



Organik Bileşik Olarak Altın Çilek (*Physalis peruviana*) Kabuk ve Meyve Özütü ile Çiçek Şekilli Hibrit Nanoyapıların Gıda Patojenleri Üzerine Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi ve Bu Nanoyapıların Morfolojik Karşılaştırılması

Ayşe DEMİRBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, 53100, Türkiye

Geliş Tarihi: 08.03.2021

Kabul Tarihi: 08.04.2021

Basım Tarihi: 30.06.2021

Atf yapmak için: Demirbaş, A. (2021). Organik bileşik olarak Altın çilek (*Physalis peruviana*) kabuk ve meyve özütü ile çiçek şekilli hibrit nanoyapıların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin incelenmesi ve bu nanoyapıların morfolojik karşılaştırılması. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(2), 157-161.

How to cite: Demirbaş, A. (2021). Comparison study of morphologic structures of synthesized hybrid nanoflowers using Goldenberry / Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) and their antimicrobial activity on food pathogens. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(2), 157-161.

*id: <https://orcid.org/0000-0002-7629-3263>

*Sorumlu yazarın:

Ayşe DEMİRBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, 53100, Türkiye

✉: ayse.demirbas@erdogan.edu.tr

Öz: Bu çalışmada, altın çilek meyve ekstresi-bakır (II) (Cu^{2+}) iyonları nanoflower (hNFs) (çiçek şekilli hibrit nanoyapılar) ve altın çilek kabuk ekstresi-bakır (II) (Cu^{2+}) iyonları nanoflower (hNFs) sentezlendi. Ve bu sentezlerin gıda kaynaklı bakteriyel patojenler (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* ve *Basillus cereus*) üzerine antimikrobiyal etkisi ayrıca sentezlenen çiçek şekilli hibrit nanoyapıların morfolojileri incelendi. Altın çilek kabuğu ekstresinin (AÇKE) ve altın çilek meyve ekstresinin (AÇME) ana bileşikleri organik bileşenler olarak ve bakır (II) (Cu^{2+}) iyonları inorganik bileşenler olarak sentezlendi. AÇME- Cu^{2+} nanoflowerları, AÇKE- Cu^{2+} nanoflower'lara kıyasla oldukça kompakt, gözenekli ve üniformdur. NF'lerin yapılarını gözlemlemek için Fourier Dönüşümü Kızılötesi spektrometresi (FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi kullanıldı. FT-IR'nin bulguları, NF'deki Cu-O ve Cu-N bağlarını gösterir ve bu NF'lerin gelişiminin bir göstergesi olabilir. Bununla birlikte, AÇME-hNF'lerin ve AÇKE-hNF'lerin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkileri doğrulandı. HNF'lerin antimikrobiyal etkilerinin bitki özlerindeki negative veya pozitif yüklü moleküller ile bağıntılı olabileceği bunda NF'ler arasındaki reaksiyonu artırabileceği söz konusu olabilir.

Anahtar kelimeler: Altın çilek, antimikrobiyal, gıda patojenleri, kabuk, meyve suyu, nanoyapılar.

Comparison Study of Morphologic Structures of Synthesized Hybrid Nanoflowers Using Goldenberry / Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) and Their Antimicrobial Activity on Food Pathogens

Abstract: In this work, we synthesized goldenberry peel extract-copper (II) (Cu^{2+}) ions nanoflower (NFs) and goldenberry fruit extract-copper (II) (Cu^{2+}) ions nanoflower (NFs) examine their antimicrobial properties on the food pathogen (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* and *Basillus cereus*). The main compounds of the goldenberry peel extract (GBPE) and the goldenberry fruit extract (GBFE) were organic components, and the copper (II) (Cu^{2+}) ions were inorganic components. GBFE- Cu^{2+} nanoflowers are quite compact, porous, and uniform as compared to GBPE- Cu^{2+} nanoflowers. Fourier Transform Infrared spectrometry (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Energy-Dispersive X-ray (EDX) spectroscopy were used to observe the structures of the NFs. The findings of FT-IR show Cu-O and Cu-N bonds in NFs, which may be an indicator of the development of NFs. Although the antimicrobial actions of GBPE-hNFs and GBFE-hNFs against food pathogens have been confirmed. The prospective pathways of the antimicrobial impacts of hNFs can be negatively/positively charged molecules in plant extracts, which could enhance the reaction between NFs.

