



Synthesis and characterization of sericin-capped gold nanoparticles

Ömer Aktürk^{1*}, Zehra Gün Gök¹, Taylan Memik Daş², Özge Erdemli³

¹Department of Bioengineering, Kırıkkale University, Kırıkkale, 71450, Turkey

²Department of Mechanical Engineering, Kırıkkale University, Kırıkkale, 71450, Turkey

³Remodern Medical Biotechnology Ltd. Sti., Turkey

Highlights:

- Synthesis of gold nanoparticles with silk sericin isolated from *Bombyx mori* silkworm cocoon
- The role of sericin as a reducing and capping agent for the synthesis reaction
- Effect of sericin concentration on gold nanoparticle properties

Keywords:

- Gold nanoparticle
- *Bombyx mori* silk worm
- Sericin
- Surface plasmon resonance

Article Info:

Received: 13.12.2016

Accepted: 20.06.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416377

Acknowledgement:

The study was financially supported by the Kırıkkale University Scientific Research Projects (BAP) Coordination Unit under the project no 2016/141. We thank Kırıkkale University BAP Coordination Unit for their support.

Correspondence:

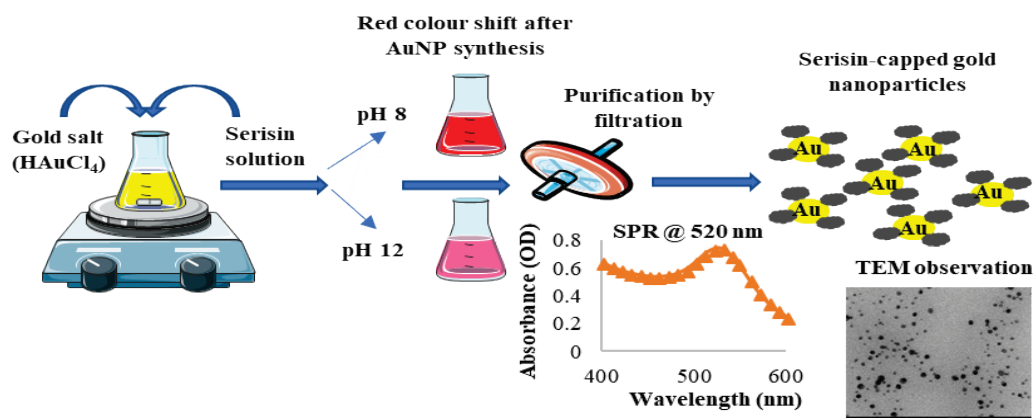
Author: Ömer Aktürk

e-mail:

omerakturk@kku.edu.tr

phone: +903183574242-1245

Graphical/Tabular Abstract



Purpose: Herein a new “green” and simple gold nanoparticle (AuNP) synthesis method was presented as an alternative to existing similar strategies. The effect of sericin concentration on synthesis reaction and on shape and size distribution of AuNPs, as well as on the aqueous stability of AuNPs was investigated in order to assess the potential ability of these AuNPs for future biomedical applications such as nanocarrier systems for therapeutics and so on.

Theory and Methods:

Sericin was isolated from *B. mori* silkworm cocoon by simply boiling cocoon fragments in de-ionized H₂O (0.01 M Na₂CO₃) for 30 min and then dialyzing the resulted sericin solution for 2 days. 10 mL of different sericin solutions (0.25, 0.5, 1% w/v) were mixed with equal volumes of gold salt (1 mM HAuCl₄·3H₂O) to obtain test groups (S-AuNP0.25, S-AuNP0.5, S-AuNP1) and exposed to UVC light for 1-day duration until a red ruby-like color was formed (Citrate-AuNP control group was synthesized similarly). AuNP synthesis was confirmed by spectral scans between 400-600 nm wavelength in UV-vis spectroscopy. Stability of AuNPs in different ionic strength media was characterized with similar spectral scans and zeta potential measurements were made as well. The size distribution and shape of AuNPs were examined with TEM micrographs.

Results:

Successful AuNP formation was clearly shown by UV-Vis spectral scans with surface plasmon resonance (SPR) peaks emerging at about 520 nm wavelengths. Adding sericin increased the negative zeta potentials of AuNPs and also suggested more stable nanoparticles in aqueous environment. S-AuNP1 and S-AuNP0.5 groups were better than S-AuNP0.25 and Citrate-AuNP groups in terms of stability. By visual observation, the reaction rate was slower in S-AuNP1 than S-AuNP0.5. Sericin also decreased AuNP size (< 10 nm) significantly and made the size distribution more homogenous.

Conclusion:

Sericin-capped gold nanoparticles (especially S-AuNP0.5 group with its high stability in aqueous environment and uniform size distribution) could be a promising candidate for future biomedical applications, such as nanocarrier systems for therapeutics or being as a bioactive agent alone. In vitro biocompatibility and potential biofunctions (such as antimicrobial, antioxidant features and so on) will further be assessed in the future for testing the potential applicability of these nanoparticles.



Serisin kaplı altın nanoparçacık sentezlenmesi ve karakterizasyonu

Ömer Aktürk^{1*}, Zehra Gün Gök¹, Taylan Memik Daş², Özge Erdemli³

¹Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

²Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

³Remodern Medikal Biyoteknoloji Ltd. Şti., Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- *Bombyx mori* ipek böceği kozasından izole edilen ipek serisini ile altın nanoparçacık sentezlenmesi
- Serisinin, sentez reaksiyonu için hem indirgeyici hem de kaplayıcı ajan olarak görev yapması
- Serisin derişiminin altın nanoparçacık özellikleri üstündeki etkisi

Makale Bilgileri

Geliş: 13.12.2016

Kabul: 20.06.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416377

Anahtar Kelimeler:

Altın nanoparçacık,
bombyx mori ipek böceği,
serisin,
yüzey plazmon rezonansı

ÖZET

Bu çalışmada, *Bombyx mori* ipek böceği kozasından elde edilen ipek serisini kullanarak serisin kaplı altın nanoparçacıklar (S-AuNP) sentezlenmiştir. Çözeltideki altın tuzu miktarı (10 mL, 1 mM) sabit tutularak buna farklı derişimlerde (%0,25, 0,5 ve 1) ve pH değerlerinde (8 ve 12) hazırlanmış 10 mL'lik serisin çözeltilerinden eklenerek deney grupları oluşturulmuştur (S-AuNP0,25, S-AuNP0,5, S-AuNP1). Bütün S-AuNP gruplarındaki kırmızı renk değişimi ve 520-530 nm dalga boylarında gözlemlenen belirgin yüzey plazmon rezonans (SPR) tepeleri nanoparçacık sentezlendiğinin göstergesidir. Ancak, bu kırmızı renk değişimi ve tepe noktaları pH 12'de belirgin değildir. FTIR analizine göre, serisinde bulunan N-H, O-H ve C=O fonksiyonel gruplarının indirgeme reaksiyonunda görev aldıkları düşünülmektedir. TEM görüntülerinde, artan serisin derişimiyle ortalama parçacık boyutu ve boyut dağılımı artmıştır. Serisin nanoparçacıkların yüzey yükünü negatif yapmıştır ve S-AuNP0,5 ve S-AuNP1 gruplarının negatif zeta potansiyelinin artması suda S-AuNP0,25 grubuna göre daha kararlı olduklarını göstermektedir. Bu bulgu, tuzda kararlılık deneyleriyle de teyit edilmiştir. S-AuNP0,25, 1 günlük inkübasyon periyodu sonucunda sıvıdaki kararlılığını yitirmiş ancak diğer gruplar 7 gün boyunca kararlı kalmıştır. Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, en uygun grubun S-AuNP0,5 olduğu kabul edilmiştir. Bu şekilde üretilen nanoparçacıkların biyomedikal sektörde nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistemler olma gibi potansiyel uygulama alanları olabilir.

