



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



MİKROORGANİZMALARDAN ANTİMİKROBİYAL PEPTİD ÜRETİMİ, İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARI

Yüksek Lisans Tezi

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROORGANİZMALARDAN
ANTİMİKROBİYAL PEPTİD ÜRETİMİ,
İMMOBİLİZASYONU VE
UYGULAMALARI

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER

Danışman: Doç. Dr. Alper AKKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir, 2019

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak sunulan **“Mikroorganizmalardan Antimikrobiyal Peptid Üretimi, İmmobilizasyonu ve Uygulamaları”** başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **24.07.2019** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Alper AKKAYA

.....

Raportör Üye: Prof Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

.....

Üye : Doç. Dr. Murat UYGUN

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Mikroorganizmalardan Antimikrobiyal Peptid Üretimi, İmmobilizasyonu ve Uygulamaları**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24/07/2019

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER

ÖZET**MİKROORGANİZMALARDAN ANTİMİKROBİYAL PEPTİD ÜRETİMİ,
İMMOBİLİZASYONU VE UYGULAMALARI**

ERDOĞAN ÖZŞEKER, Emine

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Alper AKKAYA

Temmuz 2019, 129 sayfa

Savunma peptidleri olarak da bilinen antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), mikroorganizmalardan insanlara kadar pek çok çeşitli yaşam formları tarafından üretilen kısa ve genel olarak pozitif yüklü peptidlerdir. AMP'lerin çoğu mikrobiyal patojenleri doğrudan öldürme kabiliyetine sahipken, diğerleri konakçı savunma sistemlerini değiştirerek dolaylı olarak etki ederler. Tüm dünyada konvansiyonel antibiyotiklere karşı hızla artan direnç gelişiminin sonucu olarak AMP'leri klinik kullanıma dahil etme çabaları hızlanmaktadır. Bazı AMP'ler şu anda klinik çalışmalarda yeni anti-enfektifler olarak değerlendirilmekte, aynı zamanda bağışıklık tepkisini modüle etmek, yara iyileşmesini hızlandırmak ve ameliyat sonrası yapışmayı önlemek için yeni farmakolojik maddeler olarak kullanım potansiyeli araştırılmaktadır.

Bu çalışmada farklı mikroorganizmalardan AMP üretilmesi, üretilen AMP'nin saflaştırılması ve saflaştırılan AMP'nin kalsiyum aljinata immobilize edilerek antimikrobiyal özellikte biyomateryal geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *Lactobacillus pentosus* (DSM 16366), *Bacillus subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *B. subtilis* (ATCC 6653) mikroorganizmalardan AMP üretimi gerçekleştirilmiştir. AMP üretiminin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyonda karbon kaynağı türü ve miktarı, azot kaynağı türü ve miktarı, pH ve sıcaklık parametreleri incelenmiştir. AMP üretimi her iki saatte bir besi ortamlarından alınan örneklerle antibakteriyel test uygulanması ile takip edilmiştir. Antibakteriyel test aşamasında Disk Difüzyon Metodu kullanılmıştır. AMP üretiminin optimizasyonu sonucunda en yüksek antibakteriyel aktivite elde edilen mikroorganizmadan (*L. pentosus* (DSM 16366))

AMP saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan AMP kalsiyum aljinat boncuklarına 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)kabodiimid (EDC) kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiştir. Tez alışması sonucunda geliştirilmesi hedeflenen ürün antibakteriyel olarak tasarlandığından dolayı antibakteriyel teste tabi tutulmuştur. Antibakteriyel test sonucunda, AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğu uygulanan bölgede mikrobiyal üreme gözlenmemiştir.

Sonuç olarak mikroorganizmalardan AMP retimi, üretilen AMP nin saflaştırılması ve uygulama olarak da saflaştırılan AMP'nin kalsiyum aljinat boncuklarına immobilizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve antibakteriyel özellikte bir biyomateryal elde edilmiştir. Tez alışması sonucunda elde edilen ürün, aljinatın yara örtüsü olarak kullanım özelliğinden de faydalanılarak özellikle açık yaralarda mikrobiyal kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanılma potansiyeline sahiptir.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal peptid, biyomolekül saflaştırılması, aljinat, kovalent immobilizasyon.



ABSTRACT**PRODUCTION, IMMOBILIZATION AND APPLICATIONS OF
ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MICROORGANISMS**

ERDOĞAN ÖZŞEKER, Emine

MSc in Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Alper AKKAYA

July 2019, 129 pages

Antimicrobial peptides (AMPs), also known as host defense peptides, are short and generally positively charged peptides found in a wide variety of life forms from microorganisms to humans. Most AMPs have the ability to kill microbial pathogens directly, whereas others act indirectly by modulating the host defense systems. Against a background of rapidly increasing resistance development to conventional antibiotics all over the world, efforts to bring AMPs into clinical use are accelerating. Several AMPs are currently being evaluated in clinical trials as novel anti-infectives, but also as new pharmacological agents to modulate the immune response, promote wound healing, and prevent post-surgical adhesions.

In this study, it is aimed that produce and purify AMP from different microorganisms and develop biomaterial with antimicrobial properties via immobilization of purified AMPs to calcium alginate. For this purpose, AMP production from *Lactobacillus pentosus* (DSM 16366), *Bacillus subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *B. subtilis* (ATCC 6653) was performed. Optimization studies of AMP production were carried out. In the optimization studies, carbon source type and amount, nitrogen source type and amount, pH and temperature parameters were examined. AMP production was monitored every two hours by applying antibacterial test to the samples taken from the media. Disc diffusion method was used in the antibacterial test stage. AMP purification was performed from the microorganism (*L. pentosus* (DSM 16366)) which indicated the highest antibacterial activity as a result of optimization of AMP production. The purified AMP was covalently immobilized to calcium alginate

beads using 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). As a result of the thesis, the product which was aimed to be developed was subjected to antibacterial test as it was designed as antibacterial. As a result of the antibacterial test, microbial growth was not observed in the region where AMP immobilized calcium alginate bead was applied.

As a result, AMP production from microorganisms, purification of the produced AMP and immobilization of purified AMP to calcium alginate beads were achieved successfully and an antibacterial biomaterial was obtained. The product obtained as a result of the thesis has the potential to be used in order to prevent microbial contamination especially in open wounds by taking advantage of the use of alginate as a wound dressing.

Keywords: Antimicrobial peptide, biomolecule purification, alginate, covalent immobilization.



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.B.D. Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yürüttüğüm “Mikroorganizmalardan Animikrobiyal Peptid Üretimi, İmmobilizasyonu ve Uygulaması” başlıklı projemin sonucunda elde ettiğim bilgileri dikkatinize sunmaktayım.

Tez çalışmamın konusunu, lisans tezimde ticari bir antimikrobiyal ajan ile çalışmış olmam ve bu çalışmayı, kullandığım antimikrobiyal ajanı laboratuvar koşullarında mikroorganizmalardan kendim üreterek bir üst boyuta taşımak istemem sonucu belirledim. Tez önerimi hazırlarken Fermentasyon Teknolojisi ve Medikal Biyoteknoloji alanlarında deneyim sahibi olan danışmanım Doç. Dr. Alper AKKAYA'nın bilgilerinden faydalandım. Kendisine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez önerimin hazırlanmasının ardından Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı'nda deneysel çalışmalara başladım. Tezimde kullandığım sarf ve kimyasal malzeme giderleri için Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (15-FEN-056 no'lu proje) ve Aliye Üster Vakfı'ndan destek aldım. Her iki kuruma da çalışmama yaptıkları maddi destek için teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Tez çalışmam bana akademiye yakından tanıma fırsatı sundu ve kendimi geliştirmeme katkı sağladı. Bu süreçte özellikle sabırlı olmayı öğrendim. Karşılaştığım zorlukların üzerinden ailem, danışmanım ve çalışma arkadaşlarım sayesinde gelebildim. Tez çalışmam boyunca her koşulda yanımda olup benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

24/07/2019

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	x
ÖNSÖZ.....	xiii
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
TABLolar DİZİNİ.....	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. AMPlerin Tarihçesi.....	4
2.2. AMP Biyosentezi	9
2.3. AMP'lerin Sınıflandırılması	9

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.1.	Biyokimyasal Sınıflandırma	10
2.3.2.	Yapısal Sınıflandırma	11
2.3.3.	Biyolojik Aktiviteye Göre Sınıflandırma	12
2.4.	AMP'lerin Etki Mekanizması	12
2.4.1.	AMP Aktivitesini Belirleyen Yapısal Faktörler	12
2.4.2.	AMPlerin Yapısal Belirleyicilerinde Ortak Temalar	16
2.4.3.	Hedef Membran ve Peptidin İlk Etkileşimi	17
2.4.4.	Membrana Bağlanmayı Takiben Gerçekleşen Olaylar	18
2.4.5.	Membran ile Etkileşim Sonrası Peptid Konformasyonunda Meydana Gelen Değişiklikler	19
2.5.	AMP'lerin Terapötik Ajanlar Olarak Kullanımı.....	22
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1.	GEREÇ.....	25
3.1.1.	Kimyasallar.....	25
3.1.2.	Cihazlar.....	25
3.1.3.	Mikroorganizmalar	25
3.1.4.	Besi ortamları.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Antimikrobiyal Peptid Üretiminin Optimizasyonu.....	28
3.3. Antibakteriyel Testler	29
3.4. Antimikrobiyal Peptid Saflaştırılması.....	29
3.4.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme ve Diyaliz	29
3.4.2. Sephadex G75 Üzerinde Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırma.....	30
3.4.3. DEAE-Sefaroz Üzerinde İyon Değişirme Kromatografisi ile Saflaştırma.....	30
3.5. Saflaştırılan AMP'nin SDS-PAGE ile Görüntülenmesi	30
3.6. Saflaştırılan Peptidlerin Kalsiyum Aljinat Boncuklarına İmmobilizasyonu.....	31
3.7. Peptid İmmobilize Kalsiyum Aljinat Boncuğunun Antibakteriyel Testi	32
3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme.....	33
3.9. ATR-FTIR Spektrumu.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. AMP Üretiminin Optimizasyonu	34
4.1.1. <i>Lactobacillus pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretiminin optimizasyonu.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.2. <i>Bacillus subtilis</i> (DSM 347)'dan AMP üretiminin optimizasyonu	49
4.1.3. <i>Bacillus cereus</i> 'dan AMP üretiminin optimizasyonu	60
4.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)'dan AMP üretiminin optimizasyonu	71
4.1.5. <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6653)'dan AMP üretiminin optimizasyonu	83
4.2. Antimikrobiyal Peptid Saflaştırılması.....	94
4.3. Antimikrobiyal Peptid İmmobilizasyonunun Optimizasyonu.....	97
4.3.1. İmmobilizasyona pH etkisi	98
4.3.2. İmmobilizasyona tampon konsantrasyonu etkisi	99
4.3.3. İmmobilizasyona boncuk sayısı etkisi	99
4.3.4. İmmobilizasyona başlangıç AMP konsantrasyonu etkisi	100
4.4. Antibakteriyel Testler.....	101
4.5. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme.....	101
4.6. ATR FTIR Spektrumu.....	103
5. TARTIŞMA.....	106
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	114
KAYNAKLAR DİZİNİ	116

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

TEŞEKKÜR 128

ÖZGEÇMİŞ..... 129



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. AMP aktivitesini etkileyen yapısal faktörler.	13
Şekil 2. Antimikrobiyal etki mekanizması için sunulan modeller.	22
Şekil 3. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'nın büyüme eğrisi.	34
Şekil 4. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'in büyüme eğrisi.	34
Şekil 5. <i>B. cereus</i> 'un büyüme eğrisi.	35
Şekil 6. <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)'nın büyüme eğrisi.	35
Şekil 7. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'nın büyüme eğrisi.	36
Şekil 8. Optimum koşullarda gerçekleştirilen üretim sonrası elde edilen örneğin antibakteriyel testi.	95
Şekil 9. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örneğin antibakteriyel testi.	95
Şekil 10. Sephadex G75 kolonuna yüklenerek (jel filtrasyon kromatografisi ile) elüe edilen örneğin antibakteriyel testi.	96
Şekil 11. DEAE Sefaroz kolonuna yüklenerek (iyon değişim kromatografisi ile) elüe edilen örneğin antibakteriyel testi.	96
Şekil 12. Saflaştırılan AMP'nin SDS-PAGE görüntüsü.	97
Şekil 13. Literatür SDS-PAGE görüntüsü.	97
Şekil 14. BSA standanrt grafiği.	98

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 15. AMP immobilizasyonuna pH etkisi.	98
Şekil 16. AMP immobilizasyonuna tampon konsantrasyonu etkisi.....	99
Şekil 17. AMP immobilizasyonuna boncuk sayısı etkisi.	100
Şekil 18. AMP immobilizasyonuna başlangıç AMP konsantrasyonu etkisi.....	100
Şekil 19. A: AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun antibakteriyel testi. B: İşlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğunun antibakteriyel testi.	101
Şekil 20. Kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü.....	102
Şekil 21. AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü.....	103
Şekil 22. Kalsiyum aljinat boncuğunun ATR-FTIR spektrumu.....	104
Şekil 23. AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun ATR-FTIR spektrumu.....	105
Şekil 24. <i>L. pentosus</i> (DSM 163669)'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.....	109
Şekil 25. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.	109
Şekil 26. <i>B. cereus</i> 'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.	110
Şekil 27. <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.	110

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Sayfa**

Şekil 28. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.	111
--	-----





TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. AMP veri tabanları.....	8
Tablo 2. Biyokimyasal özelliklerine göre AMP'ler	10
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.	25
Tablo 4. Antimikrobiyal peptid üretim ortamı 1 içeriği.....	26
Tablo 5. Antimikrobiyal peptid üretim ortamı 2 içeriği.....	26
Tablo 6. MRS broth içeriği	27
Tablo 7. M17 broth içeriği	27
Tablo 8. TSB içeriği.....	28
Tablo 9. Antimikrobiyal peptid üretiminin optimizasyonunda incelenen parametreler.	28
Tablo 10. % 12'lik SDS-PAGE jel hazırlamak için kullanılan çözeltiler.	31
Tablo 11. İmmobilizasyonun optimizasyonunda incelenen parametreler.....	32
Tablo 12. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'un farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi.....	36
Tablo 13. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi.....	38
Tablo 14. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi.....	40

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Sayfa

Tablo 15. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi	42
Tablo 16. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi	44
Tablo 17. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine pH etkisi	46
Tablo 18. <i>L. pentosus</i> (DSM 16366)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi	47
Tablo 19. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'in farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi.....	49
Tablo 20. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi	51
Tablo 21. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi	52
Tablo 22. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi	54
Tablo 23. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi.....	55
Tablo 24. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine pH etkisi	57
Tablo 25. <i>B. subtilis</i> (DSM 347)'ten AMP üretimine sıcaklık etkisi.....	59
Tablo 26. <i>B. cereus</i> 'un farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi.....	60
Tablo 27. <i>B. cereus</i> 'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi	62

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Sayfa

Tablo 28. *B. cereus*'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi .63

Tablo 29. *B. cereus*'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi65

Tablo 30. *B. cereus*'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi.....67

Tablo 31. *B. cereus*'dan AMP üretimine pH etkisi69

Tablo 32. *B. cereus*'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi.....70

Tablo 33. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'nın farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi72

Tablo 34. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi73

Tablo 35. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi75

Tablo 36. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi76

Tablo 37. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi78

Tablo 38. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine pH etkisi80

Tablo 39. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi.....81

Tablo 40. *B. subtilis* (ATCC 6653)'in farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi83

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Sayfa

Tablo 41. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi	84
Tablo 42. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi	86
Tablo 43. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi	88
Tablo 44. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi	89
Tablo 45. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine pH etkisi	91
Tablo 46. <i>B. subtilis</i> (ATCC 6653)'ten AMP üretimine sıcaklık etkisi.....	93



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat derece
μl	Mikrolitre
M	Molar
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
U	Unit
α	Alfa
β	Beta
Δψ	Elektrokimyasal radyasyon
θ	Teta
<u>Kısaltmalar</u>	
A	Amfipatiklik
AMP	Antimikrobiyal peptid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)kabodiimid
H	Hidrofobiklik
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LPS	Lipopolisakkarit

MBC	Minimum bakterisit konsantrasyon
MH	Hidrofobik moment
MIC	Minium inhibisyon konsantrasyonu
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PG	Fosfatidil gliserol
Q	Yük
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
VRE	Vankomisine dirençli enterokoklar
X	Konformasyon



1. GİRİŞ

Bakterilerin antibiyotiklere karşı koymak için farklı stratejiler geliştirdikleri bilinmektedir. Bakteriler, antibiyotiği enzimatik olarak parçalayarak, antibiyotik hedef bölgesini değiştirerek veya gelen antibiyotiği bir taşıma mekanizması ile hücreden dışarı pompalayarak etki gösterebilir. Bu tür süreçler, *P. aeruginosa* (Paterson 2006), *Escherichia coli* (Overbye and Barrett, 2005), metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Reynolds et al., 2004) ve penisilin dirençli *S. pneumonia* (Karchmer 2004) gibi sofistike ve genellikle yüksek dirençli patojenlerle karşı karşıya kaldığımız durumlarda enfeksiyon tedavisini çok zorlaştırır. Antibiyotiklerin uygulanması hala enfeksiyonları tedavi etmek için en önemli pratik strateji olmasına ve antibiyotik direncinin gelişimi dünya çapında endişe verici bir oranda artmasına karşın, terapötik kullanıma yönelik sadece bir tane yeni antibiyotik sınıfı (oksazolidinonlar-2000 yılında keşfedilen) geliştirildi (Walsh and Wright 2005). Bu nedenle, yeni engelleyici mekanizmalara sahip etkili antibakteriyel madde geliştirmeye acil bir ihtiyaç vardır. Bunların geliştirilmesi ile dirençli patojenlerle ve bunların antibiyotiğe dirençli türevleriyle mücadele edebilecek için geleneksel antibiyotiklerle yer değiştirebilecek antimikrobiyal ajanlar elde edilebilir.

Alternatif bir antimikrobiyal strateji olarak AMP'lere ilişkin çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Wimley and Hristova 2011; Cotter et al., 2013). AMP'ler, antibiyotiğe dirençli bakteri ve mantarlara karşı geniş spektrumlu bir aktivite sergilerler, ayrıca belirli bir protein bağlama bölgesi için spesifik bir afinite göstermezler. Her iki özellik de AMP'lere bağlı bakteriyel direnç riskini azaltır (Wimley and Hristova, 2011).

AMPlerin özellikleri, onları antibiyotiklere alternatif olarak ideal yapar. AMPler, aynı tür (dar spektrum) veya farklı cins (geniş spektrum) bakterilerin büyümesini inhibe edebilir (Cotter et al., 2005; Snyder and Worobo, 2014). AMPler, yaklaşık 20-60 amino asit kalıntısı civarında kısa zincirlerden oluşan küçük, ısıya dayanıklı peptidlerdir, ancak daha uzun zincirler de bulunabilir (Snyder and Worobo 2014). AMPlerin çoğu, BACTIBASE veri tabanında bildirildiği üzere, Gram pozitif bakteriler tarafından üretilmektedir. Gram negatif bakterilerden de az sayıda AMP tanımlanmıştır (Hammami et al., 2013).

AMPler, farklı şekilde etki gösterebilir. Genel olarak, bakteriyosinler ya hücre zarında ya da hücre içerisinde aktivite gösterirler (Cotter et al., 2013). Bakteriyel hücre ölümü, hücre içeriğinin hücre dışına sızması, hücre lizisi (peptidoglikan inhibisyonu ile), protein sentezi inhibisyonu (16S rRNA'nın bölünmesiyle), kritik iyon gradyanlarının uzaklaştırılması ve DNA degradasyonu gibi farklı yollarla gerçekleşebilir (Vriezen et al., 2009; Hammami et al., 2013). AMPler ve antibiyotikler arasındaki etki şekli önemli ölçüde farklılık gösterir ve bu durum AMPleri antibiyotiklere uygun bir alternatif haline getirir (Hammami et al., 2013).

AMP aktivitesini taramanın en basit yolu, petri kaplarında bulunan agar besiyerinde doğrudan eşzamanlı antagonizmdir (Chen and Hoover, 2003). Prensip olarak, Antonie van Leeuwenhoek'un bir mikroorganizmadan elde edilen ürünün bir diğerinin büyümesini engellediği çalışmalarına dayanmaktadır (Chen & Hoover 2003). Bazı kısıtlamaları olmasına ve zahmetli bir yöntem olarak bilinmesine rağmen, organizmaların inhibe edici aktivitesinin taranması penisilin gibi yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesine neden olmuştur (Snyder and Worobo, 2014).

Bu çalışmada farklı mikroorganizmalardan AMP üretilmesi, üretilen AMP'nin saflaştırılması ve saflaştırılan AMP'nin ticari kullanımına yönelik uygulamasının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, 5 farklı mikroorganizmadan AMP üretimi gerçekleştirilmiştir. AMP üretiminde kaynak olarak kullanılan mikroorganizmalardan *L. pentosus* (DSM 16366), *B. subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, ve *B. subtilis* (ATCC 6653) Gram pozitif bakteriler olup, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ise Gram negatif bir bakteridir. AMP üretimi, yukarıda da belirtildiği üzere daha çok Gram pozitif bakterilerden gerçekleştirildiği için, tez çalışmasında da özellikle Gram pozitif bakteriler üretici suş olarak seçilmiştir.

Tez çalışması kapsamında AMP üretiminin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında karbon kaynağı türü ve miktarı, azot kaynağı türü ve miktarı, pH ve sıcaklık parametreleri incelenmiştir. AMP üretiminin takibi, her iki saatte bir besi ortamından alınan örneklerle antibakteriyel test uygulanması yolu ile takip edilmiştir. Antibakteriyel test aşamasında Disk Difüzyon Yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin prensibi, Antonie van Leeuwenhoek'un yukarıda bahsedilen çalışmasına dayanmaktadır. *Micrococcus luteus* (ATCC 4698),

AMP üretiminde test suşu olarak kullanılmıştır. Antibakteriyel testler sonucunda en yüksek zon çapı *L. pentosus* (DSM 16366) bakterisinden elde edilmiştir. Bu nedenle *L. pentosus* (DSM 16366)'tan AMP saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma aşamasında sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Saflaştırılan AMP, kalsiyum aljinat boncuklarına EDC kullanılarak, aljinatın yapısında bulunan –COOH grupları üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir. Aljinat, yara örtüsü olarak kullanımı olan bir biyopolimerdir. Kovalent immobilizasyonu sonucu yapısına AMP dahil edilen aljinat, antibakteriyel özellik kazanmıştır. Bu durum tez kapsamında AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarına yapılan test ile kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, antibakteriyel bir biyomateryal elde edilmiştir. Elde edilen ürün özellikle mikrobiyal kontaminasyonun çok sık görüldüğü ve ciddi enfeksiyonlara yol açığı açık yaralarda kullanılabilir. Tez çalışması kapsamında, AMPLerin uygulaması bu alanda yapılmıştır. Ancak AMPLerin kullanım alanı bununla sınırlı değildir. Birçok AMP, malign kanserlerin tedavisi de dahil olmak üzere klinik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir (Lancaster ve ark. 2007; Nishie ve ark. 2012). Gıda endüstrisinde, AMPLer, kimyasal koruyucuların yerine doğal gıda koruyucu olarak kullanılır. Ayrıca, AMPLer, gastrointestinal sistemdeki proteazlara karşı duyarlı oldukları için, gastrointestinal sistemde kolayca sindirilebilecek güvenli gıda katkı maddeleridir (Cleveland et al., 2001; Yang et al., 2014). Dahası, nisin, mersasidin, mutacin 1140 ve laktikin 3147 gibi AMPLer kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, MRSA ve vankomisine dirençli *enterokoklar* (VRE) gibi antibiyotiğe dirençli bakterilerin büyümesinin inhibe edildiği görülmüştür (Nishie et al., 2012). AMP üreten *Bacillus* suşları, antifungal aktivite gösterirler ve *Candida perfringens* ve *C. difficile*'ye karşı inhibe edici aktiviteye sahip oldukları için probiyotik olarak da kullanılabilir (Abriouel et al., 2011). AMPLer, tümör hücrelerine karşı potansiyel tedavi aracı olarak kabul edilirler. Örneğin, baş ve boyun skuamöz hücre karsinomunu tedavi etmek için, hücre proliferasyonunu azaltan nisin kullanılmaktadır (Joo et al., 2012). Tez çalışması kapsamında üretilen AMPLerin de potansiyel kullanım alanları araştırılarak geliştirilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

Filogenetik ağaçta yer alan tüm organizmalar, hayvanlar da dahil, mikroorganizmalara karşı savunma için maddeler üretirler (Andrew and Rivas, 1998). Bu maddelerin çoğu peptidlerdir. Konvansiyonel antibiyotiklere karşı dirençli patojenik organizmaların giderek artması sonucu ortaya çıkan problemle birlikte, enfeksiyonu tedavi etmek için AMP'lerin farmakolojik uygulanmasına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

AMP'ler, prokaryotlardan insanlar gibi çok hücreli hayvanlara kadar birçok organizmada savunma mekanizmalarının önemli bir parçasını oluşturan ve evrimsel olarak korunan biyomoleküllerdir (Yeaman and Yount, 2003; Guan'ı Guerra et al., 2010). Yüksek hayvanlarda patojenik mikroplara ve daha düşük yaşam tarzlarına karşı birincil savunma hattının önemli bir parçasını oluştururlar; patojenik ve saprofitik mikroplara karşı tek savunma şeklidir (Zasloff, 2002). Patojenik mikroorganizmalara saldıran ve konakçı hücrelere zarar vermeyen bu peptitlerin seçici sitotoksitesisi, patojenik bakteri ve maya hücrelerindeki bileşen ve yapısı açısından temel farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bazı AMP'ler immünomodülatör etkiler ve/veya kemotaktik davranış sergilemesine rağmen, bu AMP'lerin ortak bir özelliği, amfipatik ve genel olarak pozitif olmalarıdır (Yeaman and Yount, 2003). Çeşitli organizmalardan yaklaşık 1500 AMP tanımlanmıştır ve bu peptidlerin sınıflandırılması, farklı peptidler arasındaki yüksek dereceli dizi benzerliği ile karmaşıktırılabilir. Bununla birlikte, AMP'lerin sınıflandırmaları genel olarak amino asit kompozisyonu ve ikincil yapılar esas alınarak yapılmıştır.