*Corresponding author's:

Ayşe DEMİRBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of Fisheries, Rize, 53100, Turkey

✉: ayse.demirbas@erdogan.edu.tr

Keywords: Antimicrobial, bark, food pathogens, goldenberry, juice, nanostructures.

GİRİŞ

Son zamanlarda, “nanoflower (hNF'ler)” olarak adlandırılan organik-inorganik çiçek şeklindeki hibrit nanoyapılar, ilk olarak Zare ve arkadaşları tarafından keşfedilip inorganik bir kısım olarak Cu^{2+} ve organik bileşikler olarak protein / enzim kullanarak ve katalitik aktivite ve stabiliteyi desteklediği tanımlanmıştır (Ge vd., 2012).

NF'ler, enzim saflaştırma süreçleri, ilaç dağıtımı, aşı çalışmaları ve çevre koruma için olası uygulamalar gibi endüstriyel alanlar için de önemlidir (Lee vd., 2015; Shaalan vd., 2016; Shende vd., 2018; Dar vd., 2020). Altın kaynak ve diğerleri (2016), laktoperoksidazdan türetilen hNF'lerin serbest laktoperoksidazdan daha verimli katalitik aktivite gösterdiğini ve reaksiyon bitmeden önce hNF'lerin yeniden kullanılabilirliğini gözlemiştir. NF'nin keşfinden bu yana yaban turpu peroksidaz (Osoy vd., 2015), peroksidaz (Altın kaynak vd., 2016 gibi çoklu enzimler yeni NF'lerin üretimi için organik bileşenleri oluşturmuştur. Bunların yanı sıra bitki özütleri de çok kullanılan organik bileşikler arasındadır (Wu vd., 2016; Baldemir vd., 2017; Shende vd., 2018; Yılmaz vd., 2016; Kong vd., 2019; Dadi vd., 2020; Koca vd., 2020).

Bu çalışmada ilk kez AÇKE ve AÇME (organik) ve Cu^{2+} (inorganik) bileşenlerinin etkileşimi ile Cu-hNF'lerin biyolojik sentezi yapılmış ve antimikrobiyal özellikleri gıda kaynaklı bakteriyel patojenlere (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* ve *Bacillus cereus*) karşı test edilmiştir. Literatürde varılan araştırma sonuçlarına göre gıda patojenleri dünya genelinde insanlarda zehirlenmelere, kalıcı ve geri dönüşümü olmayan hasarlara ve hatta ölümlere sebebiyet vermektedir. Bu nedenle biz de bu çalışmamızda gıda patojenlerini ele alarak antimikrobiyal etkisini araştırmayı hedefledik. Elde edilen Cu-hNF'lerin karakterizasyonu ise enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) ve elektron mikroskobu (SEM) tarama görüntüleri ile analiz edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Hibrit Nanoflower'in Hazırlanması: Hibrit nanoflower (hNF) sentezi, Somturk (2015) sürecine önemli ölçüde güncellenen bir yaklaşım kullanılarak gerçekleştirildi. İkinci olarak, ultra saf su içinde 120 mM $CuSO_4$ stok çözeltisi hazırlandı. Ardından, 0.2 mL sulu bitki özütü (kabukları ve meyve) içeren 9 mL 10 mM PBS çözeltisine (pH 7.4) 60 uL $CuSO_4$ stok çözeltisi ilave edildi. Bu nihai karışım, kuvvetli bir şekilde çalkalandı ve sonra oda sıcaklığında 72 saat (RT = 20 °C) inkübasyon için dokunulmadan bırakıldı. İnkübasyondan sonra, HNF büyüme işlemi tamamlandı ve karışım, mavi renkli bir çökelti oluşturmak için santrifüjlendi. Elde edilen çökelti

en az 3 kez deiyonize su ile yıkandı ve reaksiyona girmemiş materyalleri uzaklaştırmak için 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. hNF çökeltisi karakterizasyon işlemi için oda sıcaklığında kapalı bir alanda kurutuldu.

