

**MİKROBİYAL BİYOPOLİMER ÜRETİMİ VE
ANTİMİKROBİYAL YÜZEY OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**PRODUCTION OF MICROBIAL BIOPOLYMER AND
RESEARCH ON USING AS ANTIMICROBIAL
SURFACE**

GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ

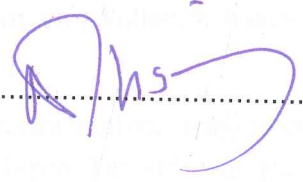
PROF. DR. NİLÜFER CİHANGİR
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

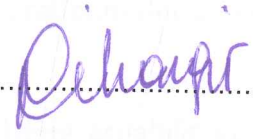
2017

GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ'nin hazırladığı "**Mikrobiyal Biyopolimer Üretimi ve Antimikrobiyal Yüzey Olarak Kullanımının Araştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

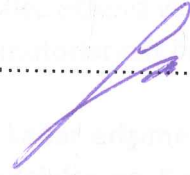
Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ
Başkan



Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR
Danışman



Prof. Dr. Sumru ÇITAK
Üye



Prof. Dr. Semra İDE
Üye



Prof. Dr. Aysun ERGENE
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 18.12.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

18 / 12 / 2017


GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ

Hava lezzetli ve aydınlık
— fakat iyice ısınmadı daha —
çağlanın kabuğu yemyeşil
tüylüdür henüz yumuşacık...
Bahtiyarız
yaşayabildiğimiz için

Hayatıma giren bütün renklere, aileme

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12/ 12 /2017



GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ

ÖZET

MİKROBİYAL BİYOPOLİMER ÜRETİMİ VE ANTİMİKROBİYAL YÜZEY OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Aralık, 2017, 100 sayfa

Levan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan doğal olarak elde edilen fruktoz homopolimeridir. Biyoyuumluluk, biyobozunabilirlik, yenilenebilirlik, esneklik ve çevre dostu olma gibi özelliklerinin yanı sıra anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-kanserojen, anti-AIDS ve hiperglisemik inhibitör gibi bazı önemli biyomedikal özelliklere de sahiptir. Yüksek üretim maliyetleri nedeniyle levan, polimer pazarında asla doğru yerini bulamamış ve bu nedenle yüksek verimle levan üreten mikrobiyal sistemler endüstriyel önem kazanmıştır.

Antimikrobiyal peptitler ve bunların öncü molekülleri insan ve memeli doğasında bağışıklığın merkezi bir bölümünü oluştururlar. hCAP18 / LL-37, antimikrobiyal peptidi, insanda bulunan tek katelidindir. Deride, invaziv bakteriyel enfeksiyonları önlemek için LL-37/mCRAMP gereklidir.

Antimikrobiyal özelliklerinin yanısıra, LL-37 doğuştan gelen bağışıklık sisteminde ve inflamasyonda merkezi bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, topraktan mikroorganizma izolasyonu ile levan üreten mikroorganizmalar belirlenmiştir. *Pseudomonas mandelii*, çalışmada levan üretimi için kullanılan mikroorganizmadır. *Pseudomonas mandelii* ile elde edilen biyopolimer ¹³CNMR, ¹HNMR, FTIR analizleri karakterize edilmiş ve bu polimerin levan olduğu doğrulanmıştır. Üretilen polimerin inkübasyon zamanı, azot, pH, sıcaklık, şeker miktarı, karbon kaynağı optimizasyonları gerçekleştirilerek en yüksek levan eldesi sağlanmıştır. Optimizasyonlar sonucu *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen en yüksek levan miktarı 42,6 g/L olarak bulunmuştur. Buna ek olarak levan dönüşüm verimi %37,8, efektif verim ise %27,7 olarak hesaplanmıştır. Levana ile farklı içeriklerde film örnekleri hazırlanmış ve plastikleştirici olarak gliserolün kullanılması uygun görülmüştür. Film örnekleri su buharı geçirgenliği ve termogravimetrik analiz (TGA) açısından değerlendirilmiştir. Film örneklerine değişik miktarlarda LL-37 antimikrobiyal peptidi ilave edilerek antimikrobiyal özellikleri farklı mikroorganizmalar üzerinde belirlenmiştir. Yara tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin antimikrobiyal etkisi ile film kompozisyonlarının antimikrobiyal etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. LL-37 içerikli biyopolimer filmlerin *E.coli*, *S.aureus*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir. Film örneklerinin özellikle *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkisi karşılaştırma yapılan tüm antibiyotiklerden daha yüksektir.