Synthesis and characterization of sericin-capped gold nanoparticles

H I G H L I G H T S

- Synthesis of gold nanoparticles with silk sericin isolated from *Bombyx mori* silkworm cocoon
- The role of sericin as a reducing and capping agent for the synthesis reaction
- Effect of sericin concentration on gold nanoparticle properties

Article Info

Received: 13.12.2016

Accepted: 20.06.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416377

Keywords:

Gold nanoparticle,
bombyx mori silkworm,
sericin,
surface plasmon resonance

ABSTRACT

In this study, sericin-capped gold nanoparticles (S-AuNP) were synthesized by using the silk sericin isolated from *Bombyx mori* silkworm cocoon. Sericin solutions having different concentrations (0.25%, 0.5 and 1) and pH values (8 and 12) were added to fixed amount of gold salt (1 mM) to obtain experimental groups (S-AuNP0.25, S-AuNP0.5, S-AuNP1). Red color shift and distinct surface plasmon resonance (SPR) peaks observed at 520-530 nm wavelengths in all groups were indicative of nanoparticle synthesis. However, these red color shift and peaks were not clear in pH 12. According to FTIR analyses, N-H, O-H and C=O functional groups of sericin might have played a role in reduction reaction. In TEM images, both the average particle size and distribution of S-AuNPs increased with increasing sericin concentration. Sericin rendered the surface charge of nanoparticles negative and the increase in negative zeta potential of S-AuNP0.5 and S-AuNP1 showed that they were more stable in water than S-AuNP0.25. This result was confirmed with stability in salt experiments. S-AuNP0.25 lost its stability in salt after 1 day incubation, but the other groups remained stable as long as 7 days. As a whole, the most convenient group was assumed to be S-AuNP0.5. Such nanoparticles synthesized in this manner could have potential applications in biomedical sector such as nanosized drug delivery systems and so on.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: omerakturk@kku.edu.tr / Tel: +90 318 357 4242-1245

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Günümüzde, altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) genellikle ıslak-kimyasal sentez diye adlandırılan yöntemlerle üretilmektedir. Islak-kimyasal sentez hem indirgeyici hem de büyümeyi kontrol eden ajan olarak çevreye zararlı malzemeler kullanılabilen birçok basamak içerebilmekte ve bu basamaklardaki reaksiyonlar çok uzun sürede tamamlanmaktadır. AuNP sentezi için kullanılan Turkevich-Frens ve Brust-Schiffren geleneksel yöntemlerinin, sodyum sitrat ya da sodyum borohidrat gibi kimyasal madde kullanımından dolayı özellikle biyolojik ve medikal uygulamalarda bazı risklere ve biyolojik vasat içinde kısıtlı kararlılık gibi sorunlara neden olduğu bilinmektedir [1]. Son zamanlarda, jelatin [2], kollajen [3], ipek fibroini [4], kitosan oligosakkarit [5] gibi doğal proteinlerin hem indirgeyici ajan hem de stabilizör olarak kullanılmasıyla da biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir AuNP'ler sentezlenmeye başlanmıştır. Birçok biyoreaktantın, metalik iyonları iyice tanımlanmış şekilde ve boyutta nanoparçacıklar haline getirebildiği ve sonrasında oluşan nanoparçacıkları kapladığı ve koruduğu düşünülmektedir [6]. Bu şekilde oluşan biyoreaktant-AuNP nanokompozitler için ayrıca bir stabilizör ajan kullanılmasına gerek duyulmadığı gibi su içinde daha kararlıdır ve daha biyoyumludur. Ayrıca, bu nanokompozitlerin hazırlanmasında kullanılan yöntem (yeşil sentezleme yöntemi) çevresel bir toksite veya biyolojik bir tehlikeye neden olmadığından basit ve çevre dostudur [7]. AuNP'ler, kontrast ajanı [8], radyoterapi ajanı [9], biyoışaretleyiciler [10] ve biyosensörler [11] gibi birçok biyomedikal uygulamalar alanında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, altın nanoyüzeylere antibadiler (antikorlar) [12], büyüme faktörleri [13], hücre yapışma molekülleri ve peptitler [14] kolaylıkla eklenilebilmektedir. Son yıllarda, AuNP'lerin biyoyumluluğu geliştirdiği [15], antioksidan [16] ve antimikrobiyal etkilerinin [17] olduğu yönünde de çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, organik-inorganik karışımlarla elde edilen nanokompozit yapıların daha üstün özelliklerde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [18]. Bu çalışmada, literatürde bulunan yeşil sentezleme yöntemlerine benzer şekilde serisin kaplı AuNP'ler sentezlenmiş, bunların kimyasal yapıları FTIR spektroskopisi ile, sudaki kararlılıkları ise zeta potansiyel ölçümleri ile incelenmiş ve sentezlenen altın nanoparçacıkların boyut ve şekilleri ise TEM ile gözlemlenmiştir. Bununla birlikte değişik tuz derişimlerinde nanoparçacıkların kararlılığı spektrofotometrik ölçümlerle gösterilmiştir. Bu çalışmada sentezlenen serisin kaplı AuNP'ler, sahip olacakları muhtemel biyofonksiyonel özellikler (antioksidanlık, antimikrobiyal, biyoyumluluk vb.) sayesinde biyomedikal uygulamalarda kullanmak için de muhtemel adaylardır.

2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHOD)

2.1. Malzemeler (Materials)

Serisin elde etmek için kullanılan ipek böceği kozaları Kirman İplik şirketinden (Bursa) temin edilmiştir. Lityum bromür (ReagentPlus®, ≥ %99), sodyum karbonat (susuz,

toz halinde, %99,999), diyaliz selüloz membranı (14 kDa, ortalama genişliği 25 mm) ve trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich'den (Almanya) alınmıştır. Hidrojen tetrakloraurat (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Applichem'den (Almanya) alınmıştır. BD Falcon™ hücre ayırıcı filtre sistemi (100 µm, naylon) Fisher Scientific'den (ABD) temin edilmiştir. Millex-HV şırınga filtre birimi (0,45 µm, PVDF) Merck Millipore'dan (Almanya) alınmıştır.