hNF'lerin karakterizasyonu: Taramalı elektron mikroskobu (SEM), ZEISS EVO LS10 cihazında (Oberkochen, Almanya) nanoflower görüntüleri karakterize etmek için kullanılmıştır. Enerji dağıtıcı X-ışını (EDX-ZEISS EVO LS10) cihazı, nanoflowerların elemental analiz etmek için kullanılmıştır. Nanoflower kristal yapısı, X-ışını kırınım analizi (XRD-BRUKER AXS D8) (Karlsruhe, Almanya) ile tanımlanmıştır. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisinin (FT-IR) nanoflower spektrumlarının, FTIR Spektrometresi (Perkin Elmer 400 Spotlight 400 Görüntüleme Sistemi, Waltham, ABD) çalıştırılarak kimyasal bileşimini test ettiği gözlenmiştir.

Antibakteriyel aktivite: Daha önce belirtildiği gibi, hNF'lerin antibakteriyel işlevini değerlendirmek için agar disk difüzyon yaklaşımı kullanılmıştır (Koca vd., 2020; Baldemir vd., 2017). Kısaca, 0.5 ug/mL hNF'ler, gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin gelişimini inhibe etmek için kullanılır. 1.0×10^8 CFU/mL konsantrasyondaki bakteri kolonileri, aynı hNFs konsantrasyonları ile belirlenmiştir. Kültür plakalarının 37 °C'de 24 saat inkübe edilmesinden sonra, bakteriyel büyümenin inhibisyon alanı milimetre olarak ölçüldü (Shrivastava vd., 2007). Her bakteri suşu için üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

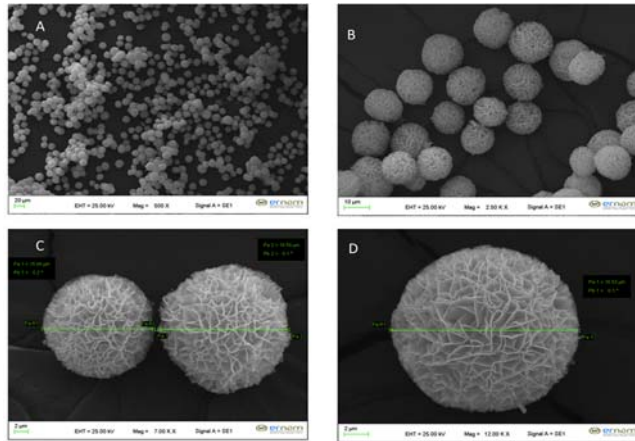
hNF'lerin sentezi ve karakterizasyonu: Bu çalışmada, AÇKE ve AÇME ilk olarak çiçek benzeri yapılar oluşturmak için organik bir bileşen olarak kullanılmıştır. Literatürde bulunan çeşitli çalışmalar ile sunulan çalışmanın organik-inorganik hibrit nanoyapıların oluşum mekanizması da yapılan analiz sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği kanıtlanmıştır. (Koca vd. 2020; Ge vd. 2012; Altın kaynak vd., 2016b; Ariza-Avidad vd., 2016; Thawari vd., 2016; Sun vd., 2014). Altın çilek kabuğu ve meyve (Şekil. 1) ekstresinin Cu-hNF biyosentezi bu çalışmada gerçekleştirilmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. SEM tarafından yapılan gözlemler, Cu-hNF'lerin çiçeğe benzer yapılar olduğu doğrulanmıştır (Şekil 2A, B, C, D, ve Şekil 3A, B, C, D). Petal benzeri yapılar, aşağıda görüldüğü gibi çiçek yapılarının gelişiminde rol oynamıştır.