Elde edilen doğada bozunabilir özellikteki bu biyopolimer filmin tıbbi alanda yaraların iyileştirilmesinde, yara bantlarında, yara örtülerinde, gıda ambalajı olarak ve pek çok alanda antimikrobiyal yüzey olarak kullanılabilirliği yaptığımız çalışma ile desteklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Levana, biyopolimer, film, antimikrobiyal peptid, LL-37, antimikrobiyal, yara bandı

ABSTRACT

PRODUCTION OF MICROBIAL BIOPOLYMER AND REASERCH ON USING AS ANTIMICROBIAL SURFACE

Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

December, 2017, 100 pages

Levan is a homopolymer of fructose naturally obtained from both plants and microorganisms. Along with the general properties of a biopolymer like bio-compatibility, bio-degradability, renewability, flexi-bility, and eco-friendliness, levan also offers some important biomedical properties such as anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-AIDS and hyperglycaemic inhibitör. Due to its exceptionally high production costs, levan could never find its proper place in the polymer market, and therefore, high-level levan producing microbial systems gain escalating industrial importance.

Antimicrobial peptides and their precursor molecules form a central part of human and mammalian innate immunity. The hCAP18/LL37 is the only known human cathelicidin. In the skin, LL-37/mCRAMP is required to prevent invasive bacterial infections. Besides its an antimicrobial properties LL-37 plays a central role in innate immune responses and inflammation.

In this study, we isolated several soil microorganisms which were levan producers. *Pseudomonas mandelii* is the microorganism used for production of levan in this study. The biopolymer was analyzed with ^{13}C NMR, ^1H NMR, FTIR and the results confirmed that the polymer was levan. The highest amount of levan was achieved by optimizing the incubation time, pH, temperature, sugar amount, nitrogen, carbon source of the produced polymer. After the optimization, the highest amount of levan produced by *Pseudomonas mandelii* was found to be 42.6 g/L. The conversion yield and effective yield were calculated as 37.8% and 27.7% respectively. Various film samples with different ingredients and levan were prepared, and glycerol was chosen as the plasticizer. Film samples were evaluated for water vapor permeability and thermogravimetric analysis (TGA). Antimicrobial properties were determined on different microorganisms by adding LL-37 antimicrobial peptides in varying amounts to the film samples. The antimicrobial effect of antibiotics used in wound treatment and the antimicrobial effect of film compositions were evaluated comparatively. It was determined that LL-37 biopolymer films had an antimicrobial effect on *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The antimicrobial effect of the film specimens, especially on *Candida albicans*, was higher than all the antibiotics tested. This biodegradable polymer film is supported by the work we have done in the treatment of medical field wounds, as bandages, wound dressings, food packaging and as an antimicrobial surface for many fields.

Keywords: Levan, biopolymer, film, antimicrobial peptide, LL-37, antimicrobial, plaster, bandages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında engin bilgisi ve deneyimiyle yanımda olan büyük bir sabırla çalışmalarına yorum ve katkıda bulunan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e; Çalışmalarım sırasında farklı bakış açısıyla beni yönlendiren, destekleyen, bilgisiyle yorum ve katkıda bulunan Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e; Tez çalışmam boyunca verdiği değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Sumru ÇITAK'a; Tezimin değerlendirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye; Çalışmalarım boyunca tez örneklerimi değerlendiren, ileriye yönelik yönlendirmeleriyle ufkumu açan Prof. Dr. Semra İDE'ye; Verdiği enerjiyle hayatıma renk katan Dr. Sinem DİKEN GÜR'e; Hayatım boyunca hep arkamda duran, maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güç veren canım annelerim Nurcan KOŞARSOY ve Ferah AĞÇELİ'ye; Varlıklarıyla hayat bulduğum canım babalarım Erol KOŞARSOY ve Dr. Cavit AĞÇELİ'ye; Her an yanımda hissettiğim, ikinci yarım, canım ablam Op. Dr. Melike KOŞARSOY ÇAKIROĞLU'na; Sonsuz sevgisi, ilgisi, sabrıyla ve bana olan inancıyla yanımda olan badem gözlü hayat arkadaşım Gökhan Oğuz AĞÇELİ'ye; Yanında huzur bulduğum, güzel kalpli, mis kokulu anneannem SAİME CANAZ'a; Her zaman nazımı çeken, çalışmalarımda beni destekleyen, canım arkadaşım Hamideh Hammamchi Mazaheri'ye; Eski öğrencim, yeni çalışma arkadaşım Ece ŞENGÜR'e; Verdiği desteklerle ve güzel kalbiyle yanımda olan Dr. S. Pınar KODAL'a; Çalışkan öğrencilerim İrem DERELİ, Esra ERKOÇ, Eylül KARABİBER'e; Güler yüzleriyle hayatıma renk katan ve her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım Seray KENAR'a, Özgecan ERDEM'e, Aydın KOÇAK'a, Batuhan KÜRKCÜ'ye, Serhan KAYMAK'a, Ofcan OFLAZ'a, Dr. Büşra Betül ÖZMEN'e; Grafiklerimin düzenlenmesinde yardımcı olan Muhammed Hasan AKYIL'a; Biyoteknoloji Anabilim dalı hocaları ve öğrencilerine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyopolimerler.....	2
2.2. Levan.....	5
2.2.1. Levan Kullanım Alanları.....	7
2.3. Bentonit.....	13
2.3.1. Bentonitin Kullanım Alanları.....	19
2.4. Antimikrobiyal Peptidler.....	22
2.4.1. LL-37 Peptidi.....	28
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	32
3.1.Mikroorganizma İzolasyonu.....	32
3.2. Mikroorganizma Türlerinin Belirlenmesi.....	32
3.3. Biyopolimer Eldesi.....	32
3.4. Biyopolimer Karakterizasyonu.....	33
3.5. Biyopolimer Üretim Optimizasyonları.....	33