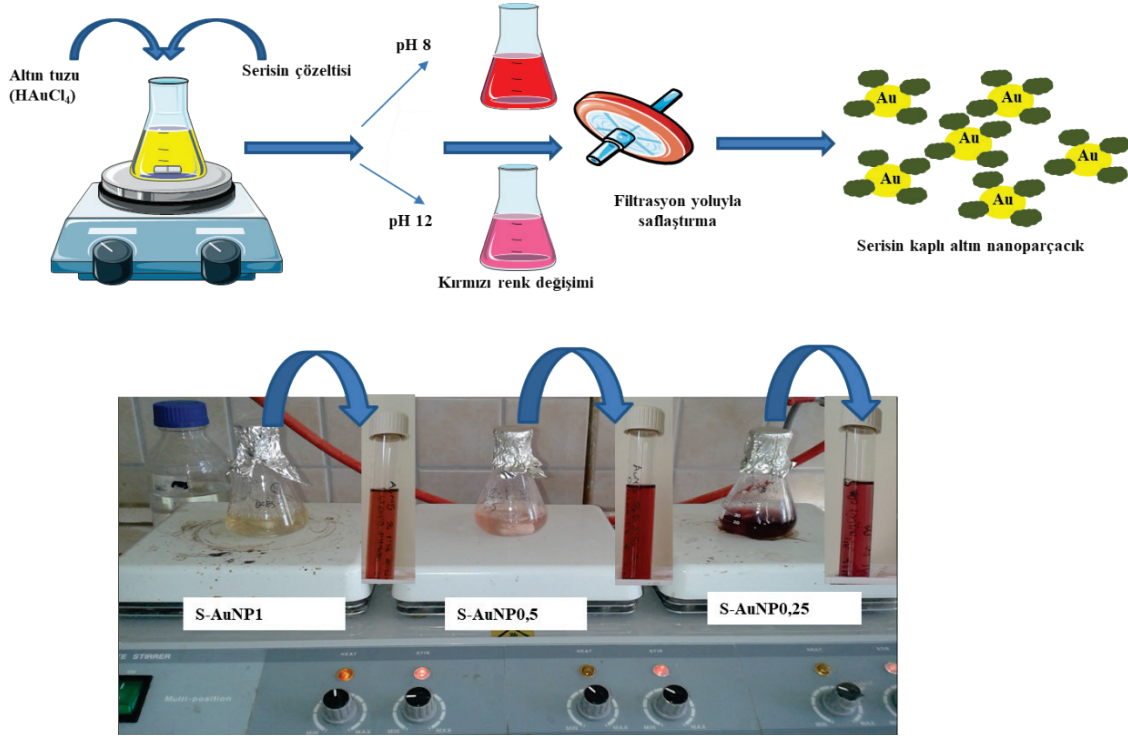
2.2. İpek Böceği Kozalarından Serisin Özüti Eldesi (Extraction of Sericin from Silkworm Cocoons)

İpek serisin eldesi için; öncelikle ipek böceği kozaları küçük parçalar halinde kesilmiş ve kaynamakta olan 0,02 M sodyum karbonatlı (Na_2CO_3) suya atılarak ipek serisini kozalardan çıkartılmıştır. Serisinden arındırılmış olan kozalar ortamdan uzaklaştırılarak serisin içeren çözelti kaynatılmaya devam edilmiş ve yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaşan çözelti selüloz membranlara aktararak deiyonize suda 2 gün boyunca günde iki kez suyu değiştirilerek diyaliz edilmiş ve sonuç olarak %0,35 (w/v) derişiminde bir serisin çözeltisi elde edilmiştir. Serisinin derişimi; diyaliz edilen çözeltiden belirli bir hacimde örnek alındıktan sonra fırında tamamen kurutulup ağırlığının hassas terazide ölçülmesi yoluyla bulunmuştur. Diyaliz sonucu elde edilen serisinin pH değeri 7,5-8 civarındadır. Hazırlanan NaOH (0,1 M) çözeltisi ile serisinin pH değeri 8 ve 12 olarak deneylerde kullanılmak üzere ayarlanmıştır. Elde edilen ipek serisinin moleküler ağırlık dağılımı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) comassie boyama tayini ile ODTÜ Merkezi Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'nde 100-260 kDa civarında bulunmuştur.

2.3. Serisin Kaplı Altın Nanoparçacık Sentezi ve Karakterizasyonu

(Synthesis and Characterization of Sericin-Capped Gold Nanoparticles)

1 g altın tuzu (Altın(III) klorür trihidrat, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) deiyonize suda çözülerek 1 mM'lık altın çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden alınan 10 mL, 50 mL'lik bir erlene aktarılıp manyetik karıştırıcı ısıtıcıya yerleştirilmiştir. Kaynama noktasında, yüksek hızda (800 rpm) karıştırılan altın çözeltisine pH 8 veya pH 12'de çözünerek hazırlanmış farklı derişimlerdeki serisin çözeltileri (%0,25, 0,5 ve 1 w/v, 10 mL) eklenmiştir. Farklı derişimlerde serisin çözeltisi eklenip ısıtılan altın çözeltilerinde gözlemlenen sarıdan kırmızı-mor arasındaki renklere dönüşümler, Au(III) iyonunun Au(0)'a indirgenmiş olduğunu göstermektedir. Bu renk derişimleri gözlemlenene kadar çözeltiler kaynama noktasında yüksek hızda karıştırılmıştır. Sonrasında elde edilen serisin kaplı AuNP içeren çözeltiler (S-AuNP0,25, S-AuNP0,5, S-AuNP1), sırasıyla 100 µL'lik ve 0,45 µL'lik filtrelerden geçirilerek deneyler sırasında oluşabilen safsızlıklardan (deney ortamından gelen kirlilik, deney sırasında oluşan kristal yapılar, agregalar vb) arındırılmıştır (Şekil 1). Ayrıca, serisin yerine sitrat kullanılarak benzer sentez yöntemiyle [19] zeta potansiyel ölçüm ve tuzlu suda kararlılık deneyleri için kontrol grubu (Sitrat-AuNP) hazırlanmıştır.



Şekil 1. Serisin kaplı altın nanoparçacık sentezlenmesinin şematik temsili resmi ve farklı deney gruplarının (S-AuNP0,25, S-AuNP0,5, S-AuNP1) sentez başlangıcındaki ve sentez bittiğindeki fotoğrafı (Schematic representation of sericin-capped gold nanoparticle synthesis and photo of different experimental groups (S-AuNP0,25, S-AuNP0,5, S-AuNP1) at the beginning and at the end of synthesis)

Isıtılarak sentezlenen S-AuNP gruplarının 400 ile 600 nm arasındaki absorbans spektrumu UV-Vis spektroskopisi (PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, ABD) ile Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (KÜBTUAM) ölçülmüştür. Kullanılan dalga boyu aralığında gözlemlenen yüzey plazmon rezonans (SPR) tepe noktaları (520-540 nm) ile AuNP oluşumu tespit edilmiştir. Farklı derişimlerde serisin çözeltisi eklenip ısıtılarak hazırlanan AuNP gruplarının boyut, şekil ve boyut dağılımları yüksek kontrastlı geçirimsiz elektron mikroskobu (CTEM, 120 kV, Tecnai™ G² Spirit Biotwin, FEI) ile ODTÜ Merkezi Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde incelenmiştir. Analizden önce AuNP'ler sonikatörde tutularak ve vorteksenerek sudaki kararlılıkları yeterli ölçüde sağlanmıştır. Daha sonra karbon kaplı bakır gritler üstüne bir miktar dökülerek tamamen kurutulmuş ve CTEM ile incelenmiştir. Gritlerde 3 ayrı bölgede, her bir bölge için en az 100 parçacığın boyutu ölçülerek AuNP'lerin ortalama boyutları ve boyut dağılımları belirlenmiş ($n \geq 300$) ve Image J programı (NIH, ABD) yardımıyla AuNP'lerin boyut dağılım analizi yapılmıştır. Elde edilen nanoparçacık boyut dağılımları eşit aralıklarla çizilmiş histogramlarda gösterilmiştir. Ayrıca, AuNP'lere ait kümülatif yüzde eğrileri de bu histogramlarda verilmiştir. AuNP'lerin parçacık boyu dağılım genişlik değerleri (SPAN değerleri), bu kümülatif yüzde eğrilerinden Eş. 1 kullanılarak hesaplanmıştır [20, 21].

$$\text{SPAN} = (d[0,9] - d[0,1]) / d[0,5] \quad (1)$$

Bu eşitlikte, $d[0,9]$, $d[0,5]$ ve $d[0,1]$ değerleri kümülatif yüzde eğrilerindeki sırasıyla 90., 50. ve 10. yüzdelerdeki ortalama nanoparçacık boyutlarını göstermektedir. S-AuNP gruplarının ve sentezlerde kullanılan ipek kozasından izole edilmiş serisinin kimyasal yapısı Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Vertex 70 V, Bruker) ile KBr peleti hazırlama tekniği kullanılarak KÜBTUAM'da belirlenmiştir. Her bir spektrum transmittans modu içinde 4 cm^{-1} netliği ve $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ spektral aralıkta 256 taramanın toplamıyla elde edilmiştir.