Ayrıca aynı bitkilerin Cu-hNFs kabuğu ve meyve suyu bazlı Cu-hNF'ler ile dış ve iç bileşenlerinin etkisi incelenmiş ve AKME ekstraktları kullanılarak Cu-hNF'lerin mükemmel şekilde oluştuğu görülmüştür (Şekil 2). Çiçek şeklindeki AÇME-hNF'ler, AKME-hNF'lere

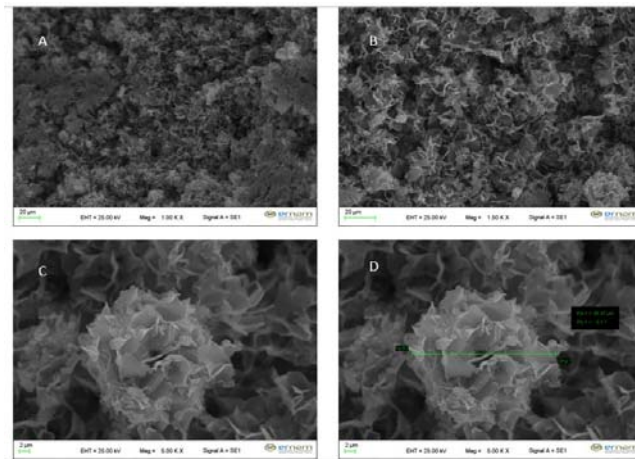
göre daha güçlü sıkı petaller oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şekil 3A, B, C, D) AÇKE kullanılarak sentezlenen Cu-hNF'lerde çiçek şeklindeki yapıların önemli ölçüde dağıldığı da gözlemlenmiştir (Şekil 3A, B, C, D).



Şekil 1. Altın çilek meyvesi (A), Altın çilek kabuğu (B).
Figure 1. Goldenberry fruit (A), peel of goldenberry (B).



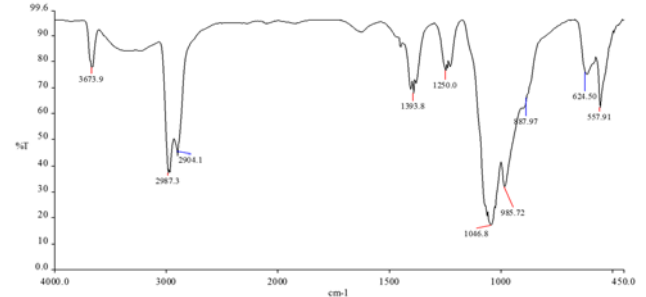
Şekil 2. AÇME-hNFs 'ların SEM görüntüleri.
Figure 2. SEM images of GBFE-hNFs.



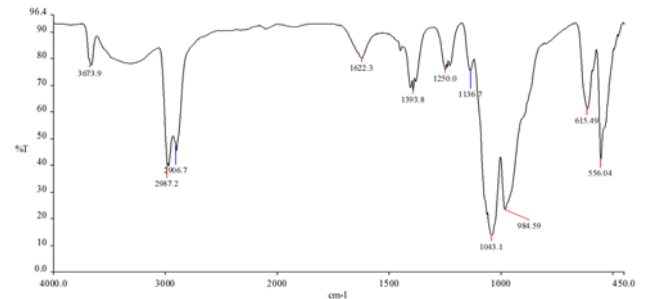
Şekil 3. AÇKE-hNFs 'ların SEM görüntüleri.
Figure 3. SEM Images of GBPE-hNFs.