3.5.1. Levan Sentezi İçin Uygun İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi.....	33
3.5.2. Üreme Ortamındaki Azot Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi.....	33
3.5.3. Levan Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	34
3.5.4. Üretim Ortamı Sıcaklığının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi...	34
3.5.5. Levan Üretimi İçin Uygun Sukroz Miktarının Belirlenmesi.....	34
3.5.6. Üreme Ortamındaki Karbon Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi.....	34
3.5.6.1. Üreme Ortamındaki Mannitol Miktarının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	35
3.6. Levan Verimi.....	35
3.6.1. İndirgen Şeker Analizi.....	35
3.6.2. Toplam Şeker Analizi.....	35
3.6.3. Levan Üretiminde Verimlilik Hesapları.....	35
3.7. Film Örneklerinin Hazırlanması.....	36
3.8. Film Örneklerinin Karakterizasyonu.....	37
3.8.1. Su Buharı Geçirgenliği.....	37
3.8.2. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	38
3.9. Antimikrobiyal Etki.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Mikroorganizma Türünün Belirlenmesi.....	41
4.2. Biyopolimer Karakterizasyonu.....	41
4.3. Biyopolimer Üretim Optimizasyonu.....	45
4.3.1. Levan Sentezi İçin Uygun İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi.....	45

4.3.2. Üreme Ortamındaki Azot Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi.....	46
4.3.3. Levan Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	48
4.3.4. Üretim Ortamı Sıcaklığının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	50
4.3.5. Levan Üretimi İçin Uygun Sukroz Miktarının Belirlenmesi.....	52
4.3.6. Üreme Ortamındaki Karbon Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi.....	53
4.3.6.1. Üreme Ortamındaki Mannitol Miktarının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	55
4.4. Levan Verimi.....	56
4.4.1. İndirgen Şeker Analizi.....	56
4.4.2. Toplam Şeker Analizi.....	57
4.4.3. Levan Üretiminde Verimlilik Hesapları.....	57
4.5. Film Örneklerinin Hazırlanması.....	58
4.6. Film Örneklerinin Karakterizasyonu.....	59
4.6.1. Su Buharı Geçirgenliği.....	59
4.6.2. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	60
4.7. Antimikrobiyal Etki.....	63
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Polimer katkılı farklı kompozisyonlardaki film örnekleri içerikleri.....	37
Çizelge 4.1. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen levanın karbon kimyasal kaymalarının karşılaştırılması.....	42
Çizelge 4.2. Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal zon çapları (mm).....	64
Çizelge 4.3. Bakteriler için kullanılan farklı antibiyotiklerin antimikrobiyal zon çapları (mm).....	65
Çizelge 4.4. Funguslar için kullanılan farklı antifungal maddelerin zon çapları (mm).....	65

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Su buharı geçirgenliği testi için tasarlanan numune kapları.....	38
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas mandelii</i> 'den elde edilen levanın ¹³ C NMR analizi.....	42
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas mandelii</i> 'den elde edilen levanın ¹ H NMR analizi.....	43
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas mandelii</i> 'den elde edilen levanın FTIR analizi.....	44
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas mandelii</i> 'nin kültür ortamında zamana göre üreme ve levan üretme miktarı.....	45
Şekil 4.5. Çeşitli azot kaynaklarının levan sentezine etkisi.....	47
Şekil 4.6. Farklı pH değerlerinde levan verimi ve üreme miktarları.....	49
Şekil 4.7. Levan üretiminde sıcaklık optimizasyonu.....	50
Şekil 4.8. Levan üretiminde sukroz miktarının optimizasyonu.....	53
Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının levan verimi ve üreme miktarları üzerindeki etkisi.....	54
Şekil 4.10. Değişik mannitol miktarlarının levan verimi ve üreme üzerindeki etkisi.....	55
Şekil 4.11. İndirgen şeker analizi standart grafiği (Dalga boyu 540 nm).....	56
Şekil 4.12. Kalan şeker analizi standart grafiği (Dalga boyu 490 nm).....	57
Şekil 4.13. Gliserol ile hazırlanan film örneği.....	58
Şekil 4.14. Gliserol içerikli filmlerin su buharı geçirgenlikleri.....	59
Şekil 4.15. GLG6'nın TGA termogramı.....	61
Şekil 4.16. GLG7'nin TGA termogramı.....	61
Şekil 4.17. GLG8'in TGA termogramı.....	62
Şekil 4.18. GLG9'un TGA termogramı.....	62
Şekil 4.19. GLG12'nin TGA termogramı.....	63
Şekil 4.20. Levan içerikli film örneklerinin antimikrobiyal etkisi.....	66