2.1. AMPlerin Tarihçesi

AMP'ler prokaryotik hücrelerde, gramicidinler denilen antimikrobiyal biyomoleküllerin *B. brevis*'ten izole edildiği ve çok çeşitli Gram-pozitif bakteriyel suşlara karşı in vivo ve in vitro aktivite gösterdiği tespit edilen 1939'dan beri bilinmektedirler. Daha sonra, Gine domuzu cildinde enfekte olmuş yaralar için başarılı bir şekilde kullanılan gramicidinler, klinik uygulama için potansiyel olarak ilan edildiler ve ticari antibiyotik olarak üretilen ilk AMP oldular (Gause and Brazhnikova, 1944; Van Epps, 2006). Adaptif bağışıklık sistemi tarafından tehdit

edilen insanlarda ve diğer canlılarda mikrobiyal enfeksiyonlara sürekli maruz kalma durumunda, bu enfeksiyonlara karşı koruma sağladığı bilinmektedir.

1920'lerin sonunda, Alexander Fleming tarafından lizozim tanımlanmıştır. Bu çalışma, bazı araştırmacılar tarafından, antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bir peptidin ilk örneği olarak kabul edilmektedir (Fleming, 1922). Bununla birlikte, lizozimin etki mekanizmasını, bakteriyel hücre duvarına enzimatik olarak zarar vererek etki ettiği bilinmektedir.

Fleming, 1928'de penisilini kelfetti ve 1940'larda, Ernst Chain ve Howard Florey ile birlikte Nobel Tıp Ödülü'nü kazandı (Fleming, 2001; Brown, 2004). Lizozim gibi doğal konakçı antibiyotiklerin terapötik potansiyeli ve 1943'te streptomisin ve penisilin ortaya çıkması ile bu immün savunma stratejisinin önemine olan ilginin giderek artması sonucu "Antibiyotiklerin Altın Çağı" başladı (Bentley, 2012; Zaffiri et al., 2012). 1942'de, daha önce buğdayda tanımlanmış olan antimikrobiyal biyomolekülün, buğday endosperminden (*Triticum aestivum*) benzerleri, *Xanthomonas campestris* ve *P. solanacearum* gibi çeşitleri fitopatojenleri inhibe eden bir peptid olduğu görülmüştür (Jago, 1926; Fernandez de Caley et al., 1972). 1970'lerde protiyonin olarak adlandırılan bu peptidin, AMP olan tiyonin ailesinin bir üyesi olduğu anlaşılmıştır (Mak and Jones, 1976; Ohtani et al., 1977). Bu çalışma ile birlikte, "Antibiyotiklerin Altın Çağı" sona ermiştir ve 1960'larda çoklu mikrobiyal patojenlerin artmasıyla birlikte, yeni savunma moleküllerine yönelik araştırmalar başlatılmıştır (Davies, 2006; Katz et al., 2006). Bazı çalışmaların AMP araştırmalarının ana kaynağı olduğu düşünülmektedir; örneğin 1950'lerde ve 1960'larda katyonik proteinlerin bakteri öldürme kabiliyetinden sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Hirsch, 1956; Zeya and Spitznagel, 1966; Nakatsuji and Gallo, 2012).

1960'larda antimikrobiyal bir protein olan laktoferrin süttten izole edilmiş ve balmumu güvesi larvalarının hemolenfindeki dirençli *P. aeruginosa*'nın atağından sonra sonra küçük antimikrobiyal moleküllerin indüklendiği gözlenmiştir (Stephens and Marshall, 1962; Groves et al, 1965). 1970'lerin ve 1980'lerin sonlarında çeşitli araştırmacılar tarafından insanlardan ve tavşanlardan α -defensinler olduğu bilinen bazı antimikrobiyal proteinlerin bulunduğu bildirilmiştir (Selsted et al., 1983;

Selsted et al., 1984; Selsted et al., 1985; Ganz et al., 1985; Levy, 2004). Ek olarak, bu defensinlerin sisteinle stabilize edilmiş ilk AMP'ler arasında olduğu bildirilmiştir. Günümüzde genellikle marker olarak kabul edilen çalışmalarda, Boman ve ark. ipek güvesi pupası *Hyalophora cecropia*'ya bakteri enjekte edilmiş ve 1981'de bu pupanın hemolenfinden indüklenebilir katyonik antimikrobiyal proteinler, P9A ve P9B'yi izole etmiştir (Hultmark et al., 1980). Bundan kısa bir süre sonra, bu peptitlerin dizilimi, karakterizasyonu ve yeniden adlandırılması (daha iyi bilinen "cecropinler" olarak) rapor edildiği, böylece ilk önemli α -helikal AMP'leri oluşturduğu bildirilmiştir (Steine et al., 1981). Diğer marker araştırmalarında, Afrika pençe kurbağası *X. laevis*'ten katyonik AMP'ler izole edilmiş ve Zasloff et al. (1987) ve bu peptidleri, 1987'deki savunma rollerini keşfetmelerinin ardından İbranice'de "kalkan" anlamına gelen "magaininler" olarak adlandırılmıştır (Zasloff, 1987). Birkaç yıl sonra sistein eşleşmeleri ile α -defensinlerden farklı olan θ -defensinler ve β -defensinler, sığır granülositlerinin ve lökositlerin al yanaklı maymundan izolasyonunun ardından karakterize edilmiştir (Selsted et al., 1993; Tang et al., 1999).

İlk anyonik AMP'ler *X. laevis*'de tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. 1990'ların ortalarında Brogden ve arkadaşları sığır ve koyunlar da dahil olmak üzere ruminantlarda birçok farklı peptid tanımlanmıştır (Brogden et al., 1997; Brogden et al., 2003). 1990'ların başında da, lizozimin, enzimatik olmayan mekanizmalar ile aktivite gösteren AMP'lere benzer şekilde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görüşünü ortaya koyan kanıtlar toplanmaya başlandı ve bu sonuçlar, bu lizozimin aslında tanımlanan ilk AMP'lerden olabileceği görüşünün ortaya çıkmasına neden oldu. (Benkerroum, 2008). Bu sonuçlara dayanarak, bazı araştırmacılar AMP'lerin adaptif bağışıklık sistemine sahip olmayan organizmaların savunma mekanizmasında kritik bir rol oynayabileceğini öne sürdüler (Ganz, 2003).

AMP'yi şifreleyen bir genin, böcekleri büyük bir mantar enfeksiyonuna karşı duyarlı hale getirdiği gösterildiğinde, 1990'ların ortalarında *Drosophila melanogaster* için meyve diyeti onaylandı (Lemaitre et al., 1996). Bu çalışmalardan bu yana, AMP'lerin yalnızca böcekler ve bitkilerin değil, aynı zamanda adaptif bağışıklık sistemi olmayan diğer organizmalarında da bu peptidlerin zengin bir kaynağı olduğu konusu yoğun olarak çalışılmıştır (Duran et al., 2011; Barbosa et al.,

2011). Bu çalışmalar, AMP'lerin insanlar dahil tüm çok hücreli organizmalarda bulunduğunu ve bu peptidlerin, memelilerin bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığını kabul etmektedir. Bu peptidler normalde insan vücudunun mukoza ve deri gibi mikroplara maruz kalan çoğu bölgesinde tanımlanmıştır ve eozinofiller, trombositler ve nötrofiller de dahil olmak üzere bir dizi kan hücresi türü tarafından üretilir (Zasloff, 2002; Bevins and Salzman, 2011). Bununla birlikte, AMP'lerin ekspresyonu ile ilgili araştırmalar arttıkça, bu peptidlerin üretiminin yaralanma veya farklı bir şekilde zarar görme sonucu uyarılmış olabileceği anlaşılmıştır (Ganz, 2003).

Genel olarak, dermicidin ve α -defensinler (cilt korumasında yer alan AMP prekürsörü) yapısal olarak üretilme eğilimindeyken, β -defensinlerin baskınlığı indüklenebilir (Hancock and Scott, 2000; Scott and Hancock, 2000; Schitteck et al., 2001). Ayrıca, bazı AMP'ler belirli vücut bölgelerinde baskın olmasına rağmen, sadece küçük bir azınlık yalnızca belirli bir hücre tipi ya da dokusu tarafından üretilir ve her doku mevcut fizyolojik koşullara bağlı olarak kompozisyonda değişebilen kendi AMP spektrumuna sahiptir (Wiesner and Vilcinskas, 2010). Örneğin, dermisidin'den türetilen peptidler, insan terlemesinde ana AMP'lerdir, ancak egzersize cevap olarak, bir kişinin vücut bölümleri arasında farklı profiller gösterir (Rieg et al., 2006). AMP'lerin keşfedilmesinden bu yana, araştırmacıların ilgisini çeken en önemli konulardan biri, antimikrobiyal aktiviteler için gereken minimum inhibisyon konsantrasyonların (MIC) in vitro değerinin, bu peptidlerin in vivo fizyolojik konsantrasyonlarından çok daha yüksek olmasıdır. Bu araştırma için önerilen iki önemli açıklama, AMP'lerin, antimikrobiyal etkiyi uygulamak için bölgesel olarak MIC değerinin üzerinde yüksek konsantrasyonlarda birikebileceği veya bu peptidlerin diğer AMP'lerle sinerjistik olarak etki edebileceğidir (Lai and Gallo, 2009). Bu sinerjik etkiler, yapısal olarak benzer ve aynı konakçı organizmadan olduğu gibi farklı konakçı organizmalardan elde edilebilen geniş aralıktaki AMP'ler ile birlikte görülebilir (Westerhoff et al., 1995; Matsuzaki et al., 1998; Han and Hancock, 2001; Cassone and Otowski, 2010).

AMP'lerin üretimi tüm organizmalarda kullanılan bir savunma stratejisidir ve neredeyse her yol yeni bir türü keşfedilen bu peptidlerin varlığı veritabanları ile kanıtlanmıştır (Tablo 1). Bu veritabanları incelendiğinde, yaklaşık 1500 AMP'nin

listelendiğini ve bildirilen peptidlerin sayısının hızla arttığını görülmektedir (Wang et al., 2008; Thomas et al., 2009). Bu veri tabanları sayesinde, AMP'ler arasında çeşitli kriterlere, en çok yapı-fonksiyon ilişkilerine ve antimikrobiyal etki mekanizmalarına dayanarak karşılaştırmalar yapılabilmektedir.

Tablo 1. AMP veri tabanları (Wang et al., 2008).

Yıl	Veri Tabanı	Websitesi	İçerik
2002	AMSDb	http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html	Animal/plant AMPs
2002	SAPD	http://oma.terkko.helsinki.fi:8080/~SAPD	Synthetic AMPs
2003	NAD	http://www.nih.go.jp/~jun/NADB/search.html	General AMPs
2004	A/OL	http://www.atoapps.nl/AOLKnowledge/	Antimicrobial compounds
2004	Peptaibol	http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml	Fungal AMPs
2006	CyBase	http://researcht.imb.uq.edu.au/cybase	Plant AMPs
2006	PenBase	penbase.immunaqua.com	Shrimp AMPs
2007	BACTIBASE	bactibase.pfba-lab.org	Bacterial AMPs
2007	Defensins	defensins.bii.a-star.edu.sg	Defensins across eukarya
2007	AMPer	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl	Animal/plant AMPs
2008	PhytAMP	phytamp.pfba-lab-tun.org	Plant AMPs
2008	RAPD	http://faculty.ist.unomaha.edu/chen/rapd/index.php	Recombinant AMPS
2009	APD2	http://aps.unmc.edu/AP	Natural AMPs
2010	CAMP	http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial	General AMPs
2012	YADAMP	www.yadamp.unisa.it	General AMPs
2012	DAMPD	http://apps.sanbi.ac.za/dampd	General AMPs
2012	DADP	http://split4.pmfst.hr/dadp/	Amphibian AMPS

2.2. AMP Biyosentezi

Çok hücreli organizmalarda bulunan AMP'ler, patojenik bir bakterilere saldırmak için cilt veya akciğerler gibi dış yüzeylerde veya nötrofillerin granüllerinde bulunur ve buralardan izole edilir. AMP sentezi genellikle enfeksiyona cevaben indüklenir (Hoffmann et al., 1999). Bu nedenle, bu peptidler doğuştan gelen immün yanıtın önemli bir parçasını oluşturur (Boman, 1995). AMP'lerin büyük çoğunluğu çok hücreli organizmalar tarafından sentezlenir ve genom tarafından kodlanır. Gen transkripsiyonu ve ribozomal translasyon, düzenli proseslerle üretilir, ardından sürekli olarak gen ürününün proteolitik prosesi yapılır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen birçok AMP, nadir bulunan amino asitleri içerir. Bunların çoğu ribozomlar aracılığıyla sentezlenmez veya ribozomal olarak sentezlenir ve sonrasında modifiye edilir (Kleinkauf and von Dohren, 1990; Nissen-Meyer and Nes, 1997).

2.3. AMP'lerin Sınıflandırılması

AMP'ler için fikir birliğine dayalı bir sınıflandırma sisteminin kurulması, esas olarak tanımlanan çok sayıda molekül olmasına rağmen, biyokimyasal ve yapısal karakterizasyonları hakkında tam olarak veri bulunmaması nedeniyle tartışmalı bir konudur. Sınıflandırma, yazara göre veya sadece karmaşıklık derecesine göre değişebilir. AMP'nin ana sınıflarını ayırt etmenin basit bir yolu biyolojik kaynaklarını hesaba katmaktır. Prokaryotlardan yüksek ökaryotlara kadar çeşitli türde organizmalar AMP sentezler. Bu nedenle, AMP'ler ya ribozomal olarak sentezlenmemiş peptitler ya da ribozomal olarak sentezlenmiş peptitler olarak sınıflandırılabilir. Ribozomal olarak sentezlenmiş peptid sentezi, peptid sentetaz tarafından katalize edilir ve bu işlem esas olarak antibakteriyel özelliklere sahip bakteri ve mantarların sitozolunda gerçekleşirken, ribozomal olarak sentezlenmiş peptidlerin sentezi, ökaryotik hücrelerin ribozomlarında meydana gelir. Bu peptidler ayrıca antiviral, antiparaziter, antineoplastik ve immünomodülatör aktiviteye sahiptir. Ribosomal olarak sentezlenmemiş peptitlerin ana örnekleri, polimiksin B, bacitrasin, vankomisin, gramikidin A ve siklik peptitlerdir (daptomisin, dalfopristin, kinupristin ve siklosporin A), bunun yanında nisin gen tarafından kodlanmış ve ribozomal olarak sentezlenen bir AMP'dir (Carmona-

Ribeiro and Carrasco, 2014). Sadece bazı ribosomal olarak sentezlenmemiş peptidler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve pazarlanmaktadır.

Nötral pH'ta molekül yükü özelliği göz önüne alındığında, diğer iki tür sınıflandırma elde edilebilir. Buna göre, AMP'ler katyonik AMP'ler ve anyonik AMP'ler olma üzere alt bölümlere ayrılmaktadır. Omurgalılar, omurgasızlar ve bitkilerde anyonik AMP'ler de tanımlanmasına rağmen, AMP'lerin çoğu katyonik özelliktedir. Anyonik AMP'ler, solunum yolu, beyin, epidermis, epididim, kan ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere vücudun çeşitli hayati organlarının bir parçasıdır. Anyonik AMP'lerin örnekleri olarak, sığırlarda kromasinler ve kappacin, insanda ise dermicidin ve amfibi temporin peptidleridir (Narayana and Chen, 2015).

Bununla birlikte, yazarlar, biyokimyasal özelliklerine, konformasyonlarına ve yapılarına dayanarak, hatta biyolojik aktivitelerini ve hedeflerini dikkate alarak daha ayrıntılı AMP sınıflandırmaları önermişlerdir.

2.3.1. Biyokimyasal Sınıflandırma

Bu sınıflandırma, temel olarak AMP'leri aşağıdaki sınıflara ayıran amino asit kompozisyonuna dayanır: (i) doğrusal, (ii) sistein bakımından zengin peptidler ve (iii) glisin, prolin, arginin veya histidin gibi spesifik amino asitler bakımından zengin peptitler. Bu sınıflandırma için AMP örnekleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Biyokimyasal özelliklerine göre AMP'ler (Narayana and Chen, 2015).

Sınıf	Örnek
Doğrusal	Cecropins, Clavanin, Piscidins, Styelin, Magainins, Dermaseptins, Buforins-II Pexiganan, LL-37
Sistein bakımından zengin	
<i>Tekli</i>	Esculentin, Bactenecin-1, Thanatin
<i>İkili</i>	Tachyplesin, Androctonin, Protegrin-I
<i>Üçlü</i>	Defensins: α -(HNP3), β -(TAP), θ -(SapecinA)

<i>Dörtlü</i>	Drosomycin, Hepsidin
Spesifik amino asitler bakımından zengin	Drosocin, Metchnikowins, Pyrrhocoricin, Metalnikowin
<i>Proline</i>	
<i>Glycine</i>	Diptericins, Attacins
<i>Arginine</i>	Penetratin
<i>Histidine</i>	Histatin
<i>Tyrosine</i>	Indolicidin

2.3.2. Yapısal Sınıflandırma

Son zamanlarda, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile yapı-fonksiyon ilişkileri çalışmalarına dayanan bir sınıflandırma önerilmiştir. Buna göre AMP'ler üç yapısal gruba sınıflandırır: α -helikal peptidler, β -sheet peptidler ve uzatılmış veya ilmek peptidler (Cruz et al., 2014).

Alfa-helikal AMP'ler, α -heliks yapıların oluşumundaki eğilimler ile karakterize edilir ve bu peptidler, çoğunlukla Gram-pozitif bakteri ve mantarlara karşı aktif olan, yüksek katyonik ve amfipatik özellikler gösterir. Bununla birlikte, helikal içerik, hemolitik aktivitenin artması ve sitotoksosite ile de ilişkili olabilir. Alfa-helikal AMP'lerin bazı örnekleri, cekropinler, magaininler, temporinler, buforinler ve clavaninlerdir (Gullberg et al., 2011; Cruz et al., 2014). β -sheet yapısındaki AMP'ler, genellikle sistein kalıntıları arasındaki disülfid köprüleri ile stabilize edilirler. Bu grup, temel olarak β -firkete peptidleri ve defensin mini proteinlerinden oluşur. Örnekler protein-1, thanatin ve laktoferrisin B'yi içerir.

Uzatılmış veya ilmek yapısındaki AMP'ler, normal alfa heliks veya β -sheet yapılara katlanmazlar. Genişletilmiş aktivite veya siklik karakter, bazı spesifik amino asit tortularının, örneğin His, Pro, Cys, Arg ve Trp'nin, varlığından kaynaklanır. Bu tip AMP'lerin örnekleri histatinler, böceklerden prolin bakımından zengin izolatlar, hepsidin ve indolisindir (Cruz et al., 2014).

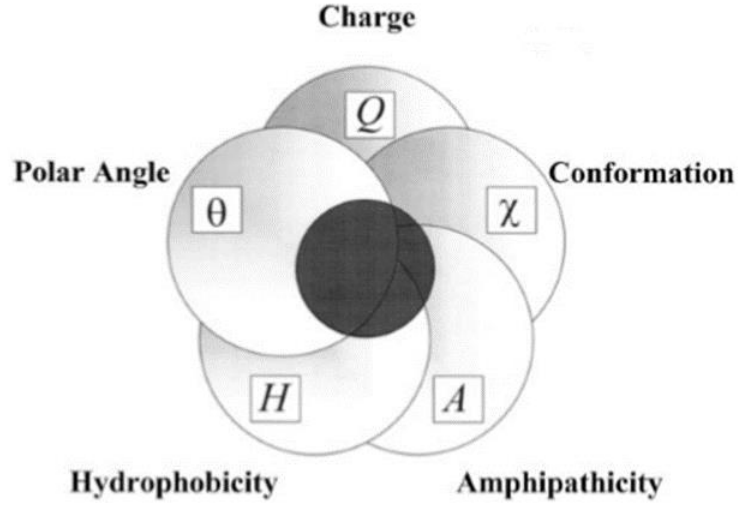
2.3.3. Biyolojik Aktiviteye Göre Sınıflandırma

Bahar ve arkadaşları, 2013 yılında hazırladıkları bir inceleme makalesinde, AMP'leri biyolojik hedeflerine ve etki türlerine göre kategorize etmişlerdir. Bu yüzden önerilen sınıflar antibakteriyel peptidler, antiviral peptidler, antifungal peptidler ve antiparaziter peptidlerdir. Farklı hedefe rağmen, AMP'ler hücre duvarını veya viral zarfı bozarak, parçalanma ve hücre içi bileşenlerin sızmasına neden olarak hareket etme eğilimindedir. Antibakteriyel ve antifungal peptidlerin, hücre içi hedeflemesinin de kanıtları vardır, bunlar DNA replikasyonu ve protein sentezi gibi hücre içindeki bazı önemli yolları inhibe ederler (Bahar and Ren, 2013).

2.4. AMP'lerin Etki Mekanizması

2.4.1. AMP Aktivitesini Belirleyen Yapısal Faktörler

Herhangi bir terapötik ajan veya antimikrobiyal konak savunmasının temel koşulu, konakçıya göre mikrobiyal hedef için seçici bir toksisiteye sahip olmasıdır. İdeal olarak, bu tür bileşikler kolayca erişilebilen, geniş bir etki spektrumunda ortak olan ve nispeten değişken olmayan bir veya daha fazla mikrobiyal determinant için afiniteye sahiptir. AMP'ler ilk olarak mikrobiyal hücreleri hedef alır ve böylece erişilebilir ve geniş ölçüde korunan patojenlerin moleküler bileşenlerini belirlemek için gerekli etkiyi gösterir. AMP'ler fosfolipidleri yansıtan amfipatik özelliklere sahiptir, bu durum AMP'lerin hücre zarları gibi temel mikrobiyal yapılardaki doğal savunma bileşenleriyle etkileşime girmelerine ve bunlardan yararlanmalarına olanak sağlar. Seçici toksisite ve antimikrobiyal aktivite ile ilgili AMP yapısının birkaç yönü, tematik olarak aşağıdaki bölümde ele alınmıştır. Spesifik olarak, hidrofobiklik (H), yük (Q), konformasyon (X), amfipatiklik (A), hidrofobik moment (MH) ve polar açı (Θ) gibi yapısal parametreler incelenmiştir. Bu parametrelerin birbirine bağımlı olduğunu ve bu nedenle, bir parametrenin modifikasyonunun sürekli olarak diğerlerinde telafi edici değişikliklere yol açtığını unutmamak önemlidir. Peptid yapı-aktivite ilişkisinin bu bütünsel görünümü, AMP'lerin etki mekanizmasını etkileyen bu temel özelliklerin her biri ile ilgilidir (Şekil 1).



Şekil 1. AMP aktivitesini etkileyen yapısal faktörler.

Konformasyon

Her ne kadar AMP'ler kaynak ve dizilimde geniş ölçüde farklı olsalar da, üç boyutlu topolojilerinde birkaç tema baskın görünmektedir ve peptidler buna göre kategorize edilmiştir. İki ana grup α -helikal ve β -sheet peptidlerdir, oysa kalan peptidlerin çoğu bir veya daha fazla amino asit artışı açısından zenginleştirilmiş olanlar olarak sınıflandırılabilir (örneğin, triptofan, prolin veya arginin bakımından zengin) (Hancock, 1997). Başka bir sınıflandırma şeması, peptid kaynağına (örneğin nötrofiller veya diğer lökositler), prekürsöre (örneğin, katehidin, türbinlerin türevleri), intramoleküler bağların kapsamına (örneğin, peptid dizisinde veya peptidlerde siklizasyona) veya başka bir parametreye dayanmaktadır.

α -heliks AMP'ler, kurbağaların ve böceklerin hücre dışı sıvılarında bol miktarda bulunur. Bu peptitlerin çoğu, ancak amfipatik fosfolipid membranlarla etkileşime girdiklerinde helikal hale gelir. β -sheet peptidleri, birincil yapı seviyesinde çok çeşitli molekül gruplarını temsil eder. Bu farklılıklara rağmen, bu peptidler, farklı hidrofilik ve hidrofobik özelliğe sahip yüzeyler ile, amfipatik kompozisyon dahil, ortak özellikleri paylaşırlar. Prolin-arginin ve triptofan açısından zengin peptidlerin yapıları hakkında daha az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, prototipik veya yapılardan farklı uyum örnekleri de tanımlanmıştır (Schibli et al., 1991; Boman et al., 1993; Cabiaux et al., 1994).