FT-IR (Şekil 4. ve 5) ve EDX (Şekil 6), incelemesi Cu-hNF'lerin kurucu yapılarını değerlendirmek için kullanılır. Cu-hNF sentezinde yer alan fonksiyonel grupların varlığını belirlemek için, NF'ler FT-IR spektroskopisi (400 - 4000 cm^{-1} arasında) ile karakterize

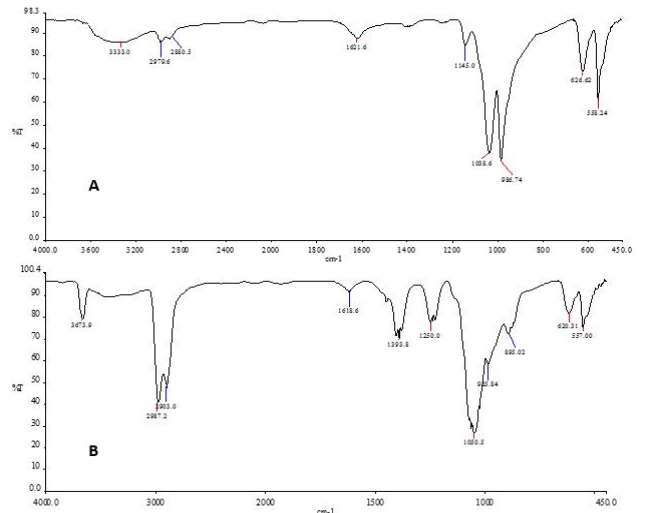
edilir. AÇME ve AÇKE ile sentezlenen Cu-hNF'lerin antimikrobiyal etkileri, gıda patojenlerine karşı kapsamlı bir şekilde kontrol edilmiştir. Cu-hNF'lerin DISC içeriği, ölçülen tüm mikroorganizmalar için 10 lg/mL 'lik bir konsantrasyonda tahmin edilmiştir (Şekil. 7).



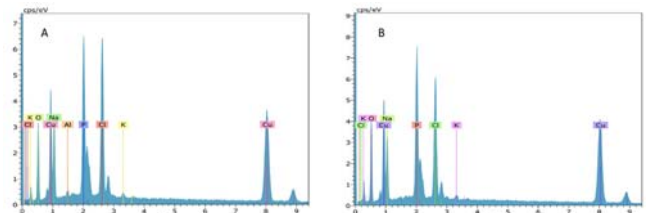
Şekil 4. FT-IR AÇME-hNFs ların sonuçları.
Figure 4. FT-IR results of GBFE-hNFs.



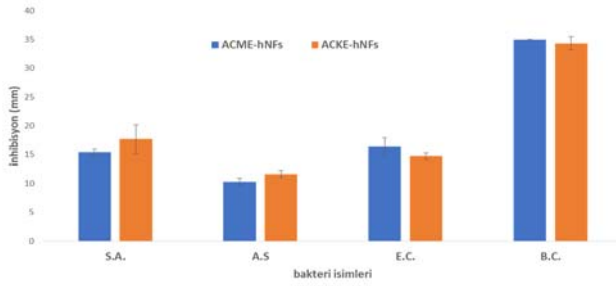
Şekil 5. FT-IR AÇKE-hNFs ların sonuçları.
Figure 5. FT-IR results of GBPE-hNFs.



Şekil 6. FT-IR AÇKE (A) ve AÇME (B) lerin sonuçları
Figure 6. FT-IR results of GBPE (A) and GBFE (B)



Şekil 7. AÇKE-hNFs (A) ve AÇME-hNFs (B) lerin EDX sonuçları.
Figure 7. EDX results of GBFE-hNFs (A) and GBPE-hNFs (B).