Şekil 4.21. Film örneği ile antibiyotiklerin <i>E.coli</i> üzerindeki etkisi.....	70
Şekil 4.22. Film örneği ile antibiyotiklerin <i>S.aureus</i> üzerindeki etkisi.....	72
Şekil 4.23. Film örneği ile antifungallerin <i>C.albicans</i> üzerindeki etkisi.....	73
Şekil 4.24. Film örneği ile antifungallerin <i>A.niger</i> üzerindeki etkisi.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg	Miligram
L	Litre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
mcg	Mikrogram

Kısaltmalar

EPS	Eksopolisakkaritler
PHA	Polihidroksialkonoat
AMP	Antimikrobiyal peptit
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
XRD	X Işını Kırınımı
XRF	X Işını Floresans
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DNS	Dinitrosalisilik Asit
PEG	Polietilen Glikol
ASTM	American Society for Testing and Materials
LPS	Lipopolisakkarit
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute

1. GİRİŞ

Ekstrasellüler polisakkarit, eksosellüler polisakkarit, eksopolimerik bileşen, ekzopolimer gibi eş anlamlı isimler alan biyopolimerler, ASTM (American Society for Testing and Materials)'ye göre; hayvan, bitki, mikroorganizma gibi canlılar tarafından doğal faaliyetler sonucunda üretilen doğal polimer materyaller olarak tanımlanmaktadır [1].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyopolimerler çeşitli uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra çevre ile dost olmasıyla da ön plana çıkmaktadır [3].

Levan, fruktozun doğal bir homopolimeridir. Yapısı, ($\beta \rightarrow 1,6$) bağları ile birbirine bağlanmış fruktoz moleküllerinden oluşan bir zincir şeklindedir. Diğer birçok yüksek molekül ağırlıklı molekülün aksine levan, düşük bir iç viskoziteye sahiptir. Bu özelliği sayesinde kapsül yapımı ve kaplanması gibi birçok farmasötik uygulamada yer almaktadır. Günümüzde, sahip oldukları daha yüksek molekül ağırlıkları ve dallanma dereceleri pek çok farklı fonksiyonel özellik sağladığı için birçok uygulamada mikrobiyal levanlar bitkisel levanlara tercih edilmektedir [2].

Levan toksik değildir. Kokusuzdur. Isıya oldukça dayanıklıdır. Oda sıcaklığında sıvı kültür içerisinde 120 saat boyunca bozunmadan kaldığı gözlenmiştir [15].

Antimikrobiyal peptitler (AMP), genlerle kodlanan doğal antibiyotiklerdir. Pek çok organizma ilk savunma mekanizmalarının bir parçası olarak AMP'leri sentezler. Antimikrobiyal peptidler oldukça kısa (12-100 amino asit) ve pozitif yüklüdürler. Günümüze kadar yüzlerce bu tip peptitten

tanımlanmış olması AMP'lerin doğal savunma sisteminde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir [114, 115].

Antimikrobiyal peptitlerin birçoğu mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerini hücre membranı ile etkileşerek göstermektedirler. Bu şekilde mikroorganizmaların hücre yapısı bozulmakta ve hücre ölümü gerçekleştirilmektedir [117].

Bu çalışma ile, nontoksik bir biyopolimer olan levanın biyoteknolojik yöntemler kullanılarak mikroorganizmalardan üretilmesi, levan ile hazırlanan farklı içeriklere sahip biyopolimer filmlere farklı oranlarda antimikrobiyal peptidlerin immobilize edilmesi, elde edilen filmin karakterizasyonu ve çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin diğer antibiyotiklerle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Medikal ve endüstriyel alanda birçok kullanım alanının olmasının yanı sıra pahalı bir biyopolimer olan levanın mikroorganizmalardan ekonomik olarak elde edilmesi ve elde edilen bu biyopolimerin antimikrobiyal yüzey olarak kullanımının sağlanması için yapılan bu çalışma, ileri çalışmalar için yol gösterici olacaktır. Antimikrobiyal peptid ilavesiyle elde edilen bu filmin yara ve yanık tedavilerinde ve çeşitli medikal alanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyopolimerler

Daha önce söz edildiği gibi, biyopolimerler, canlı organizmalar tarafından doğal olarak üretilen organik polimerler şeklinde tanımlanmaktadır [1].

