyılda “İpek Yolu” adını almıştır. Bununla birlikte birçok ürün satılmış ve ticareti yapılmış olsa da, Alman gezgin ve jeolog Ferdinand Freiherr'in yola “İpek Yolu” (Almanca'daki orijinal “Die Siedenstrasse” den) adını vermesine yol açan Çin dokuması, her zaman en çok öne çıkan ve dikkat çeken dokuma olmuştur (Liu, 2010; Liu, 2013; Pugina, 2021).

Antik kaynaklara göre de ipek böcekçiliği ilk kez Çin'de üretilmeye başlanmıştır. İpek böceği yumurtaları, Çin İmparatorluğu'ndan bir kraliyet ailesiyle evlenen bir Çinli Prenses tarafından yasadışı olarak Çin'den ihraç edilmiştir. Çin milletinin kuzey komşusu olan Türkler, uzun yolculukları sırasında ipekböceği yumurtalarını batıya taşıyarak, ipek

böceğinin yaygınlaşmasına katkı sağlamışlardır. Bugünkü Türkiye'nin Asya kısmı olan Anadolu'da ipekçilik üretimine 552 yılında Bizans İmparatoru Justinianus zamanında başlanmıştır. İpek yüzyıllardır dünya ekonomisinde çok önemli rol almaktadır. İpek Yolu, güçlü milletler arasında siyasi bir aktördür.

İpek böcekçiliği Asya, Orta Doğu ve Avrupa'da yaklaşık 30 ülkede yapılmaktadır. Yaş koza ve ham ipek üretimi ile tüketimi Çin Halk Cumhuriyeti, Japonya, Hindistan, Güney Kore, Kuzey Kore ve Rusya'da yaygındır. Türkiye, dünyada ipek böceği yumurtası üreten ülkelerden biridir. Bursa, ipek ve ipek ticaret merkezi ile ünlü bir tekstil şehri olmuştur. 16. yüzyılın ortalarında ipek sanayisi gelişmiştir. Bursa ili dışında İstanbul, Edirne, Amasya, Denizli, İzmir ve Konya illeri de önemli ipek böcekçiliği merkezlerinden olmuştur. Türkiye Cumhuriyeti kurulduktan sonra, ipek böceği yumurtası üretimi, ipek böceği bakımı ve yemi 1926 yılında 859 sayılı kanun ile koruma altına alınmıştır. Koza üretimini korumak ve artırmak amacıyla 1940 yılında Bursa, Bilecik ve Adapazarı'nda bazı kooperatif birlikleri kurulmuştur. Daha sonra bu kooperatifler birleşerek 11 Mayıs 1940'ta Bursa Koza Satış Kooperatifleri Birliği kurulmuştur. Koza Birliği'nin "İpek Böceği Yumurtası Üretim Müdürlüğü" 1963 yılında kurulmuştur. Son 20 yıl içerisinde ülkemizde ipek böceği yetiştiriciliği azalmasına rağmen Antalya, Bilecik, Eskişehir, Diyarbakır, Ankara gibi birçok ilde yetiştirilmeye devam etmektedir (Özdoğan, 2021; Yilmaz, 2015).

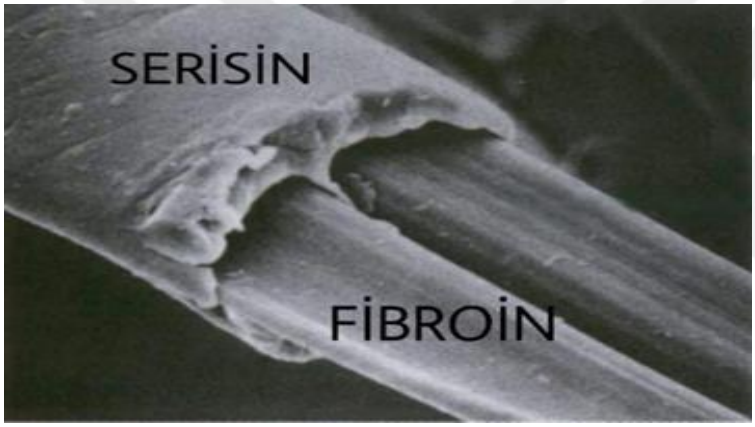
2.3. İpek Proteinleri

İpek lifleri, 4000 yıldan beri ekonomik yaşamda önemli bir yere sahiptir. Doğal ipeğe talep dünya çapında artmakta en yaygın şekilde karakterize edilen doğal ipek lifleri evcil ipekböceği, *B. mori* ve örümceklerdir (*Nephila clavipes* ve *Araneus diadematus*). İplikler aslında böcekler tarafından iplik haline gelmiş lifli proteinlerdir (Vollrath ve diğerleri, 1999). Bu lifler, böceklerini yumurtalarını veya larvalarını korumak gibi bazı hayati fonksiyonlar için, yüksek etkiye dayanabilecek ve tuzak böcekleri olarak yakalayabilecek yakalama ağları (Voltrath ve diğerleri, 2000) oluşturmak için kullanılmaktadır. İpek proteini, kozanın temel bir bileşenidir (Komatsu ve diğerleri, 1975).

İpek bezi hücreleri ipek proteinleri üretir ve bu proteinler ipek bezlerinin lümeninde depolanır. Bu proteinler ayrıca ipek liflerine dönüştürülür. İpekböcekleri sıvı ipeği salgıladığında, ön bezden geçer ve eğirme sırasındaki iplikçik açıklığından dışarı atılır

(Joseph, 2012). *B. mori* kozasından elde edilen ipek, en az iki majör fibroin protein (25 ve 325 kDa) hafif ve ağır zincirler içerir. Bu çekirdek lifleri, büyüyen solucanı korumak için koza kutusunun kompozit liflerini oluşturmak üzere iki fibroin lifini bir arada tutan tutkal benzeri proteinlerin bir ailesi olan serisin ile kaplıdır (Şekil 2.2). İpek fibroini doğada lifli halde bulunur. Serisin ise şekilsiz tutkal benzeri bir proteindir (Mondal ve diğerleri, 2007).

İpek proteini, kollajen, elastin, keratin, fibroin, sporgin gibi bir çeşit proteindir, koza filamentinin temel bir bileşenidir (Komatsu ve diğerleri, 1975). Daha sonra ipek liflerine dönüştürülür. İpekböcekleri eğirme sırasında sıvı ipliği salgıladığında, ön bezden geçer ve spinneret açıklığından dışarı atılır (Joseph ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.2. İpek proteinlerinin fiziksel yapısı (Zhang ve diğerleri, 2004)

2.3.1. Serisin

Serisin 20-310 kDa büyüklüğünde bir hidrofilik ve küresel glikoproteindir. Toplam koza ağırlığının %20-30'unu oluşturur. Serisin ipek ipliği oluşturmak için iki fibroin filamentine katılan tutkal benzeri bir proteindir. Organik bileşimi %46,5 karbon, %31 oksijen, %16,5 azot ve %6 hidrojeni içerir (Mondal ve diğerleri, 2007).

18 amino asit içerir, bunlardan 8'i insan için esansiyal aminoasittir ve yüksek bir hidrofilik amino asit içeriğine; yani serin ve glisine sahiptir. Serisin hidroksil, karboksil ve amino gruplarından yapılmış bol miktarda polar yan zincire sahiptir. Serisin esas olarak rasgele bir sarmal içinde ve daha az bir ölçüde β yapraklı bir yapıda bulunur ve soğuk suda çözünmez (Padamwar ve diğerleri, 2004).

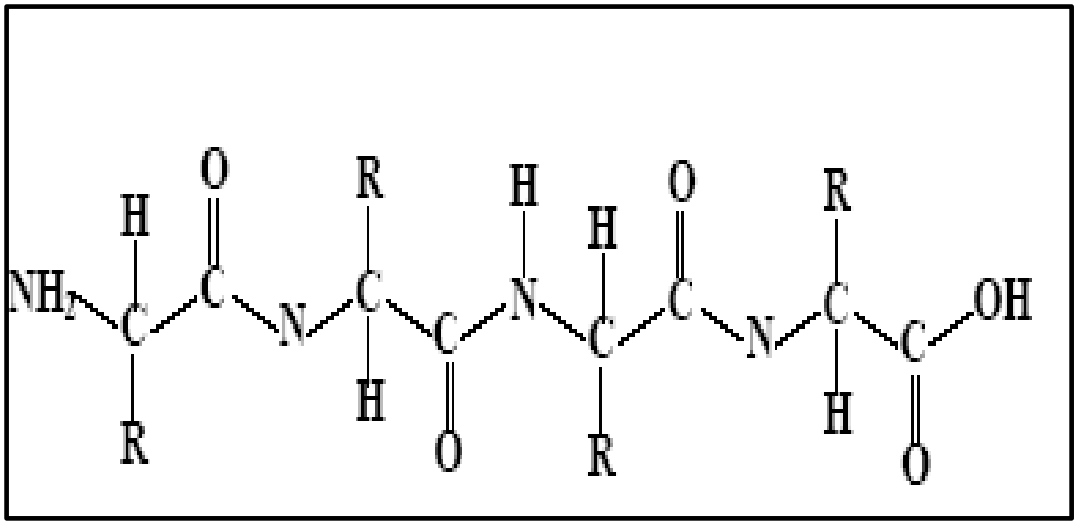
Serisinin suda çözünürlüğü rasgele sarmaldan β yapraklı yapıya dönüştüğü için azalır. İpek ipliğinden serisin izolasyon yöntemleri çözünürlüğünü, molekül ağırlığını ve jelleşme özelliklerini etkiler.

İpek serisin ipek endüstrisinin bir atık malzemesi olarak görülüyordu, ancak son çalışmalar yara iyileşmesi, kırışıklık karşıtı ve yaşlanma karşıtı gibi farmakolojik, biyoteknolojik ve kozmetik uygulamalardaki etkinliğini kanıtladı (Mondal ve diğerleri, 2007).

Serisin, çözünürlüğü ve serisin A, B ve C dahil olmak üzere koza tabakası içindeki konumu üzerine üç fraksiyona ayrılır. Bu fraksiyonlar ipek fibroininde bulunan tabakaları oluşturur. Serisin A dış tabakayı oluşturur ve ılık suda daha iyi çözünür. Serisin B ara katmandır ve serisin C en içteki katmandır veya fibroine en yakın katmandır (Shaw, 1951; Sprange, 1975).

Sıcak su, jel elektroforezi, enzimler (tripsin, alkalin proteaz veya alkilaz), sprey kurutma yöntemi ve sulu üre gibi ipek serisin ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler kullanılır. Serisinin fizikokimyasal özellikleri serisin izolasyonu tekniğine dayanır (Padamwar ve diğerleri, 2004).

Serisin soğuk suda çözünmez, ancak kolayca hidrolize olur, burada uzun protein molekülleri sıcak suda kolayca dağılabilen veya çözülebilen daha küçük fraksiyonlara ayrılmaktadır. İpek lifinin önemli bir bileşeni olan serisin seçici olarak ipeği parlak hale getirmek için ipek imalat işlemi sırasında fibroinden çıkarılır ve uzaklaştırılan serisin atık madde olarak gitmektedir. Dünya çapında üretilen yaklaşık 1 milyon ton (taze ağırlık) kozanın yaklaşık 50.000 ton geri kazanılabilir serisine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Hindistan'ın 1.600 ton ipek üretimi yılda yaklaşık 250 ila 300 ton serisin kaynağı olabilir (Gulrajani ve diğerleri, 2005).



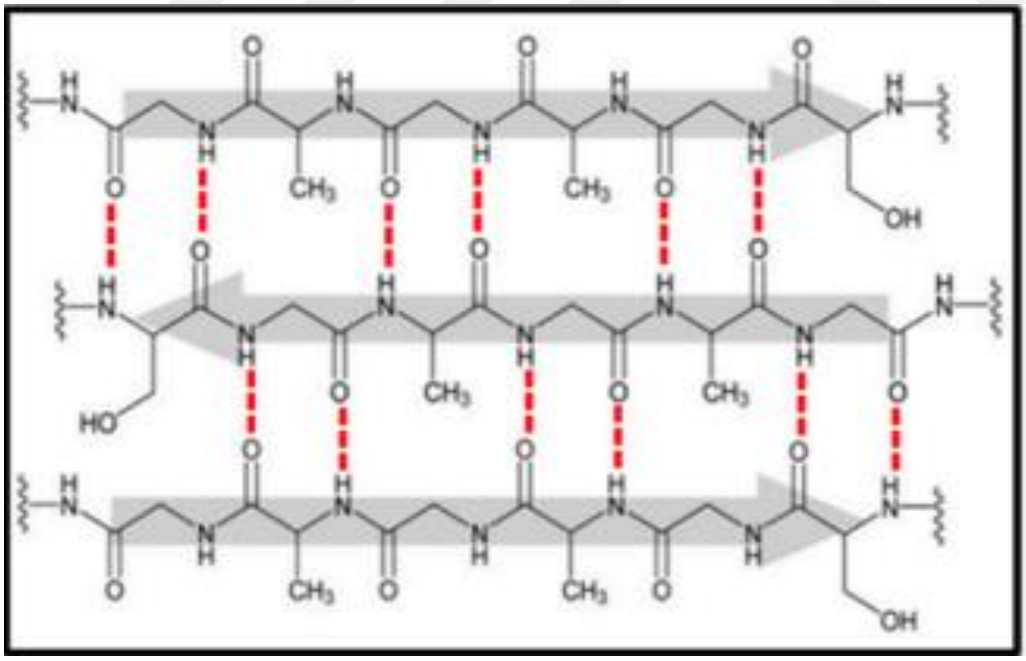
Şekil 2.3. İpek proteini serisinin kimyasal yapısı (Çapar ve Aygün, 2015)

Çizelge 2.1. İpek proteini serisinin % aminoasit içeriği (Wubulikasimu ve diğerleri, 2021)

Aminoasit	**Miktar**
Alanin	2,14
İzolösin	0,32
Lösin	0,82
Metiyonin	0,28
Fenilalanin	0,34
Valin	1,69
Prolin	2,12
Glisin	16,08
Serin	32,91
Treonin	15,16
Tirozin	3,03
Aspartik asit	17,72
Glutamik asit	2,54
Lizin	1,82
Histidin	0,87
Arjinin	2,16

2.3.2. Fibroin

İpek fibroin, bir ağır (H-) zincir (390 kDa) ve bir hafif (L-) zincir (26 KDa) olmak üzere iki ana zincirden oluşmaktadır. Bunlar bir H-L kompleksi oluşturmak üzere disülfit bağları ile bağlanır. P25 (25 KDa), H-L kompleksine hidrofobik, oligosakkarit zincirlerini içeren bir glikoproteindir (Tanaka ve diğerleri, 1999). H-zinciri, L-zinciri ve P25, üç polipeptittir. *B. mori* kozasını oluşturur ve sırasıyla 6:6:1 molar oranında bulunur (Inoue ve diğerleri, 2000). H zincirinin amino asit dizisi glisin (%45,9), alanin (%30,3), serin (%5,3), valin (%1,8) ve ayrıca diğer 15 amino asit türünün %4,5'inden oluşur. Gly-X (GX) dipeptit motif tekrarları, H zincirinin %60-75'ini oluşturur. Dipeptit tekrarlarının hidrofobik kalıntıları, kararlı antiparalel β-levha kristalitleri oluşturabilir. İki hekzapeptit, peptit dizilerinin Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser ve Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr olduğu bilinen GX dipeptit motif bölgesinin %70'ini kaplar. İpek I ve ipek II, ipek I'in bağlı su içeren yarı kararlı bir kristal yapı olduğu fibroinin baskın kristal yapılarıdır. Moleküller ve ipek II, bitişik peptit blokları arasındaki güçlü hidrojen bağı nedeniyle en kararlı durumdur, bu da sertlik ve gerilme mukavemeti dahil artan mekanik özelliklerle sonuçlanır (Sun ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.4. Fibroinin tekrarlanan aminoasit dizilimi (Nguyen ve diğerleri, 2019)

Çizelge 2.2. İpek proteini fibroinin % aminoasit içeriği (Sen ve Babu, 2014)

Aminoasit	Miktar
Aspartik asit	1,64
Glutamik asit	1,77
Serin	10,38
Glisin	43,45
Histidin	0,13
Arjinin	1,13
Treonin	0,92
Alanin	27,56
Prolin	0,79
Tirozin	5,58
Valin	2,37
Metiyonin	0,19
Sistein	0,13
İzolösin	0,75
Lösin	0,73
Fenilalanin	0,14
Triptofan	0,73
Lizin	0,23

2.4. İpek Proteinlerinin Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.4.1. Alzheimer hastalığında etkisi

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılarda sıklıkla görülen en yaygın demans türü nöron kaybıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Kolinerjik hipoteze göre; AH, nörotransmitter asetilkolin'in (ACh) sentezlemesinin azalmasına neden olmakta ve asetilkolin esteraz (AChE) seviyelerinde artış olmaktadır. Bu da kolinerjik nöronların zarar görmesine ve sonunda bilişsel bozulmalara yol açmaktadır. Şu anda, AChE inhibitörleri, antiamiloit aşı ve E Vitamini AH'yi tedavi etmek için önerilmektedir, ancak bu ilaçlara uzun süre maruz kalmak yan etkilere neden olmaktadır. Tek ilaçla AH tedavisi karmaşık yapısı nedeniyle gerçekçi bir seçenek olmadığından, AChE inhibitörünün antioksidanlarla birlikte

kombinasyon tedavisi AH'nı etkin bir şekilde tedavi etmede tercih edilmektedir. Bu nedenle, doğal kaynaktan antioksidan yapılı yeni ve seçici AChE inhibitörlerini belirlemekte fayda görülmektedir. Öğrenme ve hafıza verimliliği ile birlikte morfometrik değişiklikler; kolinerjik sistem, antioksidan sistem ve kontrol ve deney farelerinin seçilmiş beyin bölgelerinde yapılan kolinerjik sistem hakkında yapılan çalışmada ACh içeriği anlamlı derecede artarken, AChE seviyesinin biyokimyasal yönlerin bir sonucu olarak, kontrol altındaki histolojik çalışmalar ve farklı deney grupları olarak tedavi edilen sıçanların seçilmiş tüm beyin bölgelerinde inhibe edildiğini ortaya koymuştur. Çalışma serisinin, bilişsel işlevlerin çoğunun merkezi olan bölgelerinin nöronlarındaki AH kaynaklı hasarı etkili bir şekilde tersine çevirebildiğini göstermiştir. Tüm bu bulgulardan hareketle serisinin genel olarak potansiyel bir bilişsel güçlendirici ve özellikle de AH'da potansiyel olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Yellemma ve diğerleri, 2014).

2.4.2. Antibakteriyel aktivite

Biyomedikal, ilaç, kozmetik ve gıda endüstrilerinde katma değerli ürünler geliştirmek için dut *B. mori* ipekçiliğinden elde edilen serisin atığının geri dönüştürülmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Dut ile beslenmeyen *Samia ricini* adı verilen özellikle kuzeydoğu Tayland'da yetiştirilen yabani bir türle yapılan çalışmada, gram-negatif (*Escherichia coli*) ve Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) bakteri modellerinde serisinin antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Bir antibakteriyel ajan olarak serisinin disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri ile serisinin bakteri büyümesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda serisinin bakterisit etkili olduğu bulunmuştur (Senakoon ve diğerleri, 2009).

Farklı konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerin (Ag NP'ler; 10, 25, 50 ve 100 ppm), ipek liflerine uygulandığı bir çalışmada ortam pH'sının, ipek lifler üzerindeki Ag NP alımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca yardımcı maddeler olarak sodyum karbonat ve sodyum klorür ilave edilmiştir. Antibakteriyel aktivite, bakteri sayma yöntemiyle incelenmiştir. Gümüş muamelesi ile antibakteriyel aktivitenin arttığını gözlemlenlenmiştir (Moazami ve diğerleri, 2010).

2.4.3. Antifungal aktivite

İpek fibroin hidrojelleri, sulu işlem yetenekleri, biyouyumlulukları ve biyolojik olarak bozunabilirlikleri nedeniyle kontrollü ilaç dağıtım sistemleri için umut verici malzemelerdir. Yapılan bir çalışmada, Ag nanopartükülü ile yüklü ipek fibroin hidrojellerinin hazırlanmaştır ve antifungal aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlanmıştır. AgNP'ler yüklü ipek fibroin hidrojellerinin antifungal aktivitesi, *Aspergillus Niger* patojenine karşı pozitif bir yanıt göstermiştir. Bu nedenle ipek fibroin hidrojelleri, antifungal uygulamalar için biyopolimerik matris olarak kullanılabilir (Ansary ve diğerleri, 2020).

2.4.4. Antihiperlipidemik aktivite

Farklı fibroin / serisin bileşimli ipek proteininin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde vücut ağırlığı ve lipit metabolizması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hayvanlara 6 hafta boyunca deneysel diyetler verilmiştir: normal kontrol (NC), yüksek yağ (HF) ve F100 (saf fibroin, HF-F100), F81 (81:19 fibroin / serisin, w/w. HF-F81) veya F50 (50:50 fibroin / serisin, w / w, HF-F50). İpek proteini ile beslenen fareler, HF grubuna göre belirgin bir şekilde azaltılmış vücut ağırlığı ve arttırılmış lipit profili göstermiştir. Genel olarak, vücut yağ, trigliserit ve toplam plazma kolesterol düzeyleri, aterojenik indeks ve serbest yağ asidi düzeyi miktarı düşerken, HDL-kolesterol seviyesi diyetindeki artan serisin ile artmıştır. Bu hipolipidemik etki kısmen fekal lipit atılımının artmasından kaynaklanmıştır. Bu bulgular, ipek proteininin, özellikle serisin'in, yüksek yağlı diyet kaynaklı hiperlipidemi ve obezitenin önlenmesinde yararlı olabileceğini göstermiştir (Seo ve diğerleri, 2011).

2.4.5. Anti-tümör aktivite

Serisin tüketiminin kolon tümörlerinde azalmaya yol açmaktası nedeniyle serisin, anti-tümör aktiviteye sahiptir (Kato, 2000; Sasaki, 2000). Serisin içeren yiyecekler kabızlığı giderir, bağırsak kanseri gelişimini baskılar ve minerallerin emilimini hızlandırır. İnsan SW480 kolon kanseri hücrelerinin ve FHC normal kolon hücrelerinin serisin (1600 mg /ml) ile 72 saat süreyle tedavi edilmesinin önemli olduğu gösterilmiştir. SW480 hücrelerinin artan apoptozu, artmış kaspaz-3 aktivitesi ve azalmış Bcl-2 ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu da serisin, hücre eşliğinde anti-proliferatif etkisini kanıtlar niteliktedir (Kaewkorn ve diğerlei, 2012).

Fare peritoneal makrofajlarında gama ışınlanmış ipek fibroinin ön-muamelesi konsantrasyon bağımlı bir şekilde daha yüksek bir proliferatif etki göstermiştir ve bu da gama ışınlanmış ipek fibroininin anti-tümör aktivitesini göstermektedir (Byun ve diğerleri, 2010).

2.4.6. Diyet materyali olarak ipek proteinleri

İpekböceği bol miktarda protein ve çeşitli amino asitler içerir. Serisinin hidrolize edilmesiyle oluşan ara ürün ipek peptididir. Bir çeşit yüksek hidrofilik protein olan serisin, ipekböceği kozasında bir yapışkan görevi görür (Teramoto ve diğerleri, 2004). Serisin 18 tür amino asit içerir; bunların %90'dan fazlası insan vücudu tarafından kolayca emilebilir ve %17'den fazlası sekiz tür esansiyel amino asittir. Bu değer normal gıdada bulunandan daha yüksektir (Zhang ,2000). İnsan vücudu, gıdalardan emilen sekiz çeşit insan esansiyel amino aside ihtiyaç duymaktadır. Bunlar histidin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, valin ve triptofan'dır. Ayrıca ipek böceklerindeki içeriği domuzda bulunanlardan daha yüksek ve yumurta ve sütte bulunanlardan ise dört kat daha yüksektir. Bir ipekböceği krizalit parçası 18 çeşit amino asit içerir ve bunların 8'i insanlar için esansiyel amino asitlerdir (toplam proteinin %14,59'u ve toplam amino asitlerin %40'ı) Çinliler ipek böceklerini binlerce yıl boyunca yiyecek olarak kullanmışlardır. İpekböceği proteininin birçok sağlığı koruma işlevi vardır. Ayrıca ipekböceği proteininin diyabette iyileştirici bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Joseph ve diğerleri, 2012).

Ratlarda yapılan bir çalışma, ipek proteinlerinin tüketiminin kabızlığı önlediğini ve suyun bağırsaktan emilimini ve diyet etkilerini arttırdığını göstermiştir. Bu yararlı sonuçlar serisinin sağlık için diyet kaynağı olarak yararlı olduğunu düşündürmektedir (Yeo ve diğerleri, 2006).

Bugün, Gıda ve İlaç İdaresi serisin ve türevlerini yetkili katkı maddeleri olarak listelemiştir. Serisin, modüler süreçleri fermente etmeye ve önlemeye yardımcı olduğu ve sağlığa yol açan mineral emilimini ve antioksidan aktiviteyi artırdığı için güçlendirilmiş gıdaların ve diyet takviyelerinin üretiminde kullanılabilir. Serisin ekmek pişirmeye dahil edilebilir. Bu ekmek, iyi sindirimi ve emilimi, lif bakımından zengin ve protein oranı yüksek olması nedeniyle şeker hastaları tarafından da kullanılabilir (Fatahian ve diğerleri, 2021).

2.4.7. Doku mühendisliği

Serumsuz koşullarda kıkırdakların ipek iskeleler üzerindeki sentezi klinik laboratuvarlarda önemli ölçüde kullanılmıştır (Marolt ve diğerleri, 2006). Bu iskeleler, 28 güne kadar kondrosit proliferasyonunu destekleyebilir (Morita ve diğerleri, 2002) ve insan eklem kondrositlerinin hücre kültürlerinin yapılması için kullanıldığında, kondrogenez yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Wang, 2006). Osteogenez, ince fibroin filmler üzerinde *in vitro* yöntemlerle yetiştirilen kök hücrelerle de mümkündür (Wang ve diğerleri, 2005). Fibroin filmler ve iskeleler üzerinde immobilize edilmiş kemik morfogenik protein-2 (BMP-2) osteogenez yapabilir (Meinel, 2006) ve ipek iskelelere ekilmiş ve hücre içermeyen MSC'ler ile tohumlanmış ve hücre içermeyen MSC'ler ile kemik oluşumunu arttırmaktadır (Karageorgiou, 2004; Kirker, 2007).

2.4.8. Hücre büyümesi için matriks

İpek fibroin, kollajen yerine hayvan hücrelerinin kültürü için substrat olarak kullanılabilmektedir (Inouye ve diğerleri 1998). İpek proteinleri kullanarak L-929 hücrelerinin bağlanması ve büyümesi, hücre kültürü yöntemi ile incelenmiştir. Saf bileşen proteinlerinin (%100 fibroin veya serisin) filmlerinin, kollajende olduğu gibi yüksek hücre eklenmesi ve büyümesi gösterdiği bulunmuştur (Minoura ve diğerleri,1995). Hücre çoğalması çalışmaları ipek proteinlerinin kullanımını desteklemiştir.

Hem insan aort endotel (HAEC) hem de insan koroner arter düz kas hücreleri (HAEC'ler) için fibroin biyomateryal matrisi HCASMC'lerin rastgele dokunmamış nano elyaflı ipek iskelelerdeki hizalaması ve uzaması, 5 gün içinde SEM ve konfokal mikroskopi ile gözlenmiştir. Bu, vasküler hücreler ve ipek fibroin yapı iskeleleri arasında olumlu bir etkileşimi göstermiştir. Bu çalışmafa ipek fibroin iskelelerinin vasküler doku mühendisliği için potansiyel matris olduğu kanıtlanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2008).

2.4.9. Kritik boyuttaki kemik defektlerinin iyileşmesi için ipek bazlı implantlar

İpek bazlı biyomalzemelerin kemik iyileşmesi için implantlar olarak uygunluğunu değerlendirmek için, osteojenik koşullar altında hücre kültürü yapılan insan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden başlayarak kemik dokularının mühendisliği için şablon olarak yeni

gözenekli ipek fibroin yapı iskelelerinin kullanımı araştırılmıştır. Yavaş yavaş bozulan protein matrisi, hidroksiapatit birikiminin yeterli geçici kontrolüne izin vermektedir ve biyoreaktör çalışmalarında trabeküler benzeri bir kemik matrisi oluşumu ile sonuçlanmıştır. Tasarlanmış kemik dokularının organik ve inorganik bileşenleri, gen ekspresyon analizi, biyokimyasal analizler ve X ışını difraktometrisi ile gösterildiği gibi, kemiğe benzemektedir. Doku tasarımlı kemiğin implantasyonu farelerdeki kalvariyel kritik büyüklük kusurlarına implantasyondan önce (biyoreaktörlerde 5 hafta boyunca büyütülmüş) implantlar, bu hücrelerin 5 hafta içinde gelişmiş kemik oluşumunu indükleme kapasitesini ortaya koyarken, kök hücre yüklü ipek iskelelerinin implantasyonu ve sadece iskeleler daha az sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, (yeniden) kemik dokusu üretimi için tasarlanmış kemikli ipek bazlı implantların fizibilitesini göstermektedir ve mekanik olarak stabil ve dayanıklı bir seçenekle protein bazlı kemik implant materyallerinin sınıfını genişletmektedir (Meinel ve diğerleri, 2005).

2.4.10. Yara iyileştirici aktivite

Serisin çok yüksek yara iyileştirme özelliğine sahiptir (Wu ve diğerleri, 1996). İyi yapışma özelliğine ve keratine afiniteye sahip ipek proteininin yara iyileştirici özelliği, fibroblastlar ve miyofibroblastlar gibi yara iyileşmesinde rol alan hedef hücreleri tetikleyen temel fibroblast büyüme faktörü (BFGF) ekspresyonunun uyarılmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Hino, 2006; Padol, 2012; Voegeli ve diğerleri, 1993). İpekböceklerinden elde edilen iplikler, cerrahi dikiş yapmak için kullanılır (Gapurova ve diğerleri, 1983). İpek serisin zarları iyi bandaj malzemeleridir ve yeterli esnekliğe ve gerilme direncine sahiptir. İpek protein filminin iyileştirici özelliği epitelyal proliferatif etkiden kaynaklanıyor gibi görünmektedir. İpekle tedavi edilen yaralarda filmde daha fazla kollajen rejenerasyonu, daha az enflamasyon ve daha az lenfosit infiltrasyonu görülmüştür (Min ve diğerleri, 2004). Ek olarak, ipek protein filmi, cildi hassaslaştırıcı ve tahriş edici potansiyeli olmayan ve serum biyokimyasalları üzerinde hiçbir etkisi olmayan güvenli bir biyomateryaldir. Biyouyumluluğu iyi olduğundan ve enfeksiyona dirençli nitelikte, yeni bir yara iyileştirici malzemedir (Padol ve diğerleri, 2011).

2.5. İpek Proteinlerinin Kozmetikte Kullanımı

Aşırı trans-epidermal su kaybı kuru cildin nedenlerinden biridir ve deri losyonları onu yenmek için kullanılmıştır. Cildin epidermal tabakasından su kaybını önler, cilde saten gibi pürüzsüz bir his veren proaktif ve doygun bir yüzey sağlayan serisin kozmetik üretiminde önemli bir ticari kaynaktır.

Serisin tek başına veya ipek fibroin ile kombinasyon halinde cilt, saç ve tırnak kozmetiklerinde kullanılır. Serisin, tırnağın kurumasını, kırılganlığını önlemek ve tırnaklara içten parlaklık kazandırmaktan sorumludur. Doldurulmuş yüzey saç hasarını azaltır ve ayrıca saç temizleme ajanı ve cilt kremi olarak kullanılabilir.

Serisin kullanıldığında krem ve merhem şekli cilt elastikiyetinin yanı sıra kırışıklık önleyici ve yaşlanma karşıtı etkilerin arttığını göstermiştir (Henne ve diğerleri, 1986). Serisin jeller, stratum korneumdaki hidroksiprolin içeriğini arttırır ve cilt empedansını azaltır, bu da serisinin nemlendirici özelliğini ortaya çıkarır. %0,02-2 serisin ve %0,01-1 zeytinyağı, yağ asidi veya bunların tuzlarını içeren saç ve banyo preparatlarında, serisin saçlara yapışarak saç yüzeyindeki hasarı azalttığı gösterilmiştir (Hoppe ve diğerleri, 1984). Sağlıklı bir insanın cildine uygulandığında serisin jelleri cilt empedansında bir azalma, hidroksiprolin seviyesinde bir artış ve epidermal hücrelerin hidrasyonunu göstermiştir. Böylece serisin cildin iç nemini arttırır (Padamwar ve diğerleri, 2005).

2.5.1. Antioksidan aktivite

Oksidatif stres hasarı, serbest radikal oluşumu ve hücrelerin detoksifikasyon, kapasitesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Fridovich, 1986; Halliwell, 2015), bu da DNA parçalanması, lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ve böylece hücre ölümüyle sonuçlanır (Maes, 2000a, b2011).

Çok miktarda doymamış yağ asitleri, yüksek oksijen ihtiyacı ve sınırlı antioksidan kapasite nedeniyle beyin dokusu nörotransmisyonu ve nöronal fonksiyonları bozan oksidatif strese savunmasızdır (Cobley, 2018; Hulbert, 2007; Salim, 2017; Shichiri, 2014).

İpeğin birçok tıbbi avantajı, serbest radikallere ve oksidatif hasara karşı koruma sağlayan yüksek antioksidan potansiyeline atfedilebilir. Serisinin antioksidan özelliğinin altında yatan

mekanizma, amino asit sekansı ve serbest radikallerin ve ROS'un şelatlanmasını sağlayan serin ve treonin gibi yüksek hidroksil amino asit içeriği ile ilgilidir.

Ekstraksiyon yöntemleri, amino asit ve polifenol içeriği, moleküler ağırlık ve peptit uzunluğu gibi moleküler ve fonksiyonel özelliklerini etkileyerek ipeğin antioksidan aktivitesini önemli ölçüde etkileyebilir (Kumar ve diğerleri, 2017).

2.5.2. UVB'ye karşı koruyucu etki

Antioksidan bir protein olan serisinin fare derisinde UVB 'nin neden olduğu akut hasar ve tümör üzerindeki koruyucu etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada; Deney l'de, HR-1 tüysüz fareler, 1 ve 7 gün boyunca günde bir kez 180 mJ / cm2 UVB ile muamele edildi. 7 günlük tedavi, ciltte kırmızı güneş yanığı lezyonlarına neden oldu. Kırmızı rengin yoğunluğu ve bu lezyonların alanı UVB tedavisinden sonra 5 mg'lik dozda serisin topikal uygulaması ile inhibe edilir. Serisin uygulaması, 4-hidroksinonenal (4-HNE) 'de UVB'nin neden olduğu yükselmeleri, siklooksijenaz-2 (COX-2) proteininin ekspresyonunu ve UVB 'ye maruz kalan epidermiste çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) etiketleme indeksini önemli ölçüde bastırdı. Deney 2'de HR-1 tüysüz fareler, 200 nmol 7,12-dimetilbenz [a] antrasen (DMBA) ile muamele edildi, ardından 1 hafta sonra, 22 hafta boyunca haftada iki kez 180 mJ / cm^2 UVB ile ışınlandı. Serisin koruyucu etkisi, tümör insidansında önemli bir azalma ve 5 mg'lik dozda tümör çoğulculuğu açısından belirgindi. Sonuçlar, serisin, UVB'nin neden olduğu akut hasara ve fare cildinde oksidatif stres, COX-2 ve hücre proliferasyonunu azaltarak tümörün ilerlemesine karşı fotokoruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Zhaorigetu ve diğerleri, 2003).

2.5.3. Serisinin yaşlanma karşıtı etkisinin *in vitro* araştırılması

İpek serisinin yaşlanma karşıtı özelliğini fibroblast hücre kültürü modeli kullanılarak *in vitro* karakterizasyon ile araştırılması amaçlanmıştır. Sonuçlar, ipek serisin kolajen tip I sentezini uyarabildiğini, nitritin oksidatif stresi indükleyebileceğini nitrit düzenlemesini bastırabildiğini ve Bcl-2'nin ekspresyonunu değiştirmeden hücre apoptozisini inhibe etmek için yukarı doğru düzenlediğini göstermiştir. Serisinin yaşlanma karşıtı özellikleri, ipek serisinin üstün olduğu oksidatif stres dışında C vitaminiyle karşılaştırılabilir. Sonuçlar ipek serisinin, yüksek kaliteli kozmetiklere, kozmetik malzemelere ve besin takviyelerine faydalı

bir şekilde dahil edilebilecek yaşlanma karşıtı özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Kitisin ve diğerleri, 2013).

2.6. Diğer *in vitro* ve *in vivo* Çalışmalar

İn vitro çalışmalar, serisin çıkarılmasından sonra fibroinin çeşitli hücre tipleri için hücre bağlanmasını ve proliferasyonunu desteklediğini kanıtlamıştır (Jin, 2004; Unger, 2004). *Antheraea pernyi*, hücre bağlanma ve büyümesini büyük ölçüde destekleyen RGD dizisini (arjinin-glisin-aspartik asit) içermektedir (Minoura ve diğerleri, 1995).