Şekil 8. AÇME-hNFs, AÇKE-hNFs lerin antimikrobiyel etkisi (inhibasyon (mm)) değerleri (S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.: *Escherichia coli*, A.S.: *Aeromonas spp.* ve B.C.: *Basillus cereus*)
Figure 8. Antimicrobial effects of GBFE-hNFs and GBPE-hNFs (Inhibition value (mm)) (S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.: *Escherichia coli*, A.S.: *Aeromonas spp.* ve B.C.: *Basillus cereus*)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Koca ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada da benzer şekilde önceki deneylerde Cu-hNFs sentezinde organik ve inorganik bileşiklerin konsantrasyonunun veya çeşitliliğinin, sentez sırasındaki pH seviyesinin ve reaksiyon süresinin önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Koca vd., 2020). Baldemir vd. (2017), Cu iyonları ve amin gruplarının fosfat tamponlama (nükleasyon) ile bağlanmasını ilk adım olarak tanımlayıp; Cu iyon bitki ekstraktındaki amin gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan Cu-hNF'lerin oluşum mekanizmasını belirlediğini ortaya koymuştur. Daha sonra ki süreçte, Cu-proteininin gelişiminin (büyüme) taçyapraklar tarafından üretildiği ikinci adım ve son adım olarak da anizotropik büyümenin ve çiçek oluşumunun tamamlandığı (tamamlanma) üçüncü aşama ile sonuçlandığını belirtmiştir. HNF'lerin oluşum mekanizmasına göre amin gruplarının metale bağlanma kabiliyeti ortam pH'ına bağlı olduğu rapor edilmiştir (Nhung vd., 2013).

SEM fotoğrafları, küçük boyut aralığında küresel morfolojiler olduğunu göstermektedir. AÇME-Cu-NF'lerin çapı da SEM görüntüleriyle 15-18 µm'de ölçüldü. AÇKE ekstresi ile sentezlenen Cu-NF'lerin ortalaması ise 20 µm olarak ölçülmüştür ve önceki araştırmaları doğrulamaktadır (Koca vd., 2020; Baldemir vd., 2017). FT-IR analizi ile belirlenen AÇME-hNF'lerin karakteristik kırınım noktaları 3673.9 cm⁻¹, 2987.3 -2904.1 cm⁻¹, 1393.8 cm⁻¹, 1250.0 cm⁻¹, 1046.8 cm⁻¹, sırasıyla (CH), amin tuzları (NH), alken (C = C), fenol (OH), alkilhalid (CF) ve alkol (CO) bant titreşimleri (Şekil 4) (Koca vd., 2020; Baldemir vd., 2017). Spektrumda gözlenen diğer AÇME-hNF kırınımları 985 cm⁻¹, 887 cm⁻¹, 624 cm⁻¹, 557 cm⁻¹ fosfat gruplarının titreşimine karşılık gelir PO₄³⁻ (Koca vd., 2020; Cho vd., 2008). FT-IR analizi ile belirlenen AÇKE-hNF'lerin karakteristik kırınım zirveleri ise 3673 cm⁻¹, 2987-2906 cm⁻¹, 1622.3 cm⁻¹, 1393.8 cm⁻¹, 1250.0 cm⁻¹, 1136.7 cm⁻¹, (CH), amini tuzlarını işaret ediyor (NH), alken (C = C), fenol (OH), alkilhalid (CF) ve alkol (CO)

bant titreşimleri sırasıyla (Şekil 5) (Koca vd., 2020; Baldemir vd., 2017). 984,59 cm⁻¹, 615.49 cm⁻¹, 556.04 cm⁻¹ spektrumunda bulunan diğer AÇKE-hNF zirveleri fosfat grubu titreşimine (PO₄³⁻) karşılık gelir (Koca vd., 2020; Cho vd., 2008). Şekil 6 da verildiği gibi sadece bitki ekstraktlarının FT-IR sonuçları verilmiştir. FT-IR çalışması, AÇME ve AÇKE'ye dayalı Cu-hNF'lerin PBS tamponunda sentezlendiği sonucuna varmıştır. Cu-NF'lerin kimyasal bileşimi bir EDX analizi kullanılarak hesaplanmıştır. EDX spektrumunun hNF iskeletinde Cu varlığı doğrulanmıştır (Şekil 7). AÇME bazlı Cu-hNF'ler küresel bir yapıya sahiptir ve karakterizasyon bulgularına göre PBS tamponunda 15 µm çap başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. *Staphylococcus aureus*; için AÇME ve AÇKE bazlı hNF'lerin oluşturduğu inhibasyon bölgelerinin sırasıyla 15.66 ve 18 mm olduğu, *Escherichia coli* için; 16 mm ve 15 mm, *Aeromonas spp.* için; 10 mm ve 12 mm, *Basillus cereus* için; 35 mm ve 34 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 8). HNF'lerdeki Cu²⁺ iyonları, Cu¹⁺ hidrojen radikallerine neden olan H₂O₂ varlığında Cu¹⁺ iyonları içerir. Bu radikallerin bakteri zarına zarar verdiği ve bakteri hücrelerini tahrip ettiği düşünülmektedir. (Baldemir vd., 2017).