Endüstriyel alanda genelde alglerden ve bitkilerden elde edilen polimerler kullanılmaktadır. Aljinat, selüloz, nişasta, mannan ticari olarak kullanılan polimerlere örnektir [2]. Ancak bütün bitki ve alg türlerinden polimer ya da polimerlerin kimyasal türevlerinin eldesi her zaman ucuz olmamaktadır. Polisakkaritler algler, yüksek bitkilerin ekstraktları veya bakteriyel ya da fungal kültürlerin fermentasyon sıvılarından elde edilebilir. Endüstride biyoaktif polisakkaritlerin sürdürülebilir ve ekonomik üretimi, tam kontrollü fermantasyon koşulları altında bitkiler ve alglere göre mikroorganizmalarda daha hızlı ve yüksektir. Bitkisel üretimi mevsimsel ve coğrafi koşullara bağlı olarak 3-6 haftada gerçekleşirken mikrobiyal üretim günler ve haftalar içinde gerçekleşebilmektedir. Ayrıca mikroalglerin üretimi için hem güneşe hem de çeşitli karbon kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan bakıldığında mikroorganizmalar biyoaktif polisakkarit üretiminde tercih sebebidir [3-5].

Alternatif olarak birçok mikroorganizma eksopolisakkaritler (EPS), intraselüler polisakkaritler ve polihidroksialkonoatlar (PHAs) olmak üzere değişik özellikte biyopolimer üretmektedir. Bu polimerler suda çözünen doğal ya da sentetik polimerlere alternatif olarak kullanılabilir.

Mikrobiyal biyopolimerlerin temel gruplarından biri olan bakteriyel eksopolisakkaritler (EPS) benzersiz olmaları ve ticari materyal özellikleriyle büyük çeşitlilik ve fonksiyonlara sahiptir. Mikrobiyal polisakkaritler çoğunluğu glukoz, mannoz, ramnoz, üronik asit gibi

karbonhidrat kısımlarından ve asetat, pürivat, süksinat ve fosfat içeren karbonhidrat olmayan kısımlardan oluşur. Mikrobiyal polisakkaritlerin endüstriyel üretimde iklim koşullarına bağlı olmaması ve kirlilik yaratmaması avantajları arasındayken bu polimerlerin üretimi için yüksek teknolojik cihazlar, özel substratlar ve iyi eğitilmiş personele ihtiyaç vardır. Bu nedenle eksopolisakkaritlere endüstriyel ve medikal alanda ilgi her geçen gün artmaktadır [4], [5].

Mikroorganizmalar adhezyon, enfeksiyon, immun cevap gibi biyolojik fonksiyonlarda önemli rol alan birçok polisakkariti sentezleyebilir ve böylece kültür ortamı içindeki farklı karbon kaynaklarını diğerlerine göre daha avantajlı olan çeşitli özelliklere sahip polimer materyallere dönüştürülebilir [4], [6], [7]. Mikrobiyal EPS'ler arasında jellan ve kurdan jel olarak; pullulan, dekstran, ksantan viskozite ajanı olarak kullanılabilir. Bunun dışında pullulan, kefiran, selüloz ve levan film yapımında kullanılarak ambalaj uygulamalarında yerlerini almaktadır [8]-[10].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çok sayıda bakteriyel polisakkarit keşfedilmiş olup yeni yapılan çalışmalar bu polisakkaritlerin moleküler yapısı, fonksiyonel özellikleri, biyosentezi, endüstriyel gelişimi, özellikle de biyomateryal olarak kullanımı üzerinde olmaktadır. Bu polisakkaritler çevre dostu kategorisine dahil olup "biyoteknolojinin uyuyan devi" olarak adlandırılırlar [11], [12].

Polisakkaritler yapısı ve bileşimi açısından çok çeşitlilik göstermektedir. Monomer kompozisyonlarına göre homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılmaktadırlar [13]. Homopolisakkaritler tek tip monosakkaritin tekrarlanmasıyla oluşan polisakkaritlerdir. Pullulan, levan, dekstran, kurdan ve bakteriyel sellüloz

homopolisakkaritlere örnektir. Heteropolisakkaritler ise iki ya da daha fazla polisakkaritin bir araya gelmesiyle oluşur. Gellan ve xanthan bu gruba girmektedir [14], [15].

2.2. Levan

Levanın hikâyesi bir Japon geleneksel yemeği olan "natto" ile başlar. Japonlar nattonun uzun ömür ve sağlık getirdiğini düşünmektedirler. Bu geleneksel yemeğin içeriğinde bulunan levan, sağlık için yararlı doğal ürünler arayan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Lippmann, şeker pancarı endüstrisinde pekmezden toplanan zamkı tanımlamak için çoğunlukla "lävulan" terimini kullandığı için levani tanımlayan ilk kişi olarak görülmektedir. Fakat 1901'de kutuplaşmış ışığın ve dekstran benzeri özelliklerin levorotasyonu için "levan" terimini ilk defa öneren Avustralyalı bakteriyolog Greig-Smith olmuştur [16], [17].