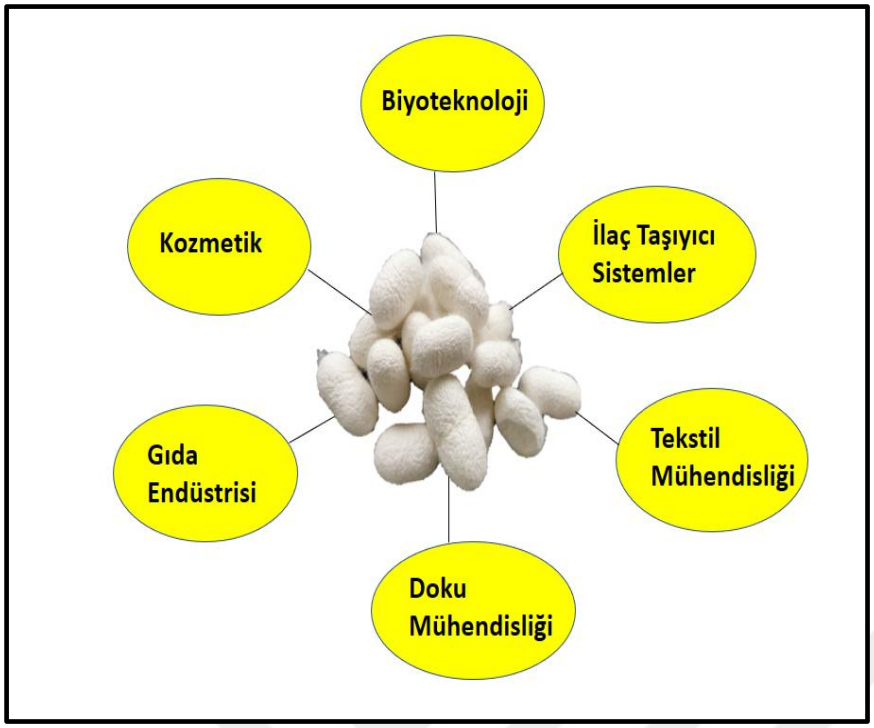
Sülfonlanmış fibroin, insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) *in vitro* replikasyonunu inhibe etmektedir (Gotoh ve diğerleri, 2000). Fibroin filmlerine *in vivo* enflamatuar reaksiyonun, kolajenininkine benzer olduğu rapor edilmiştir (Joseph ve diğerleri, 2012).

Atopik dermatitin (AD) cilt kuruluğunu iyileştirebilecek diyet kaynaklarını belirlemek için ipek proteinleri, serisin ve fibroinin, epidermal hidrasyon, filagrinler ve serbest amino asit seviyeleri ve ayrıca PPARy, peptidilarginin deiminaz-3 (PAD3) üzerindeki diyet etkileri ile filagrin ekspresyonu ve bozunma süreçlerinde yer alan kaspaz-14 proteinleri üzerine etkileri araştırılmıştır. AD'nin bir hayvan modeli olan NC/Nga fareleri, 10 hafta boyunca bir kontrol diyetine (atopik kontrol) tabi tutulmuştur. Diyet serisin, profilagrin ekspresyonunu ve yüksek seviyelerde PPARy, PAD3 ve kaspaz-14 proteinleri ile birleştirilmiş serbest AA'ya degradasyonu artırmaya paralel olarak epidermal hidrasyonu iyileştirir (Kim ve diğerleri, 2012).

Obezite metabolik sendrom ve diğer kronik hastalıklarla ilişkilidir ve enerji alımının harcanan enerjiden fazla olması durumunda ortaya çıkar. Asit hidrolize ipek peptidin (SP) yüksek yağlı diyet kaynaklı obeziteyi önlediği mekanizmayı ve beyaz yağ dokusunda (WAT) esmerleşme ve yağ asidi oksidasyonunu (FAO) *in vivo* ve *ex vivo* yaklaşımlar kullanarak araştırma yapılmıştır. Araştırmaya göre; yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde diyet SP'nin etkileri belirlenmiştir. Yağ dokusuna özgü genlerin ekspresyonu, western blot, qRT-PCR ve immünofloresan analizi ile ölçülmüştür. Ayrıca SP'nin doğrudan deri altı WAT'tan türetilen adipositlerde esmerleşmeye neden olup olmadığı da araştırılmıştır. Bulgular, SP'nin AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) fosforilasyonunu ve ayrıştırıcı protein 1 (UCP1) ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek WAT'ta bir

esmerleşme etkisine sahip olduğunu göstermektedir. SP ayrıca adipogenezi baskılar ve FAO'yu teşvik eder, bu da bir anti-obezite ilacı olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Lee ve diğerleri, 2020).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yara onarımı ile ilgili önemli endişelerdir. Son zamanlarda, antibakteriyel yara örtüleri, enfeksiyonu azaltmak ve böylece yara iyileşme sürecini hızlandırmak için umut verici adaylar olarak ortaya çıkmaktadır. Çapları 305 ila 425 nm arasında değişen poli (vinil alkol) (PVA)/kitosan (CS)/ipek serisin (SS)/tetrasiklin (TCN) gözenekli nanofiberleri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak geliştirerek karakterize etmek için yapılan bir çalışmada; üretilen nanolifler, şişme yoluyla (~325-650%) suyu almak için önemli bir kapasiteye sahiptir. Serisin ilavesi, lif çapını ve mekanik mukavemeti düşürürken hidrofilikliği ve kopma uzamasını arttırmıştır. Ayrıca, düşük serisin içerikli (PVA/CS/1-2SS) nanolifler üzerinde kültürlenen fibroblastlar (L929), serisin içermeyen nanolifler (PVA/CS) ile karşılaştırıldığında daha fazla çoğalma sergilemiştir. Yüksek serisin ve tetrasiklin içeriği ile yüklenen nanolifler, *E. coli* ve *S. aureus*'un büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. *In vivo* incelemede; PVA/CS/2SS-TCN nanoliflerinin, serisin içermeyen geleneksel gazlı bez ve nanoliflere kıyasla yara iyileşmesini, yeniden epitelizasyonu ve kolajen birikimini geliştirdiğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçları, PVA/CS/2SS-TCN nanofiberin geleneksel yara örtü malzemelerine umut verici bir alternatif oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 2.5. İpek proteini türevlerinin uygulama alanları

2.7. Organik (Protein) – İnorganik (Çinko) Hibrit Nanoçiçek Yapıları

Geleneksel enzim immobilizasyon yöntemlerinde enzimlerin kararlılığı artarken, aktiviteleri azalmaktadır. 2012 yılında ilk defa Stanford Üniversitesinden Dr. Zare ve arkadaşlarının tesadüf eseri enzim immobilizasyon yöntemi olarak buldukları organik- inorganik hibrit nanoçiçek yapılarının enzim aktivite yüzdeleri artmaktadır.

Bir sentez ürünü olan çiçek benzeri hibrit nanoparçacık sınıfından organik-inorganik hibrit nanoçiçekler, biyoteknoloji alanında basit sentez, yüksek verimlilik ve artan enzim aktivitesi gibi çoğunlukla sahip oldukları özellikler nedeniyle önem kazanmıştır (Lee ve diğerleri, 2015).

Literatürde beş ana hibrit nanoçiçek türüne rastlanmaktadır. Bu nanoçiçekler yani bakır-protein, kalsiyum-protein ve manganez-protein hibrit nanoçiçekler, bakır-DNA hibrit nanoçiçekler ve kapsüler hibrit nanoçiçeklerdir. Bu nanoçiçeklerin boyut, şekil ve protein oranı gibi yapısal özellikleri genellikle uygulamalarını belirlemektedir. Yeni nanoyapılar arasında, nanoçiçeklerin topografik özellikleri bilim adamlarının ilgisini çekmiştir çünkü küresel nanoparçacıklara kıyasla daha yüksek yüzey-hacim oranı, yüzey reaksiyonlarının

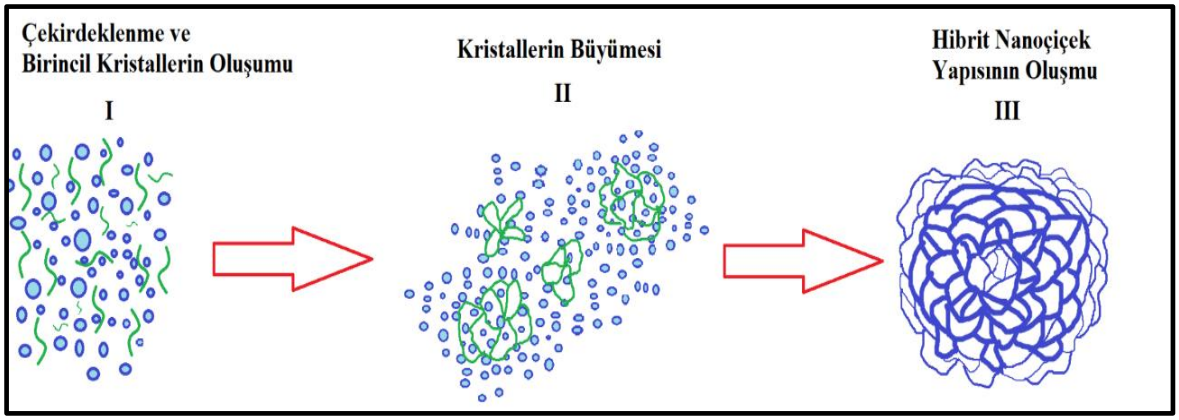
verimliliğini arttırmada faydalı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, nanoçiçeklerin uygulamalarına odaklanan kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Geleneksel immobilizasyon yöntemlerinden farklı olarak, metal iyon çözeltisine protein ekleyerek, yüksek aktivite ve stabiliteye sahip basit immobilize enzimleri üretmek mümkündür. Son birkaç yılda laktaz, lipaz, yaban turpu peroksitleri, glukoz oksidaz (GOx), α-amilaz, üreaz, tripsin, kimotripsin, papain ve DNA serbest muadillerinden daha yüksek aktivite ve mükemmel stabilite sergileyen biyomolekül-inorganik kristal hibrit nanoçiçekler formunda hazırlanmıştır (Cui ve diğerleri, 2017; Somturk, 2015; Whu, 2014; Lin, 2014; Lee, 2017; Sun, 2014; Whang, 2013; Somturk, 2016; Lin, 2014; Yin, 2015; Liang, 2015; Ocsoy, 2015; Hu, 2014). Prensip olarak, metal bağlama bölgelerine sahip biyomoleküller, koordinasyon etkileşimi yoluyla iyonlarla kompleksler oluşturabilirler, örneğin, amit ve amin gruplarında nitrojen atomları içeren bazı enzimlerin, koordinasyon etkileşimi yoluyla bakır iyonlarıyla kompleksler oluşturması sağlanmıştır (Ge, 2012; Li, 2016).

Şimdiye kadar, hibrit nanoçiçeklerin hazırlanması, metalfosfat bazlı nanoçiçeklerle sınırlı kalmıştır. Ayrıca farklı metal iyonları, aynı biyomoleküllerin farklı fonksiyonel özelliklere sahip hibrit nanoçiçeklerini oluşturabilmektedir. Prensip olarak, biyomolekül-inorganik hibrit nanoçiçek oluşumu üç adımdan oluşmaktadır. İlk adımda, birincil kristaller yani bakır fosfat kristalleri oluşur. İkinci büyüme adımında, büyük biyomoleküllerin kristal yapıları büyümektedir. Ayrıca bu aşamada çiçeğe benzer taç yapraklar belirmektedir. Son aşamada anizotropik büyüme, dallı çiçek benzeri bir yapının tam oluşumuna neden olmaktadır (Lee, 2015; Li, 2014).

Organik- inorganik hibrit nanoçiçek oluşumunun arayüzey mekanizması özetlenecek olursa:

I. Metal iyonu (çinko) ve organik madde kombinasyonu,
II. Kristallerin büyümesi, yaprakların oluşumu,
III. Hibrit nanoçiçek yapısının oluşumu (Lee, 2015).



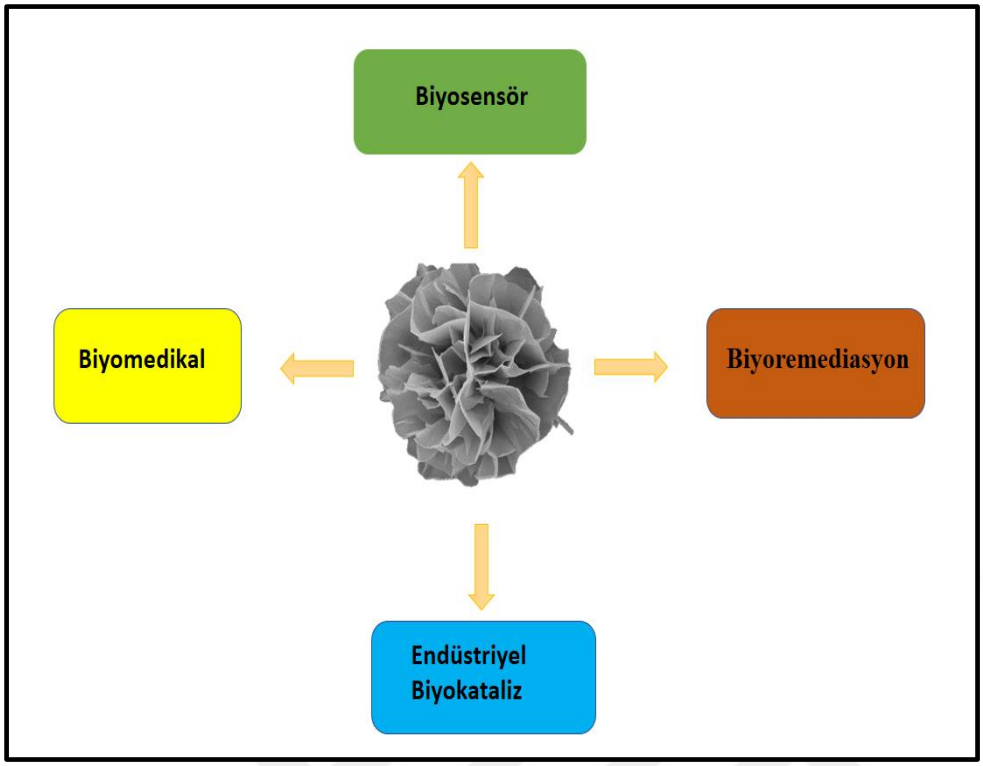
Şekil 2.6. Organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerin oluşum aşamaları (Emrah Bor'un doktora tezinden alınmıştır.)

Sentetik yöntem basit olmasına ve sert koşullar gerektirmemesine rağmen, biyomoleküller, metal iyonları, sentez pH'sı, sentez sıcaklığı ve sentez süresi hibrit nanoçiçeklerin morfolojilerini ve karakterlerini etkileyebilmektedir.

2.7.1. Potansiyel uygulama alanları

Son zamanlarda biyoteknolojik çalışmalar oldukça dikkat çekmektedir. Mikro ve nano boyutta olan organik- inorganik hibrit nanoçiçekler kolay sentezlenebilir ve yüksek yüzey/ hacim oranına sahip olmaları sayesinde biyoteknolojik araştırma-geliştirme çalışmalarında her geçen yıl önem kazanmaktadır.

Hibrit nanoçiçeklerin üstün katalitik özellikleri biyosensörler, biyomedikal, biyoremediasyon, endüstriyel biyokataliz gibi çok çeşitli biyoteknoloji uygulamaları sağlamaktadır (Cui ve diğerleri, 2017). Şekil 2.6'da organik- inorganik hibrit nanoçiçeklerin biyoteknolojik uygulama alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Organik-inorganik nanoçiçeklerin biyoteknolojik uygulama alanları

Nanoteknoloji, proteinlerin biyolojik işlevlerini *in vitro* olarak düzenlemek ve geliştirmek için muazzam fırsatlar sunmaktadır. Son yıllarda, fonksiyonel malzemeler, enzimatik kataliz, ilaç iletimi ve analitik bilimlerde potansiyel uygulamalara sahip protein içeren hibrit nanoyapılı malzemeler geliştirmeye yönelik artan çalışmalara tanık olunmuştur (Wang, 2013).

Nanoçiçek uygulamaları, diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, gıda enfeksiyonu gibi durumların hızlı ve kesin tespiti için bir biyosensör olarak kullanımı içermektedir. Nanoçiçekler ayrıca, bölgeye özgü eylem ve ilaçların kontrollü dağıtımı için kullanılmaktadırlar. Nanoçiçeklerin genişletilmiş uygulamaları, enzimin saflaştırılmasını, boya ve ağır metallerin sudan çıkarılmasını, nikel oksit kullanılarak gaz algılamayı kapsar. Son araştırmalar, Raman spektroskopisi kullanarak yüzey hassasiyetini arttırmak için nanoçiçeklerin 3B yapısını göstermektedir. Bu nanoçiçek sistemi, yüksek yüzey/hacim oranı nedeniyle yakın gelecekte akıllı bir malzeme olarak hareket edecek ve yaprakları üzerinde adsorpsiyon verimliliğini artıracaktır (Shende ve diğerleri, 2018).

2.7.2. Hibrit nanoçiçeklerle ilgili yapılan çalışmalar

Son yıllarda organik- inorganik hibrit nanoçiçekler ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Organik yapı protein, enzim, bitki ekstresi gibi yapılardan oluşmaktadır. İnorganik kısım da Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} ve Ca^{2+} gibi metal iyonlarından oluşmaktadır.

Kartopu adı verilen *Viburnum opulus* L. (*V. opulus*) ekstresi Cu^{2+} hibrit nanoyapıların sentezi ve antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Ülkemizde yapılan bu çalışmaya göre hibrit nanoçiçek yapılarının *V. opulus* ekstrelerine kıyasla daha etkili antimikrobiyal, antifungal etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre bitki ekstrelerinin hibrit nanoçiçeklerinin biyosensör ve biyotıp dahil olmak üzere çeşitli teknik ve bilimsel alanlarda etkili ve rasyonel bir şekilde kullanmak için oldukça umut verici olduğu gözlemlenmiştir (Ildiz, 2012).

Organik bileşen olarak ham yumurta akı ve inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonları kullanılarak sentezlenen hibrit nanoçiçekle ilgili yapılan bir çalışmada organik-inorganik hibrit nanoçiçekler çeşitli açılardan karakterize edilmiştir. Sentezlenen yumurta akı-inorganik hibrit nanoçiçekler, Taramalı Elektron Mikroskobi (SEM), Enerji Dağılımlı X-Işınları Yöntemi (EDX), X Işını Difraktometresi (XRD) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenen yumurta akı-inorganik hibrit nanoçiçeklerin biyomimetik polifenol/peroksidaz benzeri aktiviteleri, H_2O_2 içeren veya içermeyen çeşitli fenolikler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda yumurta akı proteinlerinden sentezlenen hibrit yapılan polifenol oksidaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir (Altinkaynak, 2018).

Organik bileşen olarak termostabil β-galaktosidaz enzimi, inorganik bileşen olarak Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} ve Ca^{2+} tuzları kullanılarak yapılan bir çalışmada enzim immomolizasyonu gerçekleştirilmiştir. 0.05 mg/mL'lik bir protein konsantrasyonu için enzimin nanoçiçeklere dahil olma verimliliği %95'ten daha yüksek çıkmıştır. Çalışmada farklı kimyasal bileşime sahip nanoçiçeklerin yapısı, aktivitesi ve geri dönüştürülebilirliği analiz edilmiştir. Ca^{2+}, Mn^{2+} ve Co^{2+} nanoçiçekleri, aynı serbest enzim içeriğine eşdeğer bir laktaz aktivitesi seviyesi göstermiştir. Cu^{2+} nanoçiçek, bu katyonun enzim üzerindeki inhibitör etkisiyle uyumlu olarak görece düşük miktarda enzim aktivitesi göstermiştir. Bu bilimsel çalışma ile

enzim immobilizasyonu ve geri dönüştürülebilirlik açısından verimli sonuçlar elde edilmiştir. (Talens-Perales, 2020).

Organik-inorganik hibrit nanoçiçek sentezi için organik bileşen olarak *Trigonella foenum-graecum* L. bitkisi tohum ekstresi ve inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonları kullanılarak bir çeşit yeşil bir üretim metodu raporlanmıştır. Çemen tohum ekstresi kullanılarak sentezlenmiş organik-inorganik hibrit nanoçiçekler; SEM, EDX, XRD ve FT-IR yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenen hibrit nanoçiçeklerin elektron mikroskop görüntüsü incelendiğinde morfolojisi oldukça düzgün dağılımlı ve küresel formda olmak üzere yaklaşık 18 µm boyutunda gözlenmiştir. Ayrıca bu hibrit nanoçiçekler; *Pseudomonas aeruginosa* ve *Haemophilus influenza* dışında *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, S. aureus, Bacillus cereus, Salmonella typhi ve E. coli* türlerine karşı antibiyotikler ile kıyaslandığında yüksek düzeyde antimikrobiyal özellik göstermiştir. Ancak hem hibrit nanoçiçekler hem de serbest ham bitki ekstresi, *Candida albicans* ve *Candida glabrata* türlerine karşı antifungal aktivite göstermemiştir. Yapılan bu çalışma çemen ekstresi içeren organik-inorganik hibrit nano çiçeklerin test edilen patojen suşlar ile gelişen mikrobiyal enfeksiyonlar için terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini ve ilaç direncinin üstesinden gelme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Altinkaynak, 2019).

Yapılan bir başka çalışmada nanoçiçek adı verilen yeni organik-inorganik nanobiyo-antimikrobiyal ajanların üretimini gösterilmiştir. Çalışmada nanoçiçeklerin antimikrobiyal aktivitesindeki artış raporlanmıştır. *Artemisia absinthium* L. (Aa), *A. vulgaris* L. (Av) ve *A. ludoviciana* Nutt (Al) dahil olmak üzere üç genotipten bitkilerin ekstrelerinin nanoçiçekleri sentezlenmiştir. Ayrıca bitki ekstresi konsantrasyonlarının nanoçiçek morfolojisi üzerindeki etkisi incelenmiştir. En düzenli ve tek biçimli çiçek şekilli morfolojiler, 0,1 mg mL^{-1} bitki ekstresi konsantrasyonu kullanıldığında gözlemlenmiştir. Sentezlenen nanoçiçekler SEM, FTIR, EDX, XRD gibi analizlerle karakterize edilmiştir. Nanoçiçekler, ekstrelere kıyasla düşük konsantrasyonlarda bile patojenlere karşı çok fazla antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. NF'ler için MİK ve MBC değerlerinin 0,4 ila 40 µg mL^{-1} ve 40 ila 400 µg mL^{-1} arasında olduğu, Aa, Av ve Al ekstreleri için ise bu değerlerin 500-2000 µg mL^{-1} ve 1000 arasında değiştiği bulunmuştur.

Nanoçiçeklerin ve ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerinin farklılıkları, Aa, Av ve Al ekstrelerinde bulunan ana moleküllerin (proteinler, flavonoidler, polifenol) bitki

ekstrelerindeki miktarları ile ilgili olabileciğini düşündürmüştür. Sonuçlar, nanoçiçeklerin yeşil sentezinin, özellikle hastane kaynaklı insan patojenlerine karşı çevre dostu antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için büyük bir potansiyel vaat ettiğini göstermektedir (Kilic, 2020).

Yapılan bir başka çalışmada, ilk defa demir iyonları (Fe^{2+}) ve yaban turpu peroksidaz (HRP) enzimini birlikte kullanarak sentezlenen çiçek benzeri hibrit nanoyapıların büyük ölçüde arttırılmış aktivite ve stabilite ile sentezlendiği bildirilmiştir. Fe^{2+}-HRP hibrit nanoçiçeğin (HNF), serbest HRP ile karşılaştırıldığında +4°C ve oda sıcaklığında (20°C) saklandığında sırasıyla ~%512 ve ~%710 katalitik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ek olarak, +4°C 'de depolanan HNF, 30 gün içinde orijinal etkinliğinin yalnızca %2,9'unu kaybederken, oda sıcaklığında depolanan HNF, orijinal etkinliğinin yaklaşık %10'unu kaybetmiştir. Ancak aynı koşullar altında +4°C ve oda sıcaklığında depolanan serbest HRP enzimleri aktivitelerinin sırasıyla %68 ve %91'ini kaybettiği belirtilmiştir. HNF aktivitelerindeki şiddetli artışların, HRP konsantrasyonu, nano ölçekli boyut, uygun HRP konformasyonu, daha az kütle transfer sınırlamaları ve Fe^{2+} iyonlarının HRP için bir aktivatör olabileceği düşünülmüştür (Ocsoy, 2015).

Ülkemizde ilk kez bitki ekstrelerinin hibrit nanoçiçeklerinin biyolojik aktivite üzerindeki etkilerini inceleyen bir doktora tezi yapılmıştır. Çalışmaya göre nanoçiçeklerin bitki ekstrelerine kıyasla konsantrasyonlara bağlı enzim inhibisyonunda artışlar gözlemlenmiştir (Bor ve diğerleri, 2021; Durbilmez ve diğerleri, 2019; Bor, Durbilmez ve Koca Çalışkan, 2020)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Tez çalışmalarında kullanılan ipek kozaları Bursa Koza Tarım Satış Kooparatifleri Birliği'nden 2018 yılında temin edilmiş, kullanılıncaya kadar karanlık ve serin bir yerde muhafaza edilmiştir. Koza örnekleri Resim 3.1.'de yer almaktadır.

Diğer materyaller, kimyasallar ve sarf malzemeleri ise Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı'nda muhafaza edilmektedir.

Kimyasallar Sigma firmasından, cam malzemeler İldam firmasından temin edilmiştir.

Resim 3.1. Tez kapsamında çalışılan *B. mori* kozası örnekleri

3.2. Yöntem

3.2.1. İpek proteinlerinin izolasyonu

Mevcut literatürler modifiye edilerek ipek proteinlerinin izolasyonu yapılmıştır. İlk önce serisin izolasyonu yapılmıştır, zamk giderme işleminin ardından fibroin içeren total protein izolasyonu yapılmıştır.

Serisin izolasyonu

Sodyum hidroksit (NaOH) ile yapılan izolasyonda, 2 g eşit şekilde kesilmiş *B. mori* ipek kozaları 100 ml 0,025 N NaOH çözeltisine ilave edilmiştir. 4°C'de 12 saat boyunca zamk giderme işlemi için manyetik bir karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Serisin, hafif alkali solüsyonda çözünmüştür (Rajan,1992). Bu yöntemden elde edilen verim az olduğu için Sodyum karbonat (Na_2CO_3) ile yapılan izolasyon yöntemine devam edilmiştir (Rockwood, 2011).

Na_2CO_3 ile yapılan izolasyonda; 0,02 M sulu Na_2CO_3 çözeltisi kullanılarak ve çözelti kaynatılarak ipek kozalarından zamk giderilme işlemi gerçekleştirilmiştir.

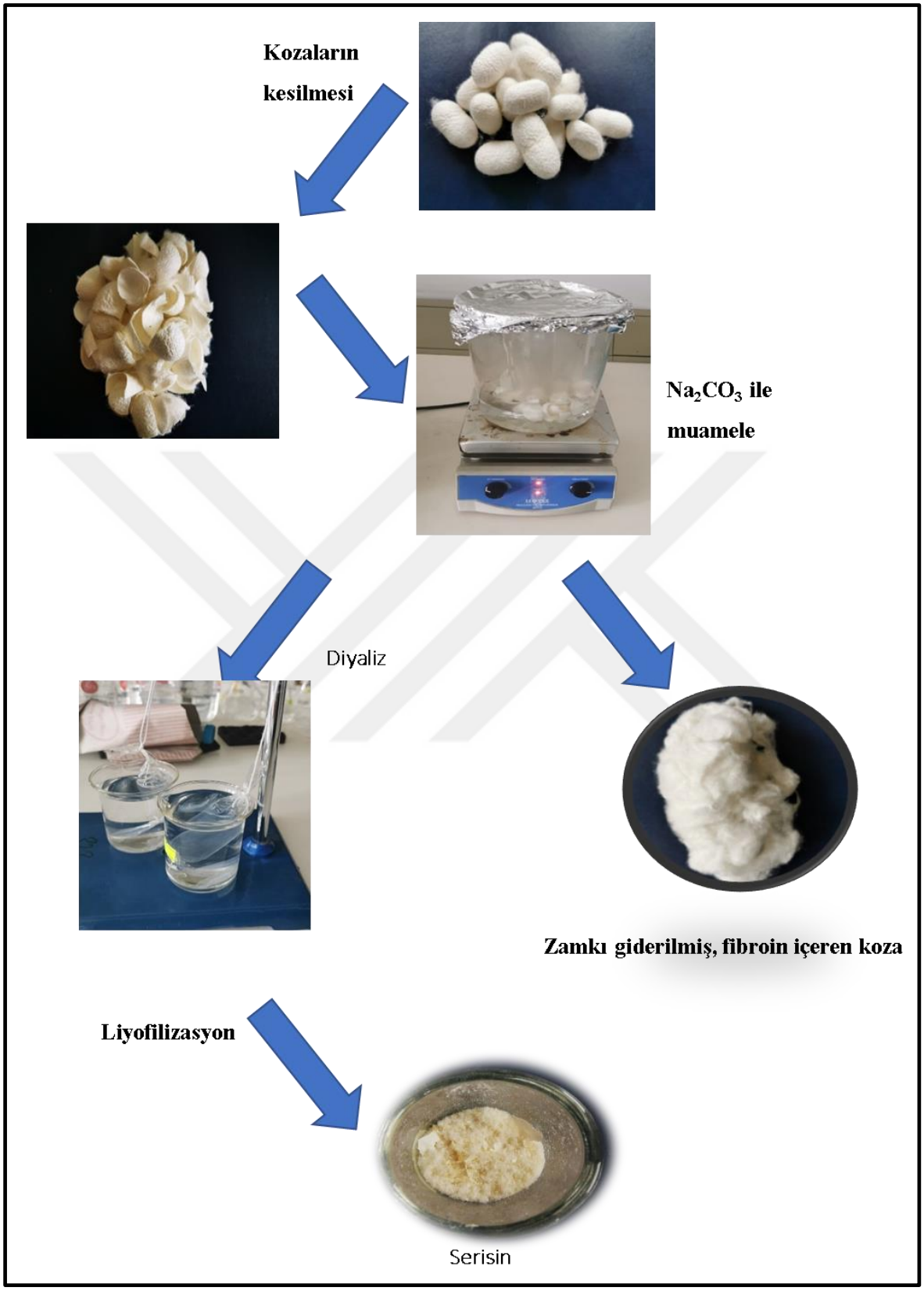
500 mL deiyonize su ile doldurulmuş cam beher, alüminyum folyo ile örtülüp ve kaynayana kadar ısıtılmıştır. *B. mori* ipek kozaları makasla eşit parçalara ayrılmıştır. 1,06 g Na_2CO_3 suya yavaş yavaş eklenip ve tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Su kaynamaya başlayınca behere 5 g ipek koza parçaları ilave edilmiştir. 30 dakika daha kaynamaya devam edilmiştir. Elde edilen Na_2CO_3 solüsyonu deiyonize suya karşı 24'er saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemlerinde selüloz diyaliz torbası kullanılmıştır. Diyaliz işlemi ile serisin proteini tuzlardan uzaklaştırılmıştır. Deiyonizasyon işleminin ardından elde edilen çözelti, proteinlerin teşhisi için 260-290 nm arasında UV absorbans ile verilen pikler analiz edilmiştir. Diyalizi ve teşhisi yapılan protein çözeltisi -80°C'de dondurulup liyofilize edilmiştir. Şekil 4.1'de serisin izolasyon aşamaları belirtilmiştir.

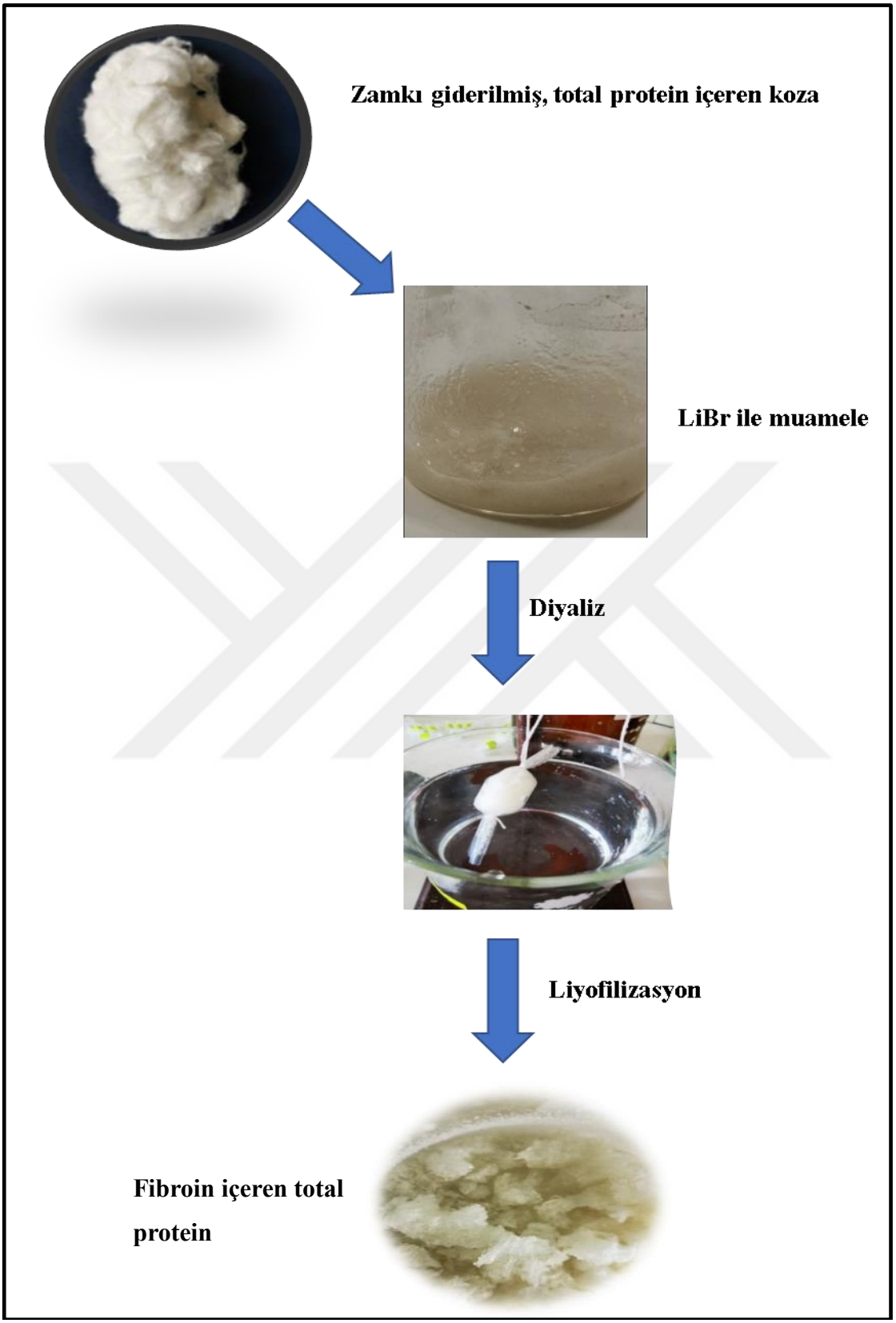
Fibroin içeren total protein izolasyonu

Zamk giderme işleminin ardından, elde edilen ipek lifleri deiyonize suda manyetik karıştırıcı ile 30 dk karıştırılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrar edilmiştir Böylece kirlilik oluşumu engellenmiştir. Ardından elde edilen ipek lifleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Tam kuruma sağlandığında izolasyon işlemine devam edilmiştir. Mevcut kurutulmuş fibroin miktarına bağlı olarak 9,3 M Lityum Bromür (LiBr) miktarını hesaplanmıştır. Çözeltinin %20'si ipek fibroin, %80'i LiBr içermektedir.

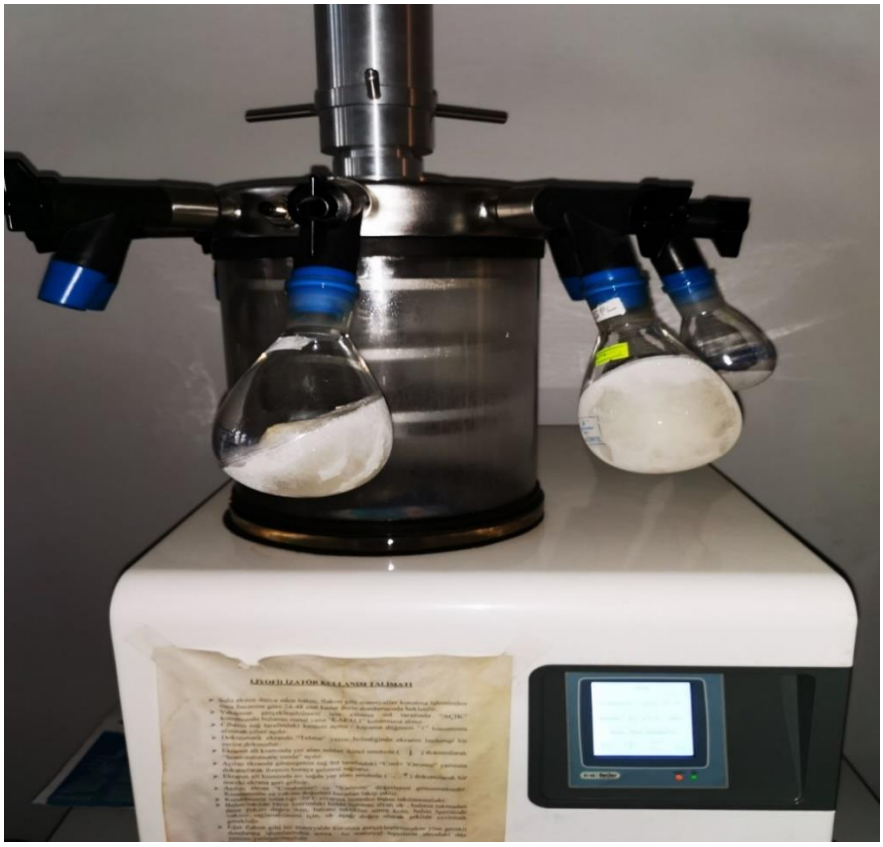
LiBr düşük yoğunluğa sahiptir bu nedenle çözelti hazırlanırken hacmi dikkate alınmıştır. Elde edilen karışımı viskoz bir çözelti elde etmek üzere 60 °C' de etüvde bekletilmiştir. İpek fibroini 50 ml'lik bir cam beher içerisinde tamamen çözüldüğünde kehribar rengini almıştır. Elde edilen çözelti 48 saat boyunca deiyonize suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemlerinde selüloz diyaliz torbası kullanılmıştır. Proteinlerin teşhisi için UV absorbans ile 260-290 nm arasında verilen pikler analiz edilmiştir. Diyalizi ve teşhisi yapılan protein çözeltisi -80°C’de dondurulup liyofilize edilmiştir (Rockwood, 2011).