S-AuNP gruplarının zeta potansiyeli Malvern ZetaSizer Nano ZS aleti (Malvern Instruments, Malvern, UK) ile KÜBTUAM'da ölçülerek sudaki kararlılıkları bulunmuştur. S-AuNP'lerin farklı tuz derişimindeki (%10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 w/v) kararlılığı, UV-Vis spektroskopisi kullanılarak 400 ile 600 nm aralığındaki ölçümlerle incelenmiştir. Ayrıca aynı tuz derişimindeki S-AuNP kararlılıklarına, S-AuNP'ler bu tuz çözeltilerinde farklı zaman periyotlarında (1, 4 ve 7 gün sonra) inkübe edildikten sonra (37°C , 200 rpm) benzer spektral tarama ile bakılmıştır.

2.4. İstatistik Analizi

Elde edilen sonuçlar, Excel paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farkın saptanmasında Kruskal Wallis testi kullanılmış ve farklar $p < 0,05$ için anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

3.1. Serisin Kaplı Altın Nanoparçacık Sentezi (Synthesis of Sericin-Capped Gold Nanoparticles)

AuNP oluşumunun tespiti, farklı pH değerleri (pH 8 ve 12) ve serisin derişimleri kullanılarak hazırlanan grupların UV-Vis spektrumlarında SPR tepe dalga boylarının gözlemlenmesi ile yapılmıştır. Hazırlanan AuNP gruplarının UV-Vis spektrumları Şekil 2’de verilmiştir. pH 8 değerinde serisin çözeltileri ile hazırlanan gruplarda, sentez sırasında kullanılan serisin konsantrasyonu 0,25’den 1’e arttıkça SPR tepe dalga boyu değerleri 530 nm’den 520 nm’ye kaymıştır (Şekil 2 (A)). S-AuNP0,5 ve S-AuNP1 SPR tepe dalgaboyları arasında ise fark yoktur. Dalga boyundaki kırmızıya kayma (520 nm’den 530 nm’ye kayma) nanoparçacık boyutunun ve/veya nanoparçacık topaklanma eğiliminin büyüdüğüne işaret edebilir [22, 23]. Dalga boyu analizi sonuçlarından beklenildiği gibi S-AuNP0,25 grubu çözeltilerinde topaklanma eğilimi gözle görülmüştür. Sentez reaksiyonu sırasında AuNP oluşumuna işaret eden çözeltilerdeki kırmızı-pembe renk dönüşümü en erken AuNP-S0,25 grubunda daha sonra ise sırasıyla AuNP-S0,5 ve AuNP-S1 gruplarında başlamıştır. Yüksek serisin miktarı, AuNP’lerin sudaki kararlılığını arttırsa da sentez reaksiyonu sırasında yarattıkları sterik engelleme yüzünden sentez reaksiyon hızını önemli ölçüde düşürmüştür. Aramwit ve ark., çalışmalarında buna benzer bir sonuçla karşılaşmış ve yüksek serisin çözeltilerinde gümüş nanoparçacıkların oluşumunun yavaşladığını gözlemlemişlerdir [24]. Ayrıca, AuNP oluşumunu gösteren SPR tepelerinin pH 12’de yok olmaya başlaması bu gruplarda nanoparçacık sentez reaksiyon hızının düşmesi ve aynı sürede pH 8 gruplarına göre oldukça az nanoparçacık oluşması ile açıklanabilir. (Şekil 2 (B)). Bu sebeple bu gruplar diğer deneylerde kullanılmamıştır.

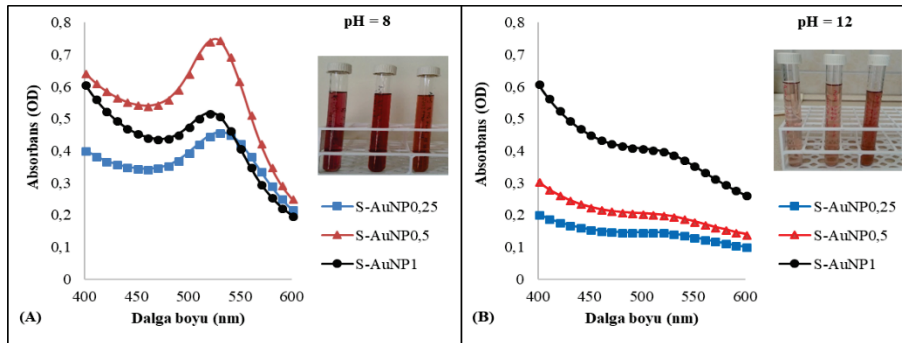
3.2. Serisin Kaplı Altın Nanoparçacıkların Boyut ve Morfoloji Analizi (Size and Morphology Analysis of Sericin-Capped Gold Nanoparticles)

Farklı S-AuNP gruplarının temsili TEM görüntüleri, parçacık boyut dağılımlarını gösteren histogramlar ve SPAN değerleri Şekil 3’de verilmektedir. Bütün gruplardaki

parçacık şekilleri ağırlıklı olarak küresel ve şekil dağılımı bakımından oldukça homojendir. Farklı şekillerde AuNP’lere (altıgen, üçgen, çubuk vb. AuNP’lere) rastlanmamıştır. S-AuNP0,5 ve S-AuNP1 gruplarında kaplayıcı ajan olarak kullanılan serisin miktarı S-AuNP0,25 grubuna göre fazla olduğu için, yüksek miktardaki serisin TEM görüntülerinde arka planda karanlık bölgelerin oluşmasına neden olmuştur. Bu sebeple, bu gruplarda S-AuNP süspansiyonları seyreltilip TEM analizi yapılmıştır. Yapılan seyreltme işlemi, bu grupların TEM görüntülerinde parçacıklara daha seyrek sayıda rastlanmasına neden olmuştur. TEM görüntülerinden Image J programı kullanılarak hesaplanan ortalama parçacık boyutları karşılaştırıldığında gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmüştür. Ortalama parçacık boyutunun serisin derişiminin artmasıyla birlikte belirgin olarak arttığı gözlemlenmiştir. AuNP gruplarının SPAN değerleri karşılaştırıldığında, S-AuNP0,5 grubu diğer gruplara göre daha düşük SPAN değerine sahiptir. SPAN değerinin küçük olması daha dar (homojen) bir boyut dağılımını göstermektedir [20, 21].