Levan, bazı mikroorganizmaların ve bazı bitki türlerinin ürettiği, olağandışı bir yapıya sahip olmayan bir polisakkarittir. Esas olarak mikrobiyal eksopolisakkarit olarak bulunan levan, ağırlıklı olarak β -2,6 glikozidik bağlarla ve β -2,1 bağlı yan zincirlerle bağlantılı olan bir fruktoz biyopolimeridir [18]. Molekül ağırlığı çoklu dallanmalarla birkaç milyon dalton kadar olabilen mikrobiyal levanlar, bakteriler, mayalar ve küfler gibi çok çeşitli mikroorganizmadan levansukraz (E.C. 2.4.1.10) enzimi aracılığıyla üretilirler [19]. Hemen hemen yalnızca karbonları ile bağlanmış fruktoz moleküllerinden oluşan bu fruktan molekülü nano boyutlu küresel formlarda, yüksek derecede düşük viskoziteye sahip olan ve doğrusal yapıda olan benzerlerine kıyasla daha kararlı bir yapıya sahiptir [20].

Mikroorganizma kültürlerinden ya da izole edilen enzimden elde edilen levan üretimi için melas, şurup ya da sukroz kullanılmaktadır. Üretim

şartlarından kaynaklanan çeşitlilikler levanın moleküler ağırlığını, dallanma derecesini, çapını, iç viskozitesini, stabilitesini, immünojenik aktivitesini ve yapışma kuvvetini etkilemektedir [21].

Yüz yıldan fazla bir süredir levan polisakkariti için sayısız kullanımlar tespit edilmiş, ancak sadece birkaçı ticari olarak gerçekleştirilmiştir çünkü levan yaygın olarak bulunmamaktadır. Laboratuvardaki levan üretimi basitken çeşitli sıkıntılar geniş çaplı üretimi kısıtlamaktadır. Yüksek miktarda alkol kullanımı, diyalizin geniş ölçekte pratik olmaması ve tonlarca üretme işlemi için ultrafiltrasyon ekipmanının bulunmaması, saflaştırmanın karmaşık hale gelmesine neden olmaktadır. Yapışkan ürünün kurutulması ise başka bir sorundur. Laboratuvarda yaygın olarak kullanılan liyofilizasyon ve vakum kurutması kolaylıkla ölçeklendirilememektedir. Püskürterek kurutma endüstride sıkça kullanılır ancak levanın yapışkan yapısı buna uygun değildir [22], [23].

Levan, çoğunlukla diğer eksopolisakkaritler ile birlikte, farklı habitatlarda bazı biyofilmlerin bir yapısal bileşeni olarak bulunmuştur. *Bacillus subtilis* gibi, toprakta yaşayan türlerde bulunan biyofilmlerdeki levan su seviyesi değiştikçe mikroorganizmaları kurumaktan korur, yapışma hücrelerine elverişli bir ortamda sağlar ve koloniyi diğer organizmalara karşı korur [24]. Biyofilm bileşeni olan levan, bitki patojenleri *Erwinia amylovora* ve *Pseudomonas syringae*'nin virülansına da katkıda bulunur [25], [26].

Endofit *Gluconacetobacter diazotrophicus*'ta, biyofilm içerisindeki levan, oksijen difüzyon bariyeri olarak görev yaparak azot fiksasyonu için gerekli mikroaerobik koşulları sağlar [27], [28]. Biyofilmlerde levan, ikincil ancak daha az önemli bir rol olarak besin yokluğunda bakteriler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilen bir hücre dışı besin rezervuarı oluşturmaktadır [29].

Veritabanlarında basit bir araştırma, farklı yaşam alanlarına sahip bakterilerdeki levansukraz genlerini ortaya çıkarmaktadır. Türlerin çoğu genellikle bir kromozomal operonun ilk bileşenini oluşturan, bir levansukraz genine sahiptir. Diğerlerinden farklı olarak sadece, bitki patojeni *Pseudomonas syringae*, üç levansukraz geni içerir. Bunlardan ikisi kromozomda, diğeri de bir plazmitte bulunur, ancak ikisi işlevsel olarak ifade edilmektedir [30].

Levan, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* ve *Zymomonas* cinsleri de dâhil olmak üzere çeşitli bakteriler tarafından sukroz esaslı substratlardan ekstraselüler olarak üretilir. Diğer mikrobiyal ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) gibi, levan üretimi, sıcaklık, pH, oksijen konsantrasyonu, biyoreaktör konfigürasyonu ve kültür ortamı gibi fermantasyon koşullarından önemli ölçüde etkilenir. Genel olarak, polimer üretimi mikroorganizma üremesi ile ilişkilidir. Sukrozun enzimatik bölünmesi üzerine, fruktoz kısmı, artmakta olan levan zincirine eklenir. Serbest bırakılan glukozun bir kısmı üreme için metabolize edilir, geri kalanı ise fermantasyon ortamında biriktirilir [29].

Şuruplar ve melas, sukroz için düşük maliyetli kaynaklardır ve mikrobiyal polisakkaritlerin fermantatif üretimi için substratlar olarak yaygın şekilde kullanılırlar [7].