Şekil 3.1. Serisin proteini izolasyon aşamaları



Şekil 3.2. Fibroin içeren total protein izolasyon aşamaları



Resim 3.2. İzole edilen serisin ve fibroin içeren total ipek proteinlerinin Liyofilizatör'de kurutulması

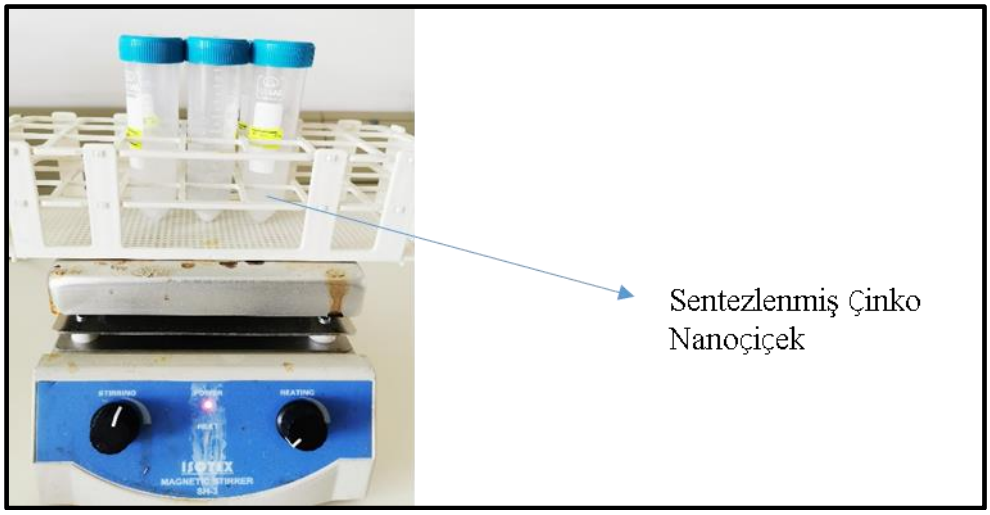
3.3. İpek Proteini-Çinko Nanoçiçek Sentezi

Ticari olarak temin edilen ve deneysel olarak elde edilen ipek proteinlerinin literatürlere göre çinko nanoçiçekleri sentezlenmiştir ve bu hibrit nanoçiçeklerin karakterizasyonu yapılmıştır.

3.3.1. Çinko hibrit nanoçiçek sentezlenmesi

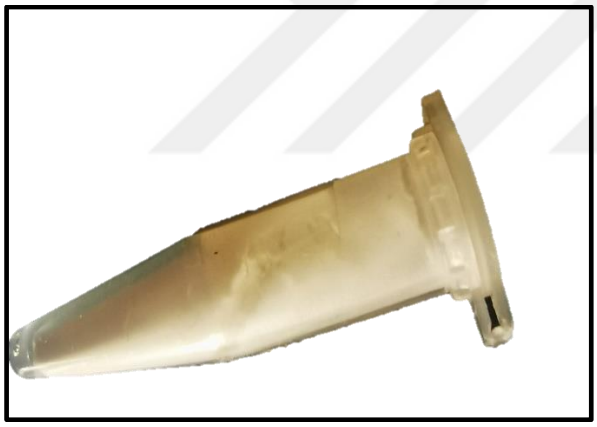
Tez çalışmalarımız kapsamında hem ticari olarak satın aldığımız hem de izole ettiğimiz proteinlerin çinko hibrit nanoçiçekleri sentezlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0,2-0,4-0,8), farklı pH (6-7.4-8-9) ve bekleme sürelerinde (3-6-12-24 saat) sentezlenip optimal koşullar belirlenmiştir (Zhang ve diğerleri, 2016).

Sentez reaksiyonlarımız sonucunda elde ettiğimiz hibrit nanoçiçekler, beyaz renkli çökeltiler meydana getirmiştir.



Resim 3.3. Nanoçiçeklerin sentezlenmesi

Sentezlenen çinko hibrit nanoçiçeklerin çeşitli açılardan karakterizasyonu için ERÜ-TAUM'da (Erciyes Üniversitesi, Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi) yapılmıştır.



Resim 3.4. Sentezlenen çinko nanoçiçek

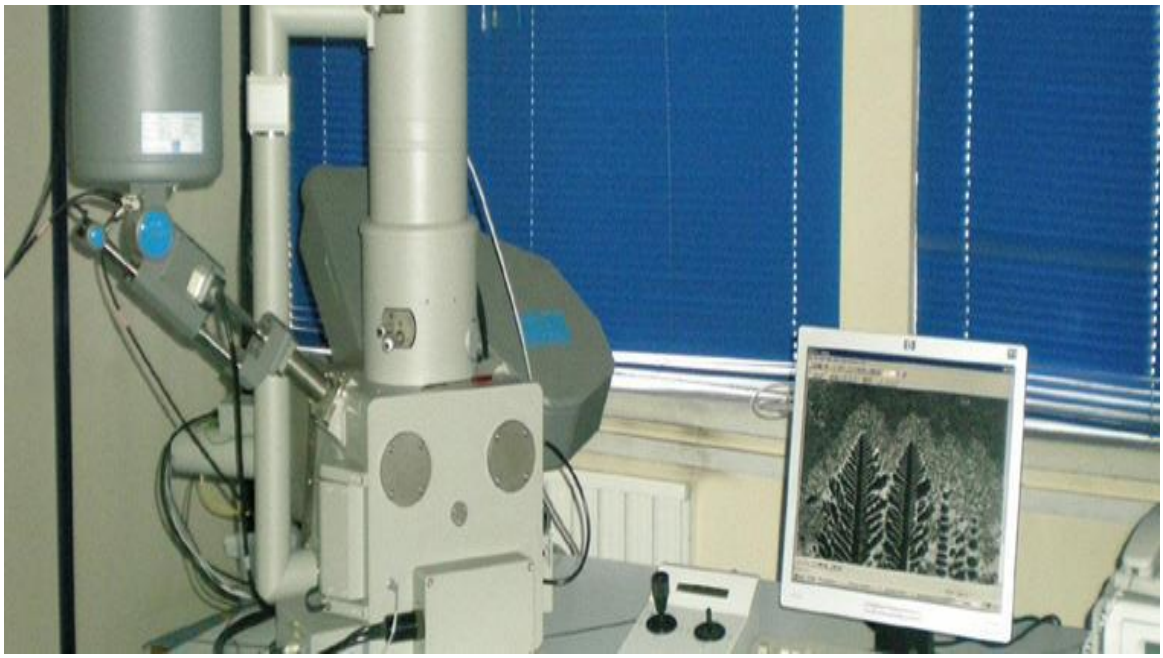
<u>Sentezlenen nanoçiçeklerin karakterizasyonu</u>

Taramalı elektron mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscope)

SEM'de, odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayıp elektronların numunedeki atomlarla etkileşerek numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler içeren farklı sinyaller üretilmektedir. ERÜ-TAUM'da bulunan Leo 440 Computer Controlled Digital (Resim 3.5) model cihaz kullanılmıştır. Numune iletken malzemeyle kaplanarak Altın – Paladyum (Au-Pd) ile incelenebilir hale getirilmiştir. Numune bu aşamada vakum altına alınmıştır. Kullanılan numunenin yapısına göre vakum süresi

değişmektedir. Ortalama vakum bekleme süresi 30 dk'dır. Vakum süresi tamamlandıktan sonra numunenin yüzey şeklinin resmi alınmıştır (McMullan, 1995).

SEM; numunenin yüzey topografyası, kristal yapısı, elementel bileşimi ve elektriksel davranışı hakkında bilgi sağlamaktadır (Vernon-Parry, 2000; Zadora, 2003). Tez çalışmalarımızda sentezlediğimiz organik- inorganik hibrit SEM'de elde edilen görüntüler sayesinde toz numunelerimizin yüzeylerinin şekilleri ve yapıları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Sonrasında elde edilen görüntülerden Image Pro-Plus programında boyut analizi yapılmıştır.



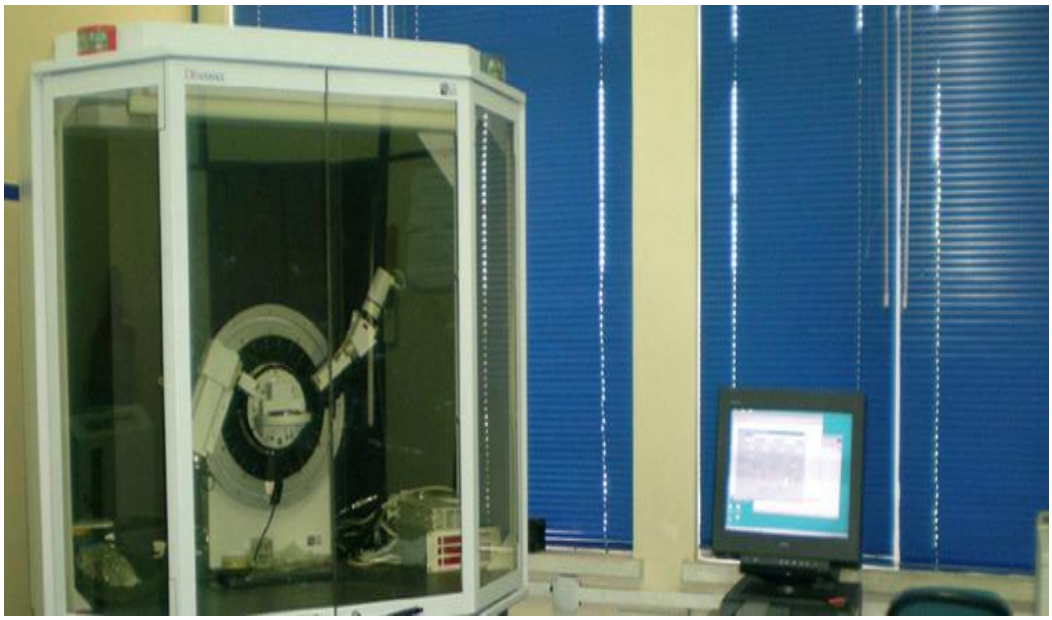
Resim 3.5. SEM ve EDX analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz (ERÜ-TAUM) (Fotoğraf çekim tarihi, 2020)

Enerji dağılımlı X-ışınları (EDX)

EDX analizi yöntemi kullanılarak, incelenen numunenin içerdiği elementlerin kompozisyonu belirlenebilmektedir. Yapılan bu analizde incelenen numuneye yüksek enerjiye sahip elektronlar çarptırılarak, incelen numuden kopan elektronların enerjilerinin anlamlı sinyaller oluşturarak karakterizasyon sağlanmaktadır. ERÜ-TAUM'da "Leo 440 Computer Controlled Digital" isimli cihaz (Resim 3.5) kullanılarak analiz işlemleri gerçekleşmiştir. Sonuç olarak oluşan EDX spektrumlarında yer alan piklerden hareketle çinko nanoçiçeklerin oluşup oluşmadığı tez kapsamında belirlenmiştir.

X-ışını kırınım/ X-ışını difraktometresi (XRD)

XRD yöntemi kristal maddelerin incelendiği bir yöntemdir. Bu yöntem, her bir kimyasal yapının spesifik içerdiği atomik dizimlerine göre X-ışınlarını karakteristik olarak kırması esasına dayanmaktadır. Bu analiz için Erciyes Üniversitesi TAUM'da bulunan "Bruker Axs D8 Advance Model" isimli cihaz (Resim 3.6.) kullanılmıştır. Elde edilen kristal yapıların ispatı High Score Plus programında bulunan veri tabanları ile çakıştırılarak yapılmıştır.



Resim 3.6. XRD analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz (ERÜ, TAUM)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analizi katı, sıvı veya gaz maddelerin absorpsiyon ve emisyon kızılötesi spektrumunun oluşturduğu bir spektroskopi tekniğidir. FT-IR yöntemi sayesinde herhangi bir bileşiğin kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Bu teknik yardımıyla, ERÜ TAUM' da bulunan "Perkin Elmer 400 FT-IR / FT-FIR Spectrometer Spotlight 400 Imaging System" isimli cihaz (Resim.3.7) kullanılarak sentezlenen hibrit nanoçiçekler karakterize edilmiştir. Bu analiz sayesinde incelenen sentez ürününün atomlar arası bağlarını, atomların bağlanma yerlerini ve incelenen yapının aromatik/ alifatik olduğu, fosfat yapısı içerip içermediği belirlenmiştir (Dominguez-Rosado, 2003).

Resim 3.7. FT-IR analizlerinin gerçekleştiği cihaz (ERÜ-TAUM)

3.4. *In vitro* Aktivite Deneyleri

Elde edilen ve ticari olarak temin edilen ipek protein ile sentezlenen ve karakterize edilen çinkolu hibrit nanoçiçeklerin UV A-B koruyucu etkileri hizmet alımı ile yapılmıştır. Ayrıca ipek proteinleri genellikle cilt yenileyici ve kozmetik amaçla kullanıldığı için antioksidan, hyaluronidaz ve tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Bu bölümde, DPPH, hyaluronidaz ve tirozinaz enzimlerinin inhibisyonu, güneş koruyucu aktivitelerin *in vitro* koşullarda araştırılmasına dair bilgilere yer verilmiştir.

3.4.1. Antioksidan aktivite

Proteinlerin ve nanoçiçeklerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivite tayini ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin esası; numunelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitelerinin, koyu-viyole renkten açık-sarı renge dönüşümün UV/görünür bölgedeki dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Her bir protein çözeltisi 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL konsantrasyonlarında ayrı ayrı hazırlanmıştır. Standart madde olarak C vitamini (askorbik asit) kullanılmıştır.

2 mg tartılan C vitamini 2 mL metanolde tamamen çözülerek ve bu stok çözeltiden seyreltme yapılarak 1 mg/mL, 0, 5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL konstanrasyonlar elde edilmiştir. Taze olarak hazırlanan DPPH solüsyonu ise 2,4 mg olarak tartılan DPPH, %70 lik metanol ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. DPPH ışık etkisiyle bozulduğu için, alüminyum folyoya sarılı mezürde hazırlanmıştır. Daha sonra her bir flakonda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1 ml protein çözeltisi üzerine 2 ml DPPH solüsyonu eklenerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda protein çözeltisi ve DPPH karışımından 96 kuyucuklu mikroplakaya 250 µL alınarak, 517 nm'de ELISA mikroplak okuyucu (Versamax tunable microplate reader, ABD) ile absorbansları ölçülmüştür (Burda, 2001).

Negatif kontrol olarak metanol (kör), pozitif kontrol (referans) olarak ise C vitamini (askorbik asit) kullanılmıştır.

% Radikal Süpürücü Etki = [(A 1 -A 2) / A 1] × 100

3.4.2. Hyaluronidaz enzim inhibisyonu aktivitesi

Tez kapsamında yapılan biyolojik aktivite çalışmalarından ilki hyaluronidaz enzim inhibisyonudur. İzole edilen ve satın alınan proteinlerden hareketle sentezlenen organik-inorganik hibrit nanoçiçek yapılarının hyaluronidaz enzim inhibisyon etkisi yapılan türbidimetrik yöntem üzerinden, hyaluronik asidin albümin çözeltisiyle reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır (Kass ve Seastone, 1944; Tolksdorf ve McCready, 1949).

ELISA mikroplakası üzerinde her bir numune çinko hibrit nanoçiçek yapıları 5 farklı konsantrasyonda, 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Test çözeltilerinden 20 µL alınarak kuyucuklara eklenmiştir. Daha sonra 0,4 mg/mL konsantrasyonda hyaluronik asit çözeltisi ilave edilerek etüvde (Nüve EN400) oda sıcaklğında 5 dk süreyle inkübe edilmiştir. Ardından üzerlerine, 0,05 mg/mL hyaluronidaz enzimi ilave edilmiştir. Kuyucuklara en son 180 µL albümin çözeltisi eklenmiştir. 10 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından 540 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri ELISA mikroplaka okuyucusu (Versamax tunable microplate reader, ABD) kullanılarak okutulmuştur. Test çözeltilerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu, "SoftMax Pro" isimli bilgisayar programı kullanılarak ölçülmüştür (Madan, 2018).

Elde edilen değerler üzerinden, aşağıda yer alan formüle göre gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

% Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonu = (Test AD− Kontrol AD)/ Test AD × 100

AD: Absorbans değeri

Test AD: *Test çözeltisinin 540 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri*

Kontrol AD: *Kontrol çözeltinin 540 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri*

3.4.3. Tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi

Tirozinaz enzim inhibisyon yöntemini Jeong ve ark. 2009 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre, 96 kuyucuklu bir plakda, fosfat tamponu ile seyreltilmiş 20 µL numune çözeltisi, 100 µL fosfat tamponu, her birinde 20 µL tirozinaz (250 U / mL) ile karıştırılmıştır.

Karıştırma sonrası 25 ° C'de yaklaşık 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra substrat olarak 20 µL 3 mM L-tirozin ilave edilip 30 dk daha 25 ° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon döneminden sonra, absorbans 492 nm'de okunmuştur. Kojik asit pozitif kontrol olarak kullanılırken, fosfat tamponu (100 mM PBS, pH = 6.8) numune yerine negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Her numune üzerinde farklı konsantrasyonlarda üç tekrarlı deney yapılmıştır (Jeong, 2009). Sonuçlar “SoftMax Pro” isimli bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

% İnhibisyon = ($A_{Kontrol}$-A_{Test}) /$A_{Kontrol}$ x 100

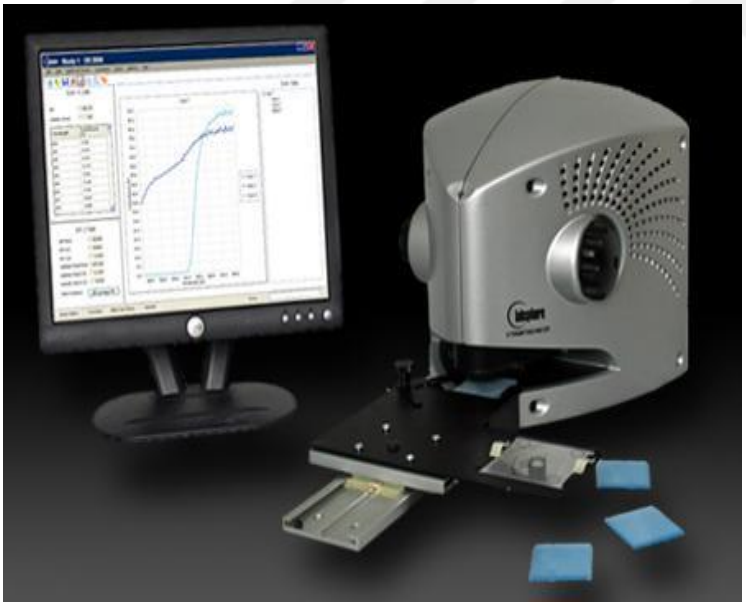
$A_{Kontrol}$: Kontrol grubunun 492 nm’de absorbansı

A_{Test}: Test grubunun 492 nm’de absorbansı

Resim 3.8. İzole edilen ipek proteinleri

3.4.4. Güneş koruyucu aktivitenin *in vitro* analizi

Protein ve sentezlenmiş hibrit nanoçiçeklerin UVA koruma faktörü ve "kritik dalga boyu" değerleri "Colipa" adı verilen *in vitro* UV koruma yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem, bir güneş koruyucusunun UVA ve UVA / UVB oranı korumasını açıklamaktadır (2006/647/EC).



Resim 3.9. UVA ve UVB ölçümünün yapıldığı cihaz

Yöneteme göre:

ADIM 1: Güneşten koruyucu ürünün *in vitro* transmisyon ölçümü, UV ışımasından önce bir PMMA (polimetilmetakrilat) plakası üzerine yayılmıştır.

ADIM 2: AO verileri ile başlangıç UV spektrumu elde edilecektir. UVA SPF0, AO (y) ve C kullanılarak hesaplanmıştır.

ADIM 3: UVA SPF0 ile orantılı olarak tek bir UV dozu D hesaplanmıştır.

ADIM 4: Hesaplanan UV dozu D'ye göre adım 1 ile aynı şekilde UV'ye maruz bırakılmıştır.

ADIM 5: UV'ye maruz kaldıktan sonra güneş koruyucu ürünün *in vitro* iletim ölçümü yapılmıştır.

ADIM 6: Daha önce adım 2'de belirlenen aynı C katsayısına göre ikinci spektrumun (UV maruziyetini takiben) matematiksel olarak ayarlanması A ve C kullanılarak ışınlama sonrası *in vitro* UVA koruma faktörü UVA-SPF'nin hesaplanması yapılmıştır. Spektrofotometre ile ölçülen dalga boyu aralığı 290-400 nm'dir

Numunelerimiz şu şekildedir:

1. Negatif Kontrol (Uygulama yapılmayan grup, baz krem)
2. Pozitif Kontrol (Therasilk isimli ürününün ipek proteini içermeyen güneş kremi
3. Referans Madde (Febs Biyoteknoji'nin Therasilk güneş kremi %1 lik)
4. Total ipek proteini + Güneş kremi (%1'lik)
5. Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%1'lik)
6. Serisin + Güneş kremi (%1'lik)
7. Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%1'lik)
8. Total ipek proteini + Güneş kremi (%2'lik)
9. Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik)
10. Serisin + Güneş kremi (%2'lik)
11. Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik)

Resim 3.10. Analizler için hazırlanan kremler

4. BULGULAR

Tez çalışmalarımız kapsamında *B. mori* ipek kozalarından izole ettiğimiz proteinlerin UV absorbans sonuçları değerlendirilmiştir.

İzole edilen ve ticari olarak temin edilen ipek proteinlerinin çinko hibrit nanoçiçekleri çeşitli açılardan karakterize edilmiştir. SEM, EDX, FT-IR, XRD analizleri yapılmıştır.

Çinko hibrit nanoçiçekler için optimal koşullar belirlendikten sonra *in vitro* biyolojik aktivite deneyleri yapılmıştır. DPPH, hyaluronidaz, tirozinaz enzim inhibisyonu ve güneş koruyucu aktivite sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1. İzole Edilen Proteinlerin UV Spektrofotometre ile Analizleri

Tez kapsamında *B. mori* ipek kozalarından izole ettiğimiz proteinlerin miktarsal analizleri Warburg yöntemi ile incelenmiştir (Warburg, 1941). Ayrıca izole ettiğimiz serisin ve total proteinin verim hesabı yapılmıştır.

4.1.1. Serisin

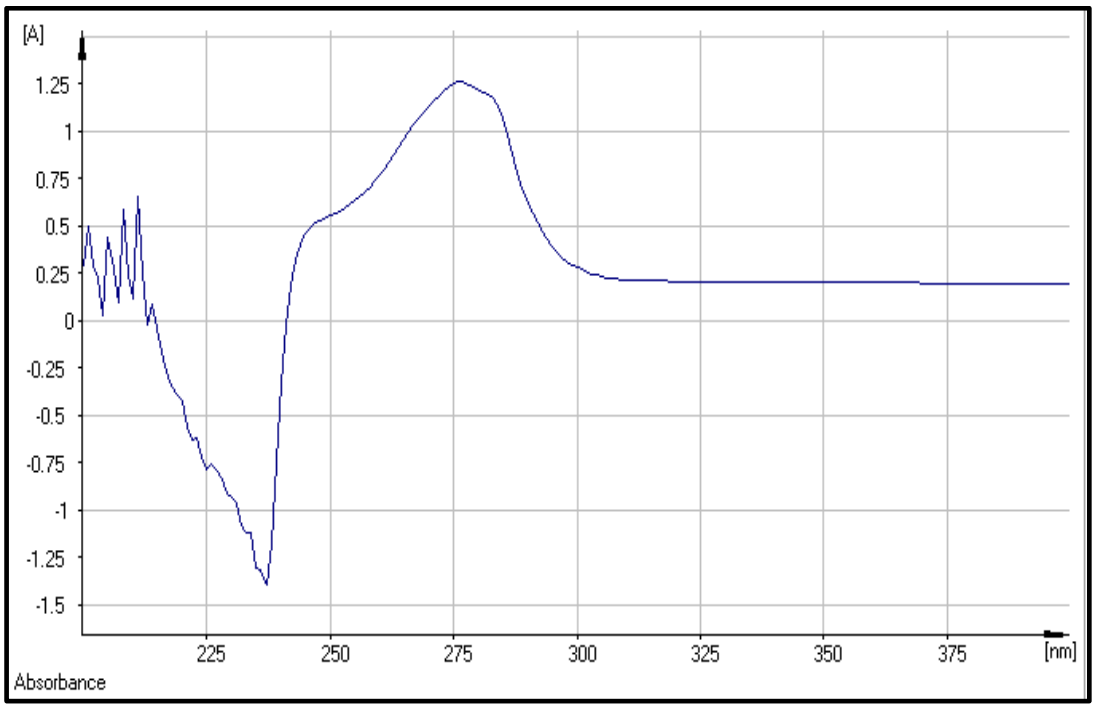
Tez kapsamında *B. mori* ipek kozalarından izole ettiğimiz serisin proteinlerin 260-290 nm arasında UV spektrofotometrede spektrumlarına bakılmıştır.

Şekil 4.1. Serisin proteininin UV absorbansı

280 nm civarında oluşan pik protein varlığını kanıtlamıştır.

4.1.2. Fibroin içeren total protein

Tez kapsamında *B. mori* ipek kozalarından izole ettiğimiz serisin proteinlerin 260-290 nm arasında UV spektrofotometrede spektrumları incelenmiştir.



Şekil 4.2. Total protein UV absorbansı

274 nm'de oluşan pik protein oluşumunu kanıtlamıştır.

<u>Serisin verim hesabı</u>

5g kozadan 1500 mg
100g? x= 30g
5 g kozadan %30 verim ile serisin izole edilmiştir.

<u>Total protein verim hesabı</u>

5g kozadan 2200 mg
100g kozadan? x= 44 g
5 g kozadan %44 verim ile total protein izole edilmiştir.

4.2. Ticari ve İzole Edilen Proteinlerin Fizikokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonu

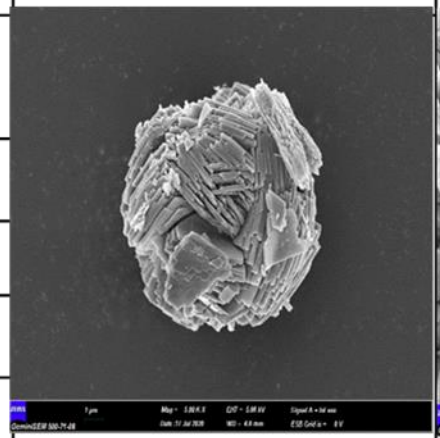
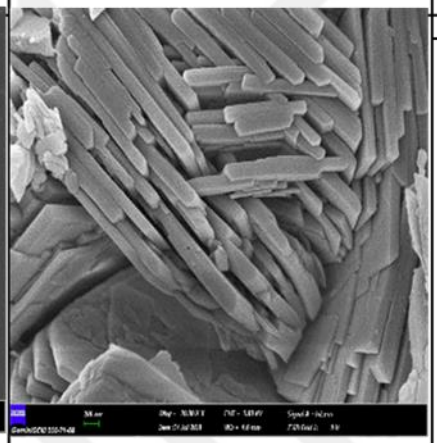
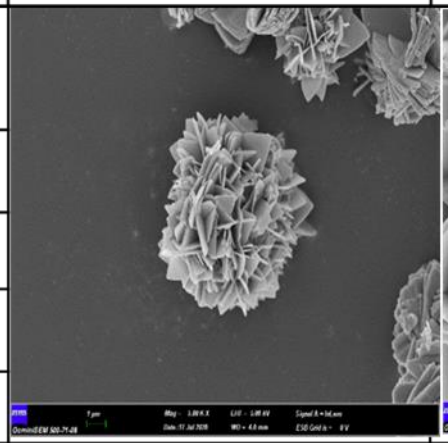
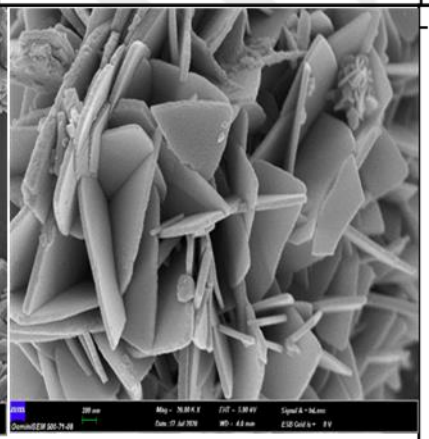
Tezimiz kapsamında hem ticari olarak temin edilen ipek proteinlerinin hem de izole edilen ipek proteinlerinin organik-inorganik çinko hibrit nanoçiçekleri sentezlenmiştir. Çeşitli açılardan karakterize edilen proteinlerin SEM analizleri sonucunda optimal koşullar belirlenmiştir.

4.2.1. SEM ile karakterizasyon

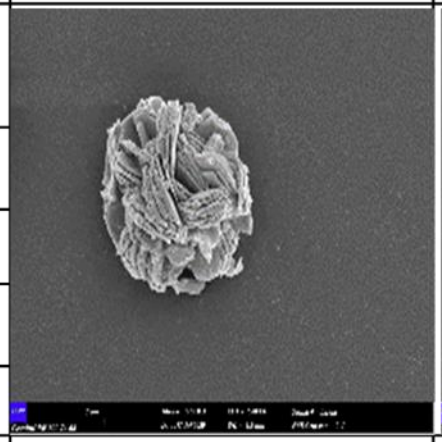
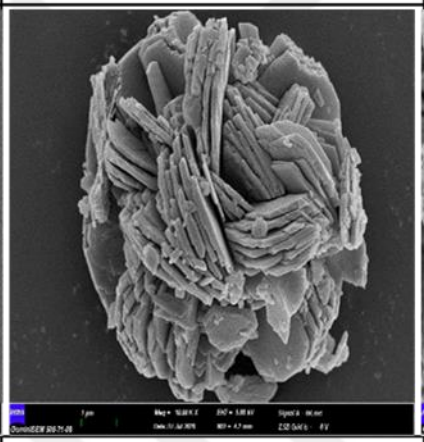
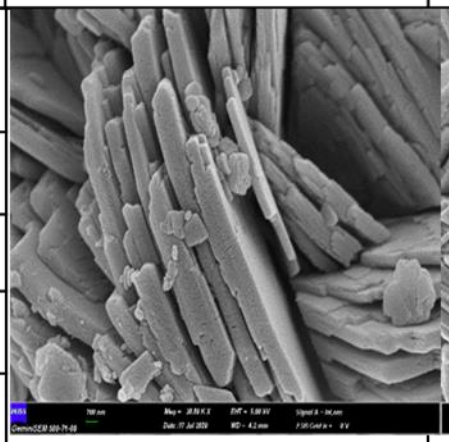
Tezimiz kapsamında ilk önce ticari olarak temin edilen proteinlerin hibrit çinko nanoçiçeklerinin farklı pH (6-7,4-8), farklı bekleme sürelerinde (3, 6, 12, 24 saat) yapılan analizler sonucunda optimal koşullar belirlenmiştir. pH 7,4 ve 6 saat bekleme süreli çinko nanoçiçeklerde optimal SEM görüntüleri elde edilmiştir. İzole ettiğimiz proteinlerin hibrit çinko nanoçiçekleri de pH 7,4 ve 6 saat bekleme sürede sentezlenmiştir.

Ticari olarak temin edilen proteinlerin ve izole edilen proteinlerin SEM görüntüleri Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Her iki çizelgede de organik, inorganik kısım, pH, konsantrasyon, bekleme süresi ve 5,00KX-10,00KX-20,00KX-30,00KX-50,00KX büyütmelerinden bir kısmı verilmiştir.

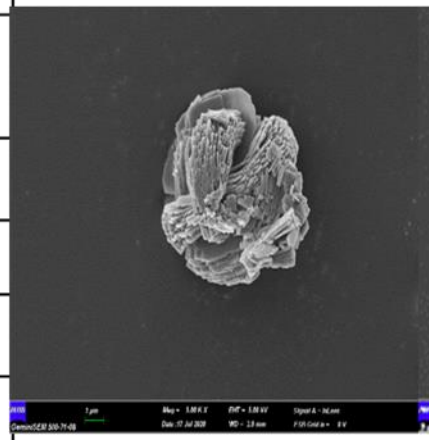
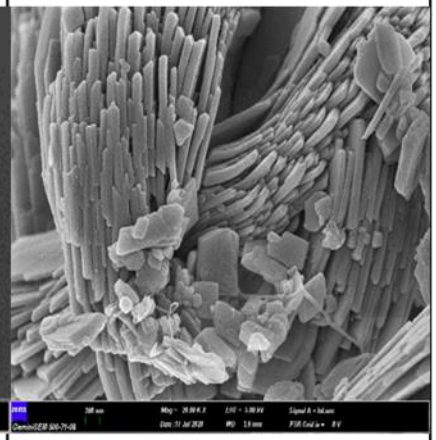
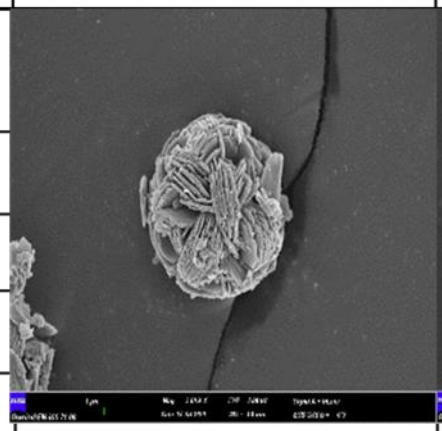
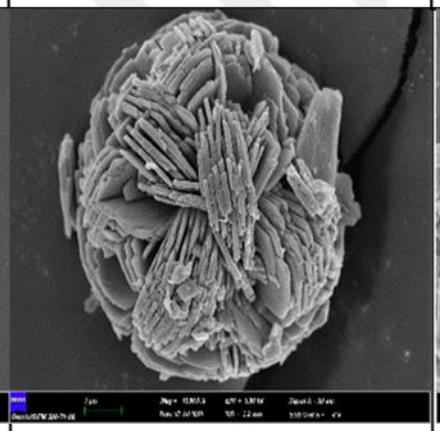
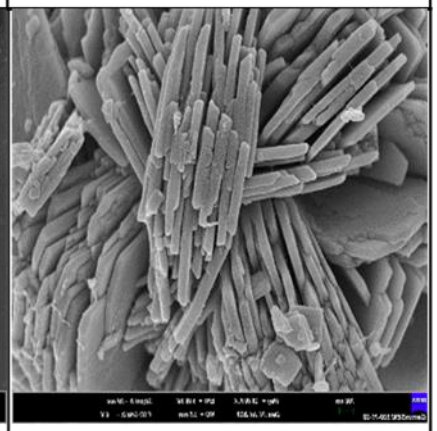
Çizelge 4.1. Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			-
İnorganik Kısım	Zn			
pH	6			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme		5,00 KX	20, 00 KX	-
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			-
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	3 saat			
Büyütme		5,00 KX	20, 00 KX	-

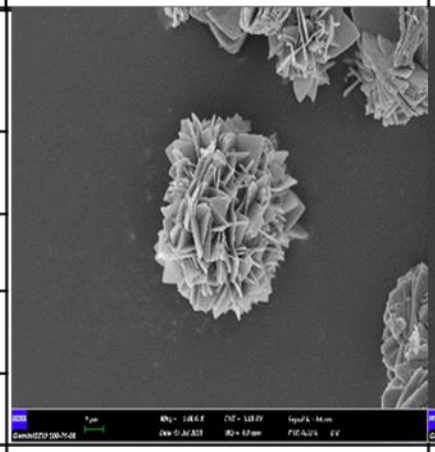
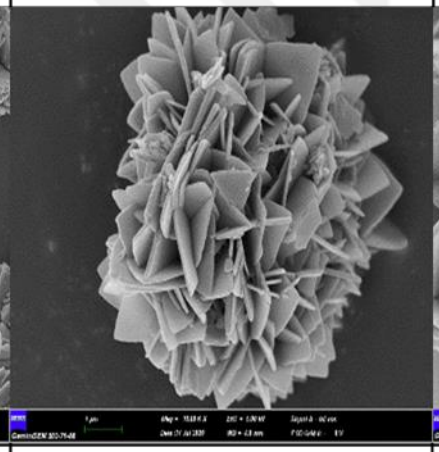
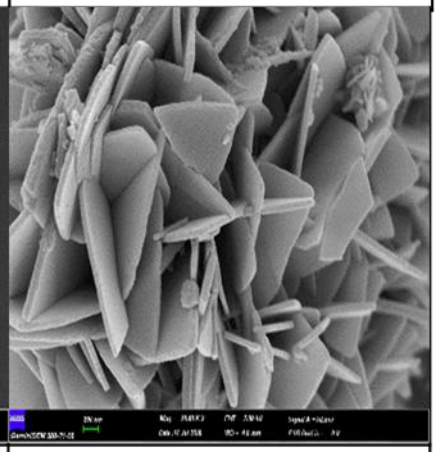
Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			-
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme		20,00 KX	30,00 KX	-