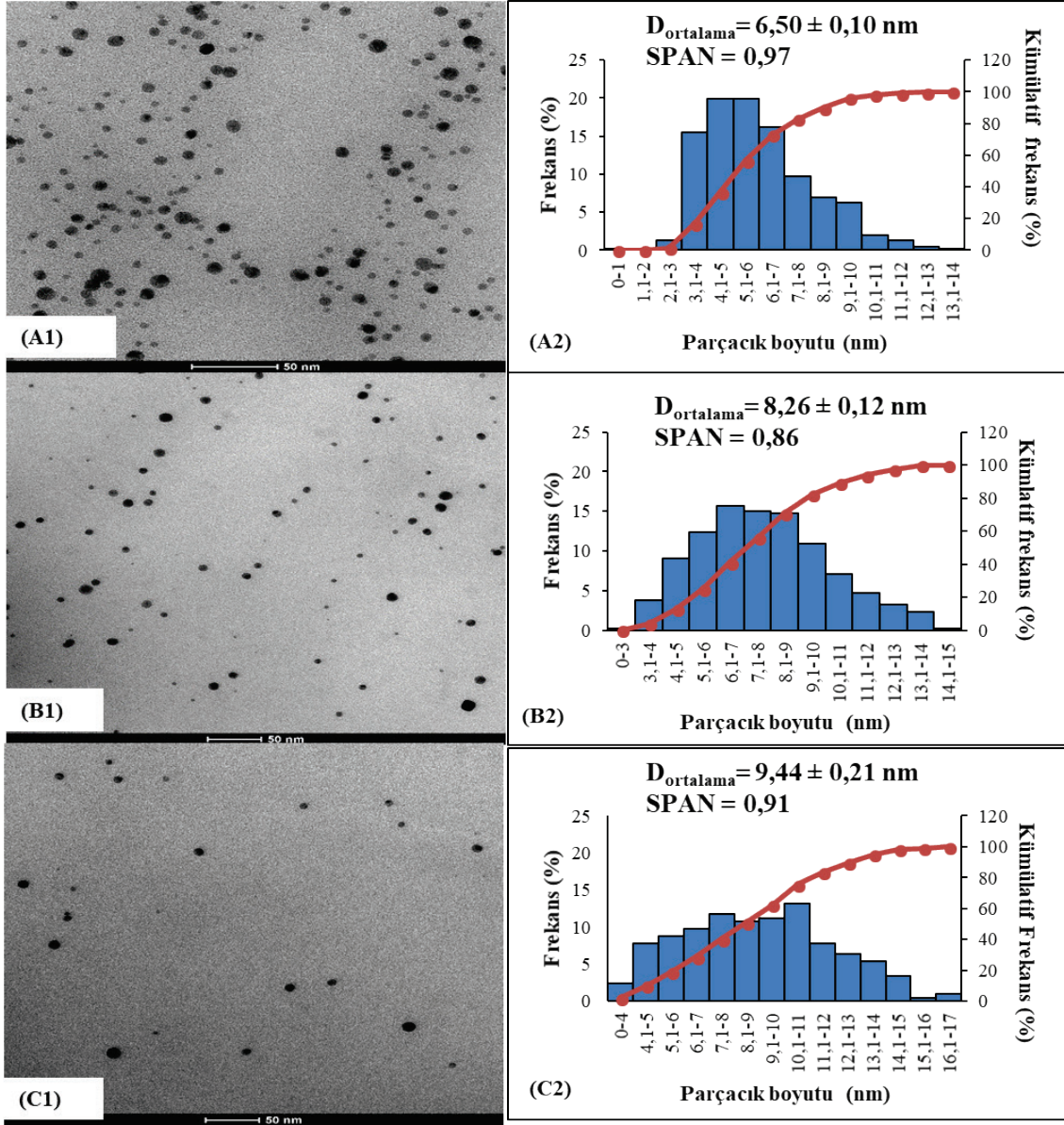
3.3. Serisin Kaplı Altın Nanoparçacıkların FTIR Analizi (FTIR Analysis of Sericin-Capped Gold Nanoparticles)

Farklı serisin derişimleri kullanılarak sentezlenen S-AuNP gruplarının ve AuNP sentezlerinde kullanılan serisinin FTIR spektrumları Şekil 4’te gösterilmiştir. İpek böceği kozalarından elde edilen serisin, hidroksil, karboksil ve amino gruplar gibi güçlü polar yan zincirlere sahip hidrofilik bir proteindir [24]. İpek böceği kozalarından elde edilen serisinin FTIR spektrumunda protein yapısında bulunan bu gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. 3500-3000 cm^{-1} aralığındaki N-H (Amit A bandı) ve 3600-3200 cm^{-1} aralığındaki O-H gerilme titreşimlerine ait bantlar üstüste çakışmış haldedir. Amit I grubuna ait C=O gerilme titreşim piki 1626 cm^{-1} ’de keskin bir pik halinde görülmektedir. Proteinlerin ikincil yapısı, Amit I pik pozisyonundan belirlenebilmektedir. İkincil yapıdaki α -heliks, β -yaprak ve gelişigüzel kıvrımlara ait pikler sırası ile 1655, 1630 ve 1645 cm^{-1} civarında görülmektedir [25, 26]. S-AuNP sentezinde kullanılan serisinin 1626 cm^{-1} ’de amit I pikine sahip olması ikincil yapısında β -yaprak varlığını göstermektedir. Doğal serisinin ikincil yapısı, %35 β -yaprak



Şekil 2. Farklı pH değerlerinde (A) pH: 8’de ve (B) pH:12’de sentezlenmiş S-AuNP gruplarının UV-Vis spektrumları ve S-AuNP çözeltilerindeki renk değişimleri

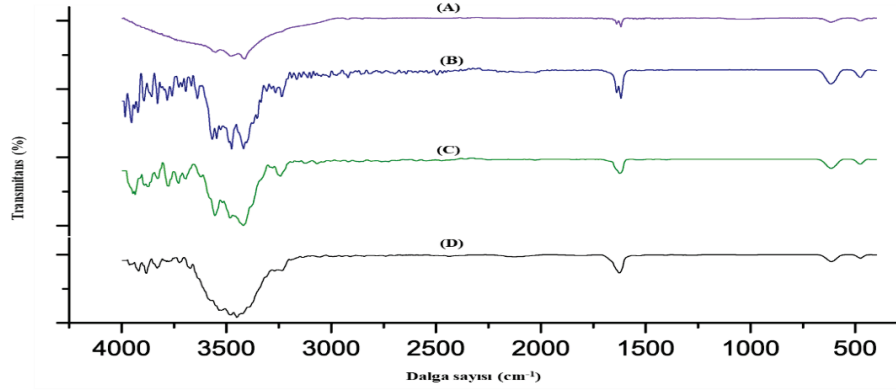
(UV-Vis spectra of S-AuNP groups synthesized at different pH values ((A) at pH 8 and (B) at pH 12) and the color changes in S-AuNP solutions)



Şekil 3. Farklı S-AuNP gruplarının ((A1, A2) S-AuNP0,25, (B1, B2) S-AuNP0,5 ve (C1, C2) S-AuNP1) temsili TEM görüntüleri ve parçacık boyut dağılım histogramları (Representative TEM images of different S-AuNP groups ((A1, A2) S-AuNP0,25, (B1, B2) S-AuNP0,5 and (C1, C2) S-AuNP1) and particle size distribution histograms)

ve %63 gelişigüzel kıvrımları içerirken, α -heliks yapısına sahip değildir [27]. İpek kozasından serisin elde edilmesi sırasında uygulanan ısıtma işleminin serisinin yapısındaki gelişigüzel kıvrımların daha kararlı olan β -yaprak yapısına dönüşmesine neden olduğu düşünülmektedir. Komatsu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, ısı uygulaması sırasında tekrarlanan nemin absorpsiyonu ve de-absorpsiyonu nedeniyle serisin ikinci yapısında gelişigüzel kıvrımların, β -yaprak yapısına dönüştüğü gözlemlenmiştir [28]. Farklı yöntemlerle sentezlenen S-AuNP gruplarının FTIR spektrumlarında da, serisin spektrumunda gözlemlenen karakteristik pikler görülmektedir. Bütün gruplarda 3500-3000 cm^{-1} aralığındaki N-H (Amit A bandı) ve 3600-3200 cm^{-1} aralığındaki O-H gerilme titreşimlerine ait bantlar üstüste çakışmış haldedir. Fakat, S-AuNP gruplarına ait spektrumlar ve serisine ait spektrumlar karşılaştırıldığında,