Yük

Bugüne kadar karakterize edilen AMP'lerin birçoğu 2 ila 9 arasında değişen bir pozitif net yük gösterir ve yüksek oranda tanımlanmış katyonik alanlar içerebilirler. Katyoniklik, AMP'lerin bakteri ve diğer mikroorganizmaların fosfolipid membranlarının (negatif yüklü) ilk elektrostatik çekimi için şüphesiz önemlidir ve karşılıklı elektro afinite, konukçu dokulara göre seçici antimikrobiyal hedefleme sağlar. Bakteriyel membranların asidik fosfolipidler fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilserin ve kardiyolip bakımından zengin olmaları, membrana negatif yük verir. Ayrıca, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin lipopolisakarit (LPS) ve teikoik veya teichuronik asitleri, bu ilgili organizmaların yüzeylerine ek negatif yük verir. Hedef hücre, prokaryotlarda tipik olarak % 50 daha büyüktür. Bu nedenle, bu tür bir kemoosmotik potansiyelin, pozitif yüklü peptidleri mikrobiyal yüzeyler üzerinde yoğunlaştırmak için elektroforetik bir şekilde etki edebileceği öne sürülmüştür.

Bu düşüncelere dayanarak, birkaç çalışmada gösterildiği gibi, peptid katyonikliği ile antimikrobiyal aktivite arasında güçlü bir korelasyonun olması şaşırtıcı değildir. Ancak, bu değişkenler arasındaki ilişkiyi doğrudan, dolaylı veya ters ilişki örnekleriyle açıklamak doğru değildir (Bessalle et al., 1992; Matsuzaki, 1998). Belli bir aralıkta, artan peptid katyonikliği, genellikle artan antimikrobiyal potansiyel ile ilişkilidir. Magainin 2 analogları ile yapılan ve peptid hidrofobikliği ve helikalliği gibi diğer parametrelerin sabit tutulduğu çalışmalar, yükün 3'ten 5'e yükseltilmesinin Gram-negatif ve Gram-pozitif patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelerin artmasına neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, artan pozitif yükün sürekli artan etkinlik sağlamayacağının da kanıtları vardır. Yukarıda tarif edilen magaininler için, 6 ila 7'lik bir net yük, hemolitik eğilimin artmasına ve antimikrobiyal aktivite kaybına neden olmuştur (Dathe et al., 2001). Antimikrobiyal aktivitedeki bu azalma, kısmen fosfolipid baş grupları ile aşırı güçlü peptid etkileşimlerinden kaynaklanabilir, böylelikle peptidin hücre içine taşınmasını önlenir.

Amfipatiklik ve hidroforbik moment

Neredeyse, tüm AMP'lerin amfipatik yapıları, hedef membranlarla etkileşime girerek oluşur. Amfipatiklik, çok sayıda protein konformasyonu ile elde edilebilir; en basit ve belki de en zarif olanlardan biri amfipatik sarmaldır. Amfipatik α -sarmal, üç ila dört kalıntı periyodikliğine sahiptir ve amfipatik biyo-zarlarla etkileşim için en uygun olanıdır. Amfipatik sarmal, peptidleri zwitteriyonik veya nötr membranlara karşı hemolitik hale getirmede belirgin bir etkiye sahip olabilir ve ayrıca negatif yüklü zarlara karşı peptid aktivitesini etkiler. Bütünleşik bir hidroforbik alan meydana getiren yüksek derecede bir sarmallık ve/veya amfipatiklik, nötr fosfolipidlerden oluşan hücrelere karşı artan toksisite ile ilişkilidir (Dathe and Wieprecht, 1999).

Amfipatiklik, bir protein içindeki hidroforbik ve hidrofilik alanların göreceli bolluğunu ve polarizasyonunu yansıtır. Bu özelliğin formüsel bir şekilde tanımlanması zordur. İdeal bir sarmalla normalize edilmiş, tek tek amino asit hidroforbikliklerin vektörel toplamı olarak hesaplanan hidroforbik moment, amfipatitenin bir kantitatif ölçüsüdür (Eisenberg, 1984). Hidroforbik momentin artırılması, model peptidlerin hedef membranlara karşı geçirgen ve hemolitik aktivitelerinde önemli bir artışa neden olur. Örneğin, Pathak ve ark. (1995) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, amfipatiklik, AMP aktivitesini yönetmedeki hidroforbiklik veya α -helikal içerikten daha önemliydi.

Hidroforbiklik

Bir peptid içindeki hidroforbik artıkların yüzdesi, peptid hidroforbikliği olarak tanımlanır. Çoğu AMP için hidroforbiklik neredeyse % 50'dir. Hidroforbiklik, AMP-membran etkileşimleri için vazgeçilmez bir özelliktir, çünkü peptidik lipid, ayırma derecesini iki tabaka halinde düzenler. Hidroforbiklik derecesinin artırılmasının memeli hücre toksisitesi ve antimikrobiyal özgüllük kaybı ile kuvvetli bir ilişkisi olmasına rağmen, hidroforbiklik membran geçirgenliği için gereklidir. Bu nedenle birçok AMP, mikrobiyal hücre zarına karşı aktiviteyi optimize edecek şekilde orta derecede hidroforbiktir.

Polar açı

Polar açısı, bir amfipatik sarmalla uyumlu bir peptidin polar olmayan tarafın ile karşı kutbunun oranının bir ölçüsüdür. Örneğin, bir tarafının sadece hidrofobik artıklardan ve diğerinin sadece yüklü artıklardan oluşan hipotetik bir a-helikal peptidi için, polar açı 180° olacaktır. Polar açı açısı, sarmalın hidrofobik içeriğinin oranının artmasıyla orantılı olarak azalır. Çok sayıda doğal ve sentetik peptid ile yapılan çalışmalarda, daha küçük bir polar açısının (ve dolayısıyla daha büyük bir hidrofobik yüzey), membranların geçirgenliğindeki artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (Wieprecht et al., 1997). Ayrıca polar açının peptid kaynaklı membran gözeneklerinin yarı ömrü ve genel stabilitesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir.

2.4.2. AMPLerin Yapısal Belirleyicilerinde Ortak Temalar

Çok çeşitli AMP dizilerinin ve yapılarının varlığı, tüm patojenlerin tek efektörü olarak tek bir AMP dizisinin ortaya çıkmadığının altını çizer. Dahası, Doğa, AMP'lere karşı mikrobiyal direncin gelişimini önleme ya da geciktirme stratejisi olarak çeşitliliği korumuş olabilir. Bununla birlikte, ayırt edici antimikrobiyal aktivite ile ilişkili yapısal parametrelerin dikkatli bir şekilde analizi, peptidler arasında konakçı hücre toksisitesine karşı, çeşitli temalar sunar. İkincil yapının korunması, farklı peptidlerin antimikrobiyal aktivitesini kolaylaştıran üç boyutlu konfigürasyonların anahtarı olabilir. Genellikle, amfipatiklik, yük, polar açı veya hidrofobik moment gibi bazı özelliklerin uç noktaları, peptidin antimikrobiyal aktivitesini ve seçici toksisiteyi azaltabilir. Mikroorganizmalara karşı AMP seçiciliği için asgari yük eşiği, düşük görünmektedir (belki 2 kadar). Bu özellik muhtemelen üç nedenden dolayı önemlidir: 1) negatif yüklü mikrobiyal zarlara ilk elektrostatik çekim; 2) zara bağlı katyonları yer değiştirme potansiyeli; 3) birçok mikroorganizmanın güçlü bir trans-negatifliği, katyonik peptidlerin membran üzerinde oryantasyonunda, polar membran çekirdeğine girişte ve/veya yer değiştiren peptidlerin ekzoplazmik membrandan sitoplazmik membran yönünde geçişlerini kolaylaştırabilir. Yükün kutuplanmasından bağımsız veya bağımlı olan makul bir amfipatiklik düzeyi, bu bakımdan daha olumlu görünmektedir. Yükün ayrılması ve hidrofobiklik, hedef lipid çift tabakanın doğal amfipatikliği ile paraleldir ve ayrıca mikrobiyal zarın içine peptid entegrasyonunu ve bozulmasını

da teşvik edebilir. Üçüncü bir tema, membran-litik peptitler arasındaki seçicilik makul hidrofobikliğe bağlı olabileceğinden, aşırı hidrofobiklik, zwitter iyonik membranlar için seçiciliği ve memeli sitotoksitesini artırabilir. Bu nedenle, seçici antimikrobiyal aktivite, bir AMP ile hedef arasındaki üç boyutlu hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler arasındaki hassas dengeden kaynaklanmaktadır (Dathe et al., 1996).

2.4.3. Hedef Membran ve Peptidin İlk Etkileşimi

Yukarıda özetlendiği gibi, AMP'ler doğal olarak biyomembranları hedef alacak ve etkileşime geçecek şekilde yapılandırılmıştır. Daha önemlisi, sonraki peptid dinamikleri ve membranı parçalayan etkiler, hedef yüzey ile ilk etkileşimden önemli ölçüde etkilenir. Aşağıda, peptidin ve hedef membranın biyokimyasal ve biyofiziksel özellikler, bu ilk etkileşimlerin temeli ile bütünleştirilmiştir.

Elektrostatik etkileşimler

Elektrostatik etkileşimlerin, mikrobiyal hücrenin başlangıçtaki hedeflemesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Matsuzaki tarafından yapılan bir araştırma, AMP katyonikliğini membran bağlama kabiliyeti ile ilişkilendirmiştir ve katyonikliğin çok çeşitli organizmalardaki neredeyse tüm AMP'lerin korunmuş bir özelliği olduğu gerçeği bu argümanı daha da desteklemektedir (Matsuzaki, 1999). Elektrostatik kuvvetler uzun bir aralık boyunca etki eder ve AMP'lerde, negatif yüklü fosfat gruplarına atak yapan lizin ve arginin kalıntıların bolluğu, bu etkileşimlerin hedef hücre zarına ilk çekimden sorumlu olduğu teorisine daha fazla güvenilirlik kazandırır. (Zasloff, 2002). Gram-negatif bakterilerde, AMP'lerin normal olarak LPS ile ilişkili olan katyonların yerini değiştirdiğine inanılmaktadır, çünkü AMP'lerin, LPS için bir bağlanma afinitesine sahip olduğuna inanılmaktadır.

LPS'nin 4-amino-4-deoksi-L-arabinoseoris ile yüksek derecede açillenmiş olarak yüksek oranda bulunduğu bakteri türleri, pozitif yüklü AMP'lere karşı daha fazla direnç gösterir. Bu da, elektrostatik yükün hedef hücre zarı ile etkileşimi için önemli olduğu teorisine daha fazla güvenilirlik kazandırır (Ganz, 2003). Gram-pozitif bakteriler, bir LPS veya dış hücre zarından yoksundurlar, ancak teichuronic

veya teichoic asit polimerlerinden oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptirler. Oldukça anyonik olan bu yapılar, katyonik AMP'ler için ideal hedeflerdir. Teikoik asitlerin modifiye edilmesi sonucu anyonik yükün arttığı *S. aureus* suşları, bunun sonucunu olarak katyonik AMP'lere karşı daha hassastır (Gross et al., 2001; Collins et al., 2002). Çoğu bakterinin, memeli hücrelerine göre güçlü bir elektrokimyasal gradyan ($\Delta\psi$) içermesinin, AMP'lerin hedef seçiciliğini arttırdığı düşünülmektedir (Yeaman and Yount, 2003).

Membran ile reseptör-ligand etkileşimi

Bazı çalışmalar, hem doğal hem de sentetik peptitlerin, D-amino veya L-amino asitlerin kullanılmasından bağımsız olarak membran ile eşit derecede iyi etkileşime girdiğini göstermiştir (Maloy and Kari, 1995; Matsuzaki, 2009). Bu da, biyomembranlarla etkileşimlerin reseptör-ligand mekanizmalarına bağlı olmadığını gösterir; Ancak, diğer çalışmalar bu durumun tüm AMP'lerde olamayabileceğini göstermiştir. Güçlü antimikrobiyal etkiye sahip, doğal, siklik bir peptid olan nisin'in özellikle bakteriyel membran lipid II'ye bağlandığı bulunmuştur (Breukink et al., 1999; Wiedemann et al., 2001). Benzer şekilde, taşıplesinin, LPS için spesifik afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, az sayıda AMP'de hücre hedeflemesi için reseptör aracılı bağlanmanın önemli olduğunu göstermektedir (Breukink et al., 1999).

2.4.4. Membrana Bağlanmayı Takiben Gerçekleşen Olaylar

Genel olarak, ilk atağın deneysel olarak belirlenmesi ve peptidlerin hücrel membranlara etkileşimi, bağlanmasını takiben gerçekleşen atak ve etkileşimleri takip etmekten daha kolaydır. X-ışını kristalografisi, NMR, ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve yüzey plazmon rezonansı gibi çeşitli yöntemler peptit-membran etkileşimlerini aydınlatmak için kullanılmıştır (Sitaram and Nagaraj, 1999; Blondelle et al., 1999). Bununla birlikte, antimikrobiyal etkinliğin ve mekanizmaların pH, ozmotik kuvvet, çözelti viskozitesi ve sıcaklık gibi koşullara son derece duyarlı oldukları, bu nedenle yukarıda belirtilen tekniklerle elde edilen verilerin bu şartlara göre bakılması gerektiği ileri sürülmektedir (Yeaman and Yount, 2003).

Membrana ilk bağlanma gerçekleştikten sonra, AMP'ler dış fosfolipid zarına nüfuz eder ve böylece sitotoksik etki hücrenin içine uygulanabilir. Peptidler tarafından hücreye giriş, lipid zarının yüzeyinde minimum eşik konsantrasyonunda AMP birikmesini gerektirir. Bu olay, peptitlerin multimerizasyon kabiliyeti gibi konsantrasyon dışındaki faktörlerin yanı sıra lipid bileşimi, kafa grubu büyüklüğü ve akışkanlık gibi fosfolipid zarın özellikleri ile de etkilenir (Yang et al., 2000). İki tabakanın transmembran potansiyeli ayrıca peptidin zara girme şeklini de etkileyebilir, çünkü oldukça negatif bir transmembran potansiyeli, pozitif yüklü peptidi zarın içine çekerek gözenek oluşumunu kolaylaştıracaktır (Huang, 2000).

2.4.5. Membran ile Etkileşim Sonrası Peptid Konformasyonunda Meydana

Gelen Değişiklikler

Birçok AMP, özellikle α -heliks sekonder yapıya sahip olanlar, iç zarın polar olmayan ortamına girdiklerinde konformasyonel olarak önemli ölçüde yeniden düzenlemeye tabi tutulur. α -heliks AMP'ler normal olarak hücre dışı ortamda düzensizdir, rastgele bobin veya genişletilmiş yapılar gösterirler, ancak biyomembran ile etkileşime girdiğinde hızlıca yapılandırılmış bir α -heliks sarmalına yapısında dönüşür (Dathe and Wieprecht, 1999). Bazı AMP'ler, yalnızca negatif yüklü çift katmanlı bir zar ile birlikte bu konformasyonel değişime uğrayabilir. Bu durum, lipidlerin bu tür membranlarda düzenlenme şekli nedeniyle olabilir. Fosfolipid kafa grupları, peptiddeki katyonik amino asit kalıntılarının optimum periyodikliğini indükleyerek, helikal sekonder yapıya doğru konformasyonu teşvik eder (Henzler et al., 2003; Sanderson, 2005). Bu özellik ile AMP'lerin sadece hedef hücre zarı varlığında (negatif yüklü bakteri olması durumunda) sitotoksik forma “aktive” edildiği ve hedef olmayan konakçı hücrelere zarar vermeyeceği öne sürülmüştür (Tossi et al., 2000). β -sheet yapısındaki peptidlerde bulunan intramoleküler disülfür bağları, sulu yapılarda bile ikincil yapılarını korudular. Bu sayede dördüncül peptid yapılarının zara girdikten sonra ayrışıyor olmasına rağmen, α -heliks peptidlerde görülen biçimsel yeniden düzenlemelere maruz kalmazlar. Bu durum, seçici toksisiteyi kolaylaştırabilir.

Hücre zarı ile ilk etkileşimin ardından, birçok peptit, lipid peptit etkileşimleriyle birleştirildiğinde, peptidin sitotoksik etkilerine katkıda bulunan

karmaşık yapıların oluşturulmasına yol açabilen yapısal dönüşüme uğrayabilir. AMP'lerin amino asit sekansı ve monomer formundaki konformasyon, bu yapıları oluşturma kabiliyetini belirleyecektir. Amfipatik peptidlerde, hidrofobik alanlar, lipit iki tabakasının polar olmayan hidrofobik çekirdek bölgesi ile etkileşime girebilir ve böylece peptidi zarın daha da derinine iter. Alternatif olarak, bu alanlar sulu ortama maruz kalınmasını önlemek amacıyla multimerizasyonu teşvik eden diğer peptitlerin hidrofobik fasetleriyle de etkileşime girebilirler. Bu tip multimerizasyon ve lipit çift tabakanın iç kısmı ile etkileşim, peptid kaplı gözeneklerin veya kanalların biyomembran içinde oluşmasına neden olabilir ve bu da bütünlük ve geçirgenlik kaybına neden olabilir. Biyomembranlar kompozisyon ve yapı bakımından oldukça değişken olduğu için, bir peptid farklı hücrel membranlarla etkileşime girdiğinde, birkaç farklı şekilde davranması mümkündür. AMP'lere maruz kalan membranlarda gözlenen gözenek oluşumunu tanımlamak için çeşitli modeller önerilmiştir.

Barrel-Stave modeli (Fıçı modeli)

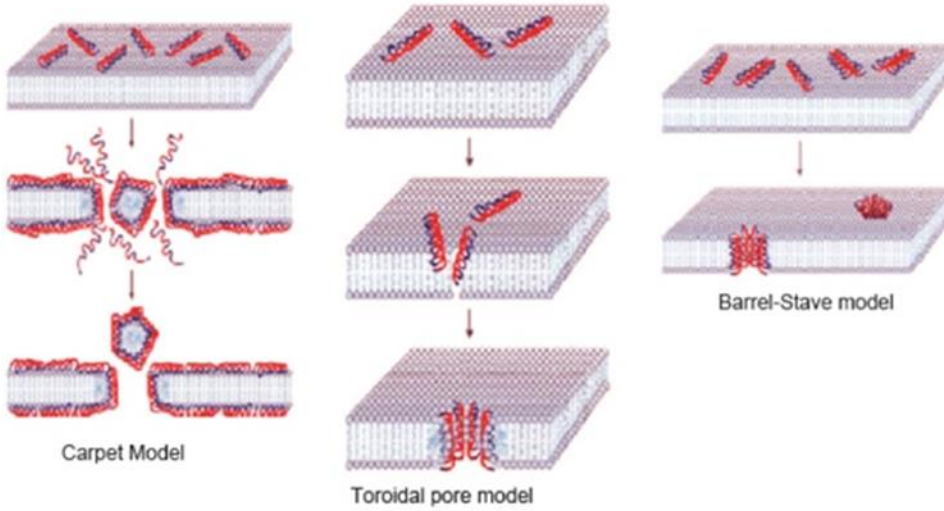
Membran gözenek oluşumunun bu mekanizması fıçı modeli olarak adlandırılır, çünkü kanalı kaplayan transmembran peptidleri veya peptid kompleksleri, fıçı benzeri bir halkada konumlandırılır ve transmembran portreler oluşturur. Amfipatik peptidler, hidrofobik bölgeleri lipit zarının iç kısmında bulunan polar olmayan hidrokarbon kuyrukları ile etkileşime girecek şekilde yönlendirilirken, hidrofilik alanlar ise gözenegin sulu kanalına bakacak ve sınırlarını oluşturacak şekilde yönlendirilir. İlk olarak, monomer peptidler hücre yüzeyinde birikir ve zara temas ettiklerinde konformasyonel olarak yeniden düzenlemeye tabi tutulur (Şekil 2). Bunun, fosfolipid kafa gruplarını kenara gitmeye doğru zorladığı ve zarın incelmeye neden olduğu düşünülmektedir. Bu, peptidin hidrofobik kısmının membranın polar olmayan iç kısmına girmesine izin verirken, AMP'nin katyonik amino asitleri negatif yüklü kafa gruplarıyla etkileşime girer. Peptidlerin eşik konsantrasyonuna ulaşıldığında, peptid monomerleri, peptidin iç zarının hidrofobik merkezini daha fazla zorlanmasına neden olan multimerler oluşturacak şekilde toplanabilirler. Peptid monomerlerinin oluşturduğu agregatlar brleştikçe, zardaki gözenek genişler (Shai, 2002).

Carpet modeli (Kilim modeli)

Kilim modeli, hücresel membran üzerinde birçok monomer peptidi tarafından yayılma etkisine dayanmaktadır. Hücre zarında yeterince yüksek konsantrasyonda AMP mevcut olduğunda, zarın bazı fosfolipidleri yer değiştirir, bu da zarların akışkanlığında değişikliklere neden olur veya zarın bariyer özelliklerinde zayıflıklar meydana getirir. Bu yer değiştirmelerin kümülatif etkisi, zarın zayıflatılması ve bütünlüğünü yitirmesidir. Daha önce bahsedildiği gibi, AMP'lerin zar ile ilk etkileşimi elektrostatik çekim kuvvetleri ile gerçekleşmektedir. Bu modelde, özel bir kanal veya gözenek oluşturulmamıştır. Membran geçirgenliğinin ve membran bütünlüğünün kaybının, fosfolipidlerin dağılmasının meydana getirdiği olumsuz enerji özellikleri nedeniyle olduğuna inanılmaktadır (Sitaram and Nagaraj, 1999).

Toroidal por veya solucan deliği mekanizması

Bu gözenek oluşumu mekanizması α -heliks yapısındaki magainin peptidleri kullanılarak çalışılmıştır. Düzensiz peptitler, yüklü hücre zarı temas ettikten sonra α -heliks yapıya dönüşür. Başlangıçta, heliksler kendilerini yönlendirir, böylece membran yüzeyine paralel olurlar. Polar fosfolipid kafa grupları yer değiştirir ve membranın yüzeyi zayıflar, bu da zarındaki pozitif bir eğrilik ile sonuçlanır. Bu zorlanma ve incelmenin bir sonucu olarak, zar kararsız hale gelir ve daha fazla peptid etkileşimlerine karşı daha duyarlı hale gelir. Eşik değerde peptid konsantrasyonuna ulaşıldığında, peptidler, zarı dik olacak şekilde yeniden düzenlenirler ve peptidlerin hidrofilik kısımları, zarın hidrofobik kısımlarıyla temas etmeyecek şekilde multimerleşmeye başlarlar. Yeni oluşan toroidal gözenek kararsızdır ve parçalandığında peptitlerin bir kısmı hücre zarının iç kısımlarını zorlar. Bu nedenle, bu geçici gözeneklerin parçalanma aşamasının, peptidlerin diğer hedefler üzerinde etki edebilecekleri hücre içi boşluğa yer değiştirmesine izin verdiği için önemli olduğuna inanılmaktadır (Yang et al., 2001).



Şekil 2. Antimikrobiyal etki mekanizması için sunulan modeller.

2.5. AMP'lerin Terapötik Ajanlar Olarak Kullanımı

AMP'lerin, çok dirençli bakterilere karşı etkili olan ve geleneksel antibiyotikleri potansiyel olarak yenileyebilecek, dirençli mikroorganizmalar tarafından inhibe edilmeyen geniş spektrumlu aktivitelere sahip olduğunu gördük. AMP'ler bakterileri hızla öldürürler, birden fazla hedef içerebilirler ve MIC çoğu zaman minimum bakterisit konsantrasyonları (MBC) ile çakışır (iki kattan az) (Bahar and Dacheng, 2013). Bununla birlikte, en duyarlı bakterilere karşı etkileri güçlü değildir ve peptidlerin düşük oral biyoyararlanımları ve hızlı metabolize olma eğilimleri nedeniyle genellikle zayıf ilaç adayları olduğu düşünülmektedir. (Picherau and Allary, 2005). Üstelik bunların sentezi için yapılan çalışmalar, çoğu zaman yüksek araştırma ve geliştirme maliyeti gerektirmektedir.

Yukarıda bahsedildiği üzere, günümüzde yaklaşık 1500 AMP, ya dokulardan izole edilerek ya da sekans analizi ile tanımlanarak keşfedilmiştir. Bu yapıların çeşitliliği, etki mekanizmaları ve aktivite spektrumu, mükemmel tıbbın tasarımı için bir altın madenidir. Bu amaca ulaşmak için, endüstriden ve üniversitelerden birçok akademisyen ve araştırmacı, yapı-etkinlik ilişkilerini, güçlü sentetik formlarını vb. geliştirmeye katkıda bulunur. Yeni AMP'lerin tasarımı, bir AMP'nin 50 amino asit kalıntısından ziyade 3 amino asitten oluştuğu gerçeği sonucu sonsuz bir iş olacak özelliğindedir. Gerçekten de, N tane kalıntısı verilen bir AMP için olası kombinasyonların sayısı 20^N 'dir. Bu nedenle, etkili bir AMP geliştiricisi için

başlangıç noktası doğal olarak güçlü bir AMP tanımlamak ve onu optimize etmek için bazı değişiklikler yapmaktır. AMP'nin geliştirilmesi/iyileştirilmesi için en önemli şartlar: bakteriyel hedef için seçici toksisite, geniş aktivite spektrumu, yüksek kimyasal stabiliteye sahip formülasyon, düşük yan etki, düşük bakteriyel direnç riski, uygun maliyettir.