Sonuç olarak; AÇME den elde edilen hNF'ler iyi dağılmış, tek tip ve küresel olarak gözlemlenmiştir. Hem AÇME-Cu²⁺ hNF'ler hem de AÇKE-Cu²⁺ hNF'ler, gıda kaynaklı bakteriyel patojenlere (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* ve *Basillus cereus*) karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, hem AÇME-Cu²⁺ hNF'ler hem de AÇKE-Cu²⁺ hNF'ler gıda sektörü uygulamaları için düşünülebilir veya patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri nedeniyle gıda paketleme materyallerinde kullanımı araştırılıp geliştirilebilir.

TEŞEKKÜR

Yazar, tüm deneysel kurgu ve uzman yorumları ile katkıda bulunan Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinden Doç. Dr. İsmail Öçsoy'a ve DLS ve Zeta ölçümleriyle ilgili yardımları için Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nden Berkay Saraymen'e teşekkür eder.

KAYNAKLAR

Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Özdemir, N. & Ocsoy, I. (2016b) A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology* 93-94, 105-112. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.06.011

- Ariza-Avidad, M., Salinas-Castillo, A. & Capitán-Vallvey, L.F. (2016)** A 3D mPAD based on a multi-enzyme organic-inorganic hybrid nanoflower reactor. *Biosensors and Bioelectronics* *77*, 51-55. DOI: [10.1016/j.bios.2015.09.012](https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.012)
- Baldemir, A., Kose, N.B., Ildiz, N., Ilgun, S., Yusufbeyoglu, S., Yilmaz, V. & Ocsoy, I. (2017)** Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major components-based nanoflowers: a new strategy to enhance antimicrobial activity. *RSC Adv* *7*, 44303. DOI: [10.1039/C7RA07618E](https://doi.org/10.1039/C7RA07618E)
- Cho, I.S., Kim, D.W., Lee, S., Kwak, C.H., Bae, S.T., Noh, J.H., Yoon, S.H., Jung, H.S., Kim, D.W. & Hong, K.S. (2008)** Synthesis of Cu₂-PO₄OH hierarchical superstructures with photocatalytic activity in visible light. *Adv. Funct. Mater.* *18*, 2154-2162. <http://pubs.kist.re.kr/handle/201004/33724>
- Dadi, S., Celik, Ç. & Ocsoy, I. (2020)** Gallic acid nanoflower immobilized membrane with peroxidase-like activity for m-cresol detection. *Scientific Reports* *10*, 16765. DOI: [10.1038/s41598-020-73778-7](https://doi.org/10.1038/s41598-020-73778-7)
- Dar, A.H., Rashid, N., Majid, I., Hussain, S. & Dar, M.A. (2020)** Nanotechnology interventions in aquaculture and seafood preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* *60*(11), 1912-1921. DOI: [10.1080/10408398.2019.1617232](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1617232)
- Ge, J., Lei, J. & Zare, R.N. (2012)** Protein-inorganic hybrid nanoflowers, *Nature Nanotechnology*, *7*, 428-432. DOI: [10.1038/nnano.2012.80](https://doi.org/10.1038/nnano.2012.80)
- Koca, F.D., Demirezen Yilmaz, D., Ertas Onmaz, N., Yilmaz, E. & Ocsoy, I. (2020)** Green synthesis of allicin based hybrid nanoflowers with evaluation of their catalytic and antimicrobial activities. *Biotechnol Lett* DOI: [10.1007/s10529-020-02877-2](https://doi.org/10.1007/s10529-020-02877-2)