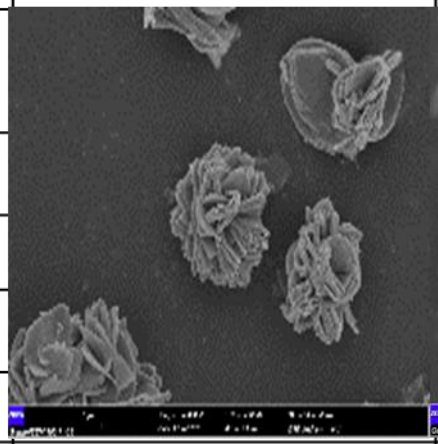
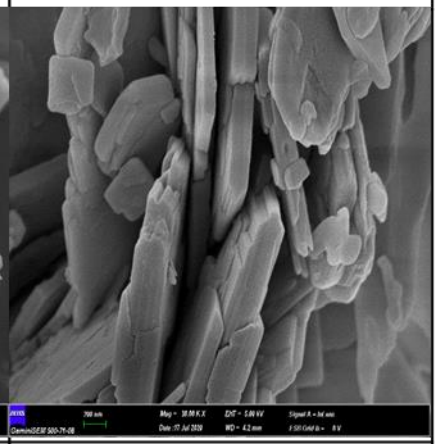
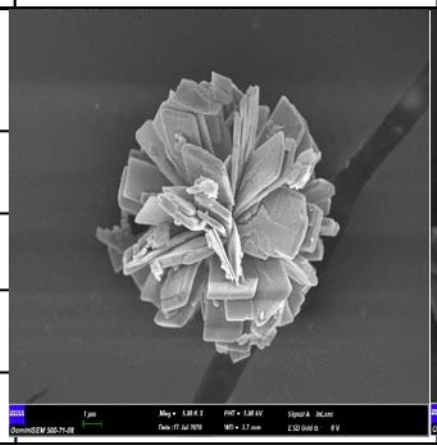
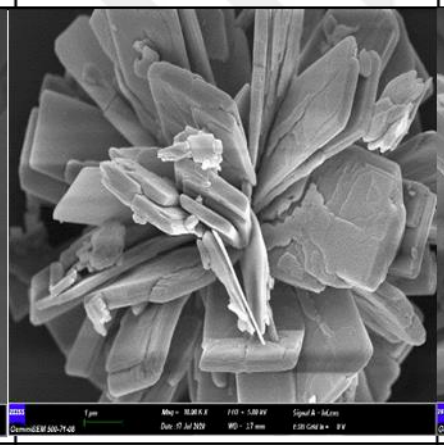
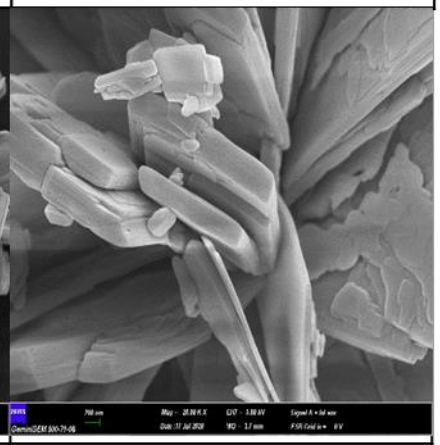
Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	8			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX
Organik Kısım	Ticari serisin proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	8			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX

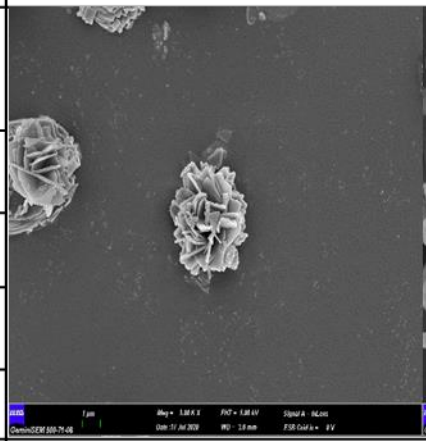
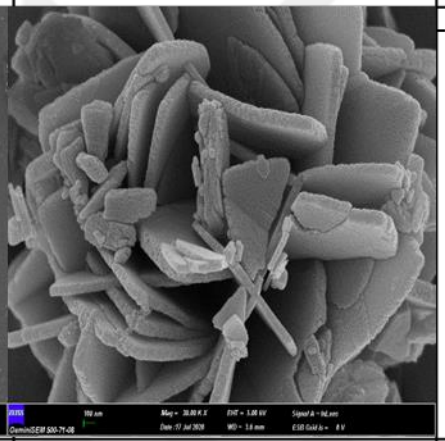
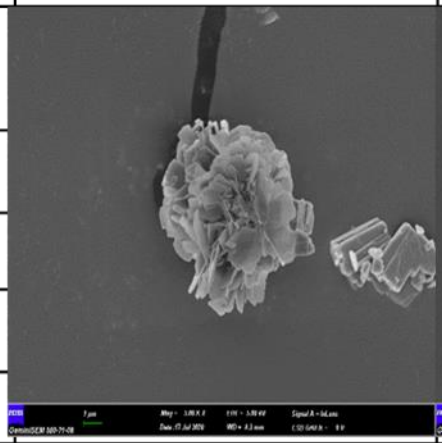
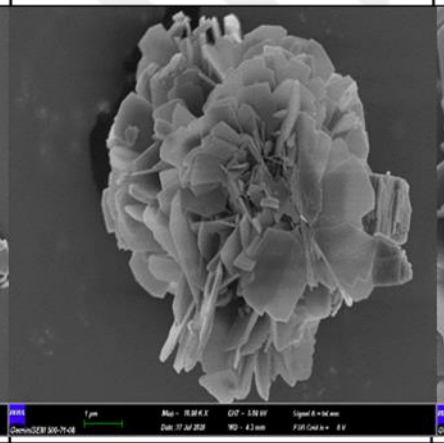
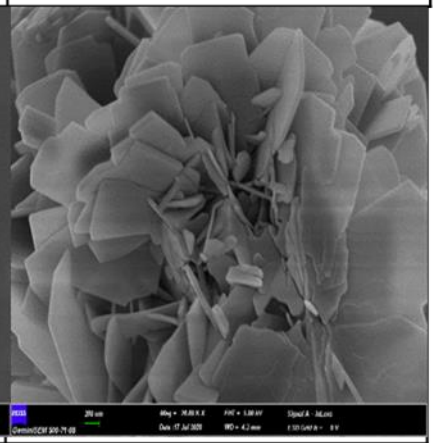
Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari ipek proteini	Oluşmadı	Oluşmadı	Oluşmadı
İnorganik Kısım	Zn			
pH	6			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme				
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	3 saat			
Büyütme		5,00 KX	30,00 KX	50,00 KX

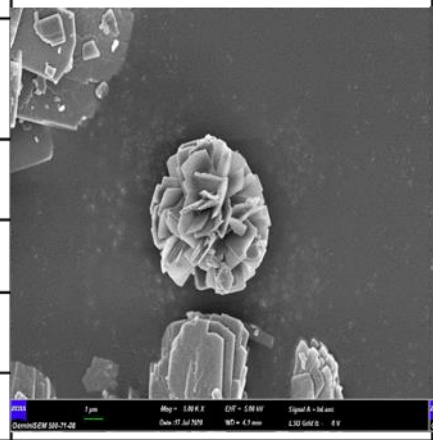
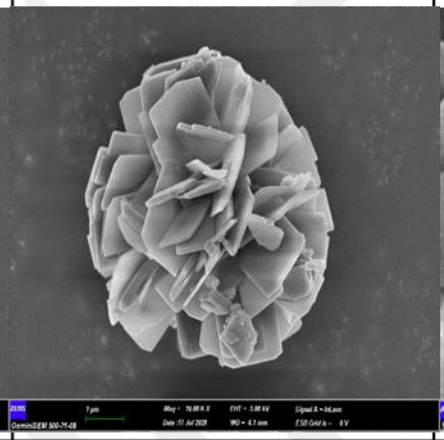
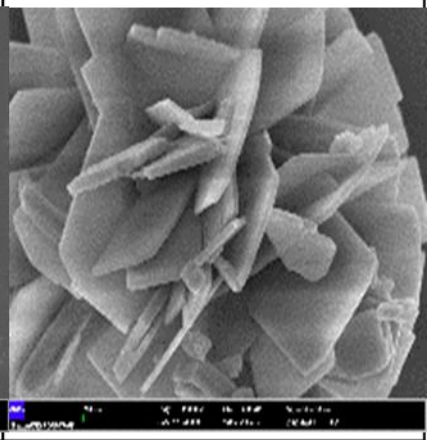
Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	20,00 KX	30,00 KX
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX

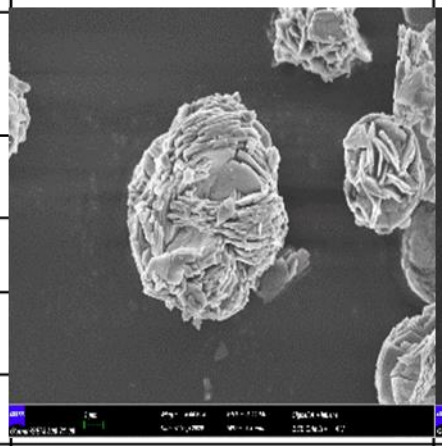
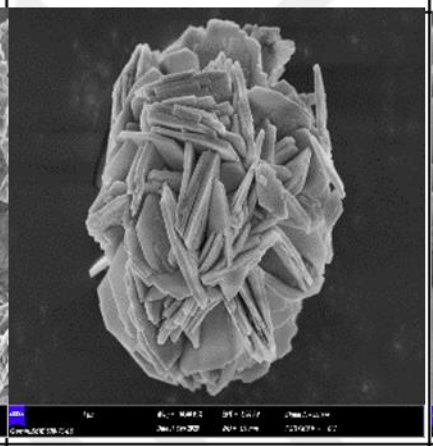
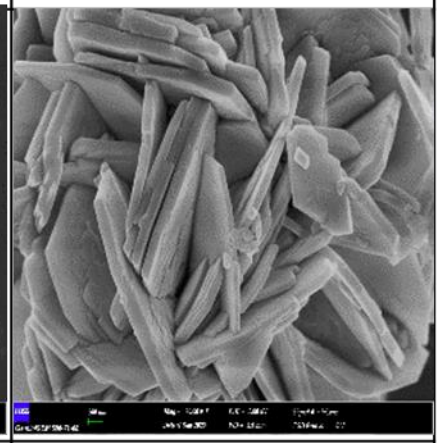
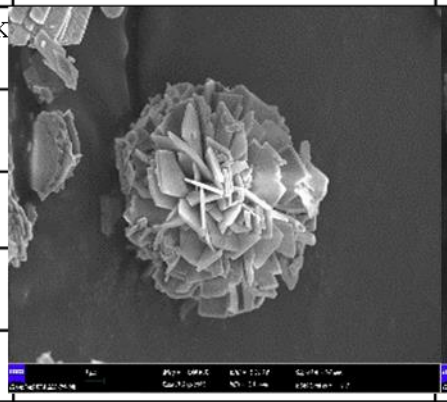
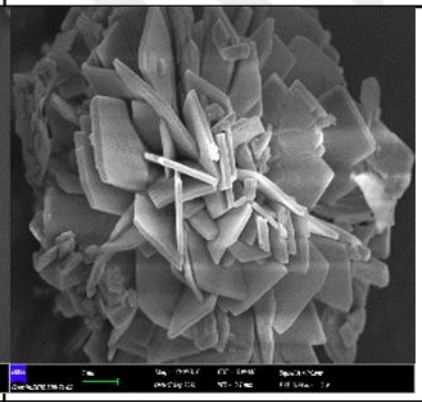
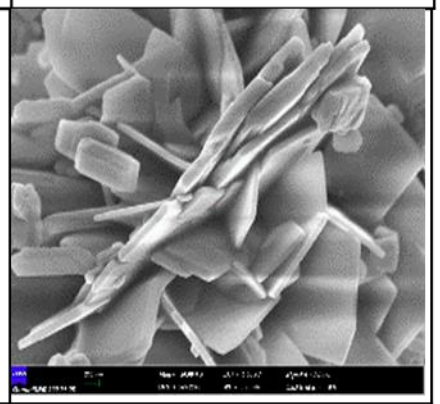
Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			-
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	24 saat			
Büyütme		5,00 KX	30 KX	-
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	8			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX

Çizelge 4.1.(Devam) Ticari ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

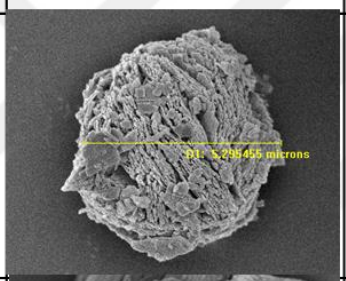
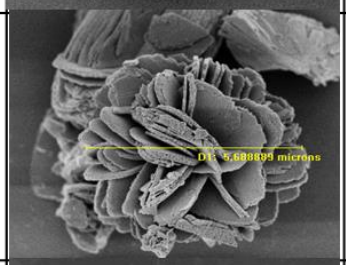
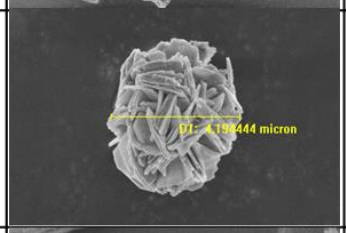
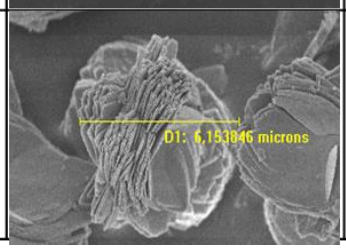
		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	Ticari ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	8			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	12 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX

Çizelge 4.2. İzole edilen ipek proteinlerinin SEM görüntüleri

		SEM görüntüsü	SEM görüntüsü	SEM görüntüsü
Organik Kısım	İzole serisin proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX
Organik Kısım	İzole ipek proteini			
İnorganik Kısım	Zn			
pH	7,4			
Konsantrasyon g/ml	0,8			
Süre	6 saat			
Büyütme		5,00 KX	10,00 KX	20,00 KX

Tezimiz kapsamında sentezlenen organik- inorganik hibrit nanoçiçekte organik kısım; ticari larak temin edilen serisin (SN) ve ipek total proteini (TP) ile izole edilen serisin (iSN) ve zole total proteinden (iTP) oluşurken inorganik kısım çinko iyonunundan (Zn) oluşmaktadır. Sentez sonucunda ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği (SN-ZnNÇ) ve ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği (TP-ZnNç) ile izole edilen serisin çinko hibrit nanoçiçeği (iSN-ZnNç) ve izole total protein çinko hibrit nanoçiçeği (iTP-ZnNç) elde edilmiştir. SEM analizi sonrasında Image Proplus programında boyut analizi yapılmıştır (Çizelge 4.3)

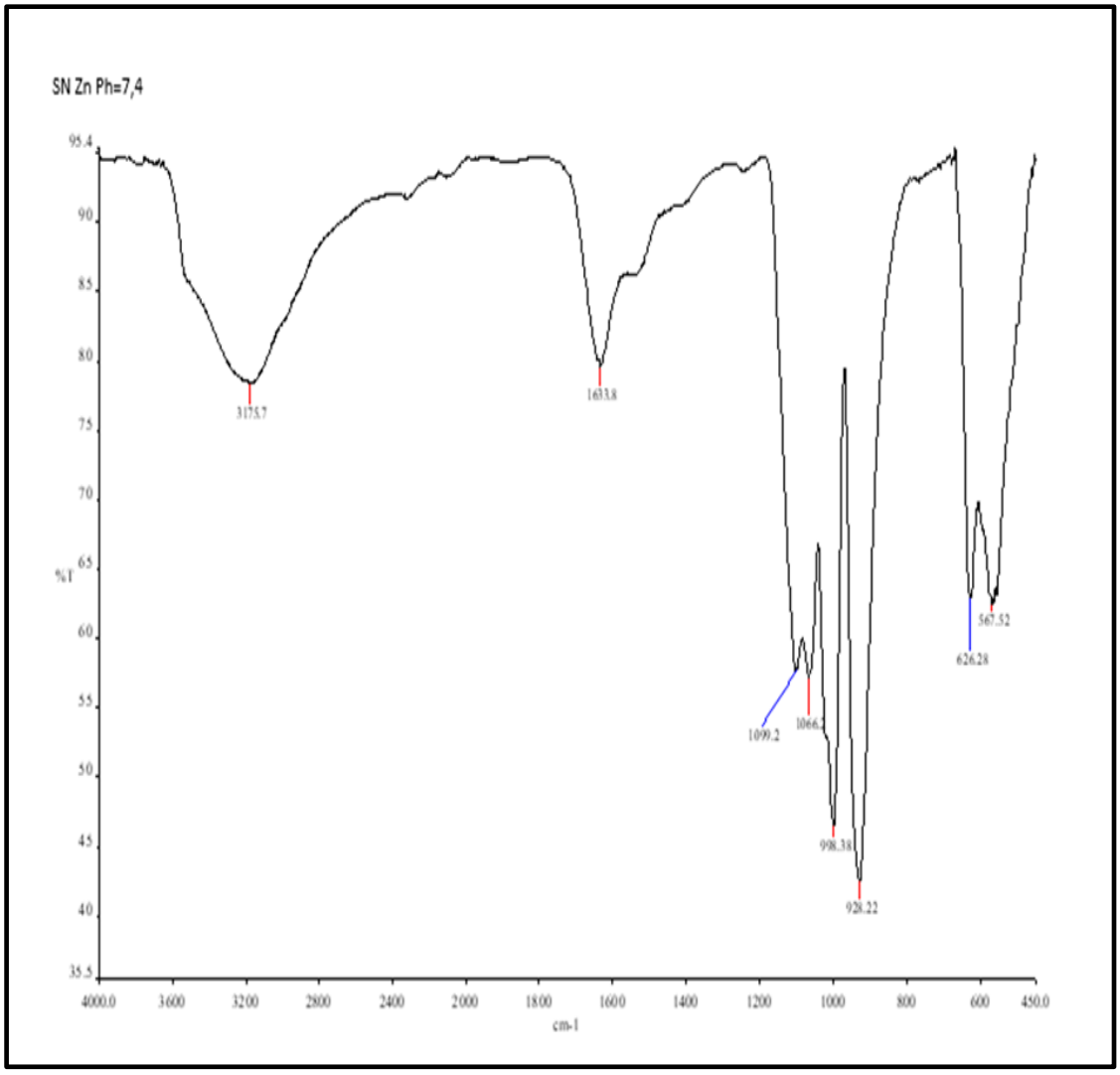
Çizelge 4.3. Sentezlenen çinko nanoçiçeklerinin boyut analizleri

Çinko (Zn) nanoçiçek	Çinko (Zn) Nanoçiçek SEM görüntüsü	Boyutu (~ µm)
SN-ZnNç		~5,29µm
TP-ZnNç		~5,68 µm
iSN-ZnNç		~4,19 µm
iTP-ZnNç		~6,15µm

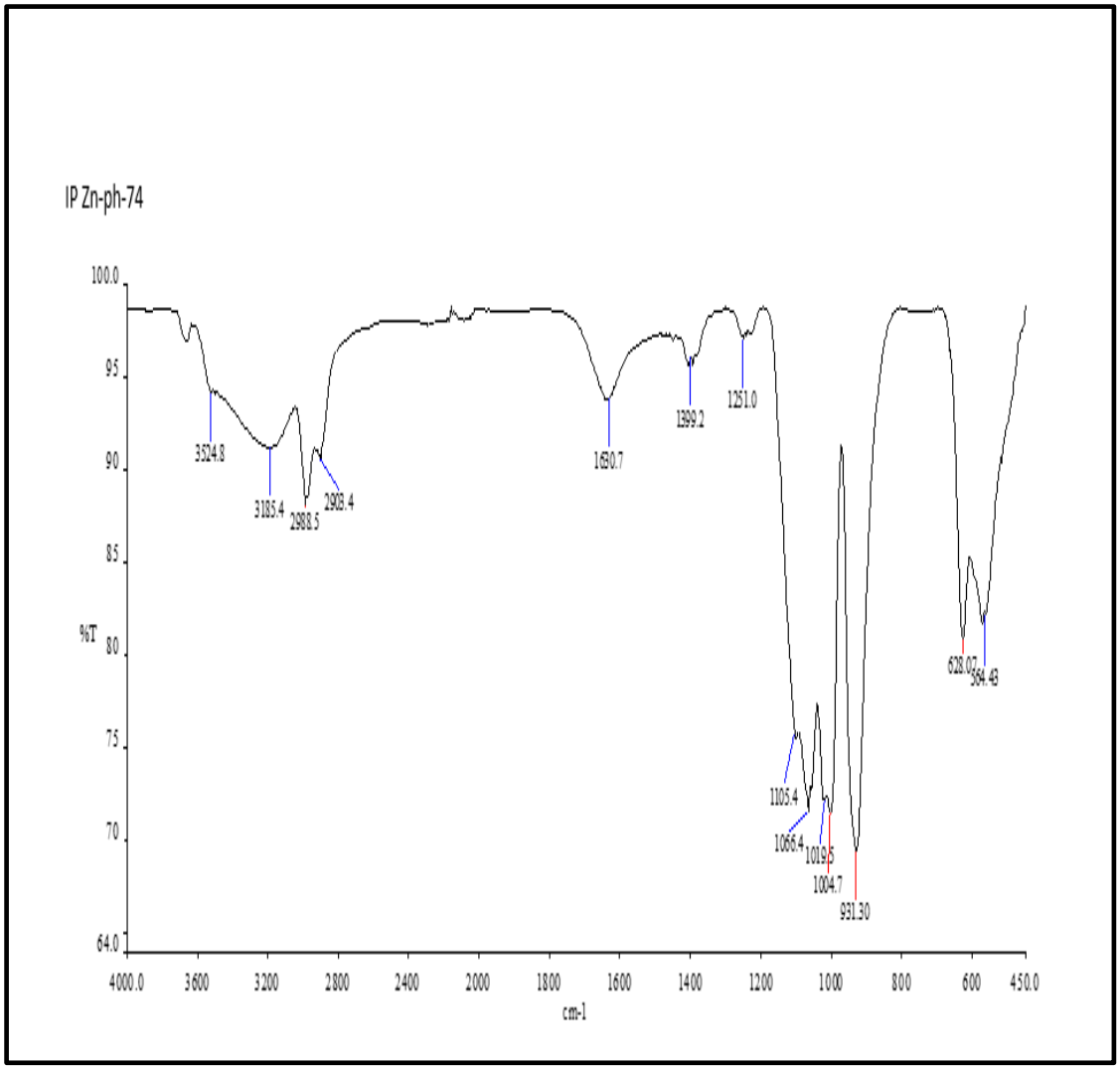
Boyut analizi sonucunda en küçük boyutta çıkan çinko nanoçiçek ~4,19 µm ile iSN-ZnNç'dir.

4.2.2. FT-IR ile karakterizasyon

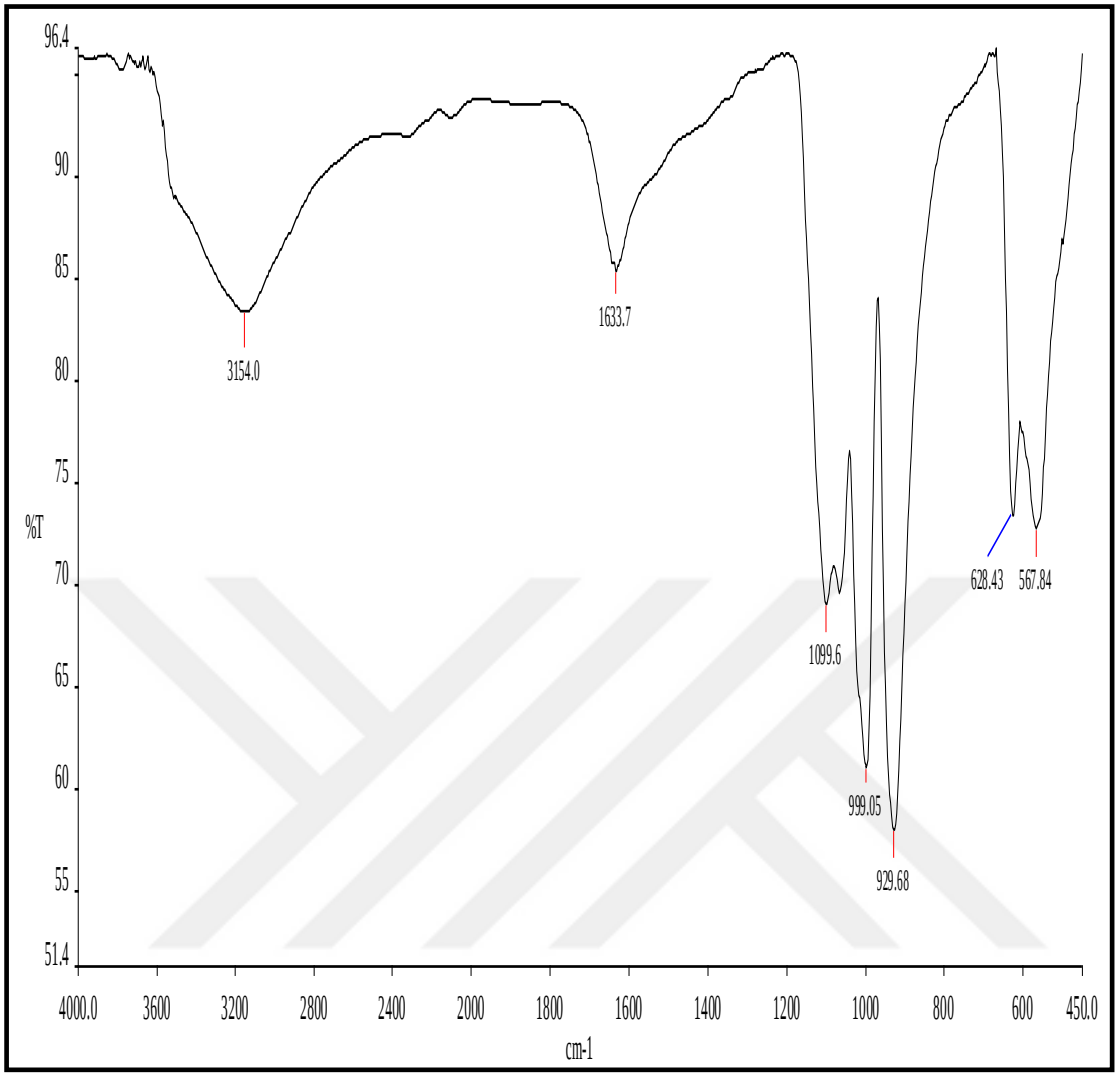
Tez kapsamında sentezlenen çinko hibrit nanoçiçek yapılarından elde edilen FT-IR spektrumları Şekil 4.3. – 4.6. ’lerde verilmektedir. Elde edilen bu spektrumlardan hareketle, sentezlenen çinko hibrit nanoçiçek yapılarının FT-IR spektrumlarına bakıldığında, fosfat grubunun ve proteinlerin sahip olduğu karakteristik bantlar gözlemlenmiştir.



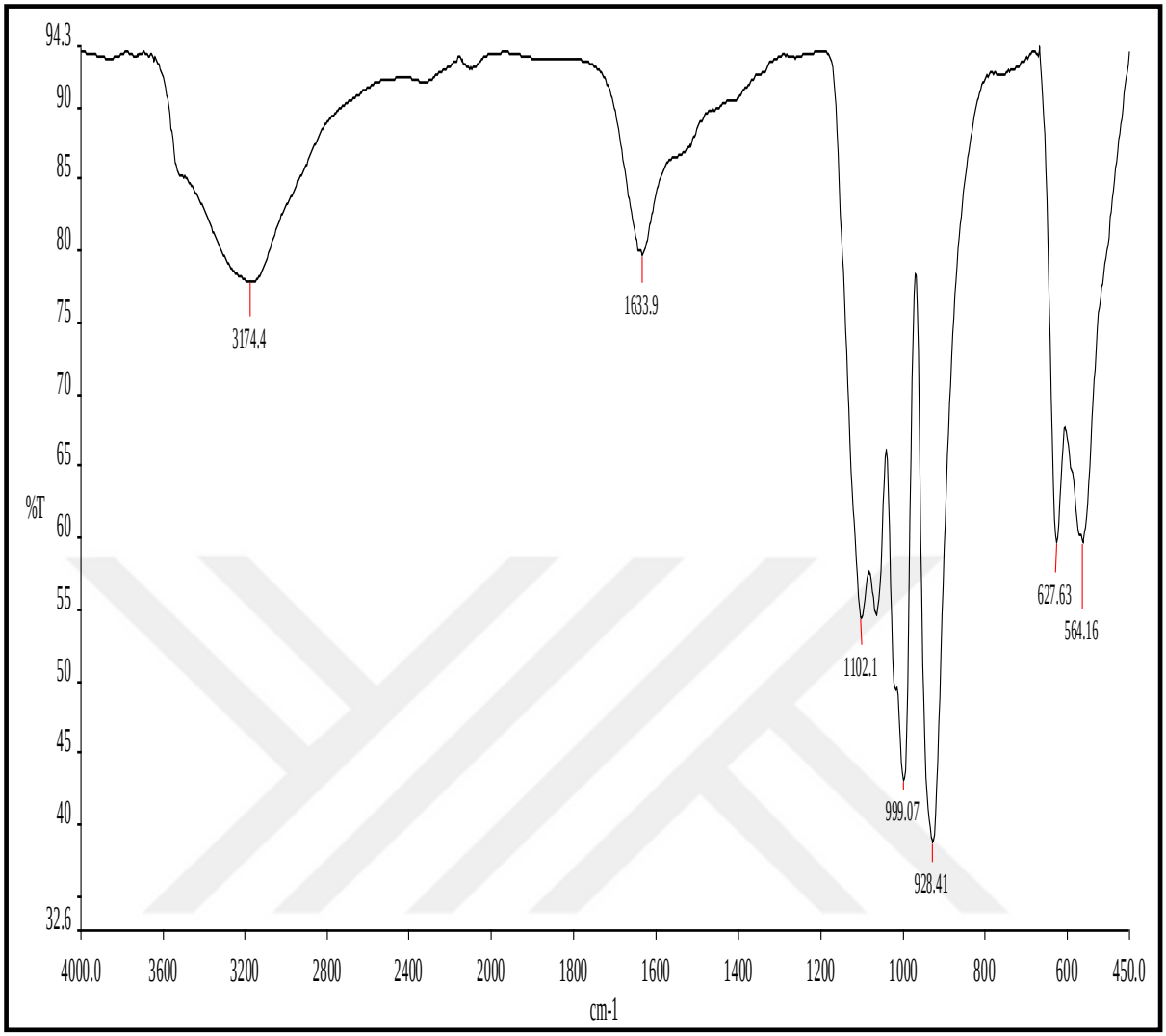
Şekil 4.3. Ticari serisinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları



Şekil 4.4. Ticari ipek proteinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları



Şekil 4.5. İzole serisinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonuçları



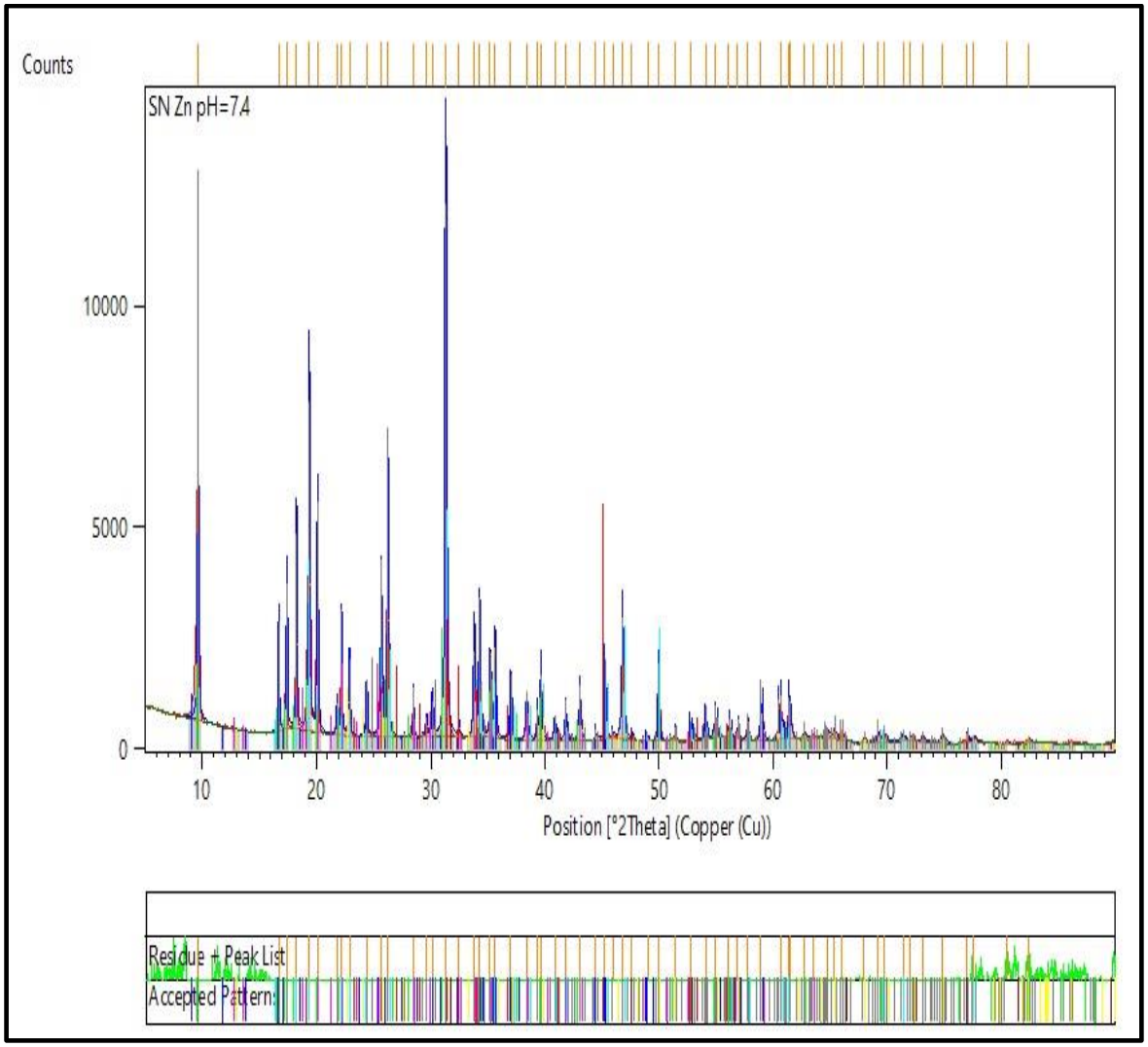
Şekil 4.6. Fibroin içeren total ipek proteinin çinko nanoçiçeğinin FT-IR analiz sonucu

Çinko hibrit nanoçiçek yapılarının içerdiği metal-fosfat kristalleri FT-IR ile karakterize edilmiştir. Spektrumlarda görülen ~564 cm^{-1} ve ~628cm^{-1} 'deki bantlar, O=P=O'e ait karakteristik bükülme titreşimlerini işaret etmektedir. P=O ve P-O gruplarına ait gerilme bantları ise ~1105 ve ~931 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir. Görülen bu karakteristik titreşim bantları sentezlenen hibrit nanoçiçek yapılarındaki metal-fosfat kristallerinin varlığını kanıtlanmıştır. Ayrıca, C=O gerilme titreşimi, N-H bükülme titreşimi ve C-N arasındaki gerilme titreşim (amit I ve II bantları) bantları ~1399 ve ~1633 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Bu karaktersitik bantlar sayesinde, sentezlenen hibrit nanoçiçek yapısındaki protein kısmının varlığı da kanıtlanmıştır.

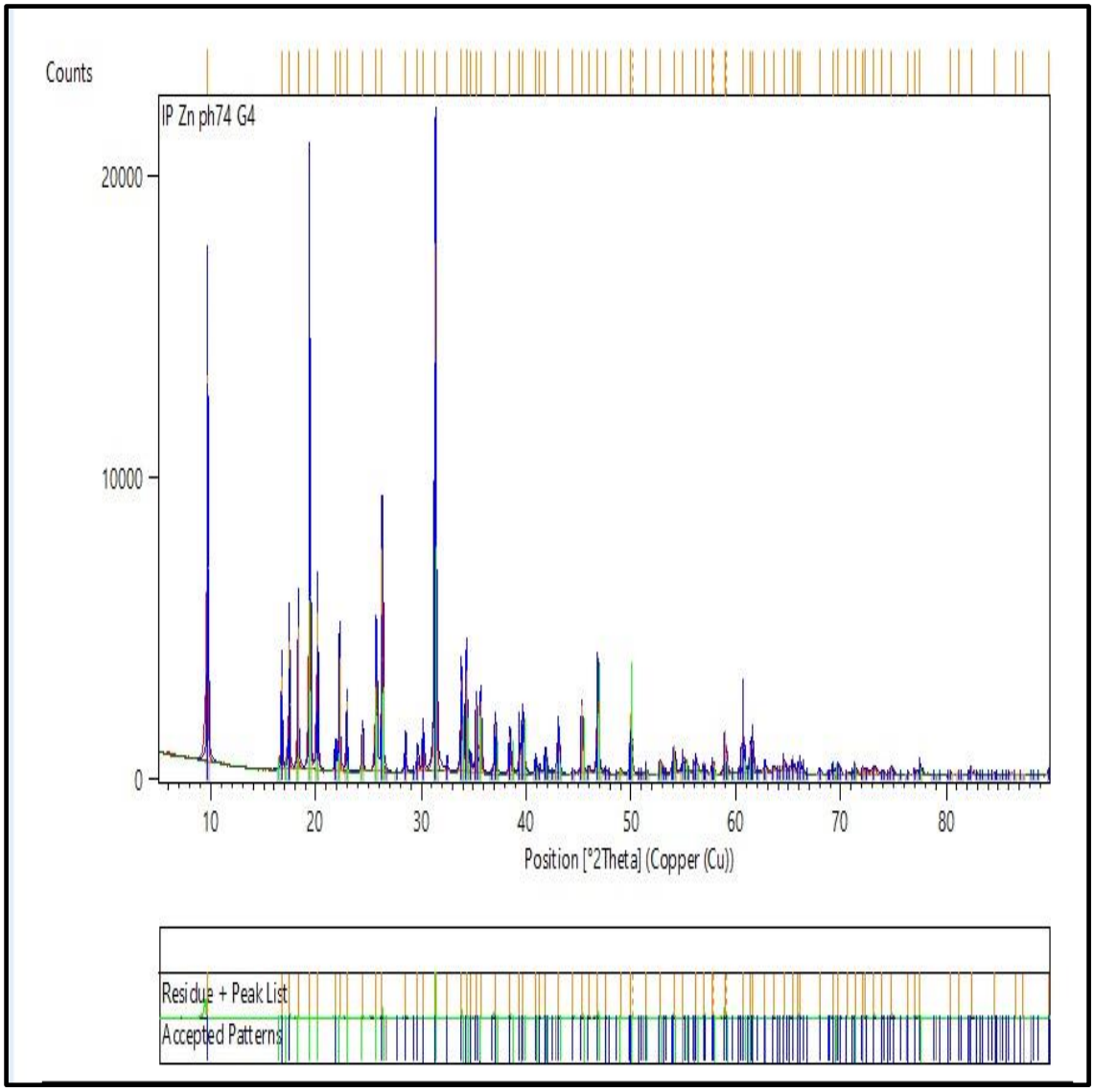
4.2.3. XRD ile karakterizasyon

Sentezlenen çinko hibrit nanoçiçek formlarının kristal yapılarının aydınlatıldığı XRD spektrumları Şekil 4.7 – 4.11 ’larda verilmektedir. Bu sonuçlara göre, elde edilen X- ışını kırınım spektrumlarındaki kırılma tepe noktalarının çakışmalar sonucunda nanoçiçek formlarının kristal bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.