- ✓ **Geniş aktivite spektrumu:** AMP'ler belirgin ve geniş in vitro aktivite gösterse de, AMP'lerin in vivo aktivitesi fizyolojik tuz ve serum koşulları altında önemli ölçüde azalır. AMP'lerin wild tip ve dirençli bakteri suşları için aynı etkinliği gösterdiği de kanıtlanmıştır (Zasloff, 2002). Doğal kaynaklar, gelişmiş sentetik AMP'lere kıyasla sınırlı aktivite spektrumu ile düşük miktarlarda/konsantrasyonlarda AMP'ler üretir.
- ✓ **Toksisite:** AMP'ler ökaryotik hücreler için toksik olabilir, çünkü etki mekanizmaları temelde membranlarla etkileşime dayanır. Bu potansiyel toksisite aynı zamanda klinik uygulamanın önündeki en büyük engeldir. Bununla birlikte, insan hücreleri genellikle AMP'lere makul konsantrasyonlarda dirençlidir, ancak akrepler, yaban arıları ve arılardan alınan zehirlerin aslında insanlar için toksik olan AMP'lerden oluştuğuna dikkat edilmelidir. Bazı defensinler memeli hücreleri için yüksek konsantrasyonlarda sitotoksiktir (Lichenstein et al., 1986; Lichenstein et al., 1988).
- ✓ **Maliyet:** Bu aşılması gereken en büyük engeldir. Bir gram AMP üretmek 400 ABD dolarına kadar mal olabilirken, geleneksel bir antibiyotik için bu 1 ABD dolarından daha düşük olabilir (Marr et al., 2006). AMP'leri sentezlemek için ticari ölçekli üretim platformlarına acil ihtiyaç vardır.

Katyonik AMP'lerin terapötik ajanlar olarak kullanımı belirlenmiş ve doğrulanmıştır (Hancock, 2000). Şu anda birçok şirket AMP'ye dayalı olarak ilaç ticareti yapmaya çalışmaktadır, ancak hiçbirisi henüz piyasaya sürülmemiştir. Buna rağmen, birçok AMP şu anda klinik deneylerde test edilmektedir.

Pexiganan (veya MSI-78), 90'lı yıllarda tasarlanan ilk nesil AMP'den biri olarak geliştirilmiştir, bu peptid, magainin-2'den türetilir ve 22 amino asitten oluşur. Pexiganan, Faz III denemelerinde test edilmiştir. Yaranın iyileşmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır ve belirgin bir toksisite veya yan etkisi yoktur (Lamb and Wiseman, 1998). Bununla birlikte, 1999'da FDA tarafından reddedilmiştir. Çünkü enfekte diyabetik ayak ülserlerine karşı test edilmesi sonucu, florokinolon antibiyotik olan ofloksasin ile geleneksel tedaviye kıyasla herhangi bir iyileşme görülmemiştir.. Yine de, Pexiganan, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı ofloxacin'den çok daha etkili bir şekilde in vitro aktivite göstermiştir. (Fuchs et al., 1998; Ge et al., 1999). Iseiganan (bir domuz proteinli sentetik analog olan IB367) ve Neuprex® da Pexiganan ile aynı kadere sahiptir, çünkü Faz III denemelerinden geçememişlerdir (Mackkin, 1998; Trotti et al., 2004)

MX-226 ve MX-594NA, Migenix'ten (Kanada) gelen sığır indolisidin bazlı AMP çeşitleri, son zamanlarda Faz III klinik çalışmalarında etkinlik göstermiştir. MX-226, kateter ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesi için, MX-594NA ise akne vulgaris tedavisi için geliştirilmiştir (Giuliani et al., 2007).

Bir fungal defensin olan plektazin, günümüzde Novozymes tarafından geliştirilmiştir ve kullanılmaktadır (Mygind et al., 2005). Bu AMP'nin *Streptococcus pneumoniae*'a karşı aktif olduğu ve şu anda prelinik gelişimde olduğu gösterilmiştir. Plectasin, yeni bir AMP temelli antibiyotik sınıfının ilk üyesi olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasallar

Tryptic soya broth (TSA) Oxoid firmasından; mannoz, D(-)-fruktoz, sakkaroz, üre, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosforik asit, aseton, HCl, Sigmaldrich firmasından; M17 broth, tripton, pepton, Fluka analytical firmasından; nişasta, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Alfa Aesar firmasından; D(+)-glukoz, K_2HPO_4 , NH_4NO_3 , asetik asit, etanol, Merck firmasından; MRS broth LAB M firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Marka ve Model
Hassas Tartı	AND GR SERİSİ
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	HANNA HI 2211-02
İnkübatör	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Mikroplaka Okuyucu	THERMO SCIENTIFIC
Mikro Pipet	EPPENDORF RESEARCH PLUS
Su Banyosu	MEMMERT
Vortex	FISONS
Steril Kabin	ESCO CLASS 2 BSC
Otoklav	HIRAYAMA
Santrifüj	EPPENDORF
-86°C	THERMO SCIENTIFIC

3.1.3. Mikroorganizmalar

L. pentosus (DSM 16366), *B. subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *B. subtilis* (ATCC 6653) mikroorganizmaları AMP üretiminde, *M. luteus* (ATCC 4698) mikroorganizması antibakteriyel test aşamasında kullanılmıştır.

3.1.4. Besi ortamları

Farklı mikroorganizmalardan AMP üretiminin gerçekleştirilmesi amacıyla Tablo 4'te ve Tablo 5'te içerikleri verilen AMP üretim ortamları, MRS Broth (Tablo 6), M17 Broth (Tablo 7) ve Tryptic Soy Broth (TSB) (Tablo 8) besi ortamlarından peptid üretimi gerçekleştirildi.

Tablo 4. Antimikrobiyal peptid üretim ortamı 1 içeriği.

Bileşen	Konsantrasyon
Pepton	15 g/l
Tripton	10 g/l
Yeast ekstrakt	10 g/l
Glukoz	10 g/l
Tween 80	1 ml/l

Tablo 5. Antimikrobiyal peptid üretim ortamı 2 içeriği

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	20,00
Nişasta	20,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,00
Yeast Ekstrakt	10,00
K ₂ HPO ₄	2,60
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,10
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,50
NaCl	0,25
CaCO ₃	9,00

Tablo 6. MRS broth içeriği

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
K ₂ HPO ₄	2,00
Glukoz	20,00
MgSO ₄ . 5 H ₂ O	0,20
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,05
Meat ekstrakt	8,00
Pepton	5,00
NaCH ₃ COO. 3 H ₂ O	2,00
Yeast ekstrakt	4,00

Tablo 7. M17 broth içeriği

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Askorbik asit	0,50
Laktoz	5,00
MgSO ₄	0,25
Meat ekstrakt	5,00
Meat pepton	2,50
Sodyum gliserofosfat	19,00
Soya pepton	5,00
Tripton	2,50
Yeast ekstrakt	2,50

Tablo 8. TSB içeriği

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Kazein pepton	17,0
K ₂ HPO ₄	2,5
Glukoz	2,5
NaCl	5,0
Soya pepton	3,0

3.2. Antimikrobiyal Peptid Üretiminin Optimizasyonu

Farklı mikroorganizmalardan AMP üretiminin incelenmesi amacıyla 5 farklı besi ortamında 5 farklı mikroorganizmanın AMP üretimi takip edildi. Deneme sonucunda en iyi üretimin görüldüğü ortam seçilerek (MRS broth), AMP üretiminin optimizasyonu çalışması yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında karbon kaynağı türü ve konsantrasyonu, azot kaynağı türü ve konsantrasyonu, pH ve sıcaklık parametreleri incelendi (Tablo 9).

Tablo 9. Antimikrobiyal peptid üretiminin optimizasyonunda incelenen parametreler.

Parametre	Değer
Karbon kaynağı türü	Glukoz-fruktoz-sükroz-malt ekstrakt-nişasta
Karbon kaynağı konsantrasyonu	2,5-5,0-7,5-10,0-15,0 g/L
Azot kaynağı türü	Amonyum sülfat-yeast ekstakt-pepton-tripton-amonyum nitrat
Azot kaynağı konsantrasyonu	3-6-12-18-24 g/L
pH	5,5-6,0-6,4-7,0-7,5
Sıcaklık	24-26-28-30-32 °C

Besi ortamı olarak MRS broth kullanıldı. Karbon ve azot kaynakları MRS broth ortamına ekstra olarak eklendi. Her denemede herhangi bir karbon ya da azot kaynağı eklenmeyen MRS broth ortamı kontrol olarak kullanıldı.

AMP üretim ortamlarından 12-26 saat aralığında 2 saatte bir örnek alındı. Örnekler 4°C'de 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası örnekler filtreden geçirildi ve antibakteriyel testler için hazır hale getirildi.

3.3. Antibakteriyel Testler

Çalışmada üretilen AMPlerin etkinliklerini incelemek amacıyla Disk Difüzyon Yöntemi (Dökme Plak) kullanıldı. Stok kültürde (-86°C) saklanan *M. luteus* (ATCC 4698) suşu TSB'ye inoküle edildi ve 30°C'de 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, % 0,75 olacak şekilde *M. luteus* (ATCC 4698) tryptic soy agar (TSA) içerisine inoküle edilerek petrilere döküldü ve üzerine örnek yüklemesi yapılan diskler yerleştirilerek 30°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklerin zon çapları ölçüldü. Disklere, filtreden geçirilerek hazırlanan örnekler ile yükleme işlemi gerçekleştirildi (20 µl). Yükleme işleminin ardından diskler oda sıcaklığında 1 saat kurutuldu.

3.4. Antimikrobiyal Peptid Saflaştırılması

AMP üretilen besi ortamı 4°C'de 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası örnekler 0,22 µm'lik filtreden geçirildi ve antibakteriyel testler için hazır hale getirildi. AMP aktivitesi antibakteriyel testler yapılarak ölçüldü.

3.4.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme ve Diyaliz

%60'lık olacak şekilde katı amonyum sülfat ve 4°C'de buz banyosunda hafifçe karıştırılarak ilave edildi. Amonyum sülfatın çözünmesinden sonra, karışım gece boyunca 4°C'de bekletildi ve ardından 9000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlendi.

Pelet, 5 ml pH 7 10 mM fosfat tampon içerisinde çözüldü, daha sonra buz banyosu üzerinde gece boyunca 1 litre pH 7 10 mM fosfat tamponuna karşı diyaliz

edildi. Diyaliz için, SPECTRAPOR^{T.M} tipi diyaz membranı kullanıldı (Philadelphia, Pa., U.S.A). Diyaliz sonrasında AMP aktivitesi antibakteriyel testler yapılarak ölçüldü.

3.4.2. Sephadex G75 Üzerinde Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırma

Jel filtrasyon kromatografisi için (2,5 x 7,0 cm) tipi kolon, Sephadex G75 ile dolduruldu ve kolon jelin dengede tutulması amacıyla pH 7 10 mM fosfat tamponu ile gece boyunca bekletildi. Bekleme sonrasında, pH 7 10 mM fosfat tamponu ile kolon yıkandı. 4 ml AMP kolona eklendi ve aynı tampon ile elüsyonu yapıldı. AMPnin diğer proteinlerden en iyi şekilde ayrılmasını sağlamak amacıyla elüsyon yavaş (0,6 ml/dakika) bir akış hızında gerçekleştirildi. 1ml'lik fraksiyonlar toplandı. Her bir fraksiyon için 280 nm'de absorbans okundu ve fraksiyonlarda antibakteriyel testler yapılarak AMP aktivitesi ölçüldü.

3.4.3. DEAE-Sefaroz Üzerinde İyon Değiştirme Kromatografisi ile Saflaştırma

İyon değiştirme kromatografisi için (2,5 x 7,0 cm) tipi kolon, DEAE- Sefaroz ile dolduruldu ve kolon jelin dengede tutulması amacıyla pH 7 10 mM fosfat tamponu ile gece boyunca bekletildi. Bekleme sonrasında pH 7 10 mM fosfat tamponu ile kolon yıkandı. 4 ml AMP kolona eklendi ve aynı tamponda hazırlanmış NaCl (0,00-0,25-0,50 0,75-1,00-1,50 M) ile lineer gradyan elüsyonu yapıldı. Elüsyon 0,8 ml/dakika'lık bir akış hızında gerçekleştirildi. 1ml'lik fraksiyonlar toplandı. Her bir fraksiyon için 280 nm'de absorbans okundu ve fraksiyonlarda antibakteriyel testler yapılarak AMP aktivitesi ölçüldü.

3.5. Saflaştırılan AMP'nin SDS-PAGE ile Görüntülenmesi

Saflaştırılması tamamlanan AMP'yi görüntülemek amacıyla SDA-PAGE yöntemi kullanıldı. SDS-PAGE düzlemsel (slab) biçimin hazırlanan jeller kullanılarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler 1:1 oranında 2X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°C'de 15 dakika inkübe edildi. SDS-PAGE'e 10 µl örnek uygulandı ve örnekler 50 mA, 300 V altında yaklaşık 90 dakika jelde yürütüldü. SDS-PAGE için kullanılacak jeller Tablo 10'da içeriği verilen çözeltiler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 10. % 12'lik SDS-PAGE jel hazırlamak için kullanılan çözeltiler.

	Alt Jel	Üst Jel
Alt veya üst jel tamponu	19,50 ml	7,38 ml
%30 (w/v) akrilamid/metilen bisakrilamid çözeltisi (37,5:1 oranında)	26,20 ml	5,90 ml
Distile su	31,58 ml	15,95 ml
Tetrametilendiamin	89,00 µl	29,00 µl
Amonyum persülfat (%10)	195,00 µl	89,00 µl

Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından jel yürütme sisteminden alındı ve % 0,25'lik Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Boya jelin yüzeyini tamamen boyadığı için jelden uzaklaştırılması gerekti. Boyayı jelden uzaklaştırmak için jel içerisinde distile su bulunan bir kaba alındı, mikrodalga fırın içerisine konuldu ve kabın içerisindeki su kaynadıktan 5 dakika sonra alındı. Bu işlem kabın içerisindeki su değiştirilerek 2 kez tekrarlandı.

3.6. Saflaştırılan Peptidlerin Kalsiyum Aljinat Boncuklarına İmmobilizasyonu

Sodyum aljinat % 2'lik olacak şekilde hazırlanarak oda sıcaklığında çözüldü, 1 gece boyunca +4°C bekletildi. 10 ml'lik enjektöre sodyum aljinat çözeltisi çekildi, daha önceden hazırlanıp +4°C'de bekletilen % 3'lük 100 ml CaCl₂ çözeltisinin içine ucu küt iğne kullanılarak küçük damlalar halinde eklendi. İşlem buz banyosu içinde, çözelti yavaşça karıştırılarak yapıldı. Damlatma işlemi sonrasında oluşan kalsiyum aljinat boncukları, 2 saat +4°C'de bekletildi. Son olarak 1 kere 50 ml saf su, 3 kere 50 ml pH 4,0 25 mM fosfat tamponu ile yıkandı ve kullanıma hazır olarak +4°C'de saklandı.

Hazırlanan kalsiyum aljinat boncukları 2 ml EDC (pH 4,0 25 mM fosfat tamponu) ile 25°C'de 150 rpm karıştırma hızında 30 dakika inkübe edilerek reaksiyona yatkın hale getirildi (verilen değerler 5 adet kalsiyum aljinat boncuğu

içeren reaksiyon ortamı için geçerlidir). Aktiflenen kalsiyum aljinat boncukları 3 kere 1 ml pH 7,0 25 mM fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkanan kalsiyum aljinat boncukları 1 ml pH 7,0 25 mM fosfat tamponu ve 0,25 ml saflaştırılan peptid içeren reaksiyon ortamına eklendi ve 25°C’de 150 rpm karıştırma hızında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında boncuklar reaksiyon ortamından alındı ve 3 kere 0,5 ml pH 7,0 25 mM fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkama suları reaksiyon ortamı ile birleştirildi. Elde edilen örneklerden peptid tayini Bradford yöntemi ile yapıldı.

3 mL Bradford reaktifi üzerine 150 µL örnek eklendi, 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 595 nm’de köre karşı absorbans okundu. 1 L Bradford reaktifi; 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, % 95 50 mL etanol ve 55 mL % 88 fosforik asit kullanılarak hazırlandı. Çözelti hazırlandıktan sonra filtreden geçirildi. Standart grafik 0,02-0,05-0,10-0,15-0,20 mg/ml BSA çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

Optimizasyon çalışmalarında pH, tampon konsantrasyonu, boncuk sayısı ve AMP konsantrasyonu parametreleri incelendi (Tablo 11).

Tablo 11. İmmobilizasyonun optimizasyonunda incelenen parametreler.

Parametre	Değer
pH	5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0-8,5-9,0
Tampon konsantrasyonu	10-25-50-100-250 mM
Boncuk sayısı	1-3-5-7-10 adet
AMP konsantrasyonu	0,032-0,064-0,128-0,320-0,640-0,960-1,280 mg/ml

3.7. Peptid İmmobilize Kalsiyum Aljinat Boncuğunun Antibakteriyel Testi

Denemede hem işlem görmemiş hem de saflaştırılan AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarının antibakteriyel etkisi *M. luteus* (ATCC 4698) bakterisi için test edildi. Antibakteriyel test aşamasında, Disk Difüzyon Yöntemi (Yayma Plak Tekniği) kullanıldı.

Stok kültürden alınan hücreler TSB'ye inoküle edildi ve 30°C'de 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda TSB'den steril petride hazırlanan TSA'ya inokülasyon yapıldı (10µl). Petriye 1 adet işlem görmemiş, bir adet AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğu yerleştirildi ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası antibakteriyel etki incelendi.

3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme

Taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 5200 SEM, Tokyo, Japonya) (SEM), işlem görmemiş kalsiyum aljinat ve AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarının görüntülenmesinde kullanıldı. Örnekler 8-20 kV arasındaki voltajda, argon atmosferde, altın kaplama yapıldıktan sonra görüntülendi.

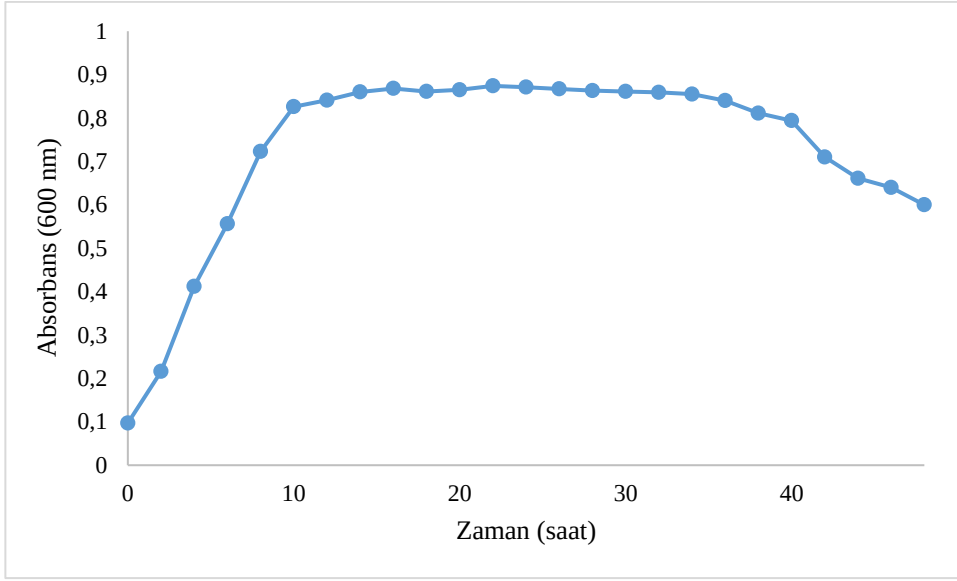
3.9. ATR-FTIR Spektrumu

FT-IR (Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi) spektrumu için Perkin Elmer Spectrum 100 Serisi kızılötesi spektrofotometre kullanıldı. Kalsiyum aljinat ve AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarının spektrumları, ATR (azaltılmış toplam yansıma) ekipmanı kullanılarak 400–4000 cm⁻¹ arasında kaydedildi.

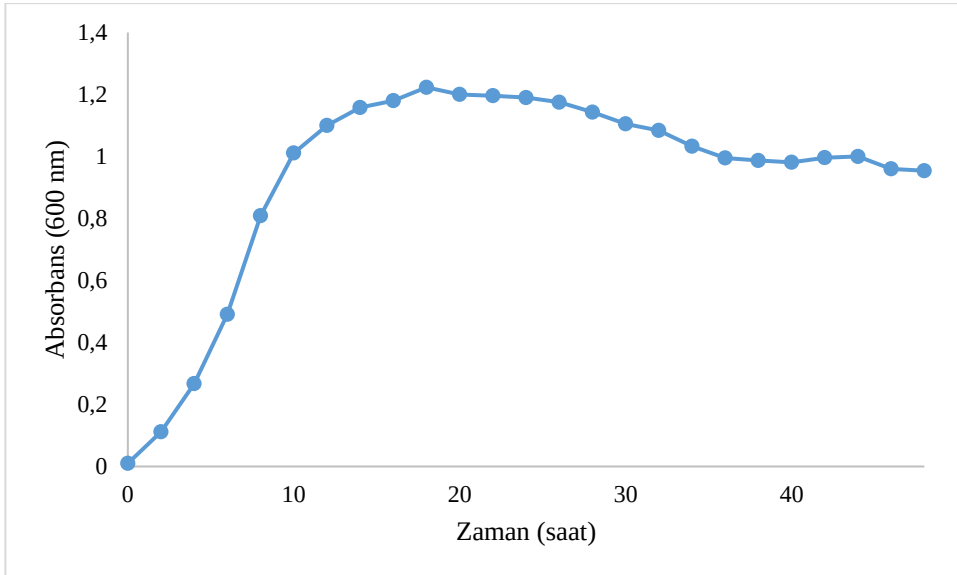
4. BULGULAR

4.1. AMP Üretiminin Optimizasyonu

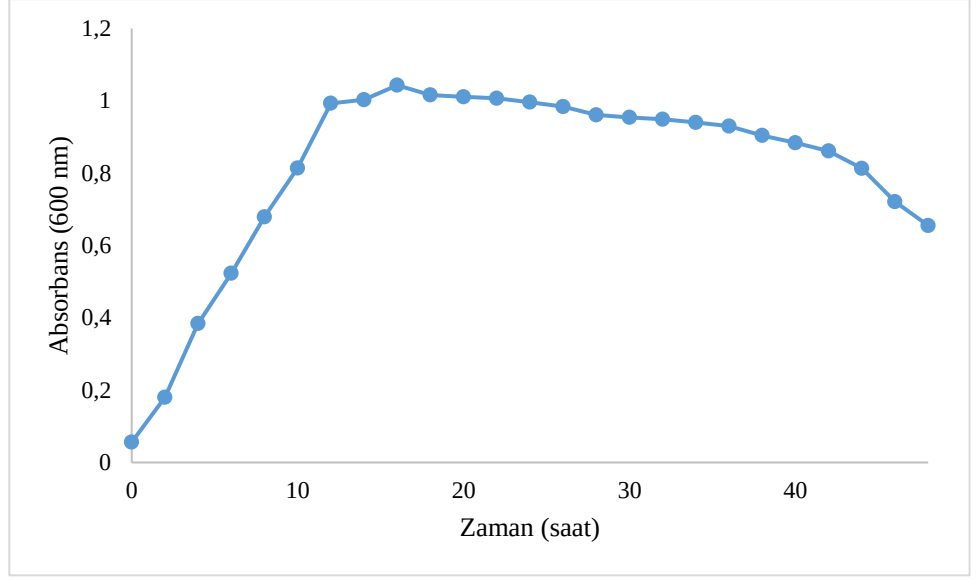
AMP üretiminin optimizasyonu, üretim ortamından alınan örneklerle antibakteriyel test yapılması yoluyla takip edildi. Çalışmada kullanılan her bir bakteri için büyüme eğrisi OD₆₀₀ ölçümü ile oluşturuldu (Şekil 3-7). Büyüme eğrileri sonucunda üretim ortamlarından örnek alımı için zaman aralığı belirlendi.



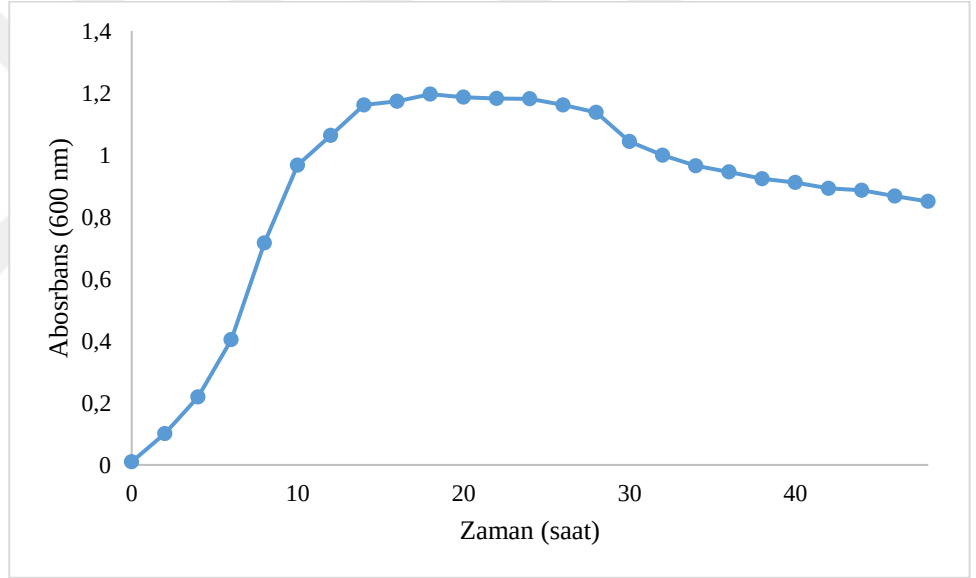
Şekil 3. *L. pentosus* (DSM 16366)'nın büyüme eğrisi.