2.2.1. Levan Kullanım Alanları

Levan, güvenli ve doğal olarak üretilmesinden dolayı ilgi odağı olmakla beraber levanın kişisel bakım ve kozmetik alanında çeşitli kullanımları mevcuttur.

Levan, tüm güvenlik kriterlerini karşılamaktadır. HRIPT (The Human Repeated Insult Patch Test) ve CAMVA (Chorioallantoic Membrane Vascular Assay)'nın yaptığı Agar Difüzyon Testi'ne göre ciltte ya da gözde herhangi bir tahrişe sebebiyet vermemekte, alerjiye yol açmamakta ve sitotoksik etki göstermemektedir [31].

Levan, hialuronik aside benzer bir nemlendirici özelliğe sahiptir. Ciltteki yağ yıkımını tetikler ve hiper pigmentli alanların aydınlatılmasında rol alır [32].

Levan, saç sabitleyici ürünlerde de kullanılmaktadır. Düşük viskozitesi su ve su/etanol çözeltilerinde sprey olarak kullanımını sağlamaktadır [33].

Karboksillenmiş levanın hasar görmüş saçlarda kullanımı ile saçlardaki gerilme kuvvetine dayanıklılığının arttığı görülmüştür [34].

Hiperpigmentasyon, derideki koyu kahverengi melanin pigmentinin artışı ile oluşur. 2006 yılında yapılan bir patent başvurusu, levanın tirozinaz enziminin aktivitesini azaltmasına bağlı olarak melanin üretiminin azaltılması ile "güzel beyazlatıcı etki" ile sonuçlandırılmıştır [35].

Levanın tıbbi açıdan da çeşitli kullanım alanları vardır. Tıbbi uygulamalarda heyecan verici araştırmalara bakıldığında hasarlı dokuların iyileştirilmesinde levan ve levan tabanlı ince filmler yer almaktadır. Sturzoiu ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı bir çalışmaya göre levanın diğer polimerlere göre hasarlı dokuları iyileştirmesinde daha etkili olması metalloproteinaz aktivasyonunda yer almasından kaynaklanmaktadır. Bu sayede yanmış ya da fiziksel olarak zarar görmüş dokuları daha etkili bir şekilde iyileştirebilmektedir [36].

Levanın lazer bazlı teknolojiler için de uygun olduğu bulunmuştur. Sima ve arkadaşları matriks destekli darbeli lazer buharlaştırıcı (MAPLE) ile ilaç taşınımı, mikrosensörler ve doku yenilenmesi üzerine film geliştirmişlerdir. Bu film levan ve okside levan kullanarak hazırlanmıştır. Hücresel çoğalma lavana göre okside olmuş levanda daha fazla miktarda olmaktadır [37].

Bacillus subtilis'ten üretilen levan ve sülfatlanmış levan, 1,1-difenil-2-piysiril-hidrazil (DPPH) radikallerine karşı test edildiğinde hem levanın hem de sülfatlanmış levanın özellikle serbest radikal temizleyici olduğu bulunmuştur [38].

Sedgwick ve arkadaşları levanın lökosit adhezyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir [39].

Ah ve arkadaşları deney hayvanı olarak kullandıkları sıçanların diyetlerine levan ekleyerek obeziteyi ve hiperlipidemiayı önlemeyi başarmışlardır. Yüksek yağlı diyetle dahi günlük kilo artışı kontrol sıçanlar için $2,58 \pm 0,29$ g/gün olmaktadırken %10 levan takviyeli bir diyetle bu sayı $1,61 \pm 0,21$ g/gün olmaktadır. Serum trigliseridi, serbest yağ asitleri ve kolesterol de yapılan levan takviyeli diyet sayesinde düşürülmüştür [40].

Bazı polisakkaritlerin kilo kontrolünde yer aldığı bilinmektedir. Oh ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada levan, fermente ginseng ve her ikisinin kombinasyonunu incelemişlerdir. Levan, (100mg/kg/gün), kurutulmuş fermente ginseng (150 mg/kg/gün) ve ikisinin kombinasyonu 11 hafta boyunca farelerin yüksek yağ oranındaki diyetlerine ilave edilmiştir. Levan ve fermente ginseng ile beslenen grup $11,7 \pm 0,8$ gr olarak tartılmış ve $16,1 \pm 1,1$ gr ağırlığında olan kontrol grubuna göre daha hafif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ginseng ve levan ile gerçekleştirilen bu

diyetin kontrollere kıyasla açlık kan şekerini, insülin direnç indeksini, leptini ve beyaz adipoz doku ağırlığını azalttığı sonucuna varılmıştır [41].