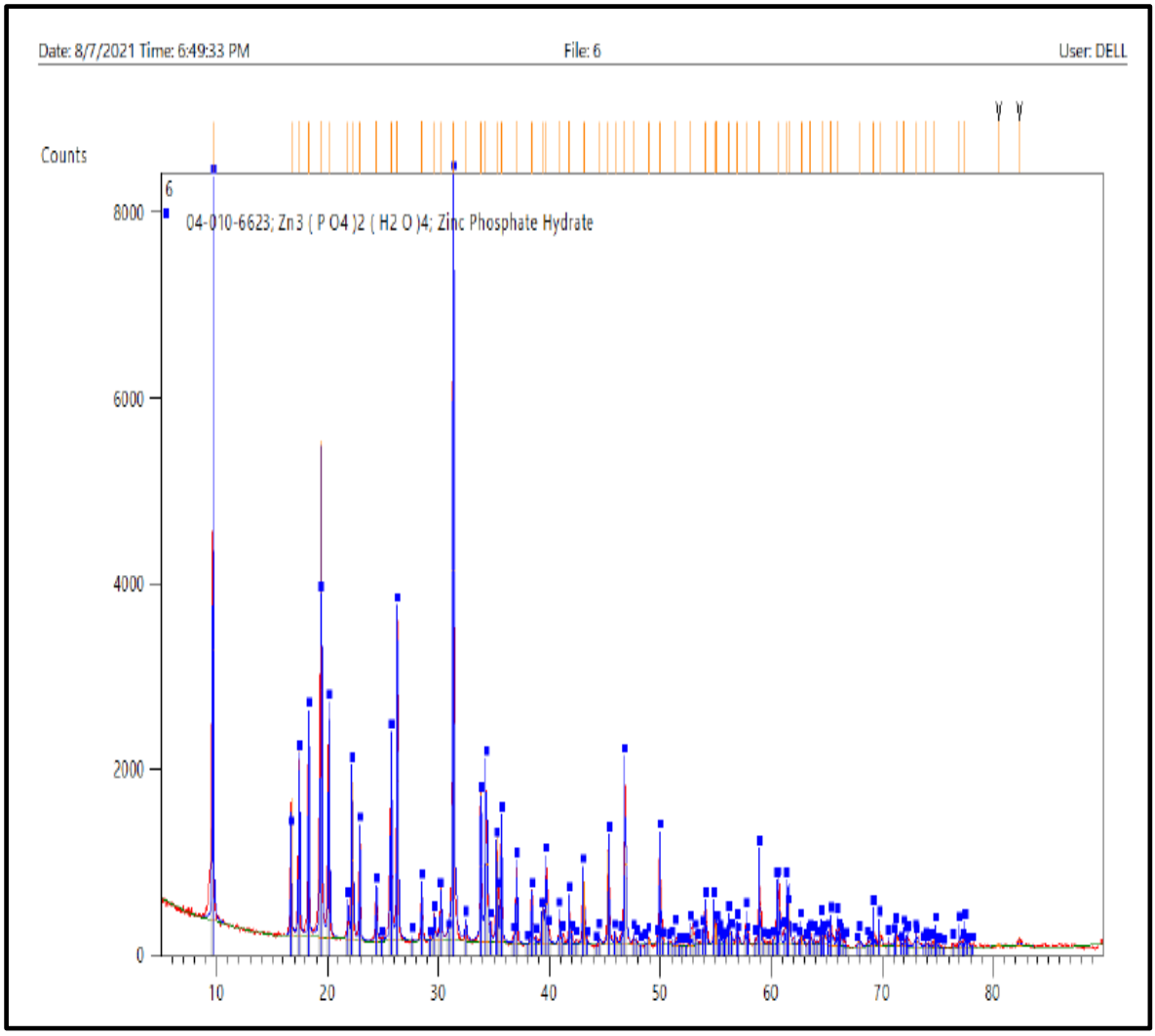
Protein- $Zn_3(PO_4)_2.4H_2O$ (JCPDS card no. 33-1474) kristal yapılarına sahip olduğu ve belirtilen JCPDS standartlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.



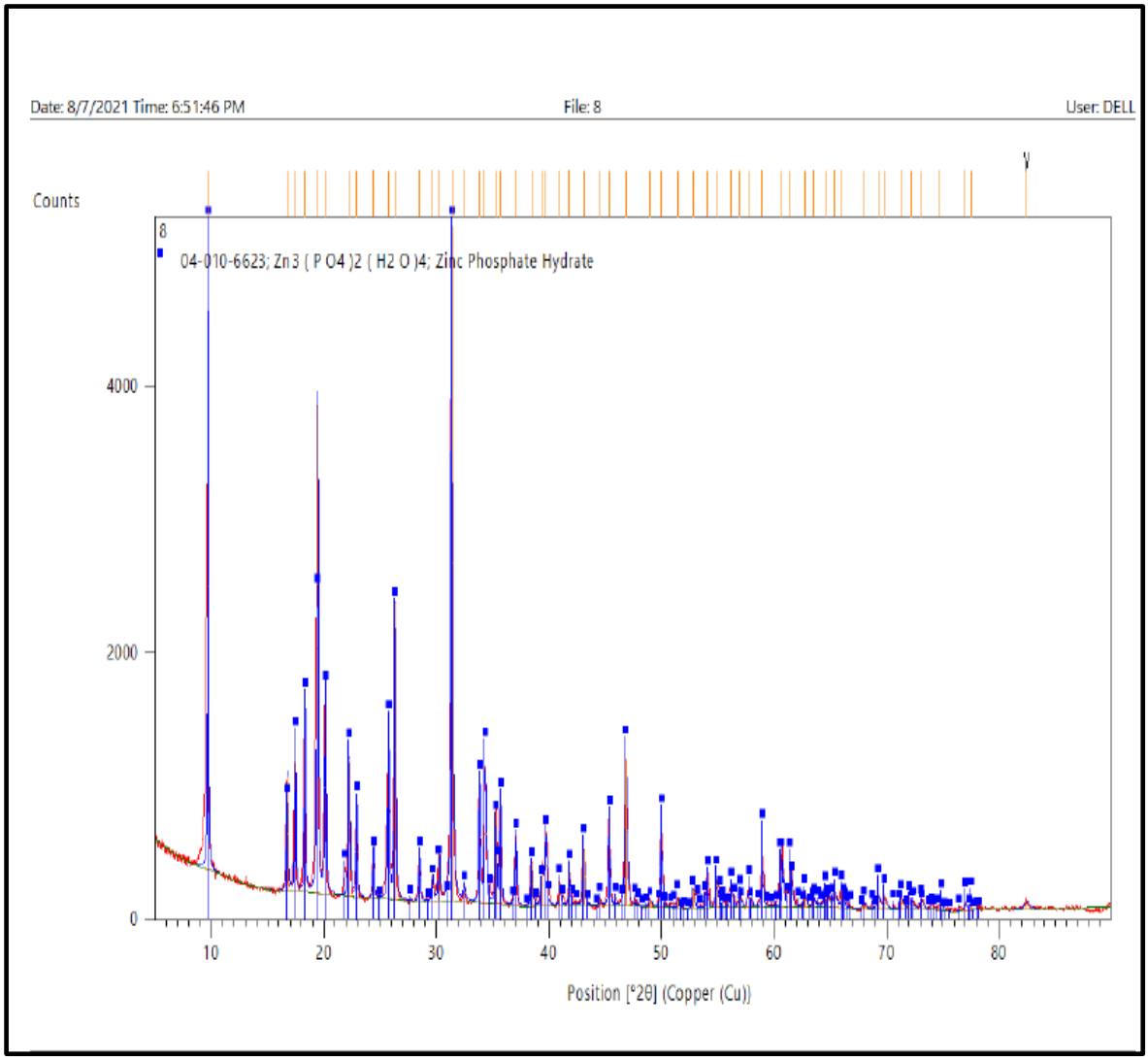
Şekil 4.7. SN-ZnNç’nin XRD analiz sonucu



Şekil 4.8. TP-ZnNç'nin XRD analiz sonucu



Şekil 4.9. iSN-ZnNç'nin XRD analiz sonucu



Şekil 4.10. iTP-ZnNç'nin XRD analiz sonucu

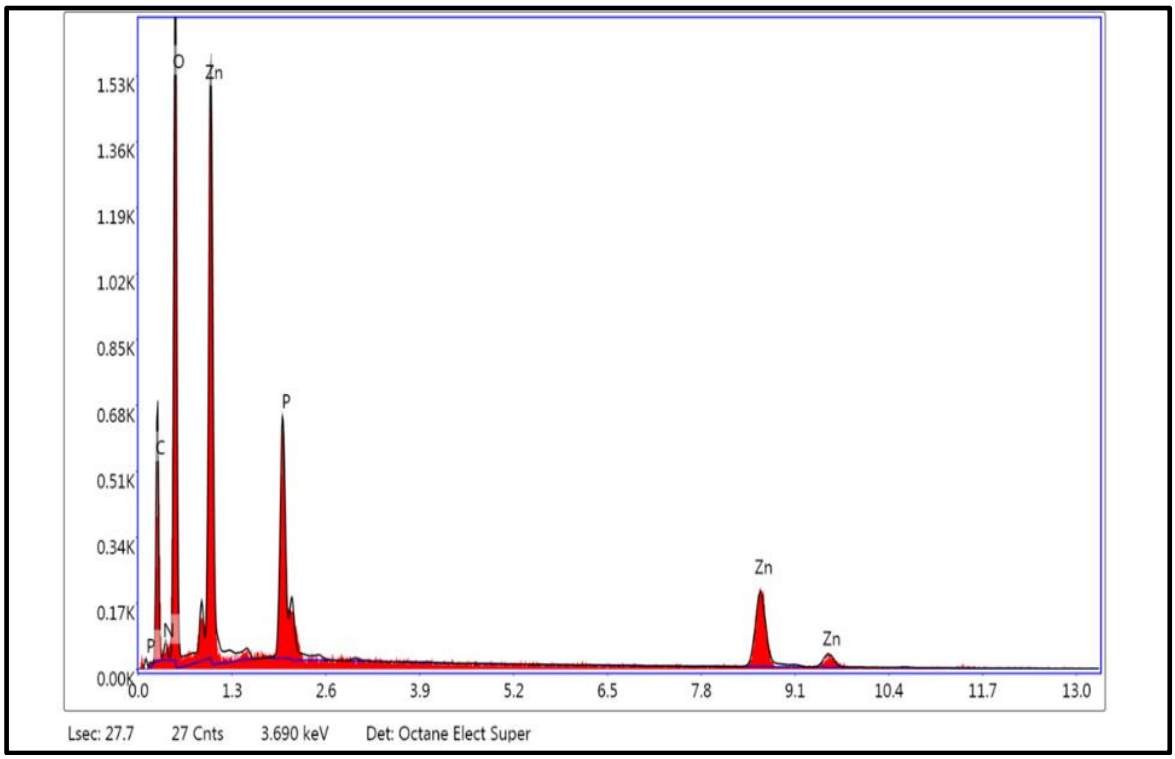
4.2.4. EDX ile Karakterizasyon

Sentezlenen çinko hibrit nanoçiçek yapılarının EDX analizlerine dair spektrumlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sentezde kullanılan metal iyonlarının (Zn), oluşturulan hibrit nanoçiçek yapılarındaki varlığı kanıtlanmıştır. (Çizelge 4.4-4.7; Şekil 4.11– 4.14).

Ayrıca sentezlenen çinko nanoçiçeklerin elementel bileşimi belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. SN-ZnNç'nin elementel analiz sonucu

Element	Ağırlık %	Atomik ağırlık (%)	Net içerik
C K	28,88	41,79	107,24
N K	2,71	3,36	8,66
O K	42,08	45,71	363,13
P K	7,27	4,08	210,07
ZnK	19,07	5,07	129,59

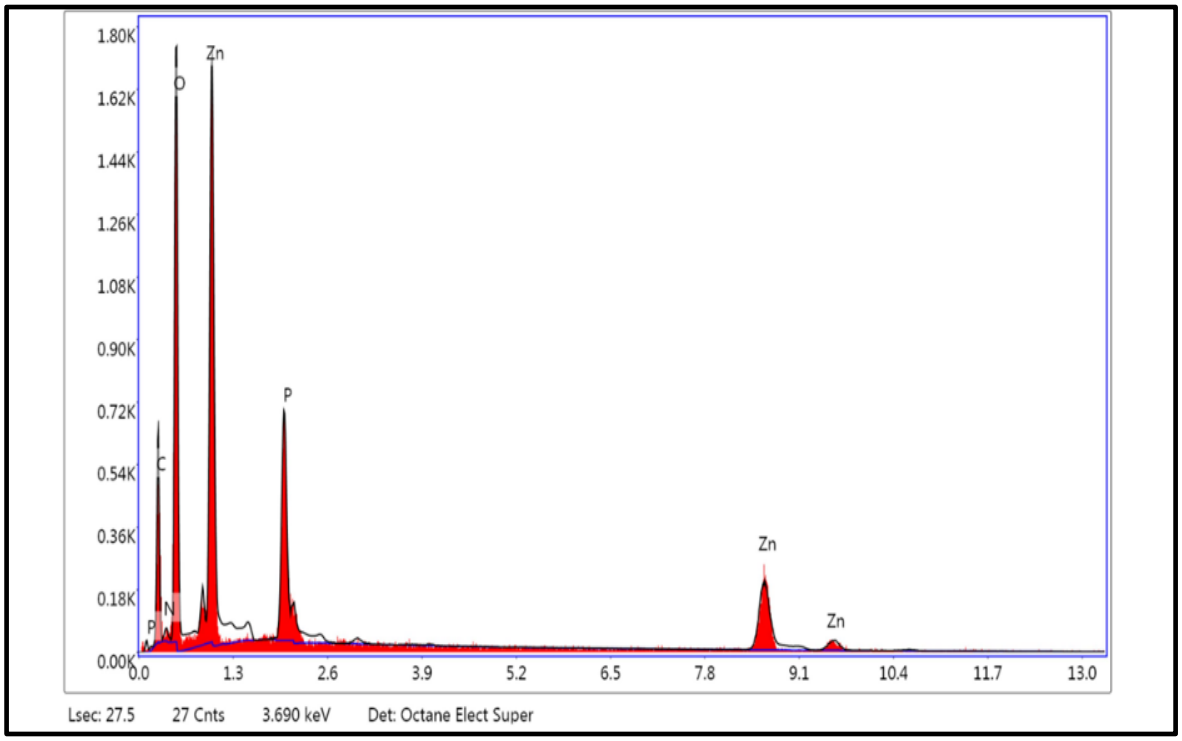


Şekil 4.11. SN-ZnNç'nin EDX analiz sonucu

SN-ZnNç'de bulunan Zn ağırlık ve atomik yüzdeleri sırasıyla %19,07 ve %5,07'dir.

Çizelge 4.5. TP-ZnNç'nin elementel analiz sonucu

Element	Ağırlık (%)	Atomik ağırlık (%)	Net içerik
C K	28,29	41,41	109,17
N K	2,5	3,13	8,59
O K	41,55	45,66	387,68
P K	7,88	4,47	244,18
ZnK	19,79	5,32	145,03

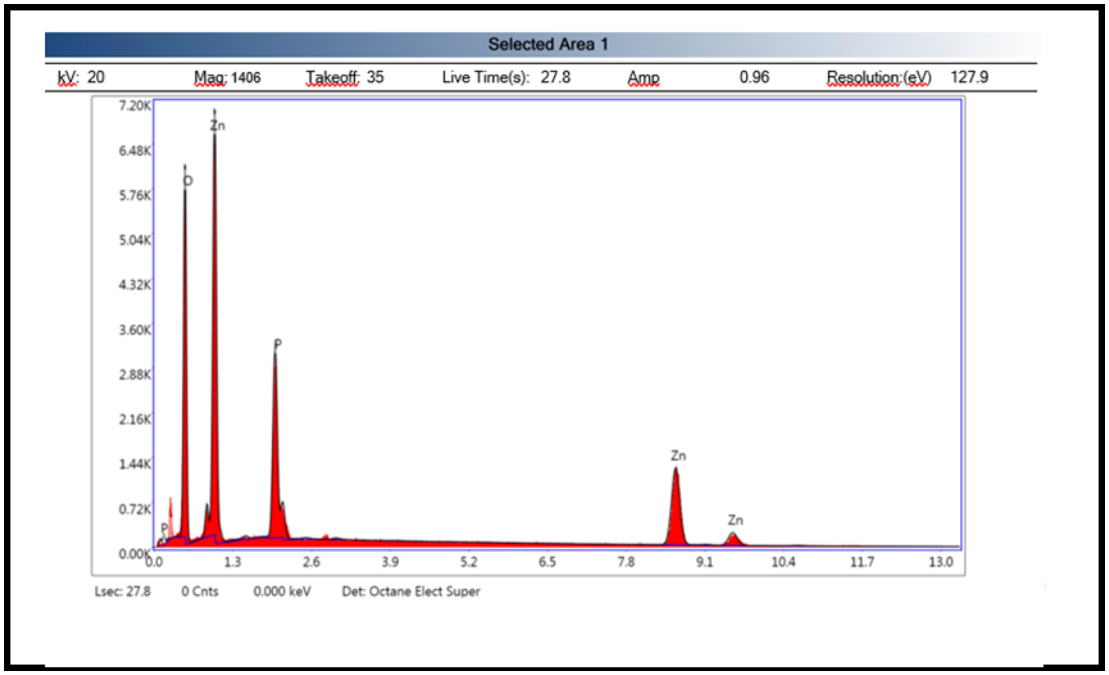


Şekil 4.12. TP-ZnNç'nin EDX analiz sonucu

TP-ZnNç 'de bulunan Zn ağırlık ve atomik yüzdeleri sırasıyla %19,79 ve 5,32'dir.

Çizelge 4.6. iSN- ZnNç'nin elementel analiz sonucu

Element	Ağırlık (%)	Atomik ağırlık (%)	Net içerik
O K	38,13	65,98	1277,2
P K	16,62	14,86	1000,85
ZnK	45,24	19,16	763,96

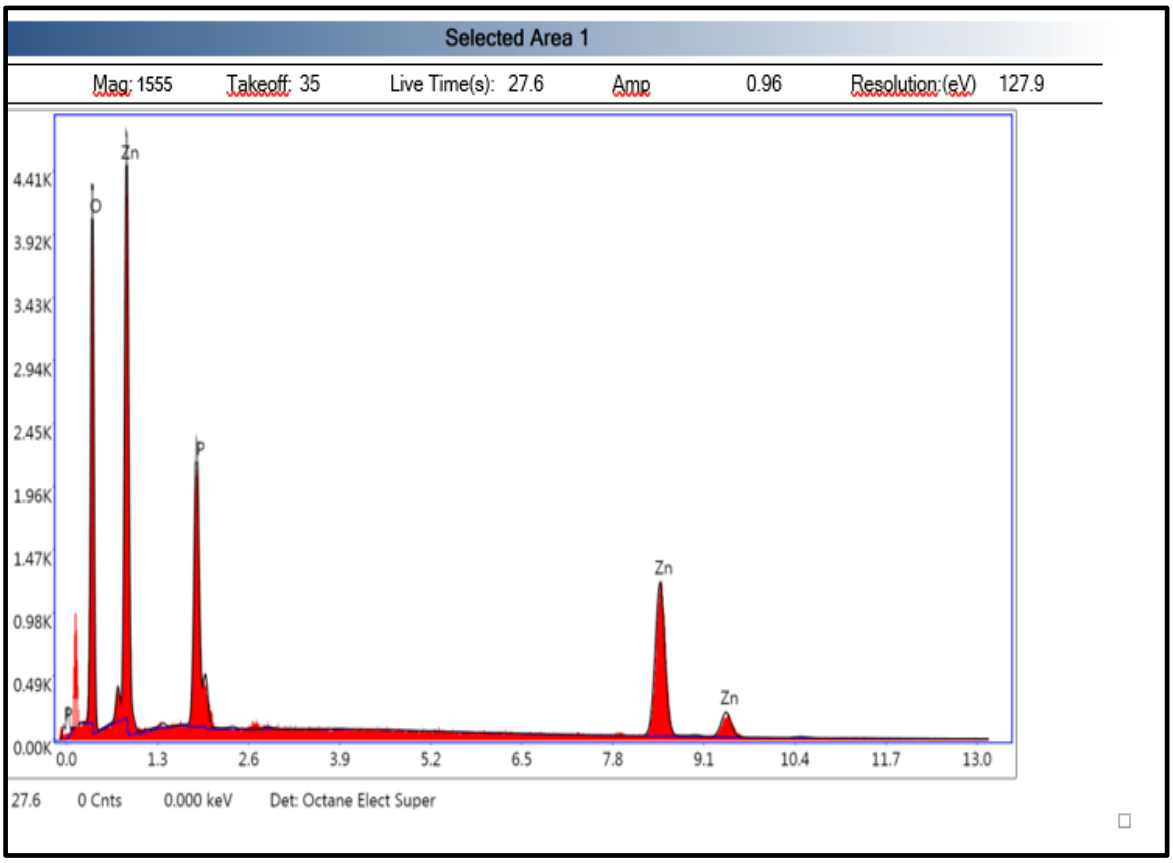


Şekil 4.13. iSN- ZnNç'nin EDX analiz sonucu

iSN- ZnNç'de bulunan Zn ağırlık ve atomik yüzdeleri sırasıyla %45,24 ve %19,16'dır.

Çizelge 4.7. TP-ZnNç'nin elementel analiz sonucu

Element	Ağırlık (%)	Atomik ağırlık (%)	Net içerik
O K	33,12	61,88	906,46
P K	14,86	14,34	724,45
ZnK	52,02	23,78	743,29



Şekil 4.14. TP-ZnNç'nin EDX sonucu

TP-ZnNç'de bulunan Zn ağırlık ve atomik yüzdeleri sırasıyla %52,02 ve %23,78'dir.

4.3. *İn vitro* Aktivite Sonuçları

Bu bölümde izole edilen ve ticari olarak temin edilen ipek proteinler ile bu proteinlerin sentezlenen çinko nanoçiçeklerinin *in vitro* aktivite sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4.3.1.Antioksidan aktivite sonuçları

Hem ticari ipek proteinlerinin hem de izole ipek proteinlerinin DPPH değerleri incelenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin çinko hibrit nanoçiçeklerinin DPPH değerleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Refersans olarak askorbik asit (C vitamini) kullanılmıştır. (Çizelge 4.8, Grafik 4.1)

Çizelge 4.8. Ticari olarak temin edilen proteinlerin ve çinko nanoçiçeklerinin DPPH sonuçları

Protein Adı/ Zn^{2+}Nanoçiçek	**Antioksidan Aktivite (% ± O.S.S.*)**				
	Konsantrasyon				
	0,0625 mg/mL	**0,125 mg/mL**	**0,25 mg/mL**	**0,5 mg/mL**	**1 mg/mL**
TP	50,58±0,006	50,59±0,68	50,73±0,47	51,02±0,24	52,90±0,11
TP-ZnNç	55,57±0,23	55,71±0,45	56,89±0,005	60,41±0,34	66,47±0,22
SN	52,12±0,98	52,07±0,68	53,289±0,76	54,95±0,46	58,94±0,35
SN-ZnNç	62,34±0,71	63,12±0,007	65,12±0,012	66,12±0,03	67,12±0,008
iTP	45,05±0,23	48,04±1,46	50,23±2,35	52,67±1,32	55,39±0,08
iTP-ZnNç	51,09±0,90	53,76±0,006	59,98±0,67	64±1,23	67±0,78
iSN	25,54±0,04	50,06±0,38	58,47±2,78	60,08±1,08	62±0,29
iSN-Zn Nç	34,00±1,25	57,02±0,97	65,75±1,34	68,39±0,089	72,23±0,09
C vitamini	92,96±0,034	93,15±0,002	93,54±0,006	94,62±0,005	96,57±0,003

*: *Ortalama Standart Sapma*

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

SN: Ticari serisin

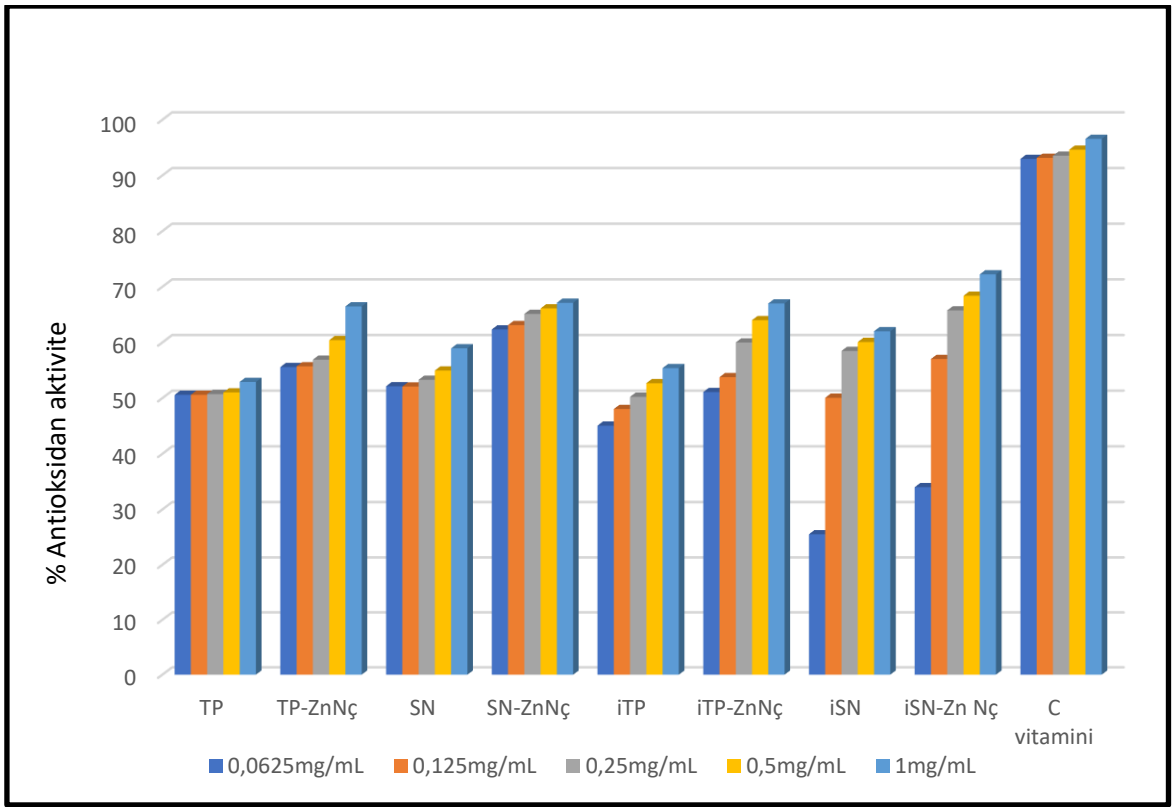
SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği

iTP: İzole ipek total proteini

iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

iSN: İzole serisin

iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği



Grafik 4.1. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %antioksidan değerleri

Tez kapsamında konsantrasyona bağlı %antioksidan aktivite incelendiğinde hem ticari hem de izole edilen proteinlerin çinko nanoçiçeklerinde radikal süpürücü etkinin arttığı gözlemlenmiştir.

4.3.2. Hyaluronidaz enzim inhibisyon sonuçları

Hem ticari ipek proteinlerinin hem de izole ipek proteinlerinin hyaluronidaz enzim inhibisyon değerleri incelenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin çinko hibrit nanoçiçeklerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Referans olarak tannik asit kullanılmıştır (Çizelge 4.9, Grafik 4.2).

Çizelge 4.9. Hyaluronidaz enzim inhibisyon sonuçları

Protein Adı/ Zn^{2+} Nanoçiçek	**Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon ± O.S.S.*)**				
	Konsantrasyon				
	0,0625 mg/mL	**0,125 mg/mL**	**0,25 mg/mL**	**0,5 mg/mL**	**1 mg/mL**
TP	21,05±0,05	28,57±0,001	46,42±0,002	50,00±0,00	51,61±0,001
TP-ZnNç	24,78±0,002	40,00±0,001	59,45±0,004	59,45±0,005	92,38±0,09
SN	21,05±0,011	34,78±0,011	48,27±0,002	54,54±0,001	55,88±0,003
SN-ZnNç	23,07±0,003	35,24±0,002	50,00±0,001	56,52±0,95	56,52±0,007
iTP	39,09±0,03	56,08±0,007	62,09±0,003	65,12±0,27	76,89±1,23
iTP-ZnNç	45,06±0,45	59,00±0,24	67,02±0,008	73,67±0,007	93,37±0,98
iSN	38,09±0,01	67,56±0,97	78,23±0,50	84,06±0,45	87,50±0,00
iSN-Zn Nç	49,07±0,09	76,02±0,87	89,27±0,90	97,34±0,97	98,78±0,74
Tannik asit	77,43±3,58	84,21±2,22	88,82±1,08	92,61±0,561	97,12±0,02

*: *Ortalama Standart Sapma*

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

SN: Ticari serisin

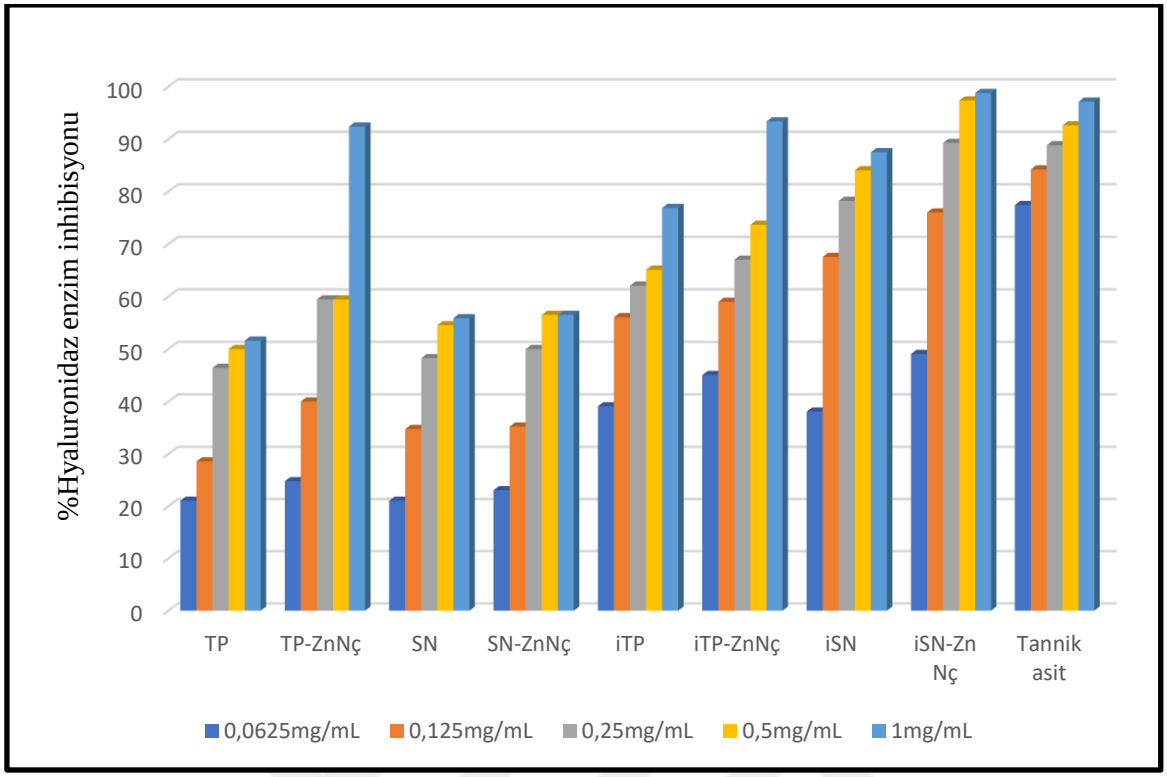
SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği

iTP: İzole ipek total proteini

iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

iSN: İzole serisin

iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği



Grafik 4.2. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %hyaluronidaz enzim inhibisyon değerleri

Tez kapsamında konsantrasyona bağlı %hyaluronidaz enzim inhibisyonu incelendiğinde hem ticari hem de izole edilen proteinlerin çinko nanoçiçeklerinin enzim inhibisyonunda artış gözlemlenmiştir.

4.3.3. Tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları

Hem ticari ipek proteinlerinin hem de izole ipek proteinlerinin tirozinaz enzim inhibisyon değerleri incelenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin çinko hibrit nanoçiçeklerinin tirozinaz enzim inhibisyon değerleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Referans olarak kojik asit kullanılmıştır. (Çizelge 4.10, Grafik 4.3)

Çizelge 4.10. Tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları

Protein Adı/ Zn^{2+}Nanoçiçek	**Tirozinaz Enzim İnhibisyonu (% İnhibisyon ± O.S.S.*)**				
	Konsantrasyon				
	50 µg/mL	**125 µg/mL**	**250 µg/mL**	**500 µg/mL**	**1000 µg/mL**
TP	34,90±0,002	47,45±1,23	52,90±0,08	65,97±0,89	67,78±0,00
TP-ZnNç	45,34±0,12	54,32±0,34	57,84±0,001	67,82±2,21	73,07±0,98
SN	23,39±0,005	44,21±0,008	55,76±0,007	64,23±0,22	75,89±0,005
SN-ZnNç	39,98±0,02	55,23±0,23	68,08±0,08	72,21±0,56	86,90±0,03
iTP	43,56±0,002	56,26±0,12	67,01±0,007	69,67±0,002	80,67±0,008
iTP-ZnNç	58,67±0,01	62,67±0,002	72,05±0,002	74,09±0,001	87,90±0,002
iSN	37,45±0,02	50,24±0,005	59,23±0,00	67,36±0,21	74,55±0,05
iSN-Zn Nç	45,54±0,008	56,13±0,009	67,43±0,1	77,32±0,004	85,44±0,01
Kojik asit	69,70±0,04	81,71±0,001	84,92±0,002	85,97±0,003	90,02±0,0005

*: *Ortalama Standart Sapma*

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

SN: Ticari serisin

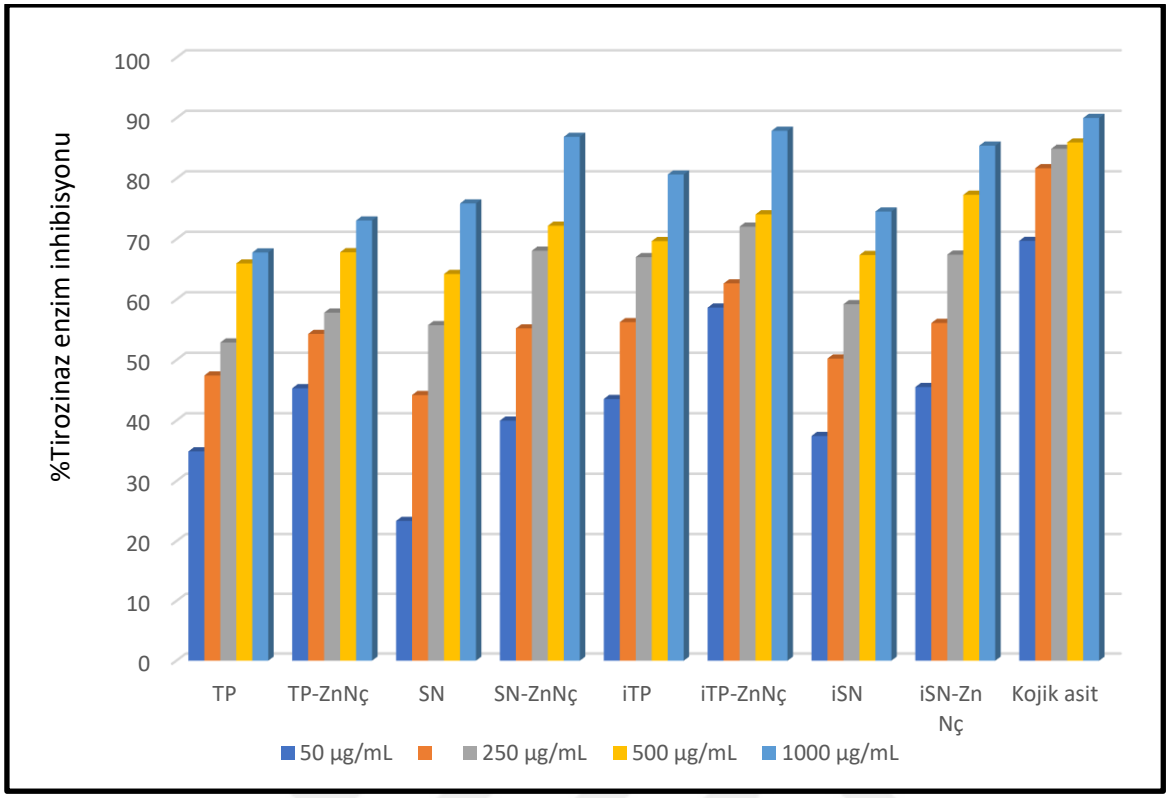
SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği

iTP: İzole ipek total proteini

iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

iSN: İzole serisin

iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği



Grafik 4.3. Konsantrasyonlara göre ipek proteinlerinin ve çinko nanoçiçeklerinin %tirozinaz enzim inhibisyonu değerleri

Tez kapsamında konsantrasyona bağlı %tirozinaz enzim inhibisyonu incelendiğinde hem ticari hem de izole edilen proteinlerin çinko nanoçiçeklerinin enzim inhibisyonunda artış gözlemlenmiştir.