N-H ve O-H gerilmeleri ve titreşimlerinin neden olduğu bant bölgeleri birebir aynı değildir. Bantları oluşturan pik değerlerinde kaymalar veya pik şiddetlerinde azalmalar görülmüştür. Bu COO^- ve NH_2^+ gruplarının AuNP oluşumundaki etkisini göstermektedir. Kitosan oligosakkarit kullanılarak yapılan AuNP sentezi çalışmasında da, N-H ve O-H gerilmeleri titreşimlerine ait pik ve bantlarda görülen kaymaların bu grupların AuNP sentezinde yer almasından dolayı gözlemlendiği belirtilmiştir [5]. S-AuNP0,25 ve S-AuNP0,5 gruplarının FTIR spektrumlarında, serisin spektrumunda gözlemlenen C=O gerilme titreşim pik şiddetinde azalma veya bu pikin yanında yeni bir pik oluşumu görülmüştür. Bu gruplarda, ortamda daha az serisin olduğu için AuNP oluşumu sonucu bu pikte gerçekleşen değişimler kolaylıkla ayırt edilebilmekte ve ikinci pik oluşumu nedeniyle serisinin yapısındaki C=O fonksiyonel



Şekil 4. S-AuNP gruplarının ((A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1) ve (D) AuNP sentezlerinde kullanılan serisin FTIR spektrumları

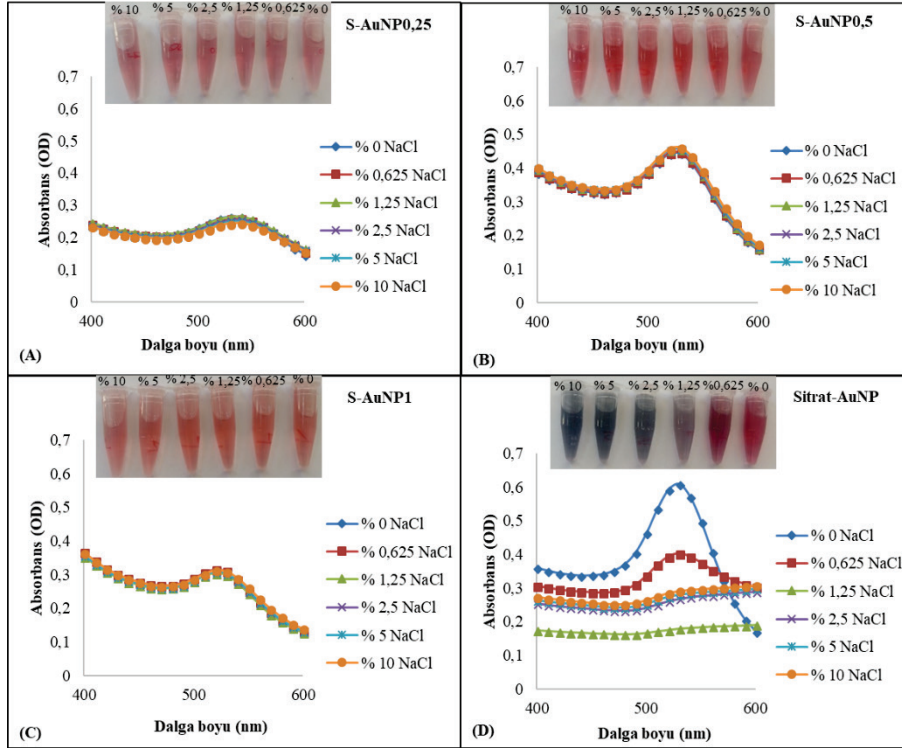
(FTIR spectra of different S-AuNP groups ((A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1) and (D) serisin used in AuNP synthesis)

grubunun AuNP oluşumunda rol aldığını düşünülmektedir. Fakat; S-AuNP1 grubunda serisin miktarı diğer iki gruba göre daha fazla olduğu için bu gruba ait spektrumda AuNP oluşumunda görev almamış serisine ait C=O fonksiyonel grubuna ait pikler ve AuNP oluşumunda görev alan C=O fonksiyonel grubuna ait piklerin örtüştüğü düşünülmektedir. Bu nedenle, S-AuNP1 grubunun spektrumunda serisin spektrumunda bu bölgede gözlenen bant şeklinin aynı gözlemlenmiştir

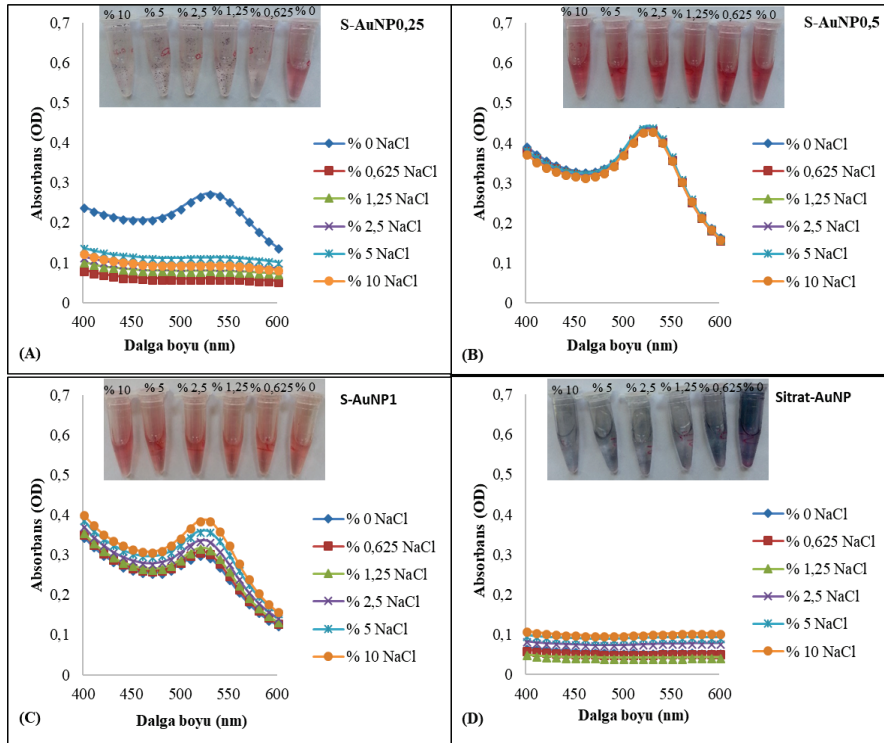
3.4. Serisin Kaplı Altın Nanoparçacıkların Sudaki Kararlılıkları (Aqueous Stability of Sericin-Capped Gold Nanoparticles)