Yapılan çalışmalar yüksek molekül ağırlıklı levanın kolesterol seviyesindeki yararlarını göstermektedir. 1 hafta boyunca sıçanlarda uygulanan kolesterol içermeyen diyetle %1 ile %5 oranında levan ilave edilmiştir. Hayvanlardaki kolesterolün iki doz azaldığı yapılan çalışma sonucu belirlenmiştir. Deneyde kullanılan sıçanların dışkılarındaki salgılarda sterol ve lipidler kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bir teori olarak, levanın sterol emilimini önlediği düşünülmektedir [42]. Belghith ve arkadaşları, levanı, yüksek kolesterollü diyetle denemişlerdir. 2 hafta boyunca hayvanların suyuna %5 oranında levan ilave edilmiştir. Levan ile tedavi edilen sıçanlarda yararlı bir etki gözlemlenerek HDL kolesterol seviyelerinde artış, LDL kolesterol seviyelerinde ise düşüş olduğu belirlenmiştir [43].

Probiyotikler, kolondaki yararlı bakterilerin çoğalmasını teşvik ederken zararlı mikroorganizmaları da inhibe ederler. Çeşitli çalışmalarla elde edilen farklı bakış açıları levan ya da levan tipi fruktooligasakkaritlerin probiyotik bakteriler ve kompleks bağırsak mikrobiyotasında rol aldığını göstermektedir. Örneğin, Adamberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada levanın insan mikrobiyotasını nasıl şekillendirdiği metagenomik ve metabolomik yöntemlerle gösterilmiştir. Levan sayesinde *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* ve *Faecalibacterium* florası zenginleştirilmiş ve metabolizmada işbirliği sağlayarak metabolik bir düzen sağlanmıştır [44]–[49].

Çiftlik hayvanlarının bağırsakları üzerinde de levanın etkisi incelenmiştir. Domuzlar üzerinde yapılan bir seri deneyde profektik antibiyotik kullanımına alternatif olarak levanın kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Yapılan 42 günlük diyet periyodunda levanın kilo üzerinde olumlu etkisi gözlemlenirken *Lactobacillus* sayısını arttırdığı *E.coli* sayısını azalttığı görülmüştür [50], [51].

Levanın etkisi tavukların beslenmesinde de araştırılmıştır. Levan, yem içeriğinde arttığında göğüs etinin arttığı, atılan amonyak miktarının azaldığı, çekumdaki yararlı bakterilerin (*Lactobacillus* ve *Bifidobacter*) seviyesinin arttığı ve zararlı bakterilerin (*E.coli* ve *Clostridium perfringens*) azaldığı gösterilmiştir [52].

Diğer çiftlik hayvanlarına bakıldığında, kültür balıklarının bağışıklığını geliştirmek amacıyla antibiyotiklere nazaran daha güvenli alternatiflere ilgi duyulmaktadır. *Cyprinus carpio* (Sazan) 75 gün levan ilave edilmiş yemlerle beslenmiştir. *Aeromonas hydrophila* verilmesinden 10 gün sonra hayatta kalma oranları intraperitoneal doz olarak belirlenmiş ve %0,5 levan içeren diyetteki balıkların %100'ünün hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. Levanın gastrointestinal sistemdeki mikroorganizma popülasyonu ile etkileşimi sayesinde balıkların hayatta kalabildikleri düşünülmektedir [53].

Yüksek sıcaklık bazı balık türleri için stres yaratmaktadır. Levan, 26°C'de yaşayan *Labeo rohita* (Rohu balığı)'nın yemine ilave edilmiştir. Seçilen balıklar sıcaklığın dakikada 0,3°C arttırıldığı akvaryuma alınmıştır. Kayıplar dengeye ulaştıktan sonra sıcaklık, maksimum kritik sıcaklık olarak kaydedilmiştir. %1,25 levan içinde bulunan balıklar için kritik ölümcül sıcaklık oldukça yüksektir. Isı şoku proteini (Heat Shock Protein-HSP), sadece levanlı diyetlerle yetiştirilen balıklarda bulunmakta olup kontrol gruplarında gözlenmemektedir [54].

Levan fosfatın yağın yerine geçmesi 1998 yılında Roberts ve Garegg tarafından önerilmiştir [55]. Bir diğer patent uygulaması ise süt ürünlerinin ağızda bıraktığı hissi, tadı ve yayılmasını iyileştirmek için fruktanlardaki yağ benzeri özelliklerin kullanımı ile ilgilidir. Levanın yağ yerin kullanımındaki avantaj, yüksek molekül ağırlıklı levanın tadının algılanmaması ve düşük uçuculuk özellik göstermesinden dolayı kokusunun olmamasıdır. Yakın tarihli bir başka patent başvurusunda levan içeren yoğurtların fonksiyonel bir gıda olarak tüketilebileceği açıklanmaktadır [56], [57].

Esansiyel diyetlerde selenyum, kobalt, demir gibi nanoparçacıkların mikrobisiner halinde verilmesi levan ile kaplanarak sağlanmaktadır. Bu yaklaşım preperatin stabilitesini arttırarak bağırsak ve mikrobiyal hücreler için daha güvenli olmasını sağlamıştır [58].

Levan, buğday ekmeği yapımında kullanıldığında, en az %1