4.3.4. Güneş koruyucu aktivite sonuçları

Hem ticari ipek proteinlerinin hem de izole ipek proteinlerinin güneş koruyucu aktivite değerleri incelenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin çinko hibrit nanoçiçeklerinin güneş koruyucu değerleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Referans olarak ipek proteinli güneş kremi kullanılmıştır. Detaylı bilgiler aşağıda yer almaktadır. (Resim 4.1-4.22, Şekil 4.15-4.25, Çizelge 4.11-4.12, Grafik 4.4.)

1 nolu numune

Negatif Kontrol (Hiçbir şey uygulanmayan baz krem) SPF değeri 1,27±0,02 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,282'dir.

Resim 4.1. 1 nolu numune / Negatif Kontrol (Baz krem)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Negatif Kontrol (Hiçbir şey uygulanmayacak, baz krem)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: BS
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 19.08.2021 16:13:15
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	1,27	92,71%	76,08%	355,08
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,282

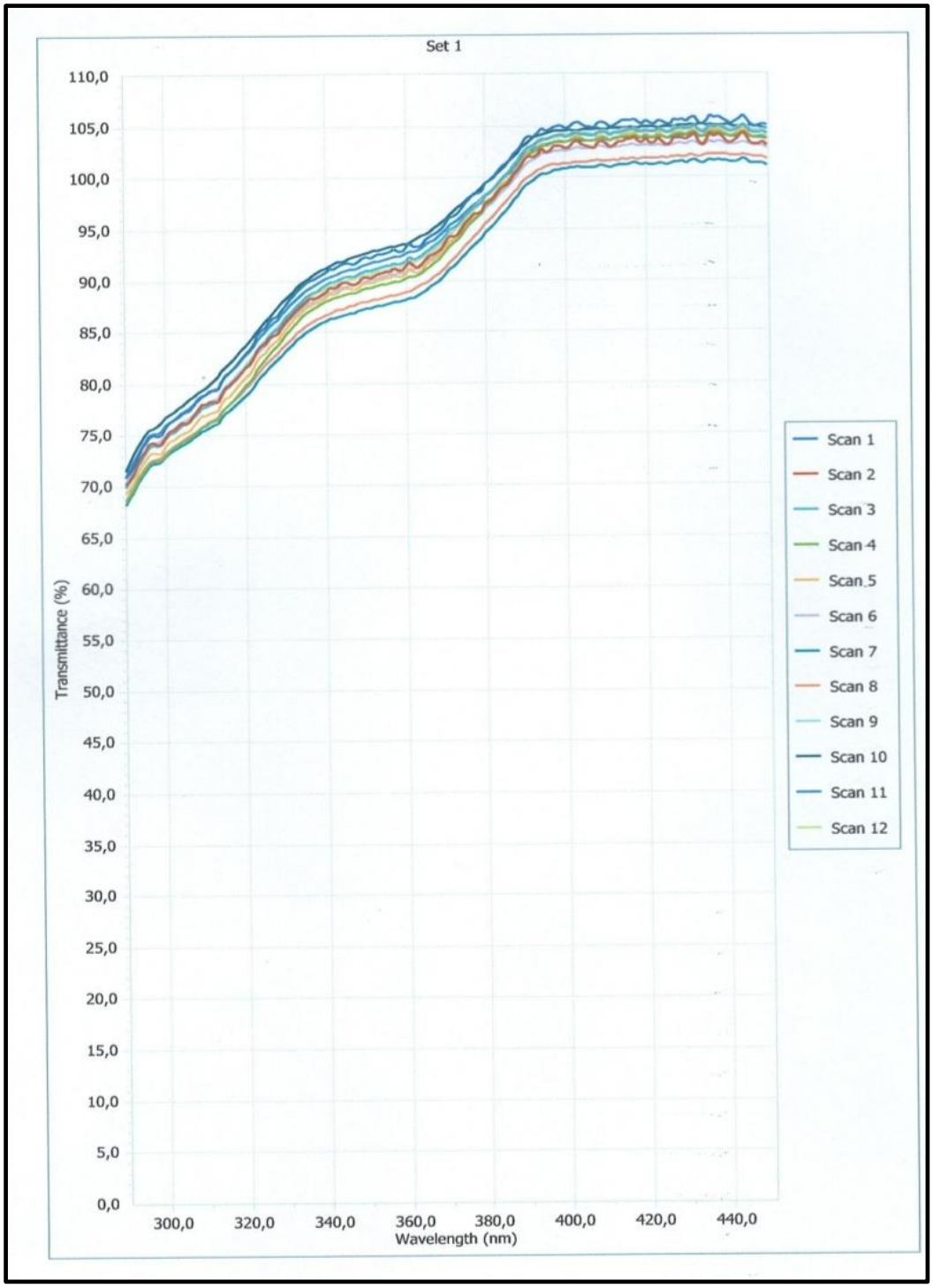
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	1,27	92,71%	76,08%	355,08
STD:	0,02	1,46%	1,23%	4,96
COV:	1,64%	1,58%	1,62%	1,40%

UVA/UVB Ratio: 0,282

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	1,25	348
Scan 2	1,27	356
Scan 3	1,27	353
Scan 4	1,30	357
Scan 5	1,28	356
Scan 6	1,27	358
Scan 7	1,31	364
Scan 8	1,30	362
Scan 9	1,26	353
Scan 10	1,24	347
Scan 11	1,25	353
Scan 12	1,27	354

Resim 4.2. 1 nolu numunenin analiz sonuçları

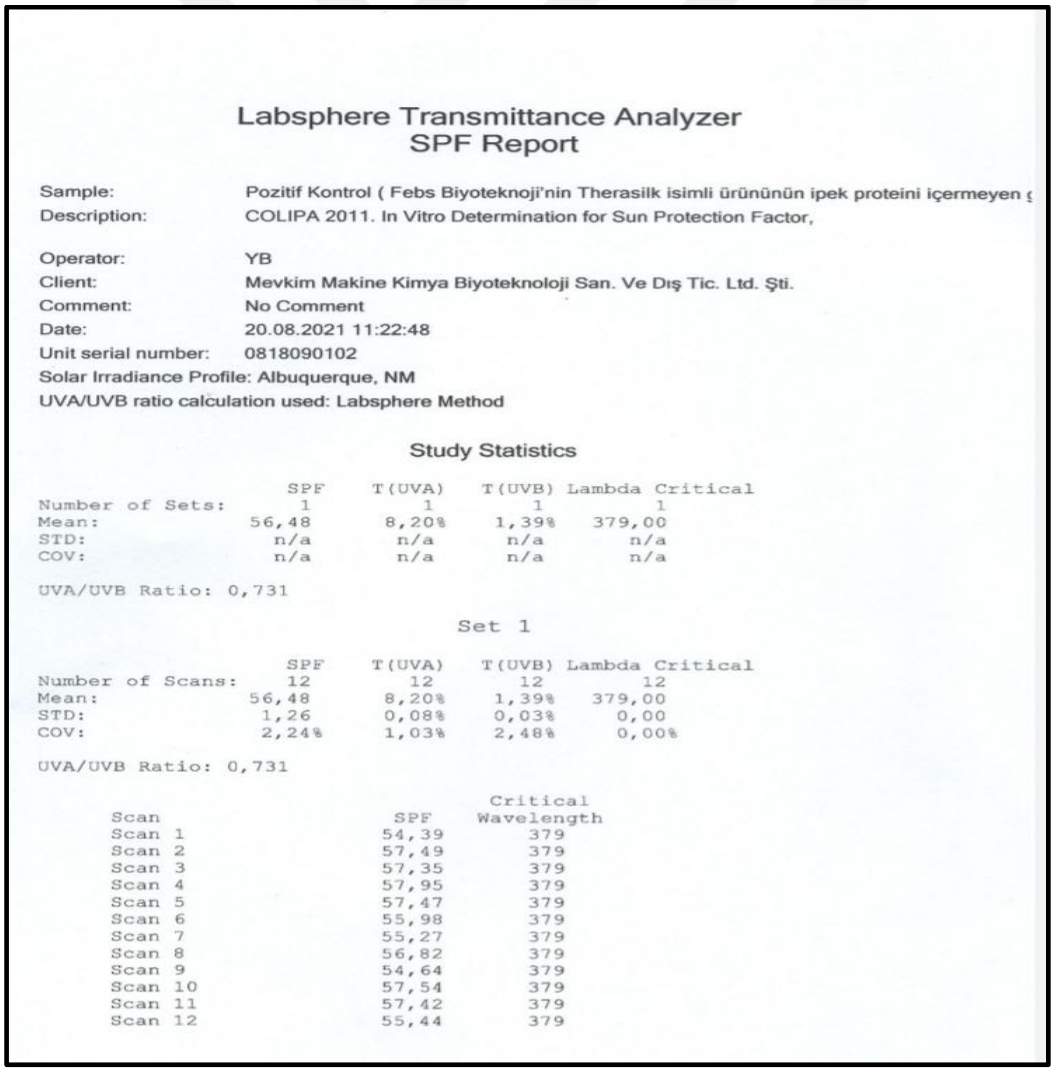


Şekil 4.15. 1 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

2 nolu numune

Pozitif Kontrol (Therasilk isimli ürünün ipek proteini içermeyen güneş kremi) SPF değeri 56,48±1,26 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,731'dir.

Resim 4.3. 2 nolu numune / Pozitif Kontrol (Therasilk isimli ürününün ipek proteini içermeyen güneş kremi



Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Pozitif Kontrol (Febs Biyoteknoji'nin Therasilk isimli ürününün ipek proteini içermeyen ş
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 11:22:48
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	56,48	8,20%	1,39%	379,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,731

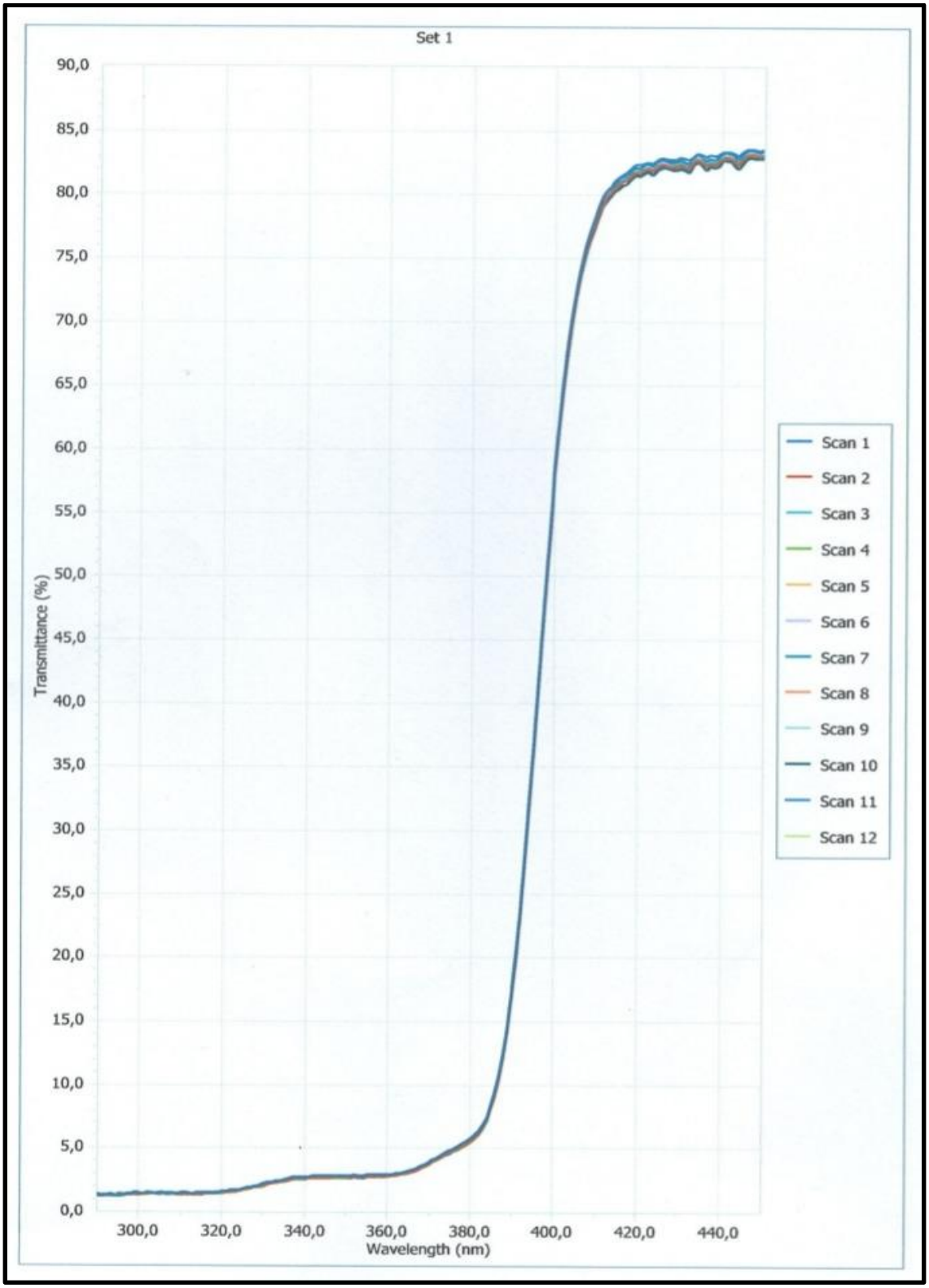
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	56,48	8,20%	1,39%	379,00
STD:	1,26	0,08%	0,03%	0,00
COV:	2,24%	1,03%	2,48%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,731

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	54,39	379
Scan 2	57,49	379
Scan 3	57,35	379
Scan 4	57,95	379
Scan 5	57,47	379
Scan 6	55,98	379
Scan 7	55,27	379
Scan 8	56,82	379
Scan 9	54,64	379
Scan 10	57,54	379
Scan 11	57,42	379
Scan 12	55,44	379

Resim 4.4. 2 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.16. 2 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

3 nolu numune

Referans Madde (Therasilk güneş kremi %1 lik) SPF değeri 61,06±0,82 olarak belirlenmiştir. UVA/UVB değeri 0,763'dür.

Resim 4.5. 3 nolu numune: Referans Madde (Therasilk güneş kremi %1 lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Referans Madde (Febs Biyoteknoji'nin Therasilk güneş kremi %1 lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 11:22:48
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	61,07	6,64%	1,33%	380,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,763

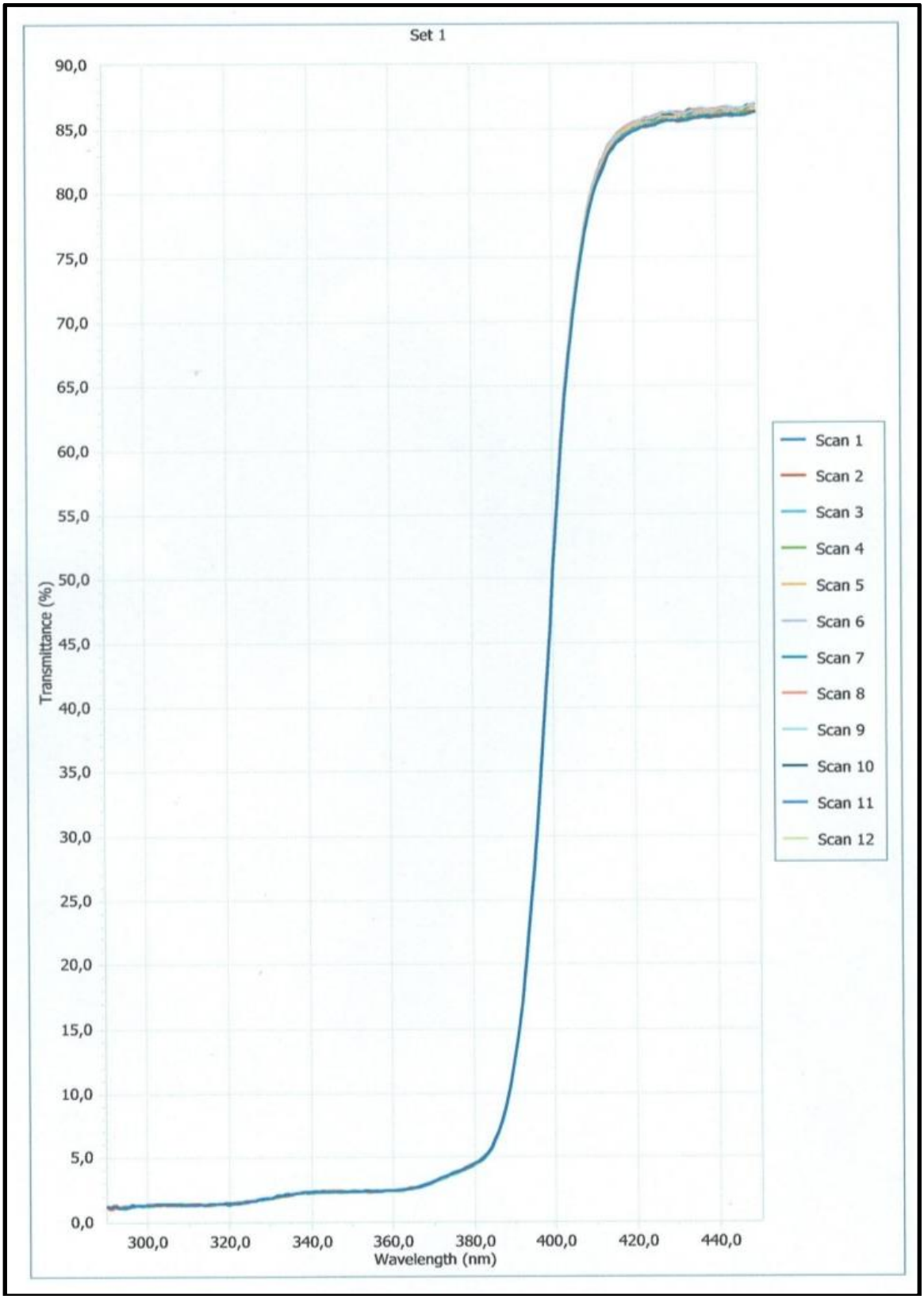
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	61,07	6,64%	1,33%	380,00
STD:	0,83	0,05%	0,02%	0,00
COV:	1,36%	0,70%	1,66%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,763

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	61,15	380
Scan 2	61,39	380
Scan 3	60,78	380
Scan 4	61,00	380
Scan 5	61,60	380
Scan 6	60,34	380
Scan 7	61,60	380
Scan 8	59,70	380
Scan 9	60,05	380
Scan 10	61,09	380
Scan 11	61,19	380
Scan 12	62,90	380

Resim 4.6. 3 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.17. 3 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

4 nolu numune

Total ipek proteini + Güneş kremi (%1'lik) SPF değeri 77,98±3,31 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,742'dir.

Resim 4.7. 4 nolu numune /Total ipek proteini + Güneş kremi (%1'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Total ipek proteini + Güneş kremi (%1'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 13:21:03
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	77,98	6,59%	0,98%	379,67
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,742

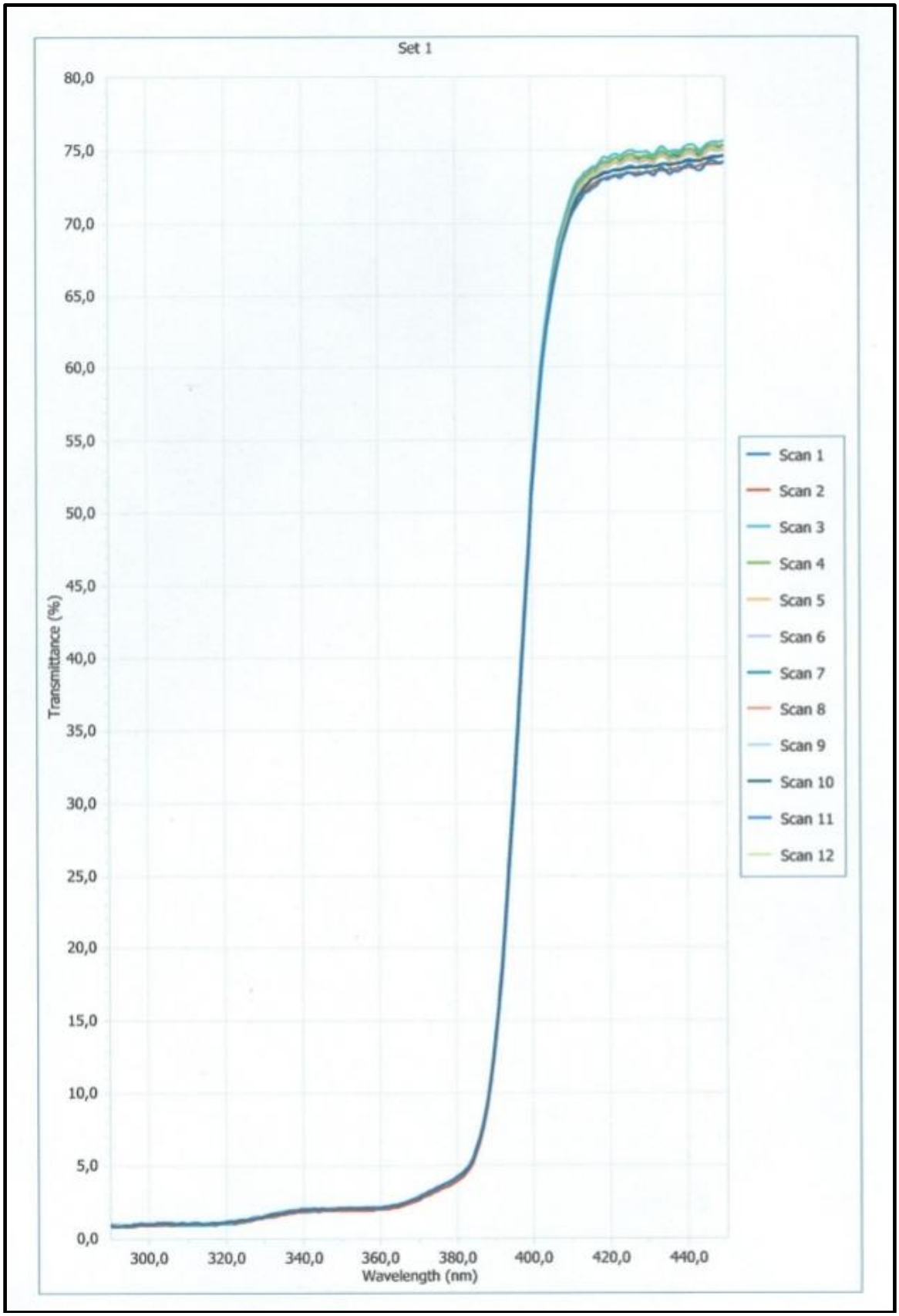
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	77,98	6,59%	0,98%	379,67
STD:	3,32	0,10%	0,05%	0,49
COV:	4,26%	1,59%	5,21%	0,13%

UVA/UVB Ratio: 0,742

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	74,93	380
Scan 2	81,02	380
Scan 3	81,83	379
Scan 4	82,72	379
Scan 5	78,15	379
Scan 6	74,52	380
Scan 7	79,94	379
Scan 8	75,48	380
Scan 9	72,31	380
Scan 10	77,82	380
Scan 11	80,82	380
Scan 12	76,23	380

Resim 4.8. 4 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.18. 4 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

5 nolu numune

Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%1'lik) SPF değeri 26,65±0,77 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,746'dır.

Resim 4.9. 5 nolu numune/ Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%1'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Total ipek proteini Zn Nanoçiçek +Güneş kremi (%1'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 13:25:28
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	26,65	11,90%	3,24%	379,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,746

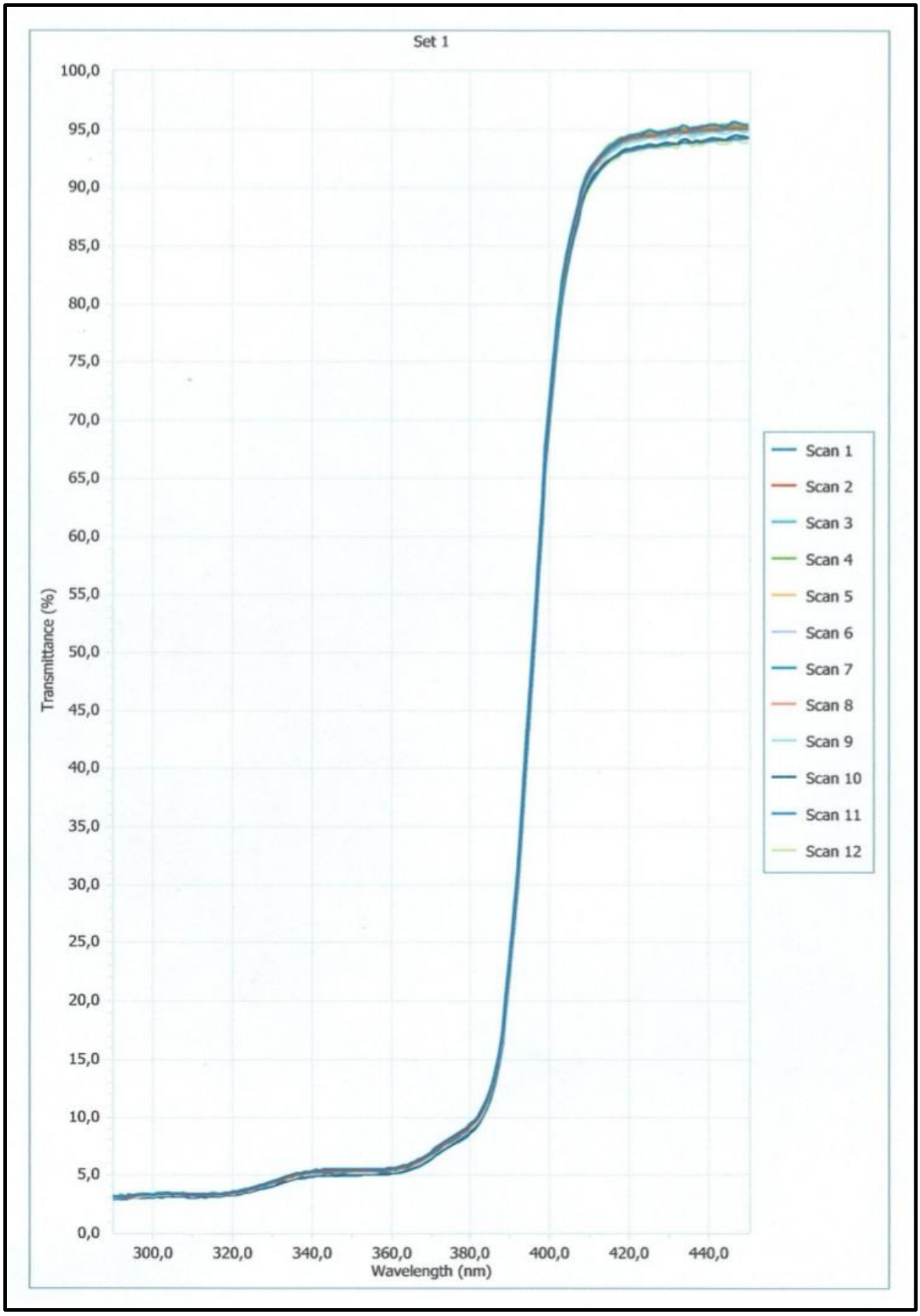
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	26,65	11,90%	3,24%	379,00
STD:	0,77	0,24%	0,09%	0,00
COV:	2,90%	2,02%	2,90%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,746

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	25,72	379
Scan 2	26,30	379
Scan 3	26,21	379
Scan 4	25,62	379
Scan 5	26,34	379
Scan 6	26,46	379
Scan 7	26,56	379
Scan 8	26,32	379
Scan 9	26,93	379
Scan 10	27,69	379
Scan 11	27,96	379
Scan 12	27,74	379

Resim 4.10. 5 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.19. 5 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

6 nolu numune

Serisin + Güneş kremi (%1'lik) SPF değeri 76,88±1,20 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,716'dır.

Resim 4.11. 6 nolu numune: Serisin + Güneş kremi (%1'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Serisin + Güneş kremi (%1'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 14:01:48
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	76,88	6,95%	0,95%	379,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,716

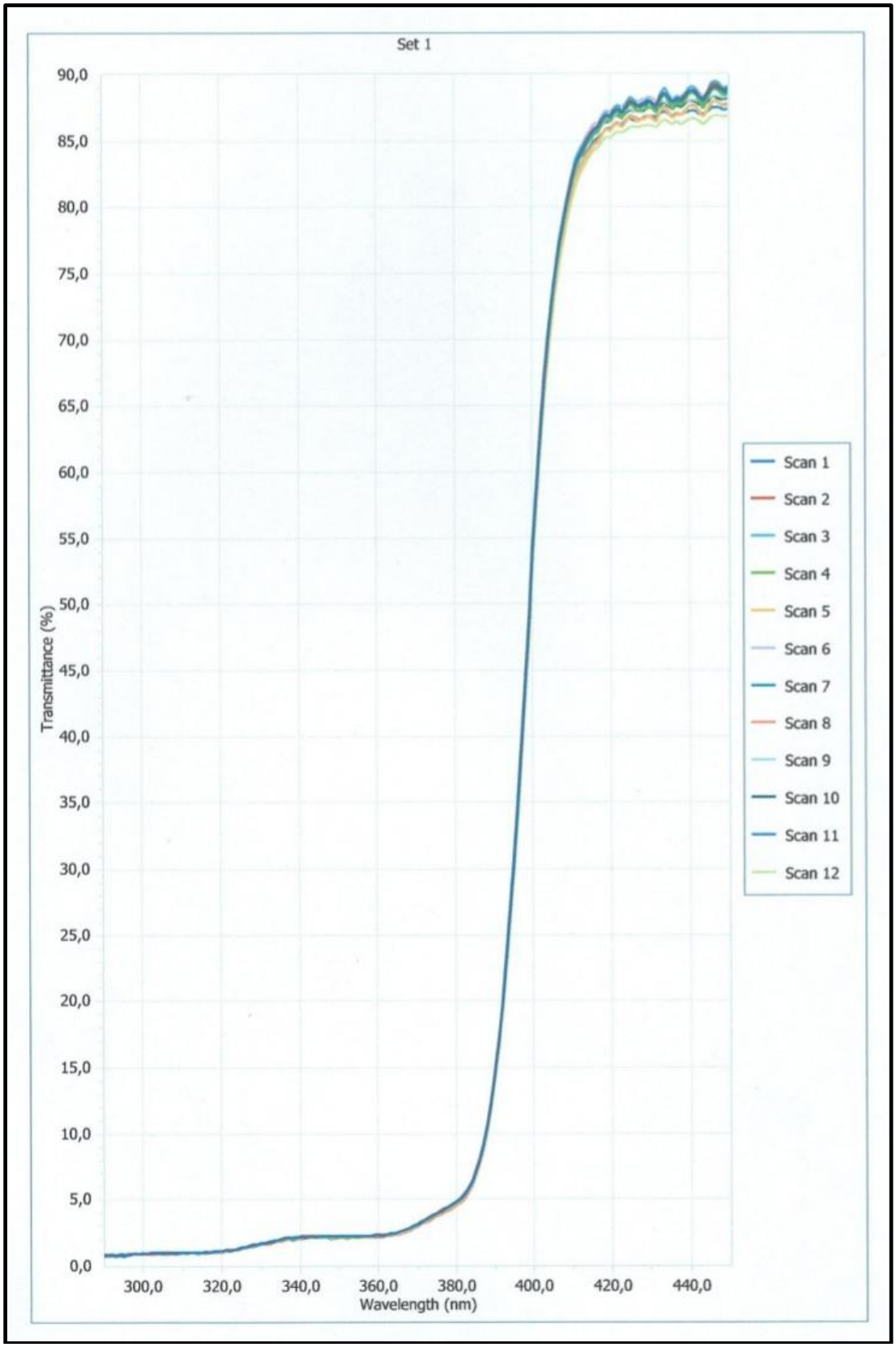
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	76,88	6,95%	0,95%	379,00
STD:	1,20	0,11%	0,02%	0,00
COV:	1,56%	1,59%	1,67%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,716

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	75,93	379
Scan 2	76,17	379
Scan 3	76,35	379
Scan 4	76,95	379
Scan 5	77,97	379
Scan 6	75,34	379
Scan 7	76,78	379
Scan 8	79,18	379
Scan 9	76,58	379
Scan 10	76,92	379
Scan 11	78,81	379
Scan 12	75,64	379

Resim 4.12. 6 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.20. 6 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

7 nolu numune

Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%1'lik) SPF değeri 54,40±2,22 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,729'dur.

Resim 4.13. 7 nolu numune: Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%1'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Serisin Zn Nanoçiçek+ Güneş kremi (%1'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 14:04:21
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	54,41	8,68%	1,44%	379,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,729

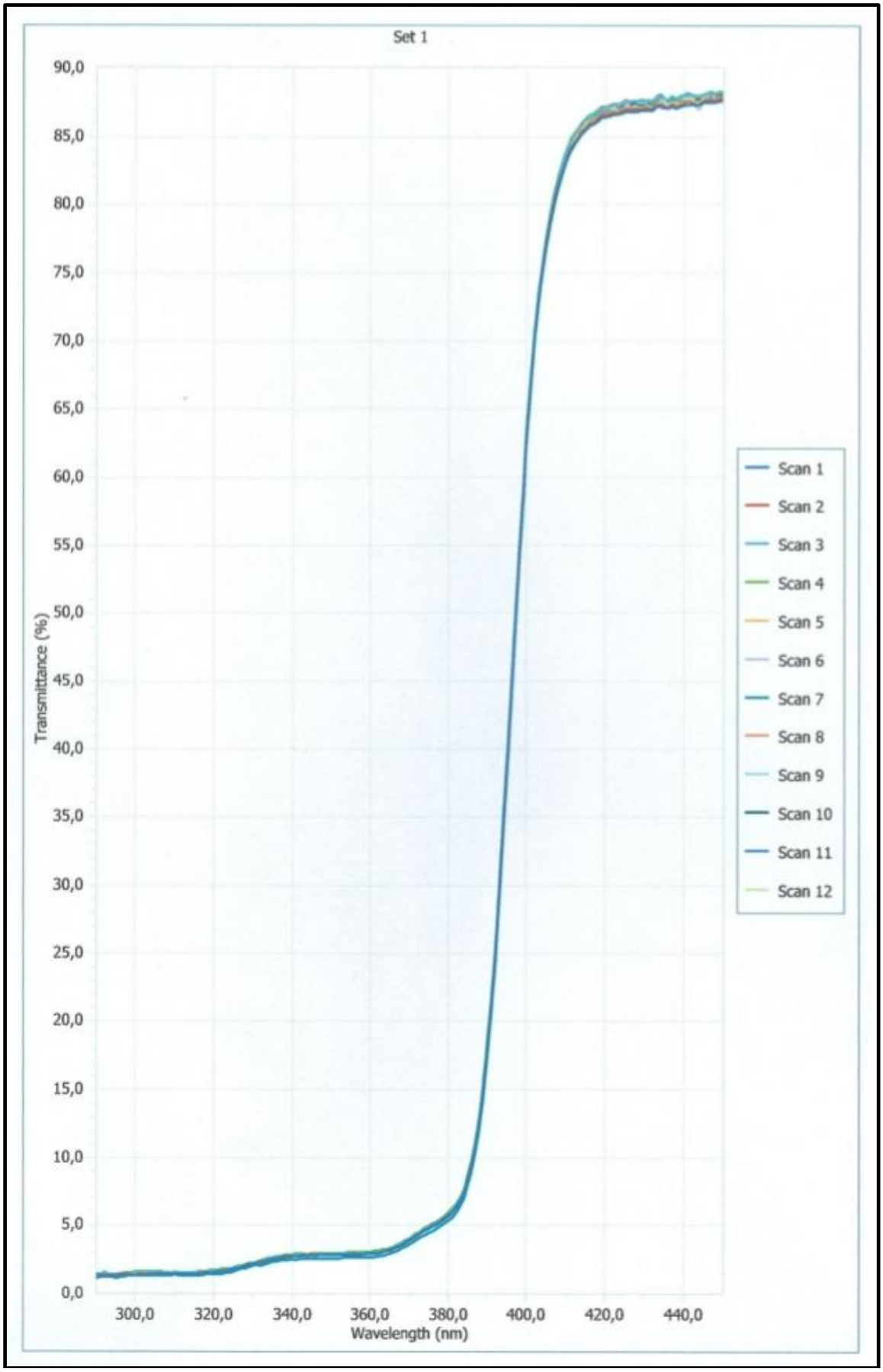
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	54,41	8,68%	1,44%	379,00
STD:	2,23	0,14%	0,07%	0,00
COV:	4,09%	1,60%	4,77%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,729

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	55,92	379
Scan 2	55,47	379
Scan 3	53,39	379
Scan 4	51,06	379
Scan 5	53,35	379
Scan 6	52,53	379
Scan 7	59,45	379
Scan 8	53,01	379
Scan 9	56,74	379
Scan 10	54,76	379
Scan 11	53,50	379
Scan 12	53,72	379

Resim 4.14. 7 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.21. 7 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

8 nolu numune

Total ipek proteini + Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 55,77±1,09 olarak belirlenmiştir. UVA/UVB değeri 0,754'tür.