- Kong, D., Jin, R., Zhao, X., Li, H., Yan, X., Liu, F., Sun, P., Gao, Y., Liang, X., Lin, Y. & Lu, G. (2019)** Protein-inorganic hybrid nanoflower-rooted agarose hydrogel platform for point-of-care detection of acetylcholine. *ACS Appl. Mater Interfaces* *11*(12), 11857-11864. DOI: [10.1021/acsami.8b21571](https://doi.org/10.1021/acsami.8b21571)
- Lee, S.W., Cheon, S.A., Kim, M. & Park, T. J. (2015)** Organic-inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *J Nanobiotechnol* *13*, 54 DOI: [10.1186/s12951-015-0118-0](https://doi.org/10.1186/s12951-015-0118-0)
- Nhung, T.T., Bu, Y. & Lee, S.W. (2013)** Facile synthesis of chitosan mediated gold nanoflowers as surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates. *J Cryst Growth* *373*, 132-137. https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/2013JCrGr.373..132N/doi:10.1016/j.jcrysgro.2012.09.042
- Shaalán, M., Saleh, M., El-Mahdy, M. & El-Matbouli, M. (2016)** Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *12*(3), 701-710. DOI: [10.1016/j.nano.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.005)
- Shende, P., Kasture P., Gaud, R.S. (2018)** Nanoflowers: the future trend of nanotechnology for multi-applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *46*(1),413-422 DOI: [10.1080/21691401.2018.1428812](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1428812)
- Shrivastava, S., Bera, T., Ro, A., Singh, G., Ramachandrarao, P. & Dash, D. (2007)** Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* *18*, 225103. DOI: [10.1088/0957-4484/18/22/225103](https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103)
- Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I. & Özdemir, N. (2015)** Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. *Dalton Trans* *44*(31), 13845-52. DOI: [10.1039/c5dt01250c](https://doi.org/10.1039/c5dt01250c)
- Sun, J., Ge, J., Liu, W., Lan, M., Zhang, H., Wang, P., Wang, Y. & Niu, Z. (2014)** Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale* *6*, 255-262. DOI: [10.1039/c3nr04425d](https://doi.org/10.1039/c3nr04425d)
- Thawari, A.G. & Rao, C.P. (2016)** Peroxidase-like catalytic activity of copper-mediated protein-inorganic hybrid nanoflowers and nanofibers of β-lactoglobulin and α-lactalbumin: synthesis, spectral characterization, microscopic features, and catalytic activity. *ACS Applied Material & Interfaces* *8*(16), 10392-10402. DOI: [10.1021/acsami.5b12591](https://doi.org/10.1021/acsami.5b12591)
- Yilmaz, E., Ocsoy, I., Ozdemir, N. & Soylak, M. (2016)** Bovine serum albumin-Cu(II) hybrid nanoflowers: an effective adsorbent for solid phase extraction and slurry sampling flame atomic absorption spectrometric analysis of cadmium and lead in water, hair, food and cigarette samples. *Anal. Chim Acta* *906*, 110-117. DOI: [10.1016/j.aca.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.001)
- Wu, Z., Wang, Z., Zhang, y., Ma, Y., He C., Li, H., Chen, L., Huo, Q., Wang, I. & Li, Z. (2016)** Amino acids-incorporated nanoflowers with an intrinsic peroxidase-like activity. *Sci. Rep.* *6*, 22412. DOI: [10.1038/srep22412](https://doi.org/10.1038/srep22412)