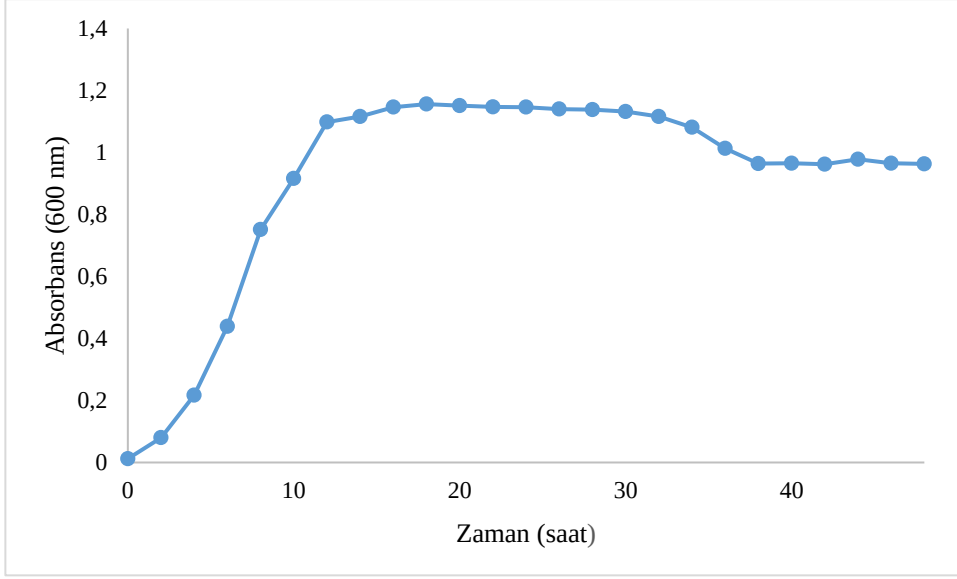
Şekil 4. *B. subtilis* (DSM 347)'in büyüme eğrisi.



Şekil 5. *B. cereus*'un büyüme eğrisi.



Şekil 6. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'nın büyüme eğrisi.



Şekil 7. *B. subtilis* (ATCC 6653)'nin büyüme eğrisi.

4.1.1. *Lactobacillus pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretiminin optimizasyonu

Besi Ortamı Seçimi

L. pentosus (DSM 16366)'nin farklı besi ortamlarındaki AMP üretimini takip etmek amacıyla kurulan deneme sonucunda MRS broth kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 12). Diğer besi ortamlarında AMP üretimi gözlenmedi.

Tablo 12. *L. pentosus* (DSM 16366)'un farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi

Besi Ortamı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
AMP üretim ortamı 1	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0

AMP üretim ortamı 2	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0
M17 broth	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0
MRS broth	12	10,0
	16	10,0
	20	11,0
	24	12,0
	28	12,5
	32	10,0
	36	10,0
TSB	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0

	32	6,0
	36	6,0

Karbon Kaynağı Türü

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 13).

Tablo 13. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi

Karbon kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Glukoz	12	9,0
	16	11,0
	20	13,5
	24	11,0
	28	9,5
	32	8,0
	36	8,0
Fruktoz	12	6,0
	16	6,0
	20	6,5
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0
Sükroz	12	7,0
	16	7,0
	20	7,0

	24	7,0
	28	8,0
	32	7,0
	36	8,0
Malt ekstrakt	12	7,0
	16	7,0
	20	8,0
	24	8,0
	28	10,0
	32	10,5
	36	9,0
Nişasta	12	6,5
	16	6,5
	20	6,5
	24	7,0
	28	7,0
	32	7,5
	36	6,5
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	12	9,0
	16	9,5
	20	10,0
	24	11,0
	28	12,0
	32	11,0
	36	9,0

Karbon Kaynağı Konsantrasyonu

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, en yüksek zon çapı 10 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi (Tablo 14).

Tablo 14. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi

Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
2,5	12	7,5
	16	7,5
	20	8,5
	24	8,0
	28	8,5
	32	8,0
	36	7,0
5,0	12	8,0
	16	9,0
	20	12,5
	24	13,0
	28	13,0
	32	11,0
	36	9,5
7,5	12	10,0
	16	10,5
	20	13,0
	24	13,0

	28	13,5
	32	12,0
	36	10,0
10,0	12	10,0
	16	12,5
	20	14,5
	24	13,5
	28	13,0
	32	11,5
	36	10,5
15,0	12	10,5
	16	10,5
	20	10,5
	24	11,0
	28	11,5
	32	9,5
	36	9,5
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	12	9,5
	16	10,5
	20	10,0
	24	12,0
	28	12,0
	32	10,5
	36	10,0

Azot Kaynağı Türü

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 15).

Tablo 15. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi

Azot kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Amonyum sülfat	12	7,0
	16	7,0
	20	6,5
	24	7,0
	28	6,5
	32	7,0
	36	7,0
Yeast ekstrakt	12	7,0
	16	7,0
	20	8,5
	24	8,5
	28	8,0
	32	8,0
	36	8,5
Pepton	12	8,5
	16	9,0
	20	9,0
	24	9,5
	28	10,0

	32	9,0
	36	9,0
Tripton	12	11,5
	16	12,0
	20	14,5
	24	15,0
	28	15,0
	32	13,5
	36	11,0
Amonyum nitrat	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	12	9,0
	16	9,0
	20	12,0
	24	12,0
	28	12,0
	32	11,5
	36	9,5

Azot Kaynağı Konsantrasyonu

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 6 g/L tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 16).

Tablo 16. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
3,0	12	9,5
	16	9,5
	20	9,5
	24	11,0
	28	9,5
	32	8,0
	36	8,5
6,0	12	10,0
	16	12,5
	20	13,5
	24	15,5
	28	14,5
	32	14,0
	36	12,5
12,0	12	9,0
	16	9,0
	20	9,5
	24	9,0
	28	9,5

	32	8,0
	36	8,0
18,0	12	8,0
	16	8,5
	20	8,5
	24	8,5
	28	8,0
	32	7,5
	36	7,5
24,0	12	8,5
	16	7,5
	20	8,5
	24	8,0
	28	8,5
	32	7,5
	36	7,5
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	12	10,5
	16	10,5
	20	11,0
	24	11,0
	28	12,5
	32	11,5
	36	10,0

pH Etkisi

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, pH değeri 6,4'e ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 17).

Tablo 17. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine pH etkisi

pH	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
5,5	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0
6,0	12	7,0
	16	9,0
	20	11,0
	24	11,0
	28	11,0
	32	10,5
	36	9,0
6,4	12	10,5
	16	11,5
	20	13,0
	24	15,0
	28	16,0

	32	14,0
	36	12,0
7,0	12	7,0
	16	7,5
	20	8,5
	24	9,0
	28	10,5
	32	10,5
	36	8,0
7,5	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0

Sıcaklık Etkisi

L. pentosus (DSM 16366)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 18).

Tablo 18. *L. pentosus* (DSM 16366)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
24	12	6,0
	16	6,0
	20	6,0

	24	7,0
	28	7,5
	32	8,0
	36	7,0
26	12	8,5
	16	8,5
	20	11,5
	24	13,5
	28	13,0
	32	12,0
	36	10,5
28	12	10,0
	16	12,5
	20	14,0
	24	16,0
	28	15,5
	32	14,0
	36	12,0
30	12	8,0
	16	8,5
	20	10,5
	24	11,0
	28	12,0
	32	10,5
	36	8,5
	12	6,0

32	16	6,0
	20	6,0
	24	6,0
	28	6,0
	32	6,0
	36	6,0

4.1.2. *Bacillus subtilis* (DSM 347)'dan AMP üretiminin optimizasyonu

Besi Ortamı Seçimi

B. subtilis (DSM 347)'in farklı besi ortamlarındaki AMP üretimini takip etmek amacıyla kurulan deneme sonucunda MRS broth kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 19). Diğer besi ortamlarında AMP üretimi gözlenmedi.

Tablo 19. *B. subtilis* (DSM 347)'in farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi

Besi Ortamı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
AMP üretim ortamı 1	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
AMP üretim ortamı 2	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0

	26	6,0
M17 broth	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
MRS broth	16	9,0
	18	9,0
	20	9,0
	22	8,5
	24	9,0
	26	8,0
TSB	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Karbon Kaynağı Türü

B. subtilis (DSM 347) 'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 20).

Tablo 20. *B. subtilis* (DSM 347)'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi

Karbon kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Glukoz	16	7,5
	18	8,5
	20	9,0
	22	9,5
	24	8,0
	26	8,0
Fruktoz	16	7,5
	18	8,0
	20	8,5
	22	8,0
	24	7,5
	26	6,5
Sükroz	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Malt ekstrakt	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	8,0
	18	8,0
	20	8,5
	22	8,0
	24	8,0
	26	7,0

Karbon Kaynağı Miktarı

B. subtilis (DSM 347)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, en yüksek zon çapı 5 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi (Tablo 21).

Tablo 21. *B. subtilis* (DSM 347)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi

Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
1,0	16	7,0
	18	7,5
	20	8,5
	22	9,0
	24	8,0
	26	7,0
2,5	16	7,5
	18	8,0
	20	9,0
	22	9,0
	24	8,5
	26	7,5

5,0	16	7,5
	18	8,0
	20	9,5
	22	10,0
	24	10,0
	26	8,5
7,5	16	7,0
	18	7,5
	20	7,5
	22	7,0
	24	6,5
	26	6,5
10,0	16	6,5
	18	7,0
	20	7,0
	22	7,5
	24	7,5
	26	6,5
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,0
	18	8,0
	20	8,5
	22	9,0
	24	8,0
	26	7,5

Azot Kaynağı Türü

B. subtilis (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, yeast ekstrakt kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 22).

Tablo 22. *B. subtilis* (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi

Azot kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Amonyum sülfat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Yeast ekstrakt	16	8,5
	18	8,5
	20	9,5
	22	11,0
	24	10,0
	26	8,5
Pepton	16	6,5
	18	6,5
	20	8,5
	22	8,0
	24	8,0
	26	8,0
	16	7,5

Tripton	18	7,0
	20	8,0
	22	9,0
	24	7,0
	26	7,0
Amonyum nitrat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,0
	18	9,0
	20	9,0
	22	10,0
	24	9,5
	26	9,0

Azot Kaynağı Konsantrasyonu

B. subtilis (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 12 g/L yeast ekstrakt kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 23).

Tablo 23. *B. subtilis* (DSM 347)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
3,0	16	7,5
	18	7,5

	20	8,5
	22	9,0
	24	7,5
	26	7,5
6,0	16	9,0
	18	9,5
	20	10,5
	22	10,5
	24	10,5
	26	10,0
12,0	16	9,0
	18	9,5
	20	11,0
	22	12,0
	24	10,5
	26	10,5
18,0	16	8,5
	18	9,5
	20	9,5
	22	9,5
	24	8,0
	26	7,0
24,0	16	6,0
	18	7,0
	20	7,0
	22	6,0

	24	6,5
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,5
	18	7,5
	20	9,0
	22	9,0
	24	9,5
	26	8,5

pH Etkisi

B. subtilis (DSM 347)'ten AMP üretimine pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, pH değeri 7,0'ya ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 24).

Tablo 24. *B. subtilis* (DSM 347)'ten AMP üretimine pH etkisi

pH	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
5,5	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
6,0	16	6,0
	18	7,0
	20	7,0
	22	7,0

	24	6,5
	26	6,5
6,4	16	9,5
	18	9,5
	20	11,0
	22	11,5
	24	11,0
	26	9,5
7,0	16	10,0
	18	10,5
	20	10,5
	22	12,5
	24	11,5
	26	10,5
7,5	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Sıcaklık Etkisi

B. subtilis (DSM 347)'ten AMP üretimine sıcaklık etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 25).

Tablo 25. *B. subtilis* (DSM 347) 'ten AMP üretimine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
24	16	6,0
	18	6,0
	20	6,5
	22	7,0
	24	7,5
	26	7,0
26	16	8,0
	18	8,5
	20	9,5
	22	9,5
	24	9,0
	26	7,5
28	16	10,0
	18	10,5
	20	11,0
	22	12,0
	24	11,5
	26	11,0
30	16	8,5
	18	8,5
	20	8,5
	22	8,0
	24	8,0

	26	7,5
32	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

4.1.3. *Bacillus cereus*'dan AMP üretiminin optimizasyonu

Besi Ortamı Seçimi

B. cereus'un farklı besi ortamlarındaki AMP üretimini takip etmek amacıyla kurulan deneme sonucunda MRS broth kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 26). Diğer besi ortamlarında AMP üretimi gözlenmedi.

Tablo 26. *B. cereus*'un farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi

Besi Ortamı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
AMP üretim ortamı 1	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
AMP üretim ortamı 2	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0

	24	6,0
	26	6,0
M17 broth	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
MRS broth	16	6,5
	18	7,0
	20	8,0
	22	8,5
	24	8,5
	26	7,5
TSB	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Karbon Kaynağı Türü

B. cereus'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 27).

Tablo 27. *B. cereus*'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi

Karbon kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Glukoz	16	7,0
	18	8,5
	20	8,5
	22	9,5
	24	9,0
	26	8,5
Fruktoz	16	6,5
	18	6,5
	20	7,5
	22	7,0
	24	7,0
	26	6,0
Sükroz	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Malt ekstrakt	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	6,5
	18	6,5
	20	8,0
	22	8,0
	24	8,0
	26	7,0

Karbon Kaynağı Konsantrasyonu

B. cereus'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, en yüksek zon çapı 7,5 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi (Tablo 28).

Tablo 28. *B. cereus*'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi

Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
1,0	16	8,0
	18	8,5
	20	7,0
	22	6,5
	24	6,0
	26	6,0
2,5	16	8,0
	18	10,0
	20	10,5
	22	9,5
	24	9,0
	26	9,0
5,0	16	8,5

	18	9,0
	20	9,5
	22	9,0
	24	8,5
	26	8,5
7,5	16	9,0
	18	9,5
	20	10,5
	22	11,5
	24	11,0
	26	11,0
10,0	16	6,5
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,5
	18	7,5
	20	8,0
	22	8,0
	24	7,0
	26	7,5

Azot Kaynağı Türü

B. cereus'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 29).

Tablo 29. *B. cereus*'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi

Azot kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Amonyum sülfat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Yeast ekstrakt	16	8,0
	18	8,0
	20	8,5
	22	9,5
	24	10,0
	26	8,0
Pepton	16	6,5
	18	7,0
	20	7,0
	22	8,0
	24	8,5
	26	7,5
	16	11,0

Tripton	18	11,5
	20	11,5
	22	12,0
	24	11,0
	26	9,5
Amonyum nitrat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	9,0
	18	9,0
	20	10,0
	22	11,0
	24	11,0
	26	10,5

Azot Kaynağı Konsantrasyonu

B. cereus'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 6 g/L tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 30).

Tablo 30. *B. cereus*'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
3,0	16	7,5
	18	8,0
	20	8,0
	22	10,0
	24	9,5
	26	9,0
6,0	16	10,0
	18	10,5
	20	12,0
	22	12,5
	24	10,5
	26	9,0
12,0	16	8,0
	18	8,5
	20	8,5
	22	10,0
	24	8,5
	26	7,5
	16	6,0

18,0	18	6,5
	20	7,0
	22	7,5
	24	7,0
	26	7,0
24,0	16	6,5
	18	6,5
	20	7,0
	22	7,0
	24	6,5
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	9,5
	18	9,5
	20	10,0
	22	11,0
	24	10,5
	26	10,5

pH Etkisi

B. cereus'dan AMP üretimine pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, pH değeri 6,4'e ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 31).

Tablo 31. *B. cereus*'dan AMP üretimine pH etkisi

pH	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
5,5	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
6,0	16	7,0
	18	8,0
	20	9,0
	22	11,0
	24	10,0
	26	8,5
6,4	16	9,5
	18	10,5
	20	11,5
	22	12,5
	24	11,0
	26	10,0
7,0	16	8,0
	18	8,0
	20	8,5
	22	8,0
	24	8,5

	26	7,5
7,5	16	6,5
	18	6,5
	20	6,5
	22	6,5
	24	6,5
	26	6,0

Sıcaklık Etkisi

B. cereus'dan AMP üretimine sıcaklık etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 32).

Tablo 32. *B. cereus*'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi.

Sıcaklık (°C)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
24	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
26	16	6,5
	18	7,5
	20	8,0
	22	10,0
	24	9,5

	26	8,0
28	16	9,0
	18	10,5
	20	12,5
	22	12,5
	24	11,5
	26	11,0
30	16	6,0
	18	6,5
	20	7,5
	22	7,5
	24	7,0
	26	6,5
32	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

4.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretiminin optimizasyonu

Besi Ortamı Seçimi

P. aeruginosa (ATCC 27853)'nın farklı besi ortamlarındaki AMP üretimini takip etmek amacıyla kurulan deneme sonucunda MRS broth kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 33). Diğer besi ortamlarında AMP üretimi gözlenmedi.

Tablo 33. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'nın farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi

Besi Ortamı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
AMP üretim ortamı 1	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
AMP üretim ortamı 2	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
M17 broth	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
MRS broth	16	6,0
	18	6,5
	20	7,0
	22	8,0
	24	7,5

	26	7,0
TSB	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Karbon Kaynağı Türü

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 34).

Tablo 34. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi

Karbon kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Glukoz	16	6,5
	18	7,5
	20	8,5
	22	9,5
	24	8,5
	26	8,0
Fruktoz	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0

	26	6,0
Sükroz	16	7,0
	18	7,5
	20	8,0
	22	8,5
	24	8,5
	26	7,5
Malt ekstrakt	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	6,0
	18	6,5
	20	7,0
	22	8,0
	24	8,0
	26	7,5

Karbon Kaynağı Konsantrasyonu

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, en yüksek zon çapı 2,5 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi (Tablo 35).

Tablo 35. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi

Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
1,0	16	6,0
	18	6,5
	20	6,5
	22	7,0
	24	7,5
	26	6,5
2,5	16	8,0
	18	8,5
	20	10,0
	22	11,0
	24	11,0
	26	10,0
5,0	16	7,0
	18	7,0
	20	8,5
	22	9,5
	24	10,0
	26	9,0
7,5	16	6,0
	18	7,0
	20	8,0
	22	7,0
	24	6,5

	26	6,5
10,0	16	6,5
	18	6,5
	20	7,5
	22	9,0
	24	8,0
	26	7,0
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	6,0
	18	6,0
	20	6,5
	22	7,5
	24	8,0
	26	6,5

Azot Kaynağı Türü

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 36).

Tablo 36. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi

Azot kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Amonyum sülfat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0

	26	6,0
Yeast ekstrakt	16	7,0
	18	8,0
	20	8,5
	22	8,5
	24	7,0
	26	7,5
Pepton	16	7,5
	18	8,0
	20	8,0
	22	9,5
	24	8,0
	26	7,0
Trypton	16	8,5
	18	10,5
	20	11,5
	22	13,0
	24	12,0
	26	9,5
Amonyum nitrat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı	16	8,0

eklenmeyen ortam	18	8,0
	20	9,0
	22	10,0
	24	10,0
	26	9,5

Azot Kaynağı Konsantrasyonu

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 6 g/L tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 37).

Tablo 37. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
3,0	16	6,5
	18	7,5
	20	7,5
	22	9,0
	24	10,5
	26	9,0
6,0	16	11,0
	18	11,5
	20	12,5
	22	13,0
	24	11,5
	26	10,0

12,0	16	8,0
	18	8,0
	20	9,5
	22	9,0
	24	8,5
	26	8,0
18,0	16	7,0
	18	7,5
	20	8,5
	22	7,5
	24	6,0
	26	6,5
24,0	16	6,5
	18	6,5
	20	6,5
	22	7,0
	24	6,5
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,5
	18	7,5
	20	8,0
	22	9,0
	24	7,5
	26	6,5

pH Etkisi

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, pH değeri 6,4'e ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 38).

Tablo 38. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine pH etkisi

pH	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
5,5	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
6,0	16	7,0
	18	7,0
	20	8,0
	22	10,0
	24	9,0
	26	7,5
6,4	16	11,0
	18	11,5
	20	12,0
	22	13,0
	24	12,0
	26	10,5
	16	7,0

7,0	18	8,5
	20	8,5
	22	10,0
	24	9,5
	26	8,5
7,5	16	6,0
	18	6,5
	20	7,0
	22	6,5
	24	6,0
	26	6,0

Sıcaklık Etkisi

P. aeruginosa (ATCC 27853)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 39).

Tablo 39. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretimine sıcaklık etkisi.

Sıcaklık (°C)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
24	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
26	16	7,5

	18	8,0
	20	8,5
	22	8,5
	24	8,5
	26	7,0
28	16	10,5
	18	12,0
	20	13,0
	22	13,0
	24	12,5
	26	10,5
30	16	6,5
	18	7,5
	20	7,0
	22	7,0
	24	6,5
	26	6,5
32	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

4.1.5. *Bacillus subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretiminin optimizasyonu

Besi Ortamı Seçimi

B. subtilis (ATCC 6653)'in farklı besi ortamlarındaki AMP üretimini takip etmek amacıyla kurulan deneme sonucunda MRS broth kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 40). Diğer besi ortamlarında AMP üretimi gözlenmedi.

Tablo 40. *B. subtilis* (ATCC 6653)'in farklı besi ortamlarında antibakteriyel aktivitesi

Besi Ortamı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
AMP üretim ortamı 1	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
AMP üretim ortamı 2	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
M17 broth	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

MRS broth	16	7,0
	18	8,5
	20	9,0
	22	9,0
	24	8,5
	26	8,0
TSB	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

Karbon Kaynağı Türü

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 41).

Tablo 41. *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisi

Karbon kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Glukoz	16	7,0
	18	7,5
	20	9,5
	22	9,5
	24	8,0
	26	8,0
Fruktoz	16	6,5

	18	6,5
	20	7,0
	22	7,0
	24	7,0
	26	6,0
Sükroz	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Malt ekstrakt	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,0
	18	8,5
	20	9,0
	22	9,0
	24	8,5
	26	8,0

Karbon Kaynağı Konsantrasyonu

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, en yüksek zon çapı 2,5 g/L glukoz kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi (Tablo 42).

Tablo 42. *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisi

Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
1,0	16	7,0
	18	7,5
	20	7,5
	22	8,5
	24	8,0
	26	7,5
2,5	16	7,0
	18	8,5
	20	10,5
	22	10,5
	24	10,0
	26	8,5
5,0	16	7,5
	18	7,5
	20	9,5
	22	10,0
	24	9,5
	26	8,0
	16	6,5

7,5	18	7,0
	20	7,0
	22	6,5
	24	6,5
	26	6,0
10,0	16	6,0
	18	6,5
	20	6,5
	22	6,0
	24	6,5
	26	6,5
Ekstra karbon kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,0
	18	8,0
	20	9,5
	22	9,5
	24	9,0
	26	8,0

Azot Kaynağı Türü

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, yeast ekstrakt kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 43).

Tablo 43. *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı türü etkisi

Azot kaynağı	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
Amonyum sülfat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Yeast ekstrakt	16	9,0
	18	10,0
	20	10,5
	22	11,5
	24	11,0
	26	10,0
Pepton	16	8,5
	18	8,5
	20	9,0
	22	9,5
	24	9,0
	26	9,0
Trypton	16	8,5
	18	9,0
	20	9,5
	22	10,0
	24	10,0
	26	8,5

Amonyum nitrat	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	8,0
	18	8,0
	20	8,0
	22	9,0
	24	9,5
	26	7,5

Azot Kaynağı Konsantrasyonu

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 18 g/L yeast ekstrakt kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 44).

Tablo 44. *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisi

Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
3,0	16	9,5
	18	9,5
	20	9,5
	22	11,0
	24	9,5
	26	8,0

6,0	16	10,0
	18	10,5
	20	10,5
	22	11,5
	24	11,5
	26	10,0
12,0	16	9,0
	18	10,0
	20	10,5
	22	12,0
	24	11,5
	26	10,0
18,0	16	9,0
	18	9,5
	20	11,5
	22	12,5
	24	11,0
	26	10,5
24,0	16	8,5
	18	10,5
	20	10,5
	22	10,5
	24	10,0
	26	8,5
Ekstra azot kaynağı eklenmeyen ortam	16	7,5
	18	7,5

	20	9,0
	22	9,0
	24	8,5
	26	7,5

pH Etkisi

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, pH değeri 7'ye ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 45).

Tablo 45. *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten AMP üretimine pH etkisi

pH	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
5,5	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
6,0	16	7,0
	18	8,5
	20	8,5
	22	9,0
	24	9,5
	26	8,5
6,4	16	9,5
	18	9,5

	20	10,5
	22	12,0
	24	11,5
	26	10,0
7,0	16	10,0
	18	11,5
	20	12,0
	22	13,0
	24	12,5
	26	11,5
7,5	16	8,5
	18	8,5
	20	9,0
	22	8,5
	24	8,0
	26	8,5

Sıcaklık Etkisi

B. subtilis (ATCC 6653)'ten AMP üretimine sıcaklık etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi (Tablo 46).

Tablo 46. *B. subtilis* (ATCC 6653) 'ten AMP üretimine sıcaklık etkisi.