Resim 4.15. 8 nolu numune: Total ipek proteini + Güneş kremi (%2'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Total ipek proteini + Güneş kremi(%2'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 14:44:20
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	55,77	7,63%	1,44%	380,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,754

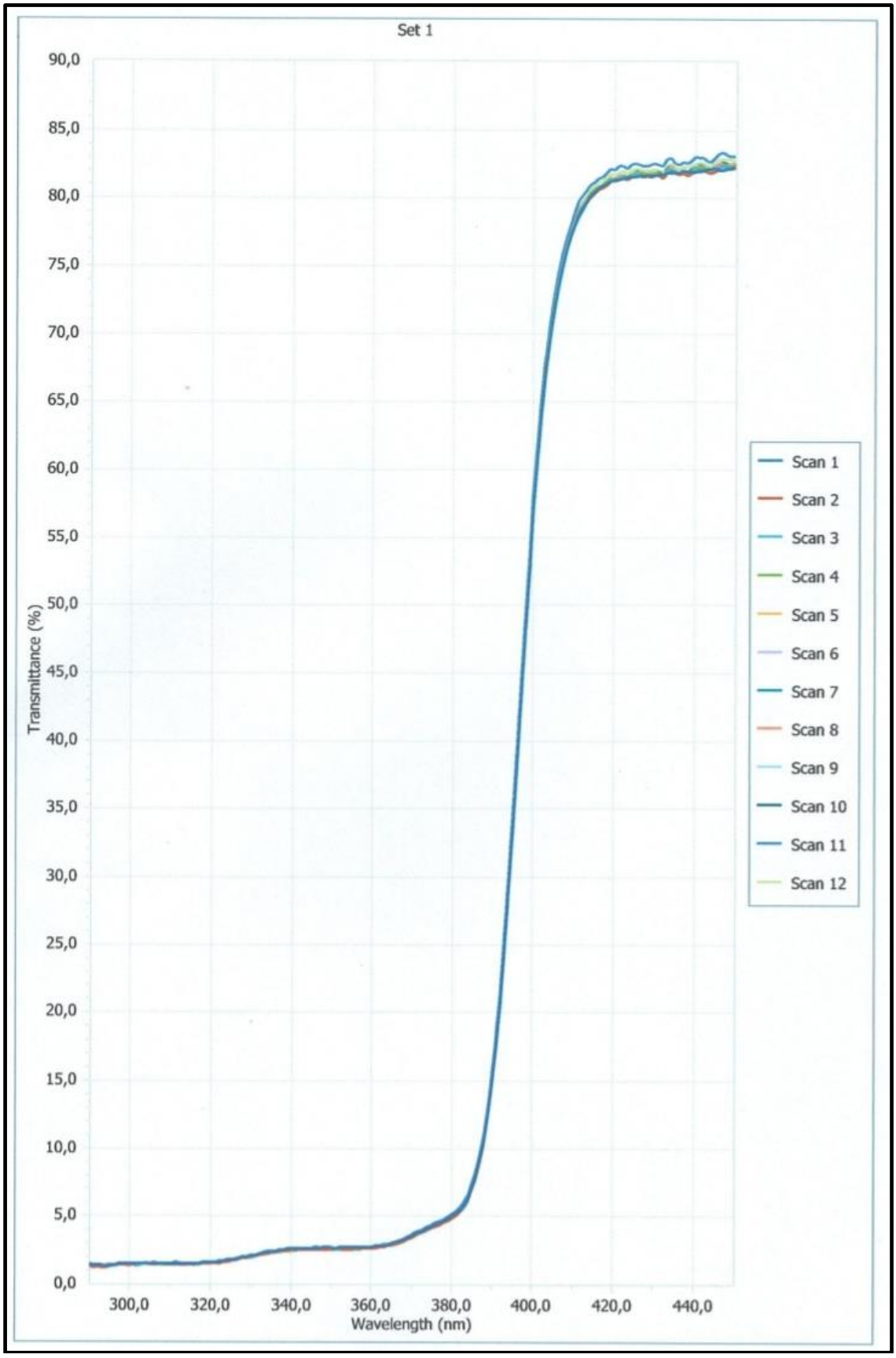
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	55,77	7,63%	1,44%	380,00
STD:	1,09	0,09%	0,03%	0,00
COV:	1,96%	1,15%	2,20%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,754

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	54,07	380
Scan 2	56,39	380
Scan 3	56,98	380
Scan 4	56,67	380
Scan 5	55,96	380
Scan 6	54,86	380
Scan 7	55,89	380
Scan 8	56,74	380
Scan 9	56,67	380
Scan 10	56,20	380
Scan 11	53,66	380
Scan 12	55,21	380

Resim 4.16. 8 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.22. 8 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

<u>9 nolu numune</u>

Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 23,99±0,46 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,746'dır.

Resim 4.17. 9 nolu numune: Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Total ipek proteini Zn Nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 09:20:08
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	23,99	12,37%	3,64%	379,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,746

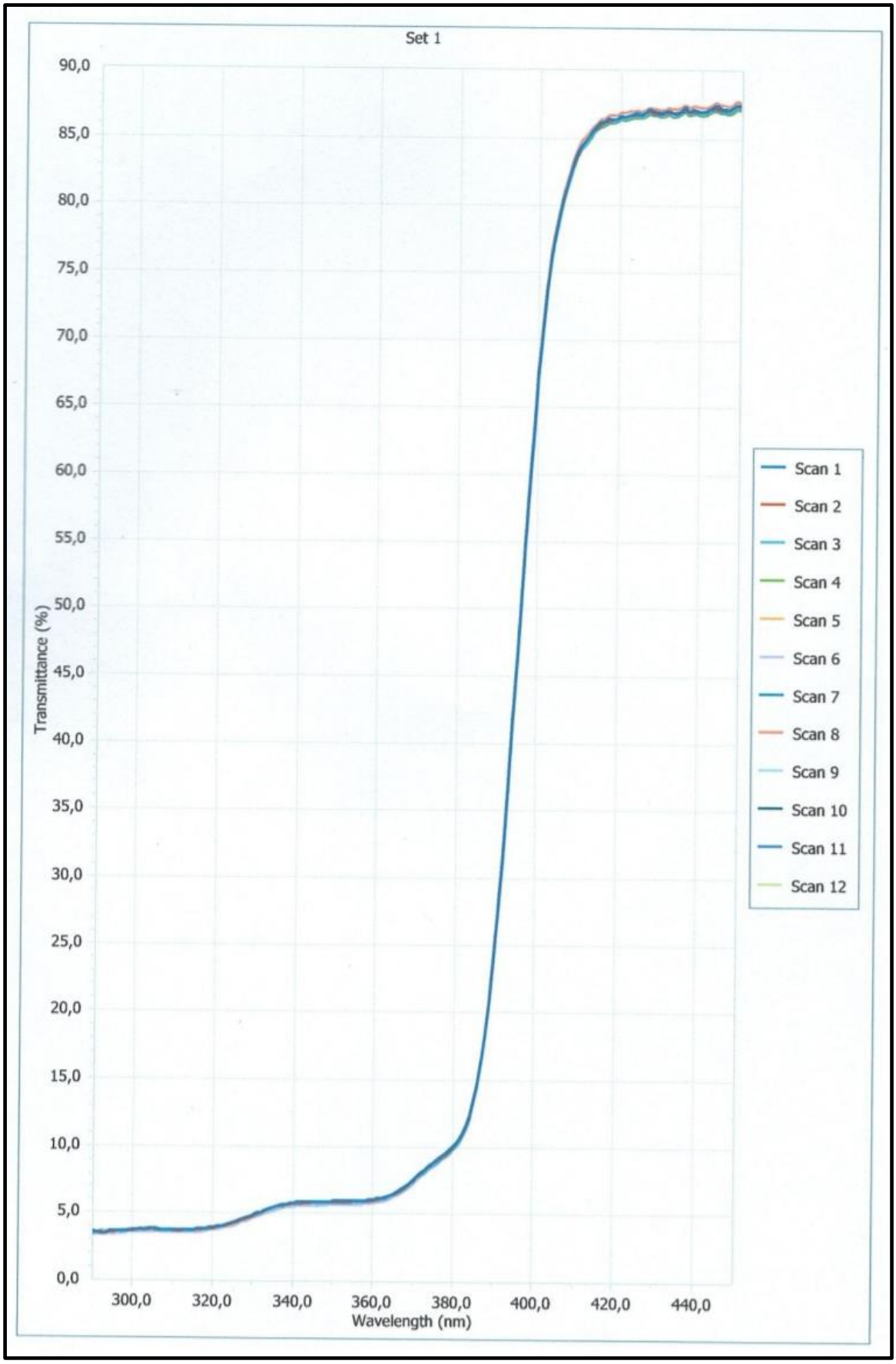
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	23,99	12,37%	3,64%	379,00
STD:	0,47	0,09%	0,08%	0,00
COV:	1,94%	0,77%	2,11%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,746

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	23,54	379
Scan 2	23,77	379
Scan 3	24,10	379
Scan 4	23,88	379
Scan 5	23,74	379
Scan 6	24,84	379
Scan 7	24,52	379
Scan 8	23,51	379
Scan 9	24,75	379
Scan 10	23,99	379
Scan 11	23,75	379
Scan 12	23,56	379

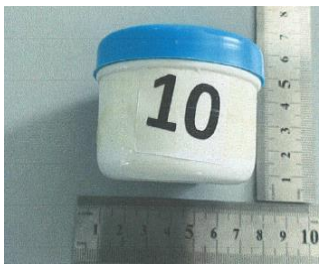
Resim 4.18. 9 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.23. 9 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

10 nolu numune

Serisin + Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 9,95±0,28 olarak belirlenmiştir. UVA/UVB değeri 0,764'tür.



Resim 4.19. 10 nolu numune / Serisin + Güneş kremi (%2'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Serisin + Güneş kremi (%2'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 15:33:14
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	9,96	19,13%	9,29%	380,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,764

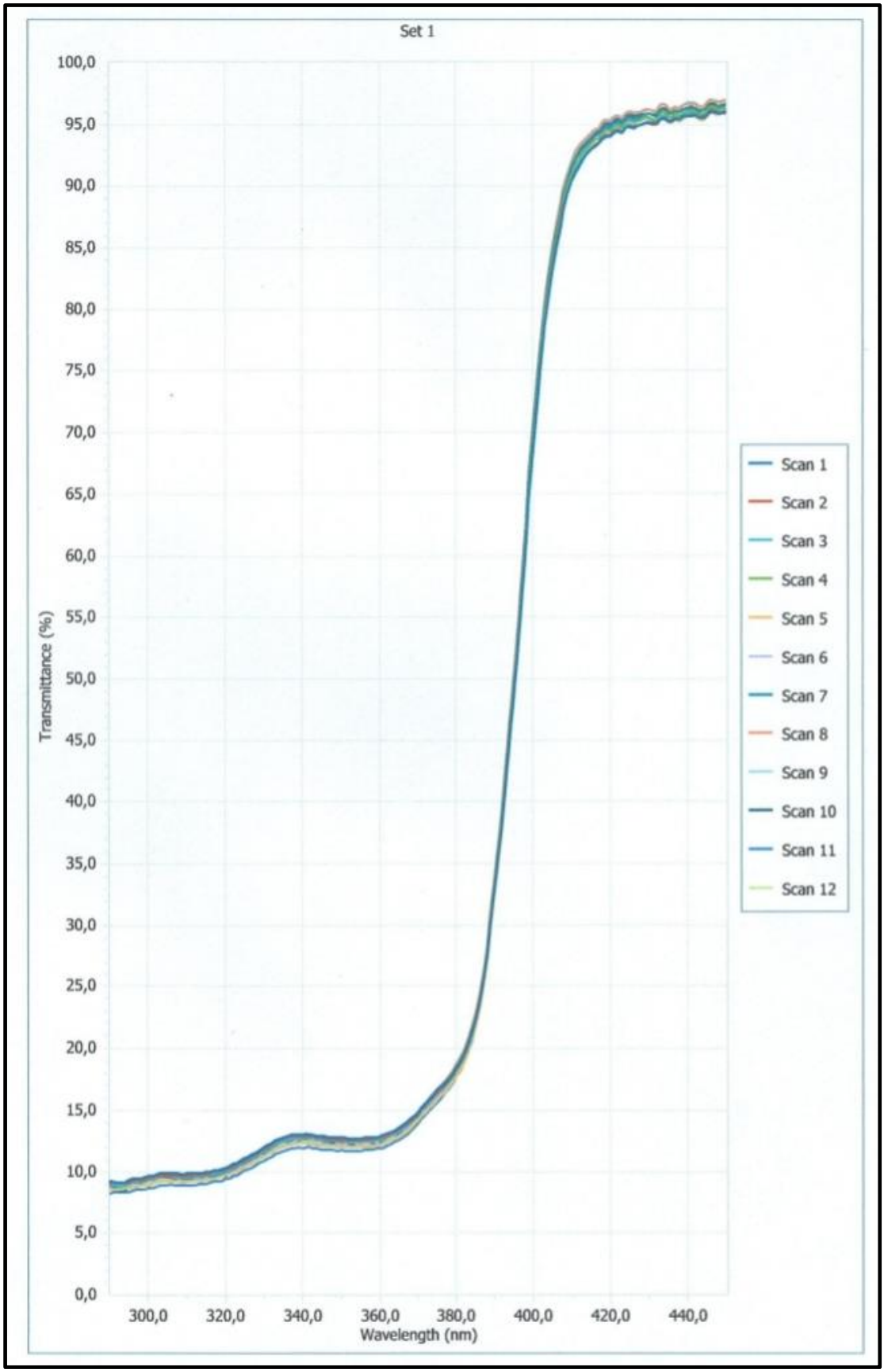
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	9,96	19,13%	9,29%	380,00
STD:	0,29	0,32%	0,28%	0,00
COV:	2,90%	1,65%	3,04%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,764

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	9,59	380
Scan 2	9,72	380
Scan 3	9,87	380
Scan 4	9,68	380
Scan 5	10,24	380
Scan 6	10,18	380
Scan 7	9,91	380
Scan 8	9,74	380
Scan 9	9,76	380
Scan 10	10,18	380
Scan 11	10,55	380
Scan 12	10,05	380

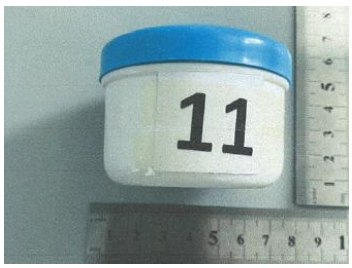
Resim 4.20. 10 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.24. 10 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

11 nolu numune

Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 8,24±0,07 olarak belirlenmiştir. UVA/ UVB değeri 0,727'dir.



Resim 4.21. 11 nolu numune / Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik)

Labsphere Transmittance Analyzer
SPF Report

Sample: Serisin Zn Nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik)
Description: COLIPA 2011. In Vitro Determination for Sun Protection Factor,

Operator: YB
Client: Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji San. Ve Dış Tic. Ltd. Şti.
Comment: No Comment
Date: 20.08.2021 17:31:03
Unit serial number: 0818090102
Solar Irradiance Profile: Albuquerque, NM
UVA/UVB ratio calculation used: Labsphere Method

Study Statistics

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Sets:	1	1	1	1
Mean:	8,24	23,96%	11,17%	378,00
STD:	n/a	n/a	n/a	n/a
COV:	n/a	n/a	n/a	n/a

UVA/UVB Ratio: 0,727

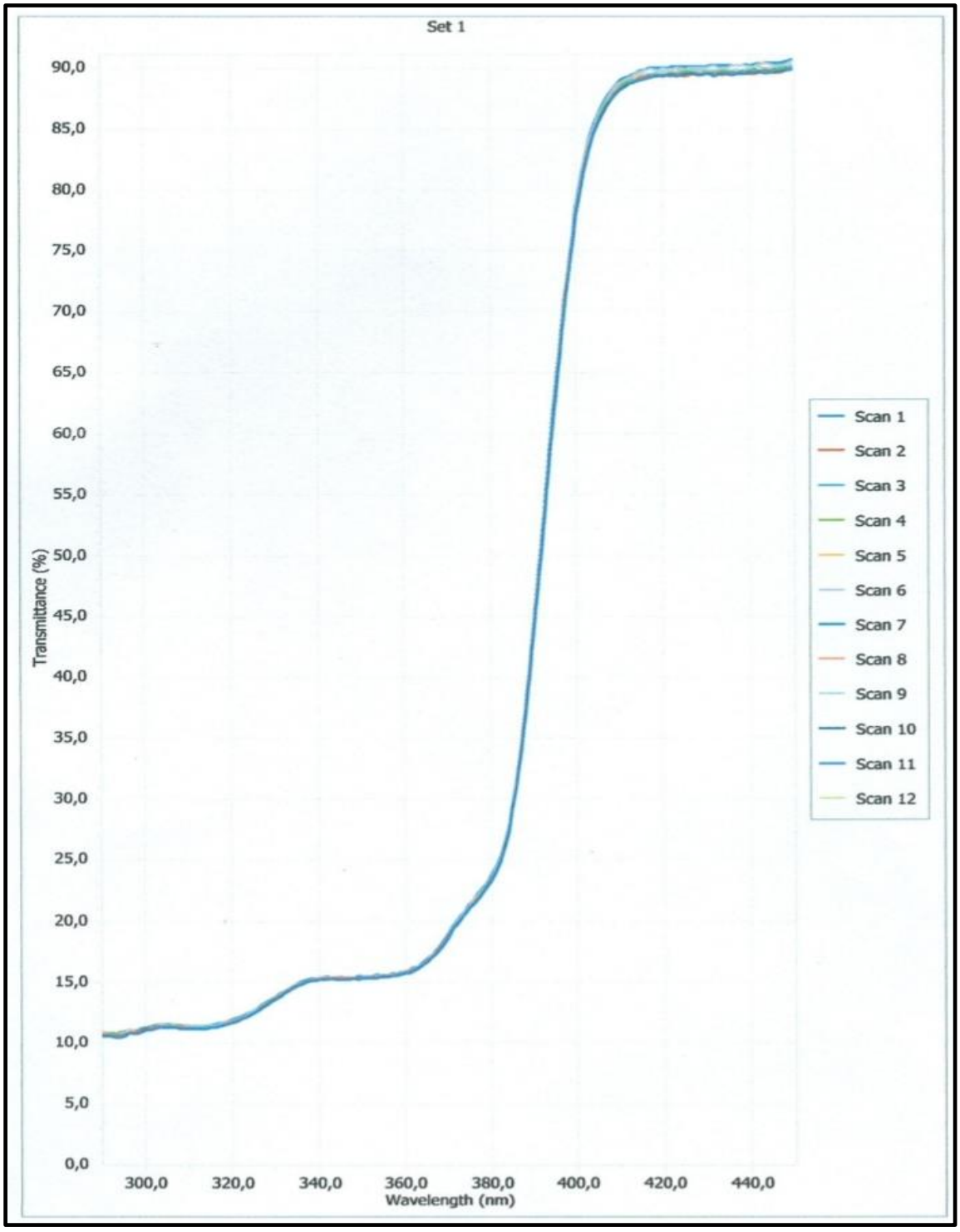
Set 1

	SPF	T(UVA)	T(UVB)	Lambda Critical
Number of Scans:	12	12	12	12
Mean:	8,24	23,96%	11,17%	378,00
STD:	0,07	0,13%	0,10%	0,00
COV:	0,86%	0,53%	0,94%	0,00%

UVA/UVB Ratio: 0,727

Scan	SPF	Critical Wavelength
Scan 1	8,37	378
Scan 2	8,33	378
Scan 3	8,30	378
Scan 4	8,30	378
Scan 5	8,30	378
Scan 6	8,22	378
Scan 7	8,19	378
Scan 8	8,17	378
Scan 9	8,18	378
Scan 10	8,22	378
Scan 11	8,20	378
Scan 12	8,16	378

Resim 4.22. 11 nolu numunenin analiz sonuçları



Şekil 4.25. 11 nolu numunenin 300-440 nm aralığındaki absorbans yüzdesi

Çizelge 4.11. Referans krem formülasyonu (Therasilk'e ait)

Hammadde	**Konsantrasyon (%)**
Deiyonize su	65,10
Kadpol 980/ 940	0,30
İpek proteini	1,00
Titanyum dioksit	1,50
Kosher gliserin	2,00
Monopropilen glikol	4,00
Sabikaol	4,00
Ercamuls LF 65	4,00
Polisorbat 20	1,00
Brb CM 50	1,00
Bersil DM 100	1,00
Miritol 318	1,00
Yeşil çay ekstresi	0,50
Vitamin E	0,50
D-pantenol	0,30
Aloe vera ekstresi	1,50
Sankat D	10,00
Lekskart PE	0,80
Esans	0,50

Çizelge 4.12. Güneş koruyucu aktivite sonuçları

Numune	**SPF Değeri±O.S.S.***
1	1,27±0,02
2	56,48±1,26
3	61,06±0,82
4	77,98±3,31
5	26,65±0,77
6	76,88±1,20
7	54,40±2,22
8	55,77±1,09
9	23,99±0,46
10	9,95±0,28
11	8,24±0,07

*: Ortalama Standart Sapma

Tez kapsamında;

1 nolu numune: Negatif kontrolümüz, hiçbir şey uygulanmayan baz kremimizin SPF değeri 1,27±0,02‘dir.

2 nolu numune: Pozitif Kontrol (Therasilk isimli ürününün ipek proteini içermeyen güneş kremi SPF değeri 56,48±1,26’dir.

3 nolu numune: Referans Madde (Therasilk güneş kremi %1 lik) SPF değeri 61,06±0,82’dir.

4 nolu numune: Total ipek proteini + Güneş kremi (%1’lik) SPF değeri 77,98±3,31’dir.

5 nolu numune: Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%1’lik) SPF değeri 26,65±0,77’dir.

6 nolu numune: Serisin + Güneş kremi (%1’lik) SPF değeri 76,88±1,20’dir.

7 nolu numune: Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%1’lik) SPF değeri 54,40±2,22’dir.

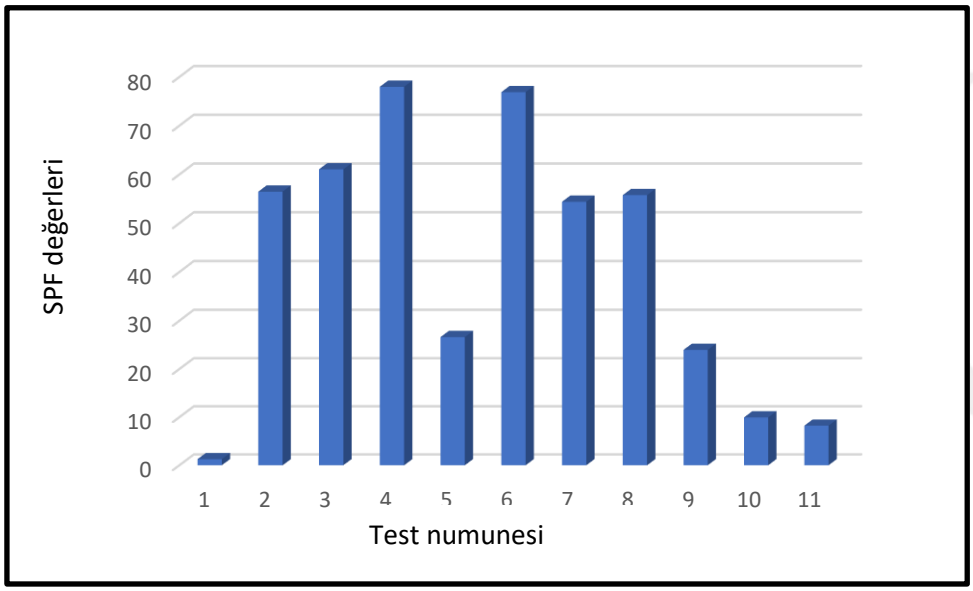
8 nolu numune: Total ipek proteini + Güneş kremi (%2’lik) SPF değeri 55,77±1,09’dir.

9 nolu numune: Total ipek proteini çinko nanoçiçek +Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 23,99±0,46 'dir.

10 nolu numune: Serisin + Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 9,95±0,28'dir.

11 nolu numune: Serisin çinko nanoçiçek+ Güneş kremi (%2'lik) SPF değeri 8,24±0,07'dir.

Referans Kremin Formülasyonu: (Therasilk güneş kremi %1 lik) (Formülasyonumuz emülsifiyedir.)



Grafik 4.4. Konsantrasyonlara göre kremlerin SPF değerleri

Yapılan ön deney sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre izole ettiğimiz hem serisin hem de total ipek proteinin %1 lik güneş kremlerinin spf değeri referans maddemiz %1'lik total ipek proteini içeren güneş kreminden yüksek çıkmıştır.

5. TARTIŞMA

Farmakognozi tanımı gereği doğal kaynaklı ilaç hammedelerini inceler. Farmakognozik çalışmalarda çoğunlukla bitkilerle çalışılsa da tez çalışmamızda *B. mori* kozalarından öncelikle serisin ardından total protein izole edilmiştir. İzole edilen proteinlerin çinko nanoçiçekleri sentezlenmiştir. Sentez edilen bu hibrit nanoçiçekler farklı fizikokimyasal (SEM, XRD, EDX, FT-IR) yöntemlerle karakterize edilmiştir. SEM ile karakterizasyondan sonra seçilen örnekler antioksidan, hyaluronidaz ve tirozinaz enzim inhibisyon etkileri bakımından analiz edilmiştir. Daha sonra da analiz edilen örneklerden güneş kremi formülasyonu hazırlanarak karşılaştırmalı olarak test edilmişlerdir. Eş güdümlü olarak piyasadan temin edilen proteinlerle de analizler yapılmıştır.

Çalışmamızda serisin izolasyonu için Na_2CO_3 methodu kullanılmıştır. Literatür taramaları ve yapmış olduğumuz ön denemeler neticesinde elde edilen yüksek verim sebebi ile Na_2CO_3 metodunu kullanmak avantajlı olmuştur. Ayrıca çalışmamızda fibroin içeren total protein elde etmek için literatürde belirlenen en verimli ve avantajlı yöntem olarak LiBr yöntemi kullanılmıştır (Kundu ve diğerleri, 2014).

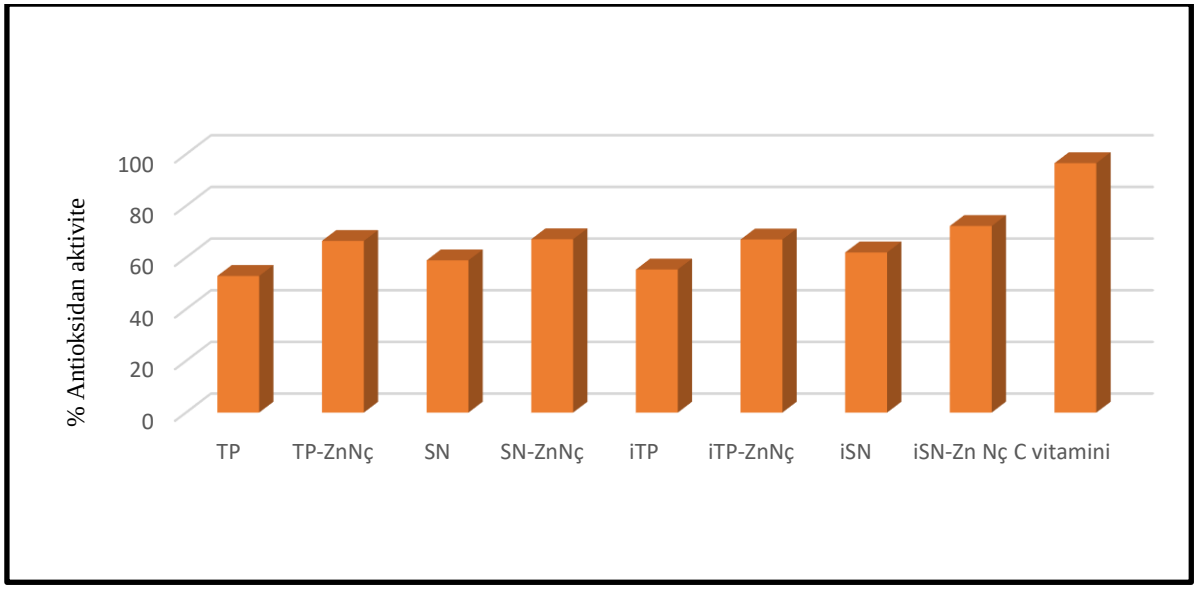
Önceki dönemlerde *B. mori* kozalarından zamk giderme işlemi ile serisin bir atık su olarak görülmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ve tezimiz sonucunda elde ettiğimiz veriler serisinin kozmetik açıdan önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Böylece atık sulardan serisin geri kazanımı sağlanmıştır. Aktürk ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada serisin kaplı altın nanoparçacık sentezlenmesi ve karakterizasyonu yapılmıştır (Aktürk ve diğerleri, 2018). Çapar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ipek atık sularından serisin proteini geri kazanılmış ve karakterize edilmiştir (Çapar, 2015). 2018 yılında yapılan bir doktora tezinde kanser tedavisinde kullanmak için ipek protein nanopartiküllerin hazırlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (Yalçın, 2018).

Biyoteknolojik öneme sahip nanoçiçekler ilk kez Stanford Üniversitesi'nde Dr. Zare ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Nanoçiçekler ucuz, kolay sentezlenilebilir, verimli, yüksek yüzey/ hacim oranı gibi avantajlı özelliklere sahip olması ile tezimiz kapsamında tercih edilmiştir. Ancak nanoçiçeklerin taç yaprakları ve boyutları gibi yapısal özellikleri, reaksiyon sırasında ve reaksiyonun tamamlanması sırasında kontrol edilmesi açısından oldukça zor olduğu için dezavantajlıdır.

Tezimiz kapsamında çinko nanoçiçekler sentezlenmiş ve çeşitli açılardan karakterizasyonu yapılmıştır. Hem ticari hem de izole edilen proteinlerin optimal SEM koşullarının pH 7,4 ve 6 saat karıştırma süresinde olduğu gözlemlenmiştir. Image Proplus programında yapılan boyut analizi sonucu çinko hibrit nanoçiçeklerin boyutu ~4-6 µm bulunmuştur.

EDX analizi ile P, N, O, Zn gibi elementlerin varlığı kanıtlanmıştır. Çinko hibrit nanoçiçek yapılarının içerdiği metal-fosfat kristalleri FT-IR ile karakterize edilmiştir. Spektrumlarda görülen ~564 cm-1 ve ~628cm-1 'deki bantlar, O=P=O'e ait karakteristik bükülme titreşimlerini işaret etmektedir. P=O ve P-O gruplarına ait gerilme bantları ise ~1105 ve ~931 cm-1 'de tespit edilmiştir. Görülen bu karakteristik titreşim bantları sentezlenen hibrit nanoçiçek yapılarındaki metal-fosfat kristallerinin varlığını kanıtlanmıştır. Ayrıca, C=O gerilme titreşimi, N-H bükülme titreşimi ve C-N arasındaki gerilme titreşim (amit I ve II bantları) bantları ~1400 ve ~1633 cm-1 'de gözlemlenmiştir. Bu karaktersitik bantlar sayesinde, sentezlenen hibrit nanoçiçek yapısındaki protein kısmının varlığı da kanıtlanmıştır.

Hem ticari olarak temin edilen hem de izole edilen proteinlerin nanoçiçeklerinin XRD sonuçları $Zn_3(PO_4)_2.4H_2O$ JCPDS standartları ile uyumludur.



Grafik 5.1. 1mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

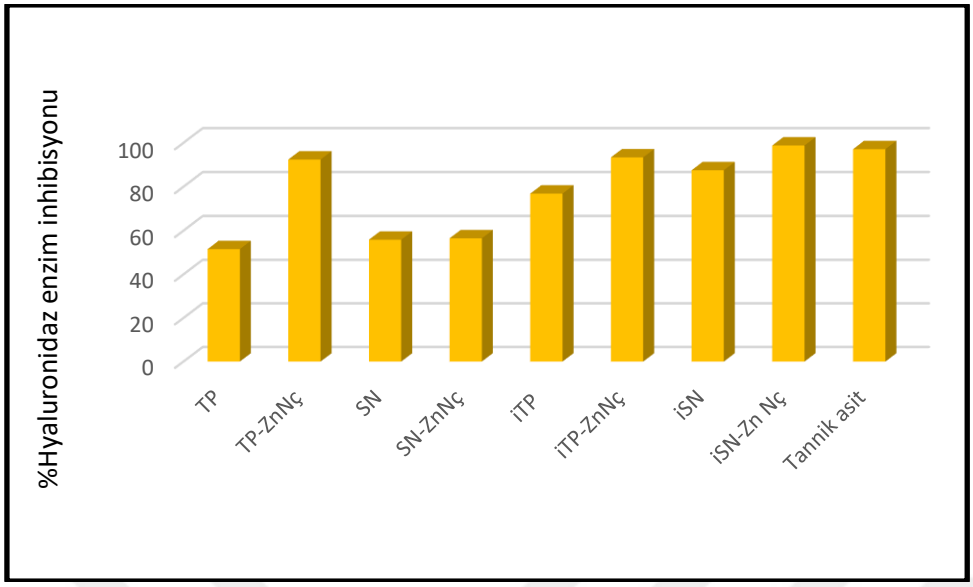
SN: Ticari serisin
SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği
iTP: İzole ipek total proteini
iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği
iSN: İzole serisin
iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği

Çalışmalarımız sonucunda ticari ipek proteinleri ve izole ipek proteinlerininin % antioksidan aktivitesi karşılaştırıldığında iSN'nin %62±0,29 değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle paralellik göstermiştir (Dash ve diğerleri, 2008; Kumar ve diğerleri, 2017; Sarovart ve diğerleri, 2003).

Çalışmamızda ticari ve izole proteinlerin çinko nanoçiçeklerinin % antioksidan aktivitesi incelendiğinde en yüksek iSN-ZnNç'nin %72,23±0,09 değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Hem ticari ipek proteinlerden hem de izole ipek proteinlerden sentezlenen çinko hibrit nanoçiçeklerin başlangıç proteinlere göre %antioksidan aktiviteyi artırdığı belirlenmiştir. Aktivitedeki artışı nanoçiçeklerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması ile yorumlanabilir.

Çalışmamızda 1 mg/mL konsantrasyonda referans maddemiz C vitaminine göre antioksidan aktivite incelendiğinde TP'in yüzdesi %52,90±0,11, TP-ZnNç: 66,47±0,2'dir. SN'de 58,94±0,35, SN-ZnNç: 67,12±0,008, iTP: 55,39±0,08, iTP-ZnNç: 67±0,78; iSN için ise 62±0,29, iSN-ZnNç: 72,23±0,09 olarak belirlenmiştir (Grafik 5.1).

Kumar ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmaya göre ipek kozalarından elde edilen ekstrenin hyaluronidaz etkisinin olabileceği gözlemlenmiştir (Kumar ve diğerleri, 2019). Yapılan *in vivo* bir çalışmada; serisin cildin içsel nemlenmesinde artışa neden olmuştur. Çalışma sonucunda serisinin nemlendirici formülasyonlarda umut verici ve önemli bir nemlendirici bileşen olabileceği yorumlanmıştır (Padamwar ve diğerleri, 2005).



Grafik 5.2. 1 mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % hyaluronidaz enzim inhibisyonlarının karşılaştırılması

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

SN: Ticari serisin

SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği

iTP: İzole ipek total proteini

iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

iSN: İzole serisin

iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği

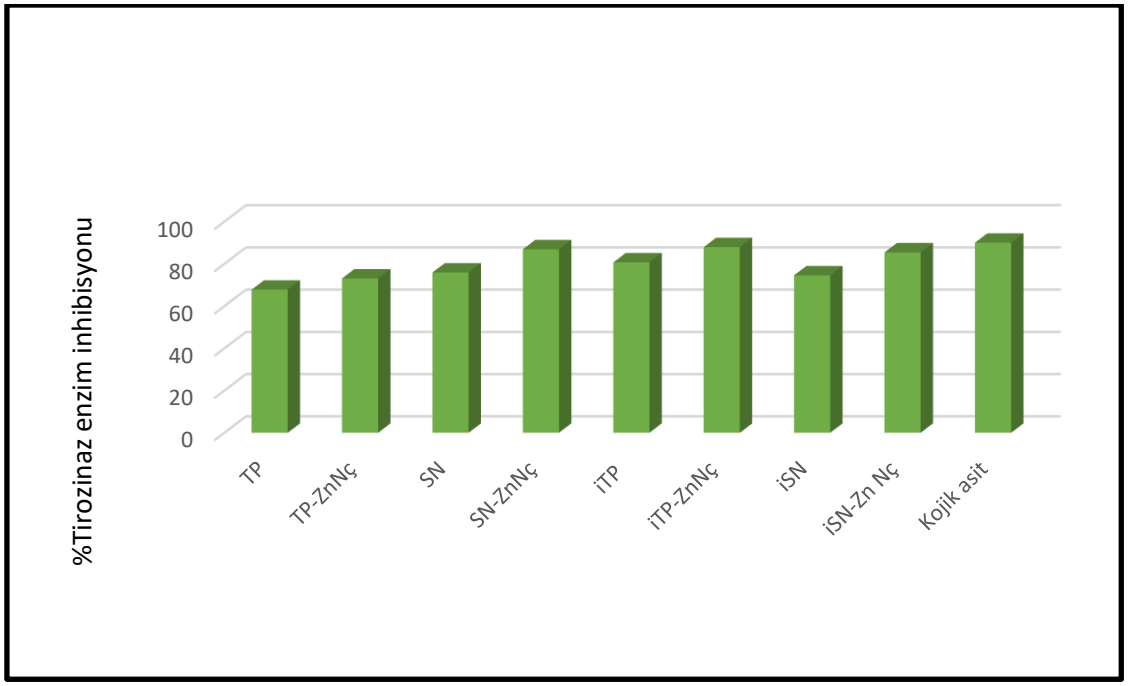
Çalışmalarımız da bu bilgileri desteklemektedir. Çalışmalarımız sonucunda ticari ipek proteinleri ve izole ipek proteinlerininin % hyaluronidaz enzim inhibisyonu incelendiğinde en yüksek etkinin %87,50±0,00 değeri ile iSN'ye ait olduğu gözlemlenmiştir.