Sentezlenen bütün S-AuNP gruplarının zeta potansiyeli negatif çıkmıştır. Bu çalışmada, serisinin izoelektrik noktasının (IP = 3,7) [29] üstündeki pH değerinde (pH 8) çalışıldığı için serisinin yüzey yükünün negatif olması zaten beklenilmektedir. S-AuNP0,25 grubunda zeta potansiyeli sıfıra yakın bulunmuştur. Bu sonuç, altının indirgenmesi için kullanılan serisin derişiminin (%0,25) reaksiyon için tam olarak yeterli miktarda olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sentez reaksiyonu bu grupta diğer gruplara kıyasla daha hızlı gerçekleşmiştir. Ancak; AuNP0,25 grubunda zeta potansiyeli (-0,8 mV) sudaki iyonik derişimlere karşı çok hassas olduğu bilinen sitrat-AuNP grubundan (-5,7 mV) bile daha düşük çıkmıştır. Bu sebeple, bu grup diğer iki S-AuNP grubuna göre suda daha az kararlıdır ve sentez reaksiyonunda 5 dakika içinde topaklanmalar ve çökeltiler oluşmaktadır. S-AuNP0,5 ve S-AuNP1 grupları ise sahip oldukları yüksek zeta potansiyeli sayesinde (sırasıyla, -31,4 ve -23,6 mV) S-AuNP0,25 grubuna göre suda daha kararlıdır. Ayrıca; S-AuNP1 grubunda zeta potansiyelinin S-AuNP0,5 grubuna göre bir miktar düşmesi, AuNP sentezlerinde kullanılan serisinin büyük oranda β -yaprak konformasyonuna sahip olması nedeniyle sudaki çözünürlüğünün az olması ve yüksek serisin derişimlerinde çökelti oluşma eğilimi ile açıklanabilir. Büyük oranda β -yaprak konformasyonuna sahip serisin türlerinin alkali ortamlarda daha iyi çözüldüğü önceki çalışmalarda gösterilmiştir [30]. AuNP'lerin sudaki kararlılığı, yüzey yükü ve yüzeyinin kaplı olduğu madde gibi yüzey

özelliklerine bağlıdır ve AuNP yüzeylerindeki elektrostatik itme ve/veya sterik engellenmenin artması AuNP'lerin sudaki kararlılıklarını arttırabilmektedir [4]. S-AuNP0,25 ve sitrat-AuNP gruplarının sudaki kararlılıklarının elektrostatik itme sonucu korunduğu, diğer grupların sudaki kararlılığının ise yüksek serisin derişimi sonucu oluşan sterik engellemeyle korunduğu söylenebilir. Şekil 5'te farklı derişimlerdeki tuz çözeltilerinin S-AuNP gruplarının kararlılıkları üstündeki etkilerinin incelendiği UV-Vis spektrumları verilmiştir. S-AuNP gruplarının hiçbirinde (%10'luk NaCl çözeltisinde bile) absorpsiyon özelliklerinde bir derişim gözlemlenmemiştir (Şekil 5 (A-C)). Bunun aksine, kontrol grubunun (sitrat-AuNP), suyun iyonik kuvvetindeki derişime karşı çok hassas olduğu ve NaCl tuzu eklenir eklenmez topaklandığı görülmüştür (Şekil 5 (D)). Düşük NaCl oranlarına sahip (%1,25'lik) tuz çözeltilerinde bile sitrat-AuNP'lerin topaklandığı gözlemlenmiştir. Artan NaCl miktarı ile birlikte S-AuNP gruplarının UV-Vis spektrumlarında gözlemlenen SPR tepelerinde kırmızıya kaymalar ve absorpsiyon bantlarında genişlemeler gözlemlenmiştir. 1 günlük inkübasyon sonuçlarına göre; sitrat-AuNP grupları tuz içermeyen suda bile kararlılığını yitirmiştir (Şekil 6 (D)). Ayrıca; 1 günün sonunda S-AuNP0,25 grubu tüm tuz içeren çözeltilerde kararlılığını yitirmiş ve topaklanmalar görülmüştür (Şekil 6 (A)). Diğer gruplar (S-AuNP0,5 S-AuNP1) ise 1. günün sonunda tüm tuz çözeltilerinde kararlılıklarını korumuştur. Bunun yanında, bu iki grubun tüm tuz çözeltilerinde 4 ya da 7 günlük inkübasyon süreleri sonunda bile absorpsiyon spektrumlarında belirgin bir derişim olmamıştır (Data gösterilmemiştir). FTIR analizlerine göre, serisinin yapısındaki hidroksil gruplarının AuNP oluşumunda yer alabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, serisindeki hidroksil gruplarının altın iyonları ile etkileşmesi sonucu S-AuNP'lerin su ve tuz çözeltilerinde topaklanma ve çökme eğiliminin azaldığı ve yüksek serisin derişimlerinde tamamen engellendiği düşünülmektedir. Benzer şekilde, serisin kaplı gümüş nanoparçacıkların sentezlendiği bir çalışmada da serisinde bulunan yüksek miktardaki hidroksil gruplarının gümüş iyonları ile kompleksleşerek topaklanma ve çökmeyi engellediği gözlemlenmiştir [24].



Şekil 5. Farklı derişimlerde NaCl içinde bulunan (A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1 ve (D) Sitrat-AuNP gruplarının inkübasyon öncesi UV-Vis spektumları
(UV-Vis spectra of (A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1 and (D) Citrate-AuNP groups in different concentrations of NaCl before incubation)



Şekil 6. Farklı derişimlerde NaCl içinde bulunan (A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1 ve (D) Sitrat-AuNP gruplarının 1 günlük inkübasyon (37 °C ve 200 rpm) süresi sonucundaki UV-Vis spektumları
(UV-Vis spectra of (A) S-AuNP0,25, (B) S-AuNP0,5, (C) S-AuNP1 and (D) Citrate-AuNP groups in different concentrations of NaCl after 1 day incubation (37 °C and 200 rpm) period)

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

İpek kozasından izole edilen serisin proteini hem indirgeyici hem de kaplayıcı ajan olarak kullanılarak yeşil bir sentez metoduyla serisin kaplı altın nanoparçacıklar başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. S-AuNP0,25 grubu, diğer gruplara (S-AuNP0,5 ve S-AuNP1) göre daha düşük zeta potansiyeline sahiptir ve tuzlu suda oldukça kararsızdır. S-AuNP1 grubunda ise diğer gruplara göre sentez reaksiyonu çok yavaştır. Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, S-AuNP0,5 grubu hızlı sentezlenmesi, sudaki yüksek kararlılığı, homojen boyut dağılımı ile AuNP sentezi için en uygun gruptur. Bu şekilde sentezlenen serisin kaplı altın nanoparçacıklar, sudaki ve yüksek tuzlu ortamlardaki kararlılıkları ve potansiyel biyofonksiyonları (antioksidanlık, antimikrobiyallık, biyoyumluluk, ilaç vb. biyoaktif maddeler için nanotaşıyıcı sistem olma) ile biyomedikal uygulamalar için önemli adaylar olabilir.

5. SİMGELER (SYMBOLS)

5.1. Kısaltmalar (Abbreviations)

AuNP	: Altın nanoparçacık
CTEM	: Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskopu
FTIR	: Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi
IP	: İzoelektrik noktası
S-AuNP	: Serisin kaplı altın nanoparçacık
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Sitrat-AuNP	: Sitrat kaplı altın nanoparçacık
SPAN	: Dağılım genişliği
SPR	: Yüzey plazmon rezonansı
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopu
UV-Vis	: Morötesi-Görünür ışık

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu proje, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından 2016/141 nolu proje ile desteklenmektedir. Desteklerinden dolayı Kırıkkale Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Freese C., Uboldi C., Gibson M.I., Unger R.E., Weksler B.B., Romero I.A., Couraud P.O., Kirkpatrick C.J., Uptake and Cytotoxicity of Citrate-Coated Gold Nanospheres: Comparative Studies on Human Endothelial and Epithelial Cells, *Particle and Fibre Toxicology*, 9 (1), 23, 2012.
- Suarasan S., Focsan M., Soritau O., Maniu D., Astilean S., One-Pot, Green Synthesis of Gold Nanoparticles by Gelatin and Investigation of Their Biological Effects on Osteoblast Cells, *Colloids and Surface B Biointerfaces*, 132, 122-131, 2015.
- Spadavecchia J., Apchain E., Albéric M., Fontan E., Reiche I., One-Step Synthesis of Collagen Hybrid Gold Nanoparticles and Formation on Egyptian-like Gold-Plated Archaeological Ivory, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 53 (32), 8363-8366, 2014.
- Jia L., Guo L., Zhu J., Ma Y., Stability and Cytocompatibility of Silk Fibroin-Capped Gold Nanoparticles, *Material Science and Engineering C*, 43, 231-236, 2014.
- Yang N., Li W.H., Preparation of Gold Nanoparticles Using Chitosan Oligosaccharide as a Reducing and Capping Reagent and Their In Vitro Cytotoxic Effect on Human Fibroblasts Cells, *Materials Letters*, 138, 154-157, 2015.
- Verma V.C., Anand S., Ulrichs C., Singh S.K., Biogenic Gold Nanotriangles from *Saccharomonospora* sp., an Endophytic Actinomycetes of *Azadirachta indica* A. Juss, *International Nano Letters*, 3 (1), 21, 2013.
- Zhang J.J., Gu M.M., Zheng T.T., Zhu J.J., Synthesis of Gelatin-Stabilized Gold Nanoparticles and Assembly of Carboxylic Single-Walled Carbon Nanotubes/Au Composites for Cytosensing and Drug Uptake, *Analytical Chemistry*, 81 (16), 6641-6648, 2009.
- Miladi I., Alric C., Dufort S., Mowat P., Dutour A., Mandon C., Laurent G., Bräuer-Krisch E., Herath N., Coll J.-L., Dutreix M., Lux F., Bazzi R., Billotey C., Janier M., Perriat P., Le Duc G., Roux S., Tillement O., The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 10 (6), 1116-1124, 2014.
- Yang C., Neshatian M., van Prooijen M., Cancer Nanotechnology: Enhanced Therapeutic Response Using Peptide-Modified Gold Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14 (7), 4813-4819, 2014.
- Haller E., Lindner W., Lammerhofer M., Gold Nanoparticle-Antibody Conjugates for Specific Extraction and Subsequent Analysis by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of Malondialdehyde-Modified Low Density Lipoprotein as Biomarker for Cardiovascular Risk, *Analytica Chimica Acta*, 857, 53-63, 2015.
- Gong Y., Chen X., Lu Y., Yang W., Self-Assembled Dipeptide-Gold Nanoparticle Hybrid Spheres for Highly Sensitive Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 392-398, 2015.
- Obaid G., Chambrier I., Cook M.J., Russell D.A., Cancer Targeting with Biomolecules: A Comparative Study of Photodynamic Therapy Efficacy Using Antibody or Lectin Conjugated Phthalocyanine-PEG Gold Nanoparticles, *Photochemical and Photobiological Science*, 14 (4), 737-747, 2015.
- Paviolo C., Chon J.W., Clayton A.H., Inhibiting EGFR Clustering and Cell Proliferation with Gold Nanoparticles, *Small*, 11 (14), 1638-1643, 2015.
- Gopalakrishnan R., Azhagiya Singam E.R., Vijaya Sundar J., Subramanian V., Interaction of Collagen Like

- Peptides with Gold Nanosurfaces: A Molecular Dynamics Investigation, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17 (7), 5172-5186, 2015.
15. Hung H.S., Chang C.H., Chang C.J., Tang C.M., Kao W.C., Lin S.Z., Hsieh H.H., Chu M.Y., Sun W.S., Hsu S.H., In Vitro Study of a Novel Nanogold-Collagen Composite to Enhance the Mesenchymal Stem Cell Behavior for Vascular Regeneration, *PLoS One*, 9 (8), e104019, 2014.
 16. Balasubramani G., Ramkumar R., Krishnaveni N., Pazhanimuthu A., Natarajan T., Sowmiya R., Perumal P., Structural Characterization, Antioxidant and Anticancer Properties of Gold Nanoparticles Synthesized from Leaf Extract (Decoction) of *Antigonon leptopus* Hook. & Arn., *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 83-89, 2015.
 17. Regiel-Futyra A., Kus-Liskiewicz M., Sebastian V., Irusta S., Arruebo M., Stochel G., Kyziol A., Development of Noncytotoxic Chitosan-Gold Nanocomposites as Efficient Antibacterial Materials, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7 (2), 1087-1099, 2015.
 18. Orman F., Altınten A., Temperature Controlled Synthesis of Polystyrene/Clay Nanocomposites and Their Characterizations, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 32 (2), 303-312, 2017.
 19. Aktürk O., Kismet K., Yasti A.C., Kuru S., Duymus M.E., Kaya F., Caydere M., Hucumenoglu S., Keskin D., Wet Electrospun Silk Fibroin/Gold Nanoparticle 3D Matrices for Wound Healing Applications, *RSC Advances*, 6 (16), 13234-13250, 2016.
 20. Vrana N.E., Erdemli O., Francius G., Fahs A., Rabineau M., Debry C., Tezcaner A., Keskin D., Lavalle P., Double Entrapment of Growth Factors by Nanoparticles Loaded into Polyelectrolyte Multilayer Films, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (8), 999-1008, 2014.
 21. Erdemli O., Keskin D., Tezcaner A., Influence of Excipients on Characteristics and Release Profiles of Poly(Epsilon-Caprolactone) Microspheres Containing Immunoglobulin G, *Material Science and Engineering C, Material Biological Applications*, 48, 391-399, 2015.
 22. Gary R., Carbone G., Petriashvili G., De Santo M.P., Barberi R., Detection of Gold Nanoparticles Aggregation Growth Induced by Nucleic Acid Through Laser Scanning Confocal Microscopy, *Sensors*, 16 (2), 258, 2016.
 23. Huang X., El-Sayed M.A., Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy, *Journal of Advanced Research*, 1 (1), 13-28, 2010.
 24. Aramwit P., Bang N., Ratanavaraporn J., Ekgasit S., Green Synthesis of Silk Sericin-Capped Silver Nanoparticles and Their Potent Anti-Bacterial Activity, *Nanoscale Research Letters*, 9 (1), 79, 2014.
 25. Teramoto H., Kameda T., Tamada Y., Preparation of Gel Film from Bombyx Mori Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72 (12), 3189-3196, 2008.
 26. Jackson M., Mantsch H.H., The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30 (2), 95-120, 1995.
 27. Tsukada M., Bertholon G., Preliminary Study of the Physicochemical Characteristics of Silk Sericin, *Bulletin de la Societe Française D'Histoire Des Hopitaux*, 10, 141-154, 1981.
 28. Komatsu K., Recent Advances in Sericin Research, *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 69 (1), 457-465, 1980.
 29. Wu L.P., Leng X.J., Sun Y., Ren F.Z., Nakai S., Analysis of the Effects of pH and Salt on the Conformation of the Sericin Particles by DLS and TEM Measurements, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 30 (5), 1391-1395, 2010.
 30. Rajput S.K., Singh M.K., Sericin-A Unique Biomaterial, *IOSR-Journal of Polymer and Textile Engineering*, 2 (3), 29-35, 2015.