Sıcaklık (°C)	Zaman (saat)	Zon çapı (mm)
24	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0
26	16	7,5
	18	8,5
	20	9,5
	22	9,0
	24	9,0
	26	7,5
28	16	10,5
	18	11,0
	20	13,0
	22	12,5
	24	12,5
	26	12,0
30	16	6,0
	18	7,0
	20	7,0
	22	7,5
	24	7,0

	26	6,5
32	16	6,0
	18	6,0
	20	6,0
	22	6,0
	24	6,0
	26	6,0

4.2. Antimikrobiyal Peptid Saflaştırılması

Çalışmada bir sonraki aşamada *L. pentosus* (DSM 16366) bakterisinden üretilen AMP'nin saflaştırılması gerçekleştirildi. AMP üretim ortamından alınan örneğe uygulanan antibakteriyel test sonucu 16 mm, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örneğe uygulanan antibakteriyel test sonucu 20 mm, Sephadex G75 kolonuna yüklenerek (jel filtrasyon kromatografisi ile) elüe edilen örneğe uygulanan antibakteriyel test sonucu 25 mm, DEAE Sefaroz kolonuna yüklenerek (iyon değişim kromatografisi ile) elüe edilen örneğe uygulanan antibakteriyel test sonucu 27 mm zon çapı elde edildi (Şekil 8-Şekil 11).



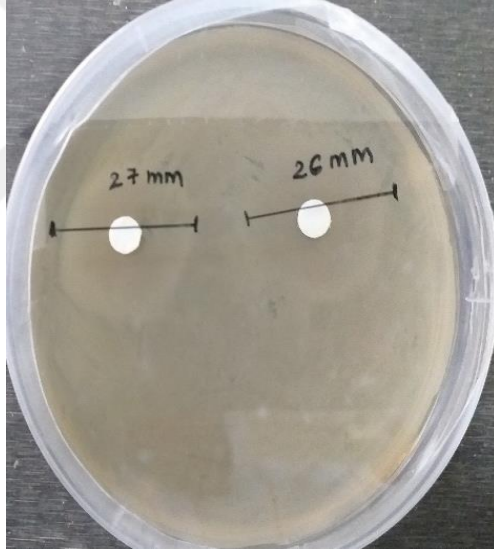
Şekil 8. Optium koşullarda gerçekleştirilen üretim sonrası elde edilen örneğin antibakteriyel testi.



Şekil 9. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örneğin antibakteriyel testi.

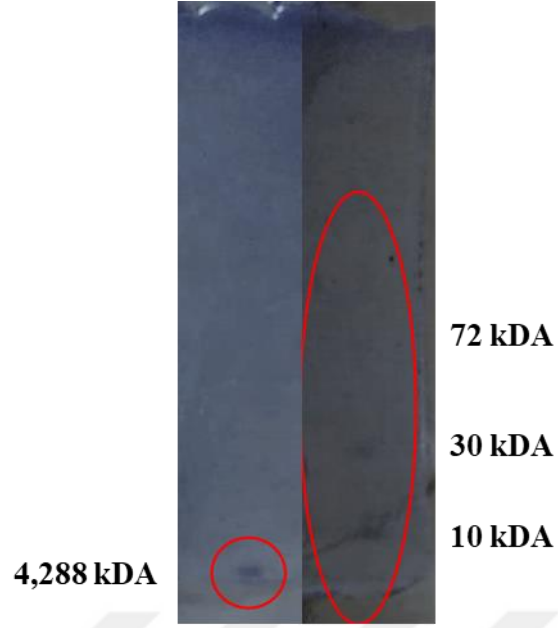


Şekil 10. Sephadex G75 kolonuna yüklenerek (jel filtrasyon kromatografisi ile) elüe edilen örneğin antibakteriyel testi.

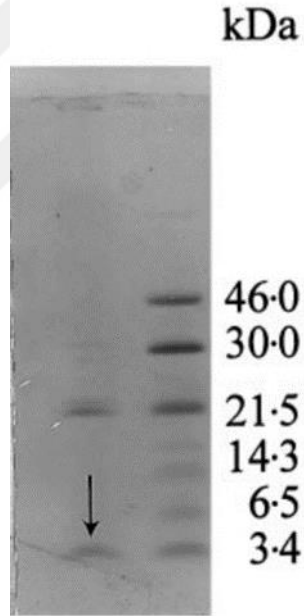


Şekil 11. DEAE Sefaroz kolonuna yüklenerek (iyon değişim kromatografisi ile) elüe edilen örneğin antibakteriyel testi.

Saflaştırılan AMP'yi görüntülemek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. SDS-PAGE sonucunda peptidin molekül ağırlığı 4,288 kDA olarak belirlendi (Şekil 12). Elde edilen sonuçlar literatür ile benzer şekildedir (Şekil 13) (Okkers et al., 1999).



Şekil 12. Saflaştırılan AMP'nin SDS-PAGE görüntüsü.

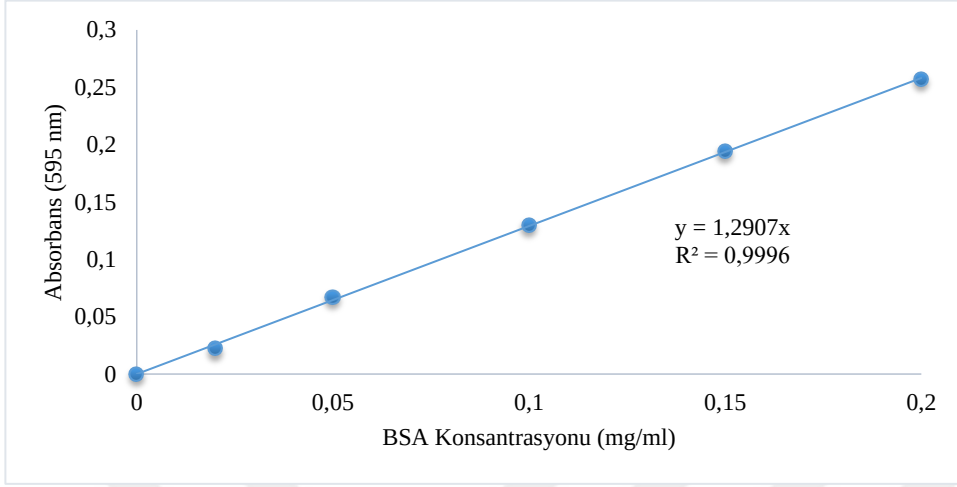


Şekil 13. Literatür SDS-PAGE görüntüsü.

4.3. Antimikrobiyal Peptid İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

Kalsiyum aljinat boncuklarına AMP immobilizasyonun optimizasyonu, reaksiyon sonucu ortamda kalan AMP'nin spektrofotometrik olarak tayin edilmesi yoluyla takip edildi (Bradford yöntemi).

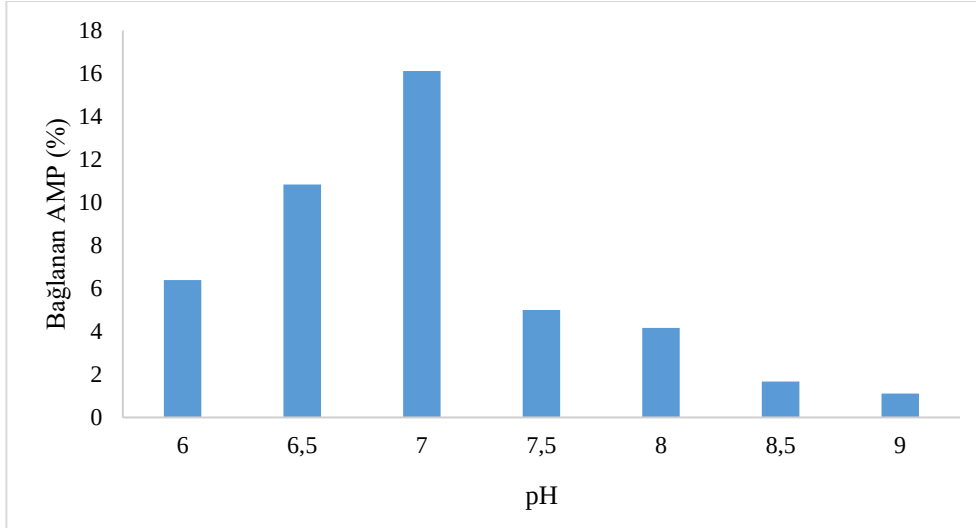
Yöntemde kullanılan standart grafik, 0,02-0,05-0,10-0,15-0,20 mg/ml BSA çözeltileri kullanılarak hazırlandı (Şekil 14).



Şekil 14. BSA standart grafiği

4.3.1. İmmobilizasyona pH etkisi

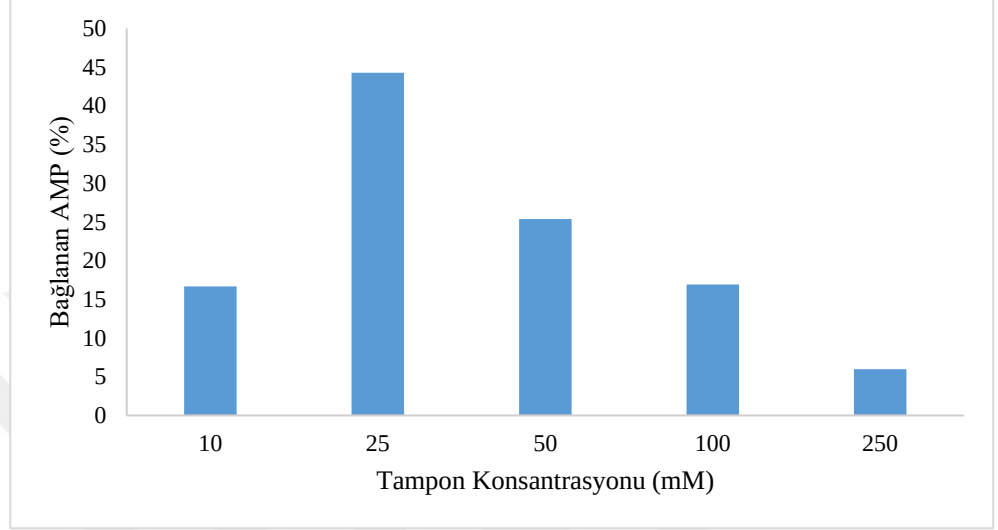
Kalsiyum aljinat boncuklarına AMP immobilizasyonuna pH etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda optimum değer pH 7,0 olarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. AMP immobilizasyonuna pH etkisi (Çalışma koşulları: tampon konsantrasyonu 100 mM (fosfat), boncuk sayısı 5, başlangıç AMP konsantrasyonu 0,32 mg/ml).

4.3.2. İmmobilizasyona tampon konsantrasyonu etkisi

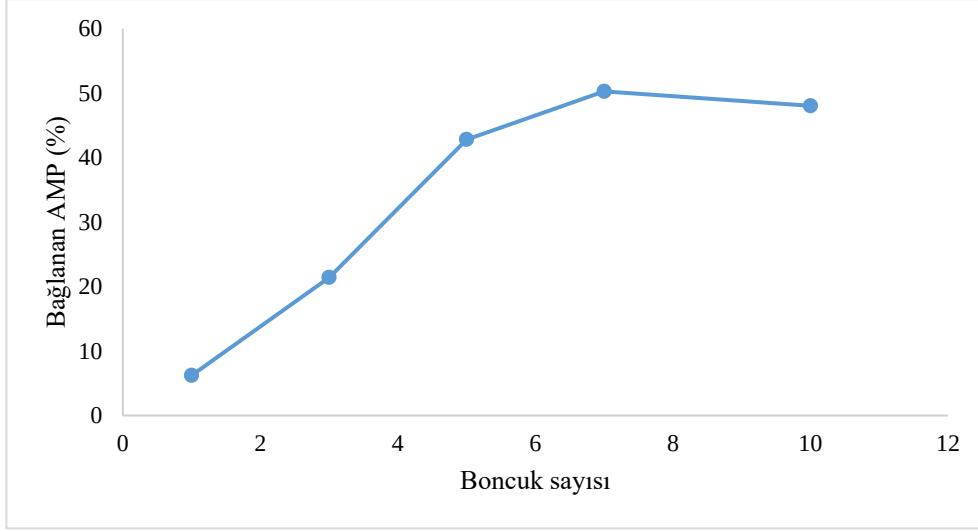
Kalsiyum aljinat boncuklarına AMP immobilizasyonuna tampon konsantrasyonu etkisini gözlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda optimum değer 25 mM olarak belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. AMP immobilizasyonuna tampon konsantrasyonu etkisi (Çalışma koşulları pH 7,0 fosfat tampon, boncuk sayısı 5, başlangıç AMP konsantrasyonu 0,32 mg/ml).

4.3.3. İmmobilizasyona boncuk sayısı etkisi

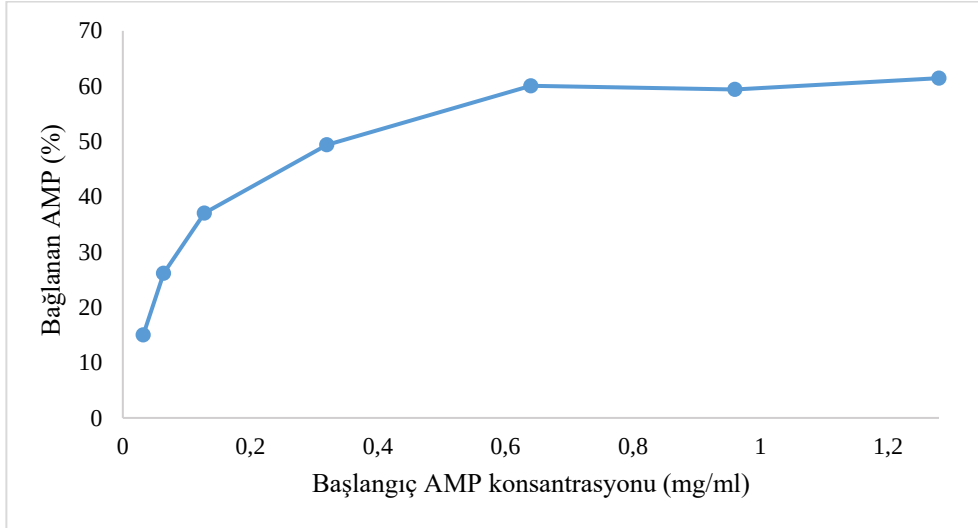
Kalsiyum aljinat boncuklarına AMP immobilizasyonuna boncuk sayısı etkisini gözlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda en yüksek bağlanma 17 adet boncuk kullanılan örnekte görüldü (Şekil 10).



Şekil 17. AMP immobilizasyonuna boncuk sayısı etkisi (Çalışma koşulları pH 7,0 25 mM fosfat tampon, başlangıç AMP konsantrasyonu 0,32 mg/ml).

4.3.4. İmmobilizasyona başlangıç AMP konsantrasyonu etkisi

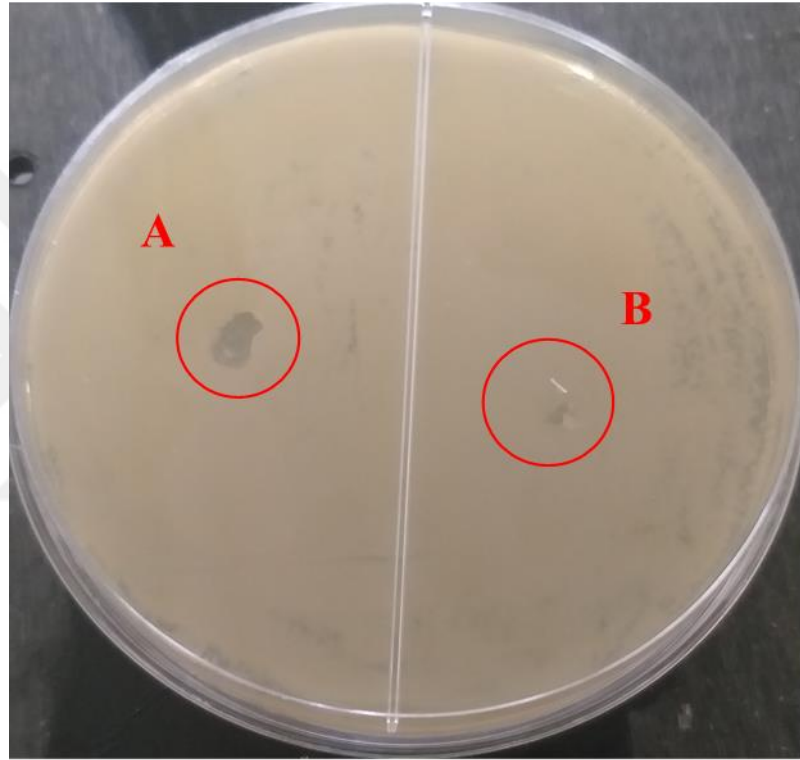
Kalsiyum aljinat boncuklarına AMP immobilizasyonuna başlangıç AMP konsantrasyonu etkisini gözlemlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda en yüksek bağlanma başlangıçta 0,64 mg/ml AMP eklenerek kurulan reaksiyon sonucunda elde edilen örnekte görüldü (Şekil 18).



Şekil 18. AMP immobilizasyonuna başlangıç AMP konsantrasyonu etkisi (Çalışma koşulları pH 7,0 25 mM fosfat tampon, boncuk sayısı 7).

4.4. Antibakteriyel Testler

Çalışmada bir sonraki aşamada işlem görmemiş ve AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarının antibakteriyel etkinliği *M. luteus* (ATCC 4698) bakterisine karşı test edildi. Yapılan testler sonucunda işlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğu uygulanan bölgede herhangi bir antibakteriyel etki görülmezken, AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun uygulandığı bölgede bakteri büyümesi gözlenmedi (Şekil 19).

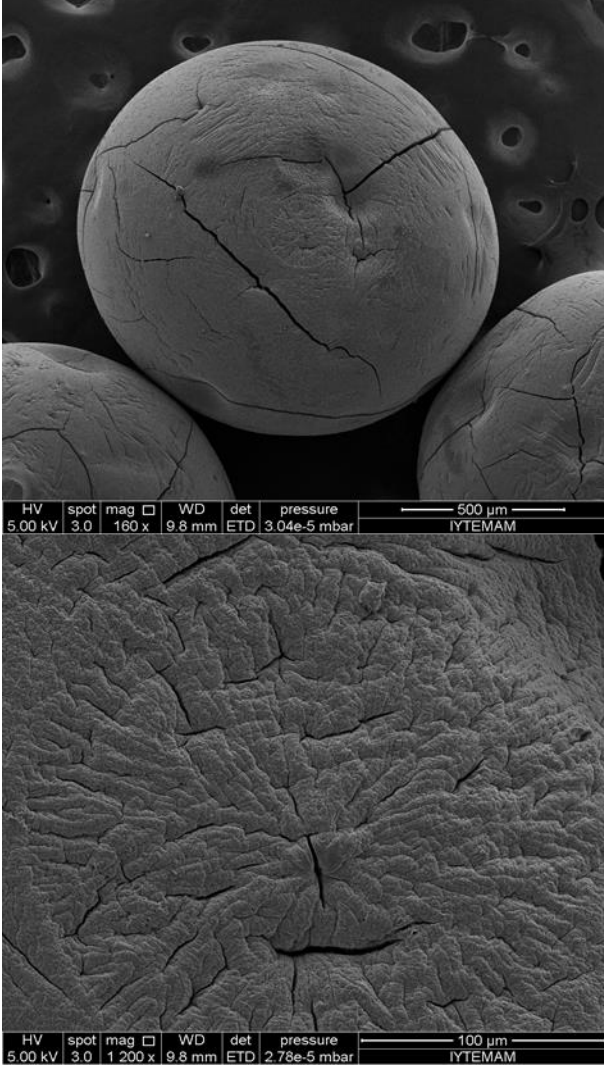


Şekil 19. A: AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun antibakteriyel testi. **B:** İşlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğunun antibakteriyel testi.

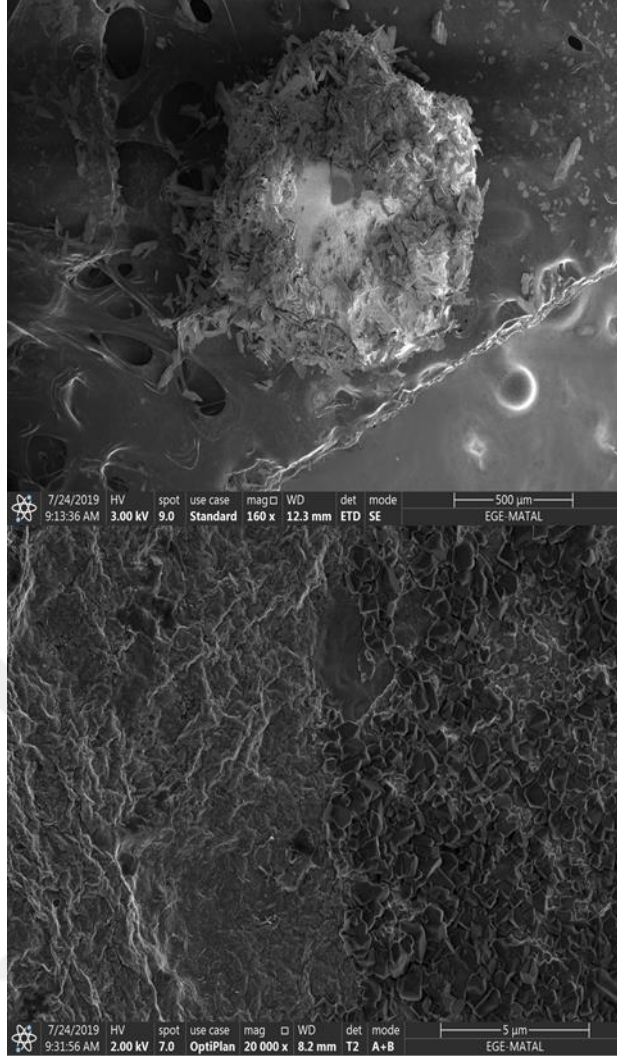
4.5. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme

Çalışmada bir sonraki aşamada kalsiyum aljinat (işlem görmemiş) ve AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuklarının SEM görüntüleri alınarak immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmiştir. İşlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü (Şekil 20), AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü (Şekil 21) ile karşılaştırıldığında, boncuğun üzerinde yeni oluşan ek yapılar görülmektedir. Bu yapılar boncuğun

yapısına kovalent immobilizasyonu yoluyla dahil edilen AMP'den kaynaklanmaktadır.



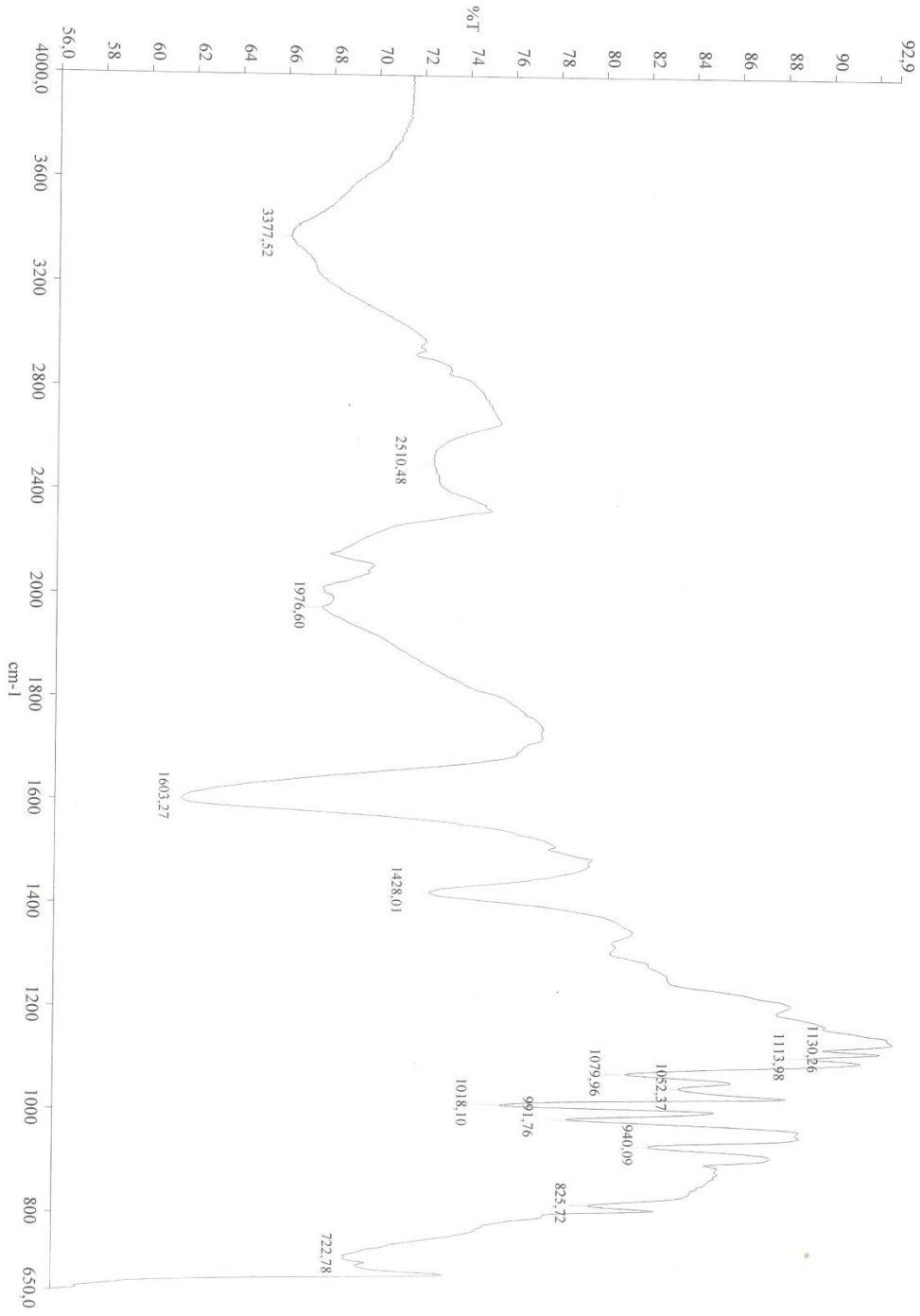
Şekil 20. Kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü.



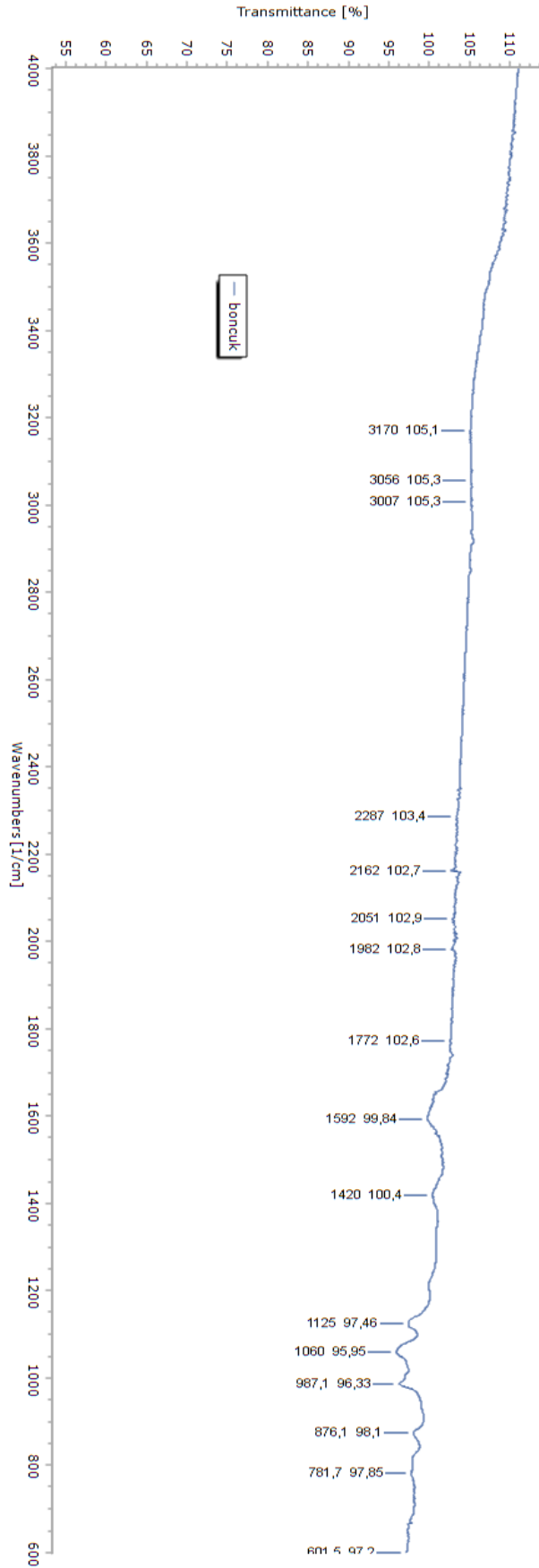
Şekil 21. AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun SEM görüntüsü.

4.6. ATR-FTIR Spektrumu

Çalışmada son olarak kalsiyum aljinat ve AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun ATR-FTIR spektrumu alınmıştır. Elde edilen sonuçlar immobilizasyonun gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. Kalsiyum aljinatın ATR-FTIR spektrumu (Şekil 22), AMP immobilize kalsiyum aljinatın AT-FTIR spektrumu (Şekil 23) ile karşılaştırıldığında 1603 cm^{-1} 'de bulunan ve aljinatın yapısında bulunan karboksilik asitlerden kaynaklanan pikin, AMP immobilizasyonunun bu gruplar üzerinden gerçekleşmesinden dolayı kaybolduğu görülmektedir. AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğunun ATR-FTIR spektrumunda görülen 781 cm^{-1} , 878 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} ve 1772 cm^{-1} 'de bulunan pikler, boncuklara bağlanan AMP'nin yapısında bulunan amino asitlerdeki primer, sekonder, alifatik ve aromatik amin gruplarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 22. Aljinatın ATR-FTIR spektrumu.



Şekil 23. AMP immobilize kalsiyum aljinatın ATR-FTIR spektrumu.

5. TARTIŞMA

Peptid üretimi için uygun bir besi yeri seçmek önemlidir. Çünkü peptid üretiminde besi ortamının bileşenlerinin (karbon ve azot kaynakları) türü ve konsantrasyonu önemli rol oynar. Farklı mikroorganizmalardan AMP üretmek amacıyla 2 farklı AMP üretim ortamı, MRS broth, M17 Broth ve TSB besi ortamlarından AMP üretimi gerçekleştirildi. Üretici suş olarak *L. pentosus* (DSM 16366), *B. subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *B. subtilis* (ATCC 6653) mikroorganizmaları kullanılarak gerçekleştirilen deneme sonucunda, MRS broth dışında kullanılan peptid üretim ortamından alınan örneklerin antibakteriyel aktivite göstermediği görüldü. Bu durumun nedeni üretici suşların bu ortamlarda peptid üretememiş olmasıdır. Deneme kapsamında kullanılan MRS broth ortamından alınan örneklerle yapılan antibakteriyel testler sonucunda antimikrobiyal aktivite görüldü. Bu nedenle AMP üretiminin optimizasyonu MRS kullanılarak gerçekleştirildi.

Evrimsel sürecin bir sonucu olarak, farklı türler farklı metabolik yollara sahiptir ve çok farklı mekanizmalarla çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilir. Karbonlu bileşiklerin geniş bir yelpazesi mevcuttur. Karbohidratlar, amino asitler, yağ asitleri ve fenolik bileşikler, karbonlu bileşiklerden bazılarıdır. AMP üretimine karbon kaynağı türü etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, tüm mikroorganizmalar için karbon kaynağı olarak MRS broth'a glukoz eklenerek gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi. Bu nedenle glukoz karbon kaynağı olarak seçildi. Denemede tüm karbon kaynakları MRS broth'a 5 g/L olacak şekilde eklendi. Herhangi bir karbon kaynağının eklenmediği MRS broth kontrol olarak kullanıldı.

Peptid üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşenleridir. Anaerobik mekanizmaya sahip mikroorganizmalar besi yerindeki karbonun yaklaşık % 10'unu, aerobik mekanizmaya sahip olanlar ise % 50-55'ini hücre yapısını oluşturmada kullanırlar. Karbon kaynakları mikroorganizmanın gelişmesi, çoğalması ve biyosentezi için gerekli olan, aynı zamanda mikroorganizmaya metabolik enerji sağlayan bileşiklerdir. Bu nedenle artan karbon kaynağı konsantrasyonu ile birlikte hücre büyümesi de artar. Daha fazla mikrobiyal üreme gerçekleşen besi ortamında, AMP üretiminde de artış olması beklenir. AMP üretimine karbon kaynağı konsantrasyonu etkisini belirlemek amacıyla kurulan

deneme sonucunda, *L. pentosus* (DSM 16366) için karbon kaynağı olarak MRS broth'a 10,0 g/L glukoz, *B. subtilis* (DSM 347) için karbon kaynağı olarak MRS broth'a 5,0 g/L glukoz, *B. cereus* için karbon kaynağı olarak MRS broth'a 7,5 g/L glukoz, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) için karbon kaynağı olarak MRS broth'a 2,5 g/L glukoz ve *B. subtilis* (ATCC 6653) için karbon kaynağı olarak MRS broth'a 2,5 g/L glukoz eklenerek gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi. Herhangi bir karbon kaynağının eklenmediği MRS broth kontrol olarak kullanıldı.

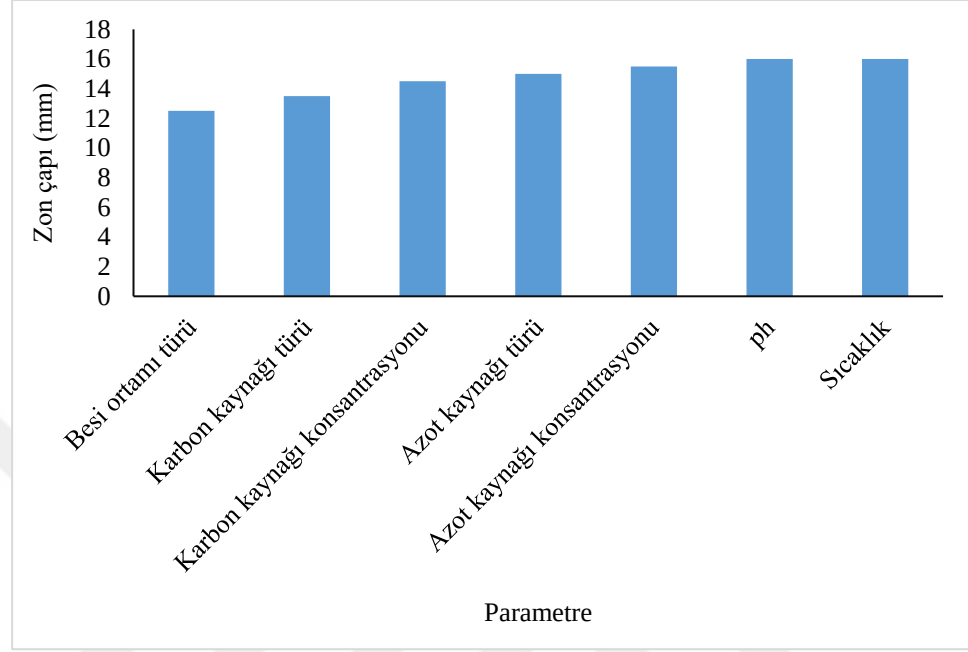
Azot, bakterilerdeki çeşitli moleküllerin yapısında yer almasının yanı sıra, aynı zamanda enzimler, üreme faktörleri, nükleik asitlerdeki pürin ve pirimidin bazlarında da bulunur. Bu nedenle çok önemli bir elementtir ve bakteriler bunu çeşitli kaynaklardan temin ederler (amonyum tuzları, organik asitler, amino asitler vb.). Bakterilerin azota olan ihtiyaçları genellikle değişiklik gösterir. Bu nedenle hem üretici suş tarafından kullanabilen hem de hedef biyomolekülün üretimini arttıran bir azot kaynağı belirlenmelidir. AMP üretimine azot kaynağı türü etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, *L. pentosus* (DSM 16366) için azot kaynağı olarak MRS broth'a tripton, *B. subtilis* (DSM 347) için azot kaynağı olarak MRS broth'a yeast ekstrakt, *B. cereus* için azot kaynağı olarak MRS broth'a tripton, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) için azot kaynağı olarak MRS broth'a tripton ve *B. subtilis* (ATCC 6653) için azot kaynağı olarak MRS broth'a yeast ekstrakt eklenerek gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi. Denemede tüm azot kaynakları MRS broth'a 6 g/L olacak şekilde eklendi. Herhangi bir azot kaynağının eklenmediği MRS broth kontrol olarak kullanıldı.

Azot, bakterilerdeki çeşitli moleküllerin yapısında yer alması nedeniyle esansiyel bir nutrienttir. Besi ortamında artan azot konsantrasyonu ile birlikte mikrobiyal üremede de artış görülür. Bu artışla beraber, AMP üretiminde de artış beklenir. AMP üretimine azot kaynağı konsantrasyonu etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, *L. pentosus* (DSM 16366) için azot kaynağı olarak MRS broth'a 6 g/L tripton, *B. subtilis* (DSM 347) için azot kaynağı olarak MRS broth'a 12 g/L yeast ekstrakt, *B. cereus* için azot kaynağı olarak MRS broth'a 6 g/L tripton, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) için azot kaynağı olarak MRS broth'a 6 g/L tripton ve *B. subtilis* (ATCC 6653) için azot kaynağı olarak MRS broth'a 18 g/L yeast ekstrakt eklenerek gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi. Herhangi bir azot kaynağının eklenmediği MRS broth kontrol olarak kullanıldı.

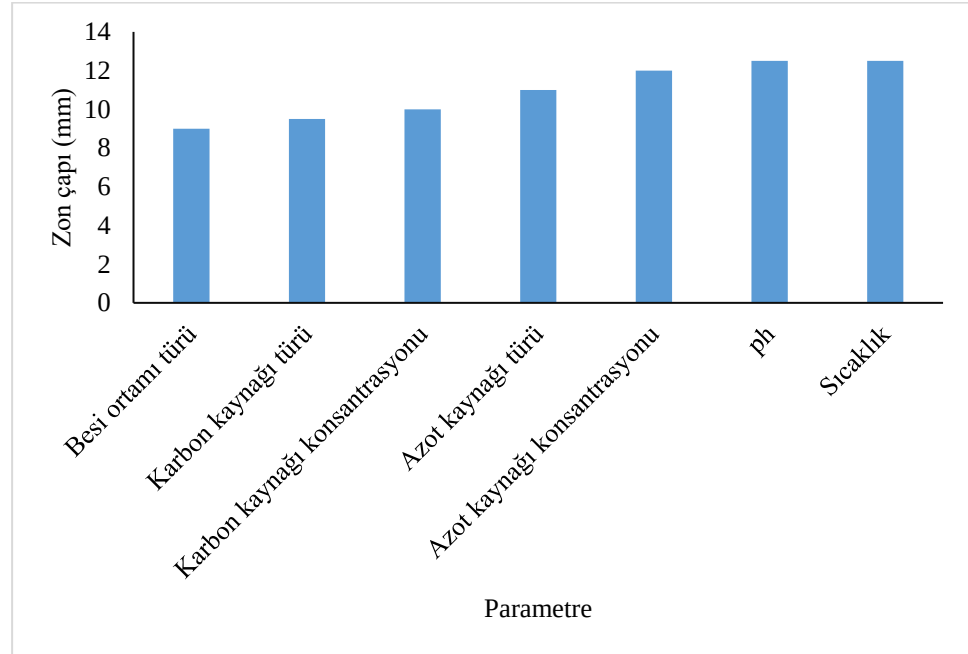
Mikroorganizmaların üremeleri için, besi ortamının pH'sının optimal sınırlar içerisinde bulunması gerekmektedir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yaklaştıkça üreme azalır ve durur. Bakterilerin optimal pH limitleri oldukça değişiktir. Ortamın pH'sının değişmesinde besi yerine katılan ve fermente olabilir karbohidratların ayrışması sonucu oluşan organik asitlerin, nitrojenli veya proteinli maddelerin dekompoze olması neticesinde meydana gelen amonyak veya alkali maddelerinin önemi fazladır. Ayrıca, hücrede oluşan ve dışarı çıkan diğer metabolizma artıkları da pH'nın değişmesini büyük ölçüde etkilerler. Mikroorganizmaya peptid ürettirilmesi amaçlanıyorsa besi ortamının pH'sının önemi daha da artar. Çünkü peptidlerin yapısında iyonlaşabilen gruplar veya fonksiyonel gruplar içeren aminoasitler bulunur. pH değişimi ile bu grupların iyonizasyon derecesi değişebilir. AMP üretimine pH etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, üretimde kullanılan besi ortamları farklı pH değerlerine ayarlandı. Üretim ortamlarından bir tanesinin pH'sı değiştirilmeden (MRS broth'un pH değeri 6,4) üretim gerçekleştirildi. En yüksek zon çapı *L. pentosus* (DSM 16366) için pH'sı 6,4'e ayarlanan, *B. subtilis* (DSM 347) için pH'sı 7,0'a ayarlanan, *B. cereus* için pH'sı 6,4'e ayarlanan, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) için pH'sı 6,4'e ayarlanan ve *B. subtilis* (ATCC 6653) için pH'sı 7,0'a ayarlanan üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen üretimde elde edildi.

Her organizmanın gelişebildiği minimum sıcaklık (gelişebildiği en düşük sıcaklık), optimum sıcaklık (en hızlı gelişebildiği sıcaklık) ve maksimum sıcaklık (gelişebildiği en yüksek sıcaklık) vardır. Optimum sıcaklık her zaman maksimuma daha yakındır. Bu üç sıcaklığa ana (cardinal) sıcaklıklar denir. Bu sıcaklıklar mikroorganizmanın türüne göre farklılık göstermektedir. Maksimum sıcaklığın üzerinde mikroorganizmanın yapısındaki proteinler ve metabolik faaliyetlerde görevli enzimler denatüre olmaktadır. Minimum sıcaklığın altında mikroorganizmaların neden yaşayamadığı kesin olarak belli olmamakla birlikte, sitoplazmik membranın donduğu ve bu nedenle besin transportunun gerçekleştirilemediği ve proton yükünün (gradienti) oluşturulamadığı düşünülmektedir. AMP üretimine sıcaklık etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda, tüm mikroorganizmalar için 28°C'de gerçekleştirilen üretimde daha yüksek zon çapı elde edildi.

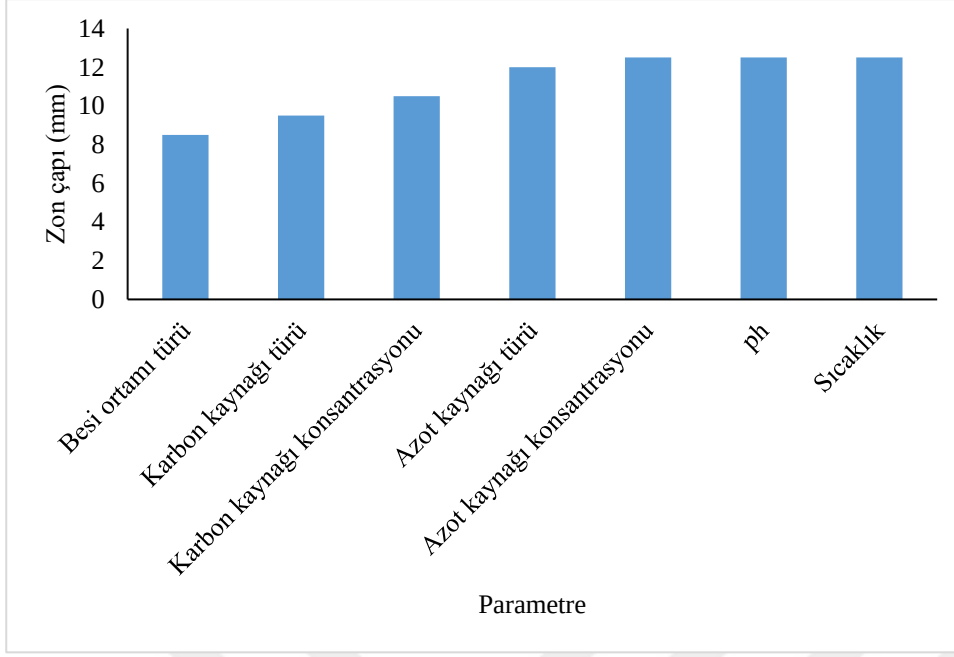
Tüm mikroorganizmalar için optimizasyon çalışması ile her bir parametre sonucu elde edilen optimum zon değerleri Şekil 20–Şekil 24’te verildi. Sonuçlardan da görüldüğü üzere farklı mikroorganizmalardan AMP üretiminin optimizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.



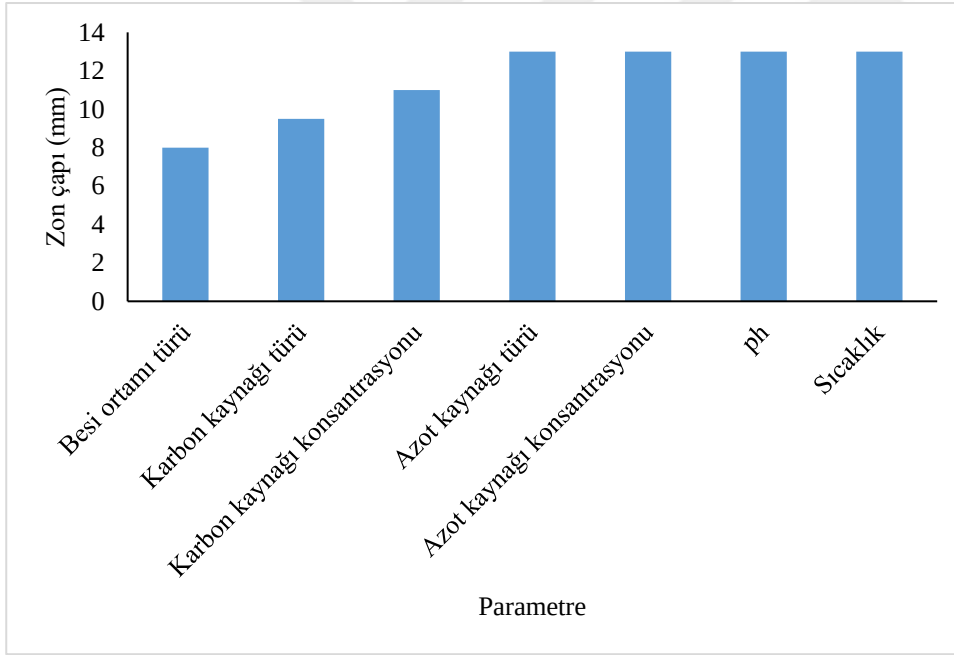
Şekil 24. *L. pentosus* (DSM 163669)’dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.



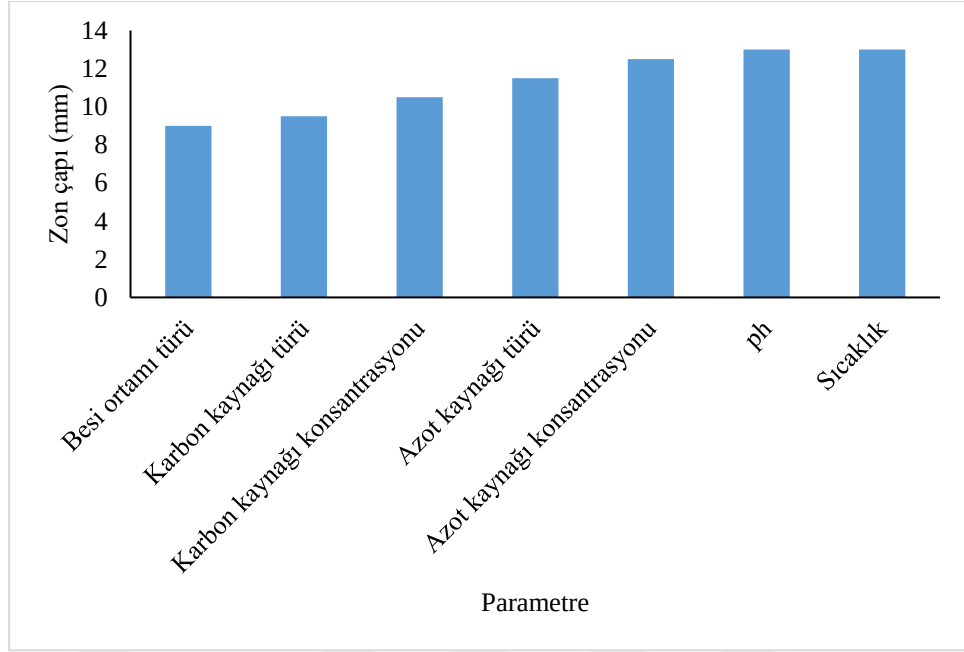
Şekil 25. *B. subtilis* (DSM 347) ’ten AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.



Şekil 26. *B. cereus* 'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.



Şekil 27. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.



Şekil 28. *B. subtilis* (ATCC 6653)'dan AMP üretiminin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler.

Projede bir sonraki aşamada en yüksek zon çapı elde edilen mikroorganizma olan *L. pentosus* (DSM 16366)'dan üretilen AMP'nin saflaştırılması aşamasına geçildi. Saflaştırmada her bir basamağın ardından elde edilen örnekler antibakteriyel test uygulandı ve elde edilen zon çapında artış görüldü. Saflaştırılan AMP'yi görüntülemek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Elektroforez sonucunda saflaştırılan AMP'nin molekül ağırlığı 4,288 kDA olarak belirlendi. Literatür incelendiğinde *L. pentosus* (DSM 16366)'dan üretilen AMP'nin pentocin olduğu ve bu peptidin molekül ağırlığının 3,4 kDA olarak bulunduğu görüldü.

Saflaştırılan AMP, kalsiyum aljinata kovalent olarak immobilize edildi. İmmobilizasyonda pH, tampon konsantrasyonu, boncuk sayısı ve AMP konsantrasyonu parametreleri incelendi.

Destek materyaline AMP immobilizasyonu kimyasal bir prosestir. Reaksiyon gerçekleşirken AMP'nin bakteriye etki eden reaktif gruplarının mümkün olduğunca bloke olmaması gerekir. Ayrıca immobilizasyon sırasında proton ve hidroksil iyonları reaksiyon ortamına salınabilir ve pH değişebilir. Bu durum AMP'nin yükünde de değişikliğe sebep olabilir. Bu nedenlerle immobilizasyon işleminde pH'nın sabit tutulması ve optimum bir değer belirlenmesi gerekir. İmmobilizasyona pH

etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneme sonucu optimum değer pH 7 olarak belirlendi.

Tampon, özellikle reaksiyon sonucu proton veya hidroksil iyonlarının reaksiyon çözeltisine verilmesi nedeniyle, çözeltinin pH'sının değişimini engellemektedir. Eğer tamponun tamponlama gücü düşük olursa reaksiyon pH'sı belirli bir süre sonra reaksiyon sonucu üretilen proton veya hidroksil iyonları nedeniyle değişir. Tamponlama kapasitesinin yüksek olması istendiği durumlarda da reaksiyon çözeltisinin iyon şiddeti artar. İyon şiddetinin artması genellikle antibakteriyel aktivitenin azalmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle optimum bir değer belirlenmelidir. İmmobilizasyona tampon konsantrasyonu etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneme sonucu optimum değer 25 mM olarak belirlendi.

AMP immobilizasyonu aljinat molekülündeki karboksilik asit grupları üzerinden gerçekleşmektedir. Bu nedenle aljinat boncuklarının sayısı arttıkça, karboksilik asit gruplarının da sayısı artacağından bağlanan AMP miktarının artması beklenmektedir. İmmobilizasyona boncuk sayısı etkisini belirlemek amacıyla kurulan deneme sonucunda 7 adet boncuk ve üzerindeki değerlerde, bağlı AMP yüzdesinin yaklaşık olarak aynı olduğu görüldü. Diğer bir deyişle belirli bir değerden sonra bağlı AMP yüzdesinde doygunluğa ulaşıldı. Bu nedenle optimum boncuk sayısı 7 olarak belirlendi.

İmmobilizasyona başlangıç AMP konsantrasyonu etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneme sonucunda 0,64 mg/ml optimum değer olarak belirlendi. 0,64 mg/ml ve üzerindeki değerlerde bağlı AMP yüzdesinin sabitlediği görüldü. Bu durumun nedeni aktiflenen tüm karboksilik asit gruplarına AMP immobilizasyonunun gerçekleşmiş olması, bu nedenle ortama daha fazla AMP eklense bile bağlanan miktarda artış meydana gelmemesidir.

İmmobilizasyonun ardından optimum koşullarda AMP immobilize edilen kalsiyum aljinat boncuğunun ve işlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğunun antibakteriyel etkisi *M. luteus* (ATCC 4698) bakterisine karşı test edildi. Antibakteriyel test sonucunda işlem görmemiş kalsiyum aljinat boncuğu uygulanan bölgede herhangi bir etki görülmezken, AMP immobilize kalsiyum aljinat boncuğu

uygulanan bölgede bakteri üremesinin olmadığı gözlemlendi. AMP kalsiyum aljinata kovalent olarak bağlandığı için antibakteriyel etki büyük bir zon çapı olarak değil, yalnızca boncuk uygulanan bölgede üreme olmaması olarak görüldü.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 5 farklı mikroorganizmadan AMP üretimi gerçekleştirilmiştir. AMP üretiminde kaynak olarak kullanılan mikroorganizmalardan *L. pentosus* (DSM 16366), *B. subtilis* (DSM 347), *B. cereus*, ve *B. subtilis* (ATCC 6653) Gram pozitif bakteriler olup, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ise Gram negatif bir bakteridir. AMP üretimi, daha çok Gram pozitif bakterilerden gerçekleştirildiği için, tez çalışmasında da özellikle Gram pozitif bakteriler üretici suş olarak seçilmiştir.

Seçilen mikroorganizmalardan AMP üretiminin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları öncesi *L. pentosus* (DSM 16366)'dan gerçekleştirilen üretim sonrası 12,5, *B. subtilis* (DSM 347)'ten gerçekleştirilen üretim sonrası 9,0, *B. cereus*'dan gerçekleştirilen üretim sonrası 8,5, *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'dan gerçekleştirilen üretim sonrası 8,0 ve *B. subtilis* (ATCC 6653)'ten gerçekleştirilen üretim sonrası 9,0 mm zon çapı elde edilirken, optimizasyon sonrası tüm mikroorganizmalar için sırasıyla 16,0, 12,5, 12,5, 13,0 ve 13,0 mm zon çapı değerlerine ulaşılmıştır. Görüldüğü üzere mikroorganizmalardan AMP üretiminin optimizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Filogenetik ağaçta yer alan tüm organizmalar, hayvanlar da dahil, mikroorganizmalara karşı savunma için maddeler üretirler Bu tez çalışmasında AMP üretimi için seçilen bakteriler dışında mikroorganizmalar kullanılarak da AMP üretimi gerçekleştirilebilir. Çalışma bu açıdan bakıldığında literatür açısından örnek niteliğindedir.

Kalsiyum aljinata AMP immobilizasyonun optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon öncesi ortamda bulunan AMP'nin % 16,11'i immobilize edilirken, optimizasyonun ardından bu değer % 60,05'e ulaşmıştır.

Çalışmada AMP immobilizasyonu için destek materyali olarak aljinat seçilmiştir. Proje sonucunda geliştirilecek ürünün özellikle açık yaralarda enfeksiyon riskini önlemek ve yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılması hedeflenmektedir. Aljinatın piyasada yara örtüsü olarak kullanımı mevcut

olduğundan dolayı böyle bir seçim yapılmıştır. Ancak, immobilizasyon için farklı destek materyalleride kullanılabilir. Kullanılacak destek materyali, geliştirilmesi hedeflenen ürüne göre belirlenebilir.

Çalışmada AMP immobilizasyonu aljinatın yapısında bulunan karboksilik asit grupları üzerinden kovalent olarak gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon öncesi karboksilik asit grupları EDC kullanılarak reaksiyona yatkın hale getirilmiştir. Immobilizasyon için farklı bir destek materyali seçilmesi durumunda, ona uygun bir prosedür kullanılarak AMP'nin kovalent olarak immobilize edilmesi sağlanabilir. Yapısında aljinata benzer şekilde reaktif grup bulunduran bir polimer seçilmesi durumunda, söz konusu reaktif grup için uygun bir aktifleyici ajan seçilebilir. Örneğin hidroksil gruplarının aktivasyonu için karbonildiimidazol kullanılabilir. Seçilen destek materyalinin yapısında reaktif grup olmaması durumundaysa, çeşitli yöntemlerle modifikasyonlar yapılarak materyalin yapısında reaktif grup/gruplar oluşturulabilir. Modifikasyon için seçilen yöntem fiziksel ve kimyasal yöntemlerden biri olabileceği gibi, çevre açısından da zararlı olmaması açısından biyolojik/biyokimyasal bir yöntem de seçilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abriouel, H., Franz, C.M.A. P., Ben Omar, N., Gálvez, A.,** 2011, Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins, *FEMS microbiology reviews*, 35(1), 201–32pp.
- Andrew, D., Rivas, L.,** 1998, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 47, 415-433.
- Bahar, A. A., Dacheng, R.,** 2013, Antimicrobial peptides, *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575pp.
- Barbosa Pelegrini, P., Del Sarto, R .P., Silva, O. N., Franco, O. L., Grosside-Sa, M. F.,** 2011, Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work, *Biochemistry*, 250-349pp.
- Benkerroum, N.,** 2008, Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk, *African Journal of Biotechnology*, 7(25).
- Bentley, R.,** 2009, Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence beta-lactams), *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(6), 775-786pp.
- Bessalle, R., Haas, H., Gorla, A., Shalit, I., Fridkin, M.,** 1992, Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension, *Antimicrob Agents Chemother*, 36(2), 313–317pp.
- Bevins, C. L., Salzman, N. H.,** 2011, Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis, *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356-368pp.
- Blondelle, S. E., Lohner, K., Aguilar, M.,** 1999, Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity, *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1462(1), 89-108pp.
- Boman, H. G.,** 1995, Peptide antibiotics and their role in innate immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 13(1), 61-92pp.
- Boman, H. G., Agerberth, B., Boman, A.,** 1993, Mechanisms of action on *E. coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61(7), 2978–2984pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G., de Kruijff, B.,** 1999, Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic, *Science*, 286(5448), 2361-2364pp.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., Huttner, K. M.,** 1997, Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1615-1617pp.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., Tack, B. F.,** 2003, Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 465-478pp.
- Brown, K.,** 2004, The history of penicillin from discovery to the drive to production, *Pharmaceutical Historian*, 34(3), 37p.
- Cabiaux, V., Agerberth, B., Johansson, J., Homble, F., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M.,** 1994, Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro-Arg-rich antibacterial peptide. *Eur J Biochem*, 224(3), 1019-1027.
- Carmona-Ribeiro, A. M., Carrasco, L. D. D.,** 2014, Novel Formulations for Antimicrobial Peptides, *Int J Mol Sci*, 15(10), 18040-18083pp.
- Cassone, M., Otvos Jr, L.,** 2010, Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small molecule antibiotics, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(6),: 703-716pp.
- Chen, H., Hoover, D.,** 2003, Bacteriocins and their food applications. reviews in food science and food safety, 2, 82–100pp.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L.,** 2001, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International journal of food microbiology*, 71(1), 1–20pp.
- Collins, L. V., Kristian, S. A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K. P., Van Strijp, J. A., Peschel, A.,** 2002, Weidenmaieretal. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice, *The Journal of Infectious Diseases*, 186(2), 214-219pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P.,** 2005, Bacteriocins : developing innate immunity for food, *Nature reviews. Microbiology*, 3, 777–788pp.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C.,** 2013, Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics, *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 95–105pp.
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzman, F., Fernandez-Lafuente, R., Torres, R.,** 2014, Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms, *Current medicinal chemistry*, 21(20), 2299-2321pp.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., Bienert, M.,** 2001, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS letters*, 501(2-3), 146-150pp.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., Bienert, M.,** 1996, Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry*, 35(38), 12612–12622pp.
- Dathe, M., Wieprecht, T.,** 1999, Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim Biophys Acta*, 1462(1), 71–87pp.
- Davies, J.,** 2006, Where have all the antibiotics gone?, *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 17(5), 287-290pp.
- Duran, N., Marcato, P. D., Duran, M., Yadav, A., Gade, A., Rai, M.,** 2011, Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(5), 1609-1624pp.
- Eisenberg, D.,** 1984, Three-dimensional structure of membrane and surface proteins, *Annu Rev Biochem*, 53(1), 595–623pp.
- Fernandez de Caley, R., GonzalezPascual, B., Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P.,** 1972, Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro, *Applied Microbiology*, 23(5), 998-1000pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Fleming, A.**, 1922, On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, Proceedings of the Royal Society of London B, 93(653), 306-317pp.
- Fleming, A.**, 2001, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of Haemophilus influenzae, Bulletin of the World Health Organization, 79(8), 780-790pp.
- Fuchs, P. C., Barry, A. L., Brown, S. D.**, 1998, In vitro antimicrobial activity of MSI-78, a magainin analog, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42(5), 1213-1216pp.
- Ganz, T.** 2003, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, Nature Reviews Immunology, 3(9), 710-720pp.
- Ganz, T.**, 2003, The role of antimicrobial peptides in innate immunity, Integrative and Comparative Biology, 43(2), 300-304pp.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S. L., Daher, K., Bainton, D. F., Lehrer, R. I.**, 1985, Defensins – natural peptide antibiotics of human neutrophils, Journal of Clinical Investigation, 76(4), 1427-1435pp.
- Gause, G .F., Brazhnikova, M. G.**, 1944, Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds, Nature, 154(3918), 703-703pp.
- Ge,Y., MacDonald, D. L., Holroyd, K. J., Thornsberry, C., Wexler, H., Zasloff, M.**, 1999, In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(4), 782-788pp.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F.**, 2007, Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics, Central European Journal of Biology, 2(1), 1-33pp.
- Gross, M., Cramton, S. E., Gotz, F., Peschel, A.**, 2001, Key role of teichoic acid net charge in S. aureus colonization of artificial surfaces, Infection and Immunity, 69(5), 3423-3426pp.
- Groves, M. L., Peterson, R. F., Kiddy, C. A.**, 1965, Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows, Nature, 207(5000), 1007-1008pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Guan'ı-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., Ter'an, L. M.,** 2010, Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease, *Clinical Immunology*, 135(1), 1-11pp.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D. I.,** 2011, Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations, *Plos Pathogens*, 7(7), e1002158.
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C. Fliss, I.,** 2013, Anti-infective properties of bacteriocins: an update, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(16), 2947–2967pp.
- Hancock R. E.,** 1997, Peptide antibiotics, *Lancet*, 349, 418–422pp.
- Hancock, R. E. W.,** 2000, Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications, *Expert opinion on investigational drugs*, 9(8), 1723-1729pp.
- Hancock, R. E. W., Scott, M. H. G.,** 2000, The role of antimicrobial peptides in animal defenses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8856-8861pp.
- Henzler, K., Wildman, A., Lee, D., Ramamoorthy, A.,** 2003, Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37, *Biochemistry*, 42(21), 6545-6558pp.
- Hirsch, J. G.,** 1956, Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes, *The Journal of Experimental Medicine*, 103(5), 589-611pp.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. B.,** 1999, Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science*, 284(5418), 1313-1317pp.
- Huang, H.W.,** 2000, Action of antimicrobial peptides: two-state model, *Biochemistry*, 39(29), 8347–8352pp.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H. G.,** 1980, Insect immunity–purification and properties of 3 inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunised pupae of *Hyalophora cecropia*, *European Journal of Biochemistry*, 106(1), 7-16pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Jago, W.**, 1926, Toxic action of wheat flour to brewer's yeast, in *Industrial Fermentations* (ed. W. Allen), The Chemical Catering Company, New York, 128-167pp.
- Joo, N. E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D., Kapila, Y. L.**, 2012, Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer medicine*, 1(3), 295–305pp.
- Karchmer, A. W.**, 2004, Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: PROTEKT US—an update, *Clin Infect Dis*, 39(3), 142– 150pp.
- Katz, M. L., Mueller, L. V., Polyakov, M., Weinstock, S. F.**, 2006, Where have all the antibiotic patents gone?, *Nature Biotechnology*, 24(12), 1529-1531pp.
- Kleinkauf, H., von Dohren, H.**, 1990, Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics, *Eur. J. Biochem*, 192(1), 1-15pp.
- Lai, Y., Gallo, R. L.**, 2009, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, *Trends in Immunology*, 30(3), 131-141pp.
- Lamb, H. M., Wiseman, L. R.**, 1998, Pexiganan acetate, *Drugs*, 56(6), 1047-1052pp.
- Lancaster, L. E., Wintermeyer, W. Rodnina, M. V.**, 2007, Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood cells, molecules & diseases*, 38(1), 15–8pp.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A.**, 1996, The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*, 86(6), 973-983pp.
- Levy, O.**, 2004, Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes, *Journal of Leukocyte Biology*, 76(5), 909-925pp.
- Lichtenstein, A. K., Ganz, T., Nguyen, T. M., Selsted, M. E., Lehrer, R. I.**, 1988, Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity, *Journal of immunology*, 140(8), p2686-2694.

KAYNAKLAR(devam)

- Lichtenstein, A., Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I.,** 1986, In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes, *Blood*, 68(6), 1407-1410pp.
- Mackin, W. M.,** 1998, Neuprex XOMA Corp, IDrugs: the investigational drugs journal, 1(6), 715-723pp.
- Mak, A. S., Jones, B. L.,** 1976, Amino acid sequence of wheat betapurothionin, *Canadian Journal of Biochemistry*, 54(10), 835-842pp.
- Maloy, W. L., Kari, U. P.,** 1995, Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides, *Biopolymers*, 37(2), 105-122pp.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., Hancock, R. E.,** 2006, Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook, *Current opinion in pharmacology*, 6(5), 468-472pp.
- Matsuzaki, K.,** 1998, Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochim Biophys Acta*, 1376(3), 391–400pp.
- Matsuzaki, K.,** 1999, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1462(1), 1-10pp.
- Matsuzaki, K.,** 2009, Control of cell selectivity of antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1687-1692pp.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., Taboureau, O.,** 2005, Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975p.
- Nakatsuji, T., Gallo, R. L.,** 2012, Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas, *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 887-895pp.
- Narayana, J. L., Chen, J. Y.,** 2015, Antimicrobial Peptides: Possible Anti-Infective agents, *Peptides*, 72, 88-94pp.
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K.,** 2012, Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications, *Biocontrol science*, 17(1), 1–16pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Nissen-Meyer, J., Nes, I. F.,** 1997, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action, Arch. Microbiol. 167(2), 67-77pp.
- Ohtani, S., Okada, T., Yoshizumi, H., Kagamiyama, H.,** 1977, Complete primary structures of 2 subunits of purothionin-A, a lethal protein for brewers yeast from wheat flour, Journal of Biochemistry, 82(3), 753-776pp.
- Overbye, K. M., Barrett, J. F.,** 2005, Antibiotics: where did we go wrong? Drug Discov Today 10, 45-52pp.
- Paterson, D. L.,** 2006, The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species, Clin Infect Dis, 43(2), 43–48pp.
- Pathak, N., Salas-Auvert, R., Ruche, G., Janna, M. H., McCarthy, D. Harrison, R. G.,** 1995, Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity and alpha helicity on the activities of antimicrobial peptides, Proteins, 22(2), 182–186pp.
- Pichereau, C., Allary, C.,** 2005, Therapeutic peptides under the spotlight, European Biopharmaceutical Review, 5,8 8-91pp.
- Reynolds, R., Potz, N., Colman, M., Williams, A., Livermore, D., MacGowan, A.,** 2004, Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001–2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. J Antimicrob Chemother 53, 1018– 1032pp.
- Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C., Schitteck, B.,** 2006, Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites, Journal of Investigative Dermatology, 126(2), 354-365pp.
- Sanderson, J. M.,** 2005, Peptide-lipid interactions: insights and perspectives, Organic & Biomolecular Chemistry, 3(2), 201–212pp.
- Schibli, D. J., Hwang, P. M., Vogel, H. J.,** 1991, Structure of the antimicrobial peptide tritrpticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. Biochemistry, 38(51), 16749–16755pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C.,** 2001, Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12), 1133-1137pp.
- Scott, M. G., Hancock, R. E. W.,** 2000, Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system, *Critical Reviews in Immunology*, 20(5), 407-431pp.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., Delange, R. J., Harwig, S. S. L., Lehrer, R. I.,** 1985, Primary structures of 6 antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils, *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4579-4584pp.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., Delange, R. J., Lehrer, R. I.,** 1983, Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 258(23), 14485-14489pp.
- Selsted, M. E., Szklarek, D., Lehrer, R. I.,** 1984, Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes, *Infection and Immunity*, 45(1), 150-154pp.
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., Cullor, J. S.,** 1993, Purification, primary structures, and antibacterial activities of betadefensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils, *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6641-6648pp.
- Shai, Y.,** 2002, Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 66(4), 236–248pp.
- Sitaram, N., Nagaraj, R.,** 1999, Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1462(1), 29-54pp.
- Snyder, A. B., Worobo, R. W.,** 2014, Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(1), 28–44pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H. G.,** 1981, Sequence and specificity of two anti-bacterial proteins involved in insect immunity, *Nature*, 292(5820), 246-248pp.
- Stephens, J. M., Marshall, J. H.,** 1962, Some properties of an immune factor isolated from the blood of actively immunised wax moth larvae, *Canadian Journal of Microbiology*, 8(5), 719-725pp.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J., Selsted, M. E.,** 1999, A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins, *Science*, 286(5439), 498-502pp.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., Idicula-Thomas, S.,** 2009, AMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides, *Nucleic Acids Research*, 38.suppl_1, 774-780pp.
- Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A.,** 2000, Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 55(1), 4-30pp.
- Trotti, A., Garden, A., Warde, P., Symonds, P., Langer, C., Redman, R., Pajak, T. F., Fleming, T. R., Henke, M., Bourhis, J., Rosenthal, D. I., Junor, E., Cmelak, A., Sheehan, F., Pulliam, J., Devitt-Risse, P., Fuchs, H., Chambers, O'Sullivan, M. B., Ang, K. K.,** 2004, A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 58(3), 674-681pp.
- Van Epps, H.L.** 2006, Rene Dubos: unearthing antibiotics, *The Journal of Experimental Medicine*, 203(2), 259-259pp.
- Vriezen, J. a C., Valliere, M., Riley, M.,** 2009, The evolution of reduced microbial killing. *Genome biology and evolution*, 1, 400-408p.
- Walsh, C., Wright, G.** 2005, Introduction: antibiotic resistance, *Chem Rev* 105, 391-394pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Wang, G., Li, X., Wang, Z.,** 2008, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, *Nucleic Acids Research*, 37.supplL_1, 933-937pp.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaijetal., C.,** 2001, Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772-1779pp.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., Bienert, M.,** Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides, *Biochemistry*, 36(42), 12869–12880pp.
- Wiesner, J., Vilcinskas, A.,** 2010, Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system, *Virulence*, 1(5), 440-464pp.
- Wimley, W. C., Hristova, K.,** 2011, Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions, *The Journal of membrane biology*, 239(1-2), 27–34pp.
- Yang, L. Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., Huang, H. W.,** 2001, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophysical Journal*, 81(3), 1475–1485pp.
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I., Huang, H. W.,** 2000, Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin, *Biophysical Journal*, 79(4), 2002-2009pp.
- Yang, S., Lin, C., Sung, C. T., Fang, J.,** 2014, Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5(May), 241p.
- Yeaman, M. R., Yount, N. Y.,** 2003, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27-55pp.
- Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo Pereyra, L. H.,** 2012, History of antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins, *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67-77pp.

KAYNAKLAR(devam)

- Zasloff, M. N.**, 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415(6870), 389-395pp.
- Zasloff, M.**, 1987, Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5449-5453pp.
- Zasloff, M.**, 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415(6870), 389-395pp.
- Zeya, H. I., Spitznagel, J. K.**, 1966, Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action, *Journal of Bacteriology*, 91(2), 755-762pp.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, çalışmama bilimsel katkılarda bulunan, bana bilimsel çalışma yöntemlerini öğreten ve sevdiren, deneyimlerini benimle hiç sıkılmadan paylaşan, yoğun çalışma temposuna rağmen tezimin tarama, deneysel ve yazım aşamalarında bana üst düzey yardımlarda bulunan ve bana akademi ortamını tanıma fırsatı sunan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Alper AKKAYA'ya bilimsel ve manevi yardımlarından dolayı sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda çok özel bir yeri olan, yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini asla esirgemeyen, yorulduğum ve yılmak üzere olduğum tüm anlarda beni motive ederek çalışmaya devam etmemi sağlayan ve bu tez çalışmasının tamamlanmasında en önemli paya sahip kişi olan eşim Ramazan ÖZŞEKER'e, bana dayanma gücü veren sevecen tavırları ve anlayışından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini asla esirgemeyen annem Güler PETEK ve ablam Kadriye NURSUNUR başta olmak üzere tüm aileme en içten dileklerimle teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca yanımda bulunan, bana yoldaşlık eden ve zor zamanlarımda beni motive eden Fulya BÖREKÇİ ve Sevinç AKSOY başta olmak üzere Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

Çalışmama maddi desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve Aliye Üster Vakfı'na teşekkürlerimi sunarım.

24/07/2019

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER

ÖZGEÇMİŞ

Emine ERDOĞAN ÖZŞEKER, İzmir Buca 85. Yıl Anadolu Lisesi'nden 2009'da, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden ise 2014'de mezun olmuştur. Lisans tezinde “Antibakteriyel Ürünlere Yeni Bir Yaklaşım: Tetrasiklin İmmobilize Aljinat” başlıklı çalışmayı 2014'te tamamlamıştır. SCI kapsamında dergilerde 4 tane bilimsel yayını ve 1 bilimsel kitap bölümü yazarlığı olan ÖZŞEKER, 20'den fazla ulusal ve uluslararası poster sunum yapmış olup, atıf sayısı 19'dur (Yayınların listesi ve kitap bölümü aşağıda verilmiştir). Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimi boyunca TÜBİTAK projelerinde görev almış, proje pazarlarına katılmıştır. Lisans öğrencisi iken katıldığı Ulusal Biyosidal Kongresi 2014'te poster ödülü kazanmış, yüksek lisans öğrencisi iken katıldığı Uluslararası UTİB Türkiye Tekstil Ve Konfeksiyon Sektöründe IX. Uluslararası Ar-ge Proje Pazarı Zirvesi'nde yüksek lisans kategorisi birinciliği elde etmiştir. 2018 yılında T.C. Milli Eğitim Bakanlığı'ndan Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları alanında yurt dışı eğitim bursu (YLSY 2018) kazanmıştır.

Bilimsel Makaleler

H. A. AKDOĞAN, **E. E. ÖZŞEKER**, A. AKKAYA, Degradation of Dyes by Laccase, ANALYTICAL LETTERS, 2016, 49(6), 790-798.

E. E. ÖZŞEKER, A. AKKAYA, Development of a New Antibacterial Biomaterial by Tetracycline Immobilization on Calcium-Alginate Beads, CARBOHYDRATE POLYMERS, 2016, 151, 441-451.

S. GULER, **E. E. ÖZŞEKER**, A. AKKAYA, Developing an Antibacterial Biomaterial, European Polymer Journal, 2016, 84, 326-337.

A., AKKAYA, **E. E. ÖZŞEKER**, Modification of Polyacrylonitrile Fabric for Antibacterial Application by Tetracycline Immobilization, Polymer Testing, 2019, 105959.

Kitap Bölümü

E. E. ÖZŞEKER, A. AKKAYA, *Antimicrobial Peptides and Their Nanotechnology Based Applications*, Nanomaterials: Fundamentals and Applications, Palme Publication and Distribution, ANKARA, 2018.