Hem ticari ipek proteinlerden hem de izole ipek proteinlerden sentezlenen çinko hibrit nanoçiçeklerin başlangıç proteinlere göre hyaluronidaz enzim inhibisyonunu artırdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda 1 mg/mL konsantrasyonda %98,78±0,74 inhibisyon oranıyla iSN-ZnNç'in hyaluronidaz enzim inhibisyonu, referans olarak kullanılan tannik asitten yüksek çıkmıştır.

Tezimiz kapsamında 1 mg/mL konsantrasyonda referans maddemiz tannik asite (97,12±0,02) göre hyaluronidaz enzim inhibisyonu incelendiğinde TP: 51,61±0,001, TP-

ZnNç: 92,38±0,09, SN: 55,88±0,003, SN-ZnNç: 56,52±0,007 ; iTP: 76,89±1,23, iTP-ZnNç: 93,37±0,98, iSN: 87,50±0,00, iSN-Zn Nç ise 98,78±0,74 olarak belirlenmiştir (Grafik 5.2).

Ayrıca çalışmamızda sentezlenen tüm çinko hibrit nanoçiçekler, başlangıç proteinlere göre hyaluronidaz enzim inhibisyon yüzdesini artırmıştır. Enzim inhibisyonundaki artışı nanoçiçeklerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması ile yorumlanabilir.



Grafik 5.3. 1 mg/mL konsantrasyonda ipek proteinleri ve çinko nanoçiçeklerinin % tirozinaz enzim inhibisyonlarının karşılaştırılması

TP: Ticari ipek total proteini

TP-ZnNç: Ticari ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

SN: Ticari serisin

SN-ZnNç: Ticari serisin çinko hibrit nanoçiçeği

iTP: İzole ipek total proteini

iTP-ZnNç: İzole ipek total protein çinko hibrit nanoçiçeği

iSN: İzole serisin

iSN-Zn Nç: İzole serisin çinko hibrit nanoçiçeği

Enzim inhibisyonu çalışmalarımızdan bir diğeri tirozinaz enzim inhibisyonudur. Çalışmalarımız sonucunda ticari ipek proteinleri ve izole ipek proteinlerininin % tirozinaz

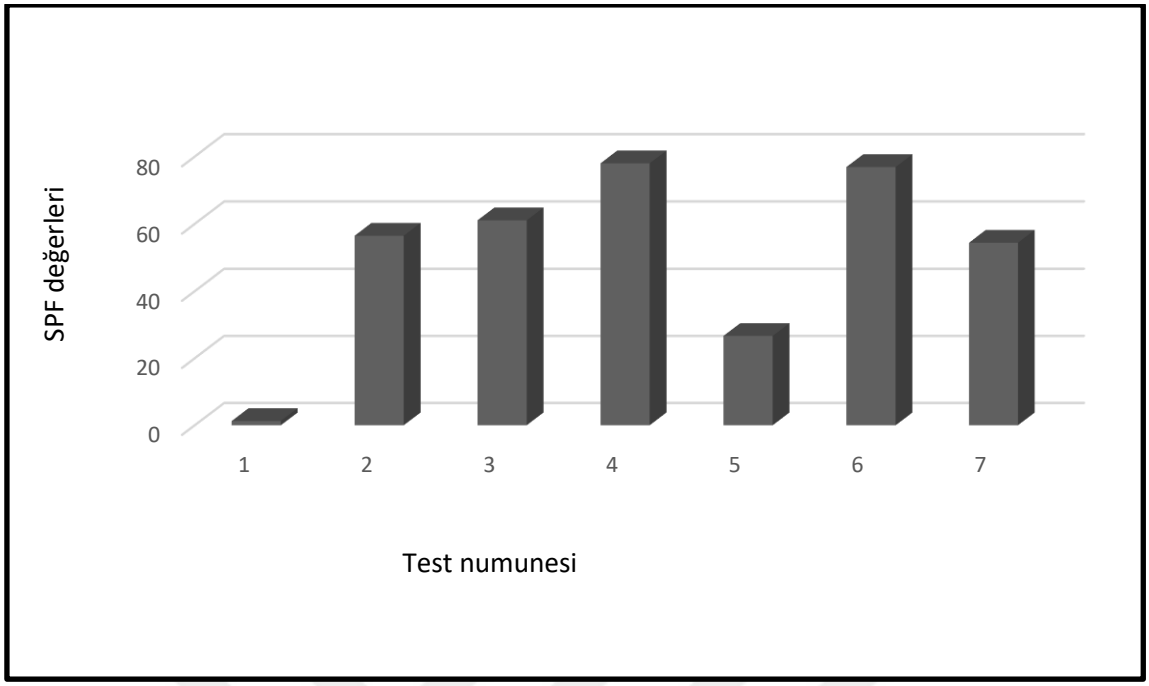
enzim inhibisyonu incelendiğinde en yüksek etkinin 80,67±0,008 değeri ile iTP ‘ye ait olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ticari ve izole edilen proteinlerin çinko nanoçiçeklerinin % tirozinaz enzim inhibisyonu incelendiğinde iTP-ZnNç 87,90±0,002 değeri ile en yüksek tirozinaz enzim inhibisyonuna sahip olduğu görülmüştür.

Tezimiz kapsamında 1 mg/mL konsantrasyonda referans maddemiz kojik asite göre (90,02±0,0005) tirozinaz enzim inhibisyonu incelendiğinde TP: 67,78±0,00, TP-ZnNç: 73,07±0,98, SN: 75,89±0,005, SN-ZnNç: 86,90±0,03, iTP: 80,67±0,008, iTP-ZnNç: 87,90±0,002, iSN: 74,55±0,05, iSN-Zn Nç: 85,44±0,01 olarak belirlenmiştir (Grafik 5.3).

Hem ticari ipek proteinlerden hem de izole ipek proteinlerden sentezlenen çinko hibrit nanoçiçeklerin başlangıç proteinlere göre tirozinaz enzim inhibisyon yüzdesini artırdığı belirlenmiştir. Enzim inhibisyonundaki artışı nanoçiçeklerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması ile yorumlanabilir. Literatürde verilen bilgiler ve elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında serisinin tirozinaz enzim inhibisyonu etkisi olduğu belirlenmiştir (Kato ve diğerleri, 1998; Jena ve diğerleri 2018). Potansiyel antioksidanların topikal olarak verilmesi, redoks dengesini koruyarak cildi ultraviyole (UV) radyasyonunun neden olduğu oksidatif hasara karşı korur. İpeğin ana bileşenlerinden biri olan serisin, antioksidan özellikleri ile serisin UVB radyasyonunun neden olduğu hasara karşı cilt koruyucu aktivite göstermektedir (Kumar ve diğerleri, 2018).

İpek proteini serisin, fare derisi modelinde yapılan bir çalışmada ultraviyole B (UVB) ışınına karşı güçlü bir antioksidan ve fotokoruyucu madde olarak tanımlanmıştır (Dash ve diğerleri, 2008). Yapılan bir başka çalışmada ipek proteini taşıyan ürünlerin hem UVA hem de UVB radyasyonlarına tepkisi belirlenmiştir ve UVA absorpsiyonundan serisinin sorumlu olduğunu bulunmuştur (Kaur, 2013).



Grafik 5.4. %1'lik güneş kremlerinin negatif kontrol, pozitif kontrol ve referans madde ile kıyaslanması

1: Negatif kontrol

2: Pozitif kontrol

3: Referans madde

4: %1'lik total ipek proteinli güneş kremi

5: %1'lik total ipek protein çinko nanoçiçek içeren güneş kremi

6: %1'lik izole serisin içeren güneş kremi

7: %1'lik serisin çinko nanoçiçek içeren güneş kremi

Yapılan ön deney sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre izole ettiğimiz hem serisin hem de total ipek proteinin %1 lik güneş kremlerinin SPF değeri referans madde olarak kullanılan %1'lik total ipek proteini içeren güneş kreminden yüksek çıkmıştır.

B. mori kozalarından izole ettiğimiz proteinlerden %1'lik total ipek proteinli güneş kremi (4 nolu numune) SPF değeri 77,98±3,31 ve %1'lik serisin güneş kremi (6 nolu numune) SPF değeri 76,88±1,20 çıkmıştır. Referans maddemiz olan Therasilk markalı %1'lik total ipek proteini içeren güneş kreminin (3 nolu numune) SPF değeri 61,06±0,82 olarak belirlenmiştir (Grafik 5.4).

Formülasyona eklediğimiz çinko nanoçiçeklerdeki düşüşler bu formülasyondaki maddeler ile nanoçiçeklerin etkileşmesinden kaynaklı olabilir. Ayrıca %2'lik güneş kremlerindeki düşüşlerin de nedeni formülasyonla etkileşimler olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye'de üretilen *B. mori* ipekböceği kozalarından suda çözünen serisin ve fibroin içeren total protein izole edilmiştir. İzole edilen ve ticari olarak temin edilen proteinlerin çinko hibrit nanoçiçekleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Yapılan *in vitro* aktivite deneyleri sonucunda izole ettiğimiz serisin ve total proteinlerin antioksidan, antitirozinaz, antihyaluronidaz ve güneş koruyucu etkileri genel olarak ticari proteinlere eşit ya da daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda doğal kaynaklı hammadde elde edilmesi açısından verimli *B. mori* ipek kozalarının farmakognozik açıdan önemi ortaya konmuştur.

İpek proteinleri tüm dünyada tıp, biyomühendislik, doku mühendisliği gibi pek çok alanda kullanıma sahiptir. Türkiye'de hammadde üretimi oldukça önemli bir açıktır. Tez çalışmamızın sonuçları ipek proteinlerinin gıda, kozmetik ve ilaç sanayisinde kullanılmak üzere ön çalışma olarak değerlendirilebilir ve izolasyon yönteminin büyük ölçeğe taşınmasına önderlik edilebilir. Ayrıca çalışmamızda güneş koruyucu, leke giderici ve nemlendirici krem formülasyonu çalışmalarının temelleri atılmıştır. İlerleyen çalışmalarda izole serisin ve fibroin içeren total proteinler saflaştırma aşamalarından geçtikten sonra stabilite, homojenite, etken madde salımı gibi ölçümler yapıldıktan sonra gıda ve kozmetik için farklı formülasyonlarda değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Akai, H. (1997). Anti-bacterial function of natural silk materials. *International Journal of Wild Silkmoth and Silk*, 3, 79-81.

Aktürk, Ö., Gök, Z. G., Daş, T. M., ve Erdemli, Ö. (2018). Synthesis and characterization of sericin-capped gold nanoparticles. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33(2), 675-684.

Ali, Z., Zhang, Q. Y., (2016). Papain/$Zn_3(PO_4)_2$ hybrid nanoflower: preparation, characterization and its enhanced catalytic activity as an immobilized enzyme. *RSC Advances*, 6(52), 46702-46710.

Altinkaynak, C., Baldemir, A., Özdemir, N., Yılmaz, V., and Öçsoy, İ. (2019). Synthesis of organic-inorganic hybrid nanoflowers using *Trigonella foenum-graecum* seed extract and investigation of their anti-microbial activity. *Derim*, 36(2), 159-167.

Altinkaynak, C., Kocazorbaz, E., Özdemir, N., and Zihnioglu, F. (2018). Egg white hybrid nanoflower (EW-hNF) with biomimetic polyphenol oxidase reactivity: synthesis, characterization and potential use in decolorization of synthetic dyes. *International journal of biological macromolecules*, 109, 205-211.

Ansary, R. H., Roy, T., Asraf, A., and Easmin, S. (2020). Preparation, characterization and antifungal activity studies of AgNPs loaded silk fibroin hydrogels. *American Journal of Nano Research and Applications*, 8(2), 28-34.

Bor, E. (2021). *Halk Tıbbında Cilt Üzerinde Kullanılan Bitki Ekstrelerinin Nanoçiçek Metodu İle Hazırlanması Ve Etkinliklerinin İn Vitro Yöntemlerle Araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Bor, E., Durbilmez G. D., and Koca Çalışkan, U. (2020, 3-4 September) *The Investigation Of Hyaluronidase Inhibition: Plant Extract Used For Skin Problems In Folk Medicine And Its Hybrid Nanoflowers*. Paper presented at the 10th International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress (IPPC Greece 2020 + Virtual).

Burda, S., and Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of agricultural and food chemistry, 49(6), 2774-2779.

Byun, E. B., Sung, N. Y., Kim, J. H., Choi, J. I., Matsui, T., Byun, M. W., and Lee, J. W. (2010). Enhancement of anti-tumor activity of gamma-irradiated silk fibroin via immunomodulatory effects. *Chemico-biological Interactions*, 186(1), 90-95.

Chen, F., Porter, D., and Vollrath, F. (2012). Silk cocoon (*Bombyx mori*): multi-layer structure and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2620-2627.

Cobley J. N., Fiorello M. L., and Bailey D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490–503.

Commission recommendations of 22 September 2006 on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto (2006/647/EC). Official Journal of the European Union. 26.9.2006.265/39-265/43.

Cui, J., and Jia, S. (2017). Organic–inorganic hybrid nanoflowers: A novel host platform for immobilizing biomolecules. *Coordination Chemistry Reviews*, 352, 249-263.

Çapar, G., ve Aygün, S. S. (2015). Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 72(3).

Dash, R., Acharya, C., Bindu, P. C., and Kundu, S. C. (2008). Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB reports*, 41(3), 236-241.

Dash, R., Mandal, M., Ghosh, S. K., and Kundu, S. C. (2008). Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 311(1), 111-119.

Dominguez-Rosado, E., and Pichtel, J. (2003, January). Chemical characterization of fresh, used and weathered motor oil via GC/MS, NMR and FTIR techniques. In *Proceedings of the Indiana Academy of Science* (Vol. 112, No. 2, pp. 109-116).

Durbilmez, G. D., Bor, E., Dönmez, C., Geçili, F., Özdemir, N., and Çalışkan, U. K. (2019) Synthesis of Hybrid Nanoflowers with Plant Extracts Traditionally Utilized In Skin Problems and Their Activity Profile. In I. International Aromatic Plants and Cosmetic Symposium, 45-54.

Fatahian, R., Fatahian, A., Fatahian, E., and Fatahian, H. (2021). A critical review on application of silk sericin and its mechanical properties in various industries. *Journal of Research and Applications in Mechanical Engineering*, 9(2).

Gapurova G.N. (1983). Chemical and physicochemical properties of surgical sutures (Turk Gos Med Inst, Ashkhzbad, USSR). *Zdravookhraneniye Turkmenistana*, 27(7), 15–7.

Gauthier, N., Mandon, N., Renault, S., and Bénédet, F. (2004). The acrolepiopsis assectella silk cocoon: kairomonal function and chemical characterisation. *Journal of Insect Physiology*, 50(11), 1065-1074.

Ge, J., Lei, J., and Zare, R. N. (2012). Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature nanotechnology*, 7(7), 428-432.

Gotoh K., Izumi H., Kanamoto T., Tamada Y., and Nakashima H. (2000). Sulfated fibroin, a novel sulfated peptide derived from silk, inhibits human immunodeficiency virus replication in vitro. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 64(8), 1664–70.

Gulrajani, M. L. (2005). Sericin: A Bio-moecule of Value. In *Souveni 20th congress of the international sericultural commission Bangalore, India 15-18^<th> December* 2005 (pp. 21-29).

Henne W., Hoppe U. 1986. *Light and screening composition*. Geroffen DE 3408406 A1 (to Beiersdrof A G Fed Rep Ger) 12 September 1985, P 14. Chem Abstr. 104(6):39519.

Hino, R., Tomita, M., and Yoshizato, K. (2006). The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 27(33), 5715-5724.

Hoppe, U., Koerbaecher, K., and Roeckl, M. (1984). *Hair and bath preparations containing sericin*. Ger Offen DE 3233388 A1 (to Beiersdorf A G, Ger) 15 March 1984, P 15. Chem Abstr. 100(1984):215-305.

Hu, R., Zhang, X., Zhao, Z., Zhu, G., Chen, T., Fu, T., and Tan, W. (2014). DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery. *Angewandte Chemie*, 126(23), 5931-5936.

Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., and Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*, 87(4), 1175-1213.

Ildiz, N., Baldemir, A., Altinkaynak, C., Özdemir, N., Yilmaz, V., and Ocsoy, I. (2017). Self assembled snowball-like hybrid nanostructures comprising *Viburnum opulus* L. extract and metal ions for antimicrobial and catalytic applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 102, 60-66.

Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K., and Mizuno, S. (2000). Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6: 1 molar ratio. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40517-40528.

Jena, K., Pandey, J. P., Kumari, R., Sinha, A. K., Gupta, V. P., and Singh, G. P. (2018). Tasar silk fiber waste sericin: new source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds. *International journal of biological macromolecules*, 114, 1102-1108.

Jeong, S. H., Ryu, Y. B., Curtis-Long, M. J., Ryu, H. W., Baek, Y. S., Kang, J. E., ... & Park, K. H. (2009). Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1195-1203.

Jin H. J., Chen J., Karageorgiou V., Altman G. H., Kaplan D. L. (2004). Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials*, 25(6), 1039–1047.

Joseph, B., and Raj, S. J. (2012). Therapeutic applications and properties of silk proteins from Bombyx mori. *Frontiers in Life Science*, 6(3-4), 55-60.

Kaewkorn, W., Limpeanchob, N., Tiyaboonchai, W., Pongcharoen, S., and Sutheerawattananonda, M. (2012). Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Biological Research*, 45(1), 45-50.

Karageorgiou V., Meinel L., Hofmann S., Malhotra A., Volloch V., and Kaplan D. (2004). Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 71A(3), 528–37.

Kass, E. H., and Seastone, C. V. (1944). The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group A hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 79(3), 319-330.

Kato, M., Isobe, K. I., Dai, Y., Liu, W., Takahashi, M., and Nakashima, I. (2000). Further characterization of the Sho-saio-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET-transgenic mice. *The Journal of investigative dermatology*, 114(3), 599-601.

Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., FUWA, N., and NOMURA, M. (1998). Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(1), 145-147.

Kaur, J., Rajkhowa, R., Tsuzuki, T., Millington, K., Zhang, J., and Wang, X. (2013). Photoprotection by silk cocoons. *Biomacromolecules*, 14(10), 3660-3667.

Kilic, A. B., Altınkaynak, C., Ildiz, N., Ozdemir, N., Yilmaz, V., and Ocsoy, I. (2020). A new approach for green synthesis and characterization of *Artemisia* L.(Asteraceae) genotype extracts-Cu^{2+}nanocomplexes (nanoflower) and their effecitve antimicrobial activity. *Medicine Science, 9(1),* 191-196.

Kim, H., Lim, Y. J., Park, J. H., and Cho, Y. (2012). Dietary silk protein, sericin, improves epidermal hydration with increased levels of filaggrins and free amino acids in NC/Nga mice. *British Journal of Nutrition*, 108(10), 1726-1735.

Kirker-Head, C., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Betz, O., Merkle, H. P., ve Meinel, L. (2007). BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone*, 41(2), 247-255.

Kitisin, T., Maneekan, P., and Luplertlop, N. (2013). *In vitro* characterization of silk sericin as an anti-aging agent. *Journal of Agricultural Science*, 5(3), 54.

Komatsu K. (1975). Studies on dissolution behaviors and structural characteristic of silk sericin. *Bulletin of the Sericultural Experiment Station*, 26, 135–256.

Kumar, J. P., Alam, S., Jain, A. K., Ansari, K. M., and Mandal, B. B. (2018). Protective activity of silk sericin against UV radiation-induced skin damage by downregulating oxidative stress. *ACS Applied Bio Materials*, 1(6), 2120-2132.

Kumar, J. P., and Mandal, B. B. (2017). Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry silk sericin and its implications in biomedicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 803-818.

Kumar, J. P., and Mandal, B. B. (2019). Inhibitory role of silk cocoon extract against elastase, hyaluronidase and UV radiation-induced matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(5), 1259-1274.

Kundu, B., Kurland, N. E., Yadavalli, V. K., & Kundu, S. C. (2014). Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, 70, 70-77.

Lee, H. R., Chung, M., Kim, M. I., and Ha, S. H. (2017). Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 105, 24-29.

Lee, K., Jin, H., Chei, S., Lee, J. Y., Oh, H. J., and Lee, B. Y. (2020). Dietary silk peptide prevents high-fat diet-induced obesity and promotes adipose browning by activating AMP-activated protein kinase in mice. *Nutrients*, 12(1), 201.

Lee, S. W., Cheon, S. A., Kim, M. I., and Park, T. J. (2015). Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1), 1-10.

Lesile, M., Stephen, M., and Robert, S. (2003). Cotton and wool outlook. *Econ Res Service, USDA, CWS*, 303(11), 1-15.

Li, M., Luo, M., Li, F., Wang, W., Liu, K., Liu, Q., and Wang, D. (2016). Biomimetic copper-based inorganic–protein nanoflower assembly constructed on the nanoscale fibrous membrane with enhanced stability and durability. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(31), 17348-17356.

Li, Z., Zhang, Y., Su, Y., Ouyang, P., Ge, J., and Liu, Z. (2014). Spatial co-localization of multi-enzymes by inorganic nanocrystal–protein complexes. *Chemical Communications*, 50(83), 12465-12468.

Liang, L.W., Fei, X., Li, Y. Tian, J. Xu, L.Q., Wang, X.Y. and Wang, Y. (2015). Hierarchical assembly of enzyme-inorganic composite materials with extremely high enzyme activity. *RSC Advances*, 5, 96997–97002.

Lin, Z., Xiao, Y., Wang, L., Yin, Y., Zheng, J., Yang, H., and Chen, G. (2014). Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *RSC advances*, *4*(27), 13888-13891.

Lin, Z., Xiao, Y., Yin, Y., Hu, W., Liu, W., and Yang, H. (2014). Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol. *ACS Applied Materials and İnterfaces*, 6(13), 10775-10782.

Liu, G. K. (1952). The silkworm and Chinese culture. *Osiris*, 10, 129-194.

Liu, X. (2010). *The Silk Road in world history*. Oxford University Press.

Liu, X. (2013). Silk Road: A new history. By Valerie Hansen. New York: Oxford University Press. *The Journal of Asian Studies*, 72(4), 993-995.

Madan, K., and Nanda, S. (2018). *In-vitro* evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. *Bioorganic Chemistry*, 77, 159-167.

Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., and Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(3), 676-692.

Magoshi, J., Magoshi, Y., Becker, M. A., and Nakamura, S. (1996). Polymeric materials encyclopedia. *Joseph CS, ed*, 1, p667.

McMullan, D. (1995). Scanning electron microscopy 1928–1965. *Scanning*, 17(3), 175-185.

Meinel, L., Fajardo, R., Hofmann, S., Langer, R., Chen, J., Snyder, B., and Kaplan, D. (2005). Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone*, 37(5), 688-698.

Meinel, L., Hofmann, S., Betz, O., Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., and Kaplan, D. L. (2006). Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, 27(28), 4993-5002.

Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., and Park, W. H. (2004). Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(7-8), 1289-1297.

Minoura, N., Aiba, S. I., Gotoh, Y., Tsukada, M., and Imai, Y. (1995). Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *Journal of biomedical materials research*, 29(10), 1215-1221.

Moazami, A., Montazer, M., Rashidi, A., and Rahimi, M. K. (2010). Antibacterial properties of raw and degummed silk with nanosilver in various conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 118(1), 253-258.

Mondal, M., Trivedy, K., and NIRMAL, K. S. (2007). The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., a review. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 5(2), 63-76.

Nguyen, T. P., Nguyen, Q. V., Nguyen, V. H., Le, T. H., Huynh, V. Q. N., Vo, D. V. N., and Le, Q. V. (2019). Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: A review. *Polymers*, 11(12), 1933.

Ocsoy, I., Dogru, E., and Usta, S. (2015). A new generation of flowerlike horseradish peroxides as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity. *Enzyme and microbial technology*, 75, 25-29.

Özdoğan, A., Çalışkan, U. K., Durbilmez, G. D., ve Küçük, Ş. (2021). Silk protein fibroin and its applications in health. *Acta Biologica Turcica*, 34(2), 105-113.

Padamwar, M. N., Pawar, A. P., Daithankar, A. V., and Mahadik, K. R. (2005).Silk sericin as a moisturizer: an *in vivo* study. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 4(4), 250-257.

Padol A.R., Jayakumar K., Shridhar N.B., Narayana Swamy H.D., Mohan K., and Manochaya S. (2012). Efficacy of the silk protein based biofilms as a novel wound healing agent. International Journal of Toxicol Application Pharmacol, 2(3), 31–6.

Padol, A. R., Jayakumar, K., Shridhar, N. B., Swamy, H. N., Swamy, M. N., and Mohan, K. (2011). Safety evaluation of silk protein film (a novel wound healing agent) in terms of acute dermal toxicity, acute dermal irritation and skin sensitization. *Toxicology international*, 18(1), 17.

Papavero, N., and Pujol-Luz, J. R. (2011). Notas sobre o bicho-da-seda no folclore Chinês. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55, 141-142.

Pugina, R. S., and Caiut, J. M. A. (2021). Silk: history, obtaining, structure and properties of an old material in the development of new technologies. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology-IJAMB*, 4(1), 27-45.

Rajan, M. K., Balakrishnan, A., and Jayaraman, K. (1992). Development of an antibody against a 170-kDa fragment of fibroin isolated from cocoon fibres of *Bombyx mori*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 25(1), 37-43.

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., and Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature protocols*, 6(10), 1612-1631.

Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201-205.

Sarovart, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B. P., and Magaraphan, R. (2003). The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Reviews on Advanced Material Science*, 5(3), 193-198.

Sasaki, M., Kato, N., Watanabe, H., and Yamada, H. (2000). Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Oncology Reports*, 7(5), 1049-1101.

Sen, K., and Babu K, M. (2004). Studies on Indian silk. I. Macrocharacterization and analysis of amino acid composition. *Journal of Applied Polymer Science*, 92(2), 1080-1097.

Senakoon, W., Nuchadomrong, S., Sirimungkararat, S., Senawong, T., and Kitikoon, P. (2009). Antibacterial action of eri (samia ricini) sericin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, 222-228.

Seo, C. W., Um, I. C., Rico, C. W., and Kang, M. Y. (2011). Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4192-4197.

Shaw J.T.B., Smith S.G. (1951). Amino acid of silk sericin. *Nature*, 4278:745.

Shende, P., Kasture, P., and Gaud, R. S. (2018). Nanoflowers: The future trend of nanotechnology for multi-applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 413-422.

Shichiri, M. (2014). The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 14-10.

Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I., and Özdemir, N. (2015). Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. *Dalton Transactions*, 44(31), 13845-13852.

Somturk, B., Yilmaz, I., Altinkaynak, C., Karatepe, A., Özdemir, N., and Ocsoy, I. (2016). Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme and microbial technology*, 86, 134-142.

Sprange K.U. (1975). The Bombyx mori silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*. 14(5), 925–31.

Sun, J., Ge, J., Liu, W., Lan, M., Zhang, H., Wang, P., and Niu, Z. (2014). Multi-enzyme co-embedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*, 6(1), 255-262.

Sun, W., Gregory, D. A., Tomeh, M. A., and Zhao, X. (2021). Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1499.

Talens-Perales, D., Fabra, M. J., Martínez-Argente, L., Marín-Navarro, J., and Polaina, J. (2020). Recyclable thermophilic hybrid protein-inorganic nanoflowers for the hydrolysis of milk lactose. *International journal of biological macromolecules*, 151, 602-608.

Tanaka, K., Inoue, S., and Mizuno, S. (1999). Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the HL complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(3), 269-276.

Teramoto, H., Nakajima, K. I., and Takabayashi, C. (2004). Chemical modification of silk sericin in lithium chloride/dimethyl sulfoxide solvent with 4-cyanophenyl isocyanate. *Biomacromolecules*, 5(4), 1392-1398.

Tolksdorf, S., and McCready, M. H. (1949). The turbidimetric assay of hyaluronidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 34(1), 74-89.

Ude, A. U., Eshkoor, R. A., Zulkifili, R., Ariffin, A. K., Dzuraidah, A. W., and Azhari, C. H. (2014). *Bombyx mori* silk fibre and its composite: a review of contemporary developments. *Materials & Design*, 57, 298-305.

Unger, R. E., Wolf, M., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., and Kirkpatrick, C. J. (2004). Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 25(6), 1069-1075.

Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: *an introduction. III-Vs Review*, 13(4), 40-44.

Voegeli, R., Meier, J., Blust, R., and Hofsteter, R. (1993). Sericin silk protein: unique structure and properties. *Cosmetics and Toiletries*, 108(12), 101-108.

Vollrath, F. (1999). Biology of spider silk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(2-3), 81-88.

Vollrath, F. (2000). Strength and structure of spiders' silks. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(2), 67-83.

Yalçın, E. (2018). *Kanser tedavisinde kullanılmak üzere ipek protein nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Wang, L. B., Wang, Y. C., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J., and Hou, J. G. (2013). A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *Journal of the American Chemical Society*, 135(4), 1272-1275.

Wang, R., Zhang, Y., Lu, D., Ge, J., Liu, Z., and Zare, R. N. (2013). Functional protein–organic/inorganic hybrid nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(4), 320-328.

Wang, X., Kim, H. J., Xu, P., Matsumoto, A., and Kaplan, D. L. (2005). Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir*, 21(24), 11335-11341.

Wang, Y., Blasioli, D. J., Kim, H. J., Kim, H. S., and Kaplan, D. L. (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*, 27(25), 4434-4442.

Warburg, O. (1941). Isolierung und kristallisation des gaarungsferments enolase. *Biochem. z.*, *310*, 384-421.

Weisman, S., Trueman, H. E., Mudie, S. T., Church, J. S., Sutherland, T. D., and Haritos, V. S. (2008). An unlikely silk: the composite material of green lacewing cocoons. *Biomacromolecules*, 9(11), 3065-3069.

Wu, C., Tian, B., Zhu, D., Yan, X., Cheng, W., Xu, G., and Jia, S. (1996). Wound protection film and its preparation method. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN*, 1121836(8).

Wu, Z., Li, X., Li, F., Yue, H., He, C., Xie, F., & Wang, Z. (2014). Enantioselective transesterification of (R, S)-2-pentanol catalyzed by a new flower-like nanobioreactor. *RSC Advances*, 4(64), 33998-34002.

Wubulikasimu, A., Omar, A., Gao, Y., Mukhamedov, N., Arken, A., Wali, A., and Yili, A. (2021). Antioxidant hydrolysate of sericin from *Bombyx mori* cocoons. *Chemistry of Natural Compounds*, 57(2), 346-349.

Yellamma, K. (2014). Silk protein, sericin as a cognitive enhancer in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Dis Parkinsonism*, 4(163), 2161-0460.

Yeo, J. H., Lee, K. G., Kweon, H. Y., Han, S. M., Park, K. H., Kim, S. S., and Shin, B. S. (2006). Application for dietary resources by silk protein. *Journal of Sericultural and Entomological Science*, 48(1), 6-10.

Yilmaz, O., Erturk, Y. E., Coskun, F., Wilson, R. T., and Ertugrul, M. (2015). History of sericulture in Turkey. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3(02).

Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z., and Cai, Z. (2015). An enzyme–inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(11), 2295-2300.

Zadora, G., & Brożek-Mucha, Z. (2003). SEM–EDX—a useful tool for forensic examinations. *Materials chemistry and physics*, 81(2-3), 345-348.

Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., and Hirano, S. (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(1), 99-105.

Zhang, X., Baughman, C. B., and Kaplan, D. L. (2008). In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. *Biomaterials*, 29(14), 2217-2227.

Zhang, Y. Q., Tao, M. L., Shen, W. D., Zhou, Y. Z., Ding, Y., Ma, Y., and Zhou, W. L. (2004). Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*, 25(17), 3751-3759.

Zhao H.P., Feng X.Q., Yu S.W., Cui W.Z., and Zou F.Z. (2005). Mechanical properties of silkworm cocoons. *Polymer*, 46, 9192–9201

Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H., and Kato, N. (2003). Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 71(1-3), 11-17.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı : Durbilmez

Adı : Gökşen Dilşat

Uyruğu :

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

Medeni Durum :

E-Posta :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	TÜBİTAK 2211-A Doktora Bursu	2019- Devam ediyor
	YÖK 100/2000 Bursu (Farmasötik Biyoteknoloji ve İlaç Tasarımı)	2017- Devam ediyor
	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Ana Bilim Dalı	2017- Devam ediyor
Lisans	Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Türk Dili ve Edebiyatı Bölümü	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2017
Lise	Nevşehir Hüseyin Avni İncekara Fen Lisesi	2012

Burslar:

TÜBİTAK 2211-A Doktora Bursu	2019- Devam ediyor
YÖK 100/2000 Bursu (Farmasötik Biyoteknoloji ve İlaç Tasarımı)	2017- Devam ediyor

Yabancı Dil

İngilizce

Kitap Bölümü

Çalışkan, U. K., El-seedi, H., Dönmez, C. and Durbilmez, G. D., (2020). Hyaluronıdase and gelatinase (MMP-2, MMP-9) inhibitör plants, D.N. Chauhan, *Advances in Phytopharmaceuticals for Human Health Apple* Academic (CRC) Press.

Uluslar ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Özdoğan, A., Çalışkan, U. K., Durbilmez, G. D. and Ş. K., (2021). Silk protein fibroin and its applications in health, *Acta Biologica Turcica,* 2458-7893, 34, 2, 105-113.

Durbilmez, G. D., Karakuş, M. M. and Çalışkan, U. K., (2021). Tiroid fonksiyon bozukluklarında fitoterapötik seçenekler, *Journal of Traditional Medical Complementary Therapies,* 2630-6425, 4, 1, 131- 146.

Çalışkan, U. K., Durbilmez, G. D. ve Memiş, G., (2019). Memiş, Benign prostat hiperplazisi üzerinde etkili fitoterapötikler, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 1015-3918, 43, 2, 173-196.

Onbaşlı, D., Yuvalı, G., Durbilmez, G. D., ve Öçsoy, İ. (2018). Kitosan-gümüş nanopartikülü ve kitosan-gümüş-grafen oksit nanokompozitinin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 2018, 1304-7280, 15, 3, 208-215.

Sözlü Bildiriler

Durbilmez, G. D. and Çalışkan U. K. Isolition of silk protein and synthesis/ characterization hybrid nanoflowers, 10 Eylül 2021.

Yıldırım, S., Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U. K., (2019). Cannabis use in skin disorders and cosmeceutical products, Sözlü Sunum, I. International Aromatic Plants and Cosmetic Symposium.

Durbilmez, G. D., Bor, E., Dönmez, C., Geçili, Özdemir F. N. and Çalışkan, U. K. Synthesis of hybrid nanoflowers with plant extracts traditionally utilized in skin problems and their activity profile, Sözlü Sunum, I. International Aromatic Plants and Cosmetic Symposium, 03 Ekim 2019, 06 Ekim 2019.

Durbilmez, G. D. and U. Koca Çalışkan, Comparatıve study of antıhyaluronıdase actıvıtıes of hybrıd nanoflowers of rosmarınus offıcınalıs methanol plant extract. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-13), 22-25 June, 2021.

Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U. K. Investıgatıon of hyaluronıdase ınhıbıtıon of copper and zınc nanoflowers of methanol extract of *cotınus coggygrıa* plant. In *10th International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress* (IPPC GREECE, 2021)

Posterler

Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U. K. Synthesis and characterization of silk protein and sericin nanoflowers, Poster Sunumu, IPPC, 03 Eylül2020, 04 Eylül 2020.

Bor, E., Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U.K. The ınvestıgatıon of hyaluronıdase ınhıbıtıon: plant extracts used for skın problems ın folk medıcıne and theır hybrıd nanoflowers, Poster Sunumu, IPPC, 03 Eylül 2020, 04 Eylül 2020.

Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U.K. Kronik obstrüktif akciğer hastalğ (KOAH) Tedavisinde tbbi bitkilern rolü, Poster Sunumu, ITCM-2 (2. İnternational Traditional And Complementary Medicine Congress), 24 Nisan 2019, 24 Nisan 2019.

Çalışkan, U.K. and Durbilmez, G. D. Phytotherapeutics in sports exercises, Poster Sunumu, ITCM-1 (1st İnternational Traditional and Complementary

Medicine Congress, 19 Nisan 2018, 22 Nisan 2018.

Durbilmez, G. D. and Çalışkan, U.K. Doğal ergojenikler ve spor eczacılğında eczacının ve akademisyenin rolü, Poster Sunumu, BİHAT-23 (23. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı), 09 Nisan 2018, 12 Nisan 2018.

Durbilmez, G. D. Onbaşlı, D. Yuvalı, G. Öçsoy, İ. ve Fidan, S. Kitosan-gümüş ve kitosan-gümüş-grafen oksit nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, Poster Sunumu, YEMPS, 27 Mayıs 2017, 27 Mayıs 2017.

Durbilmez, G.D., Onbaşlı, D., Yuvalı, G., Öçsoy, İ. and Fidan, S. Kitosan-gümüş ve kitosan-gümüş-grafen oksit nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, Poster Sunumu, İVEK 3. İnternational Convention of Pharmaceuticalsn and Pharmacies, 26 Nisan 2017, 29 Nisan 2017.

Ödüller

Uluslararası, *Third in the poster presantation competition during IPPC 2020, Synthesis and characterization of silk protein and sericin nanoflowers*, Ödül Alınan Kurum: 10. International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress, Yunanistan, 04 Eylül 2020.

Proje

Bombyx mori kozalarından protein izolasyonu, hibrid nanoçiçeklerinin sentezi, karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin in vitro yöntemlerle tayini, **Proje No: BAP-**02/2020-02, (Proje Tutarı: 50.000 TL), *Proje Araştırmacısı* (2020-)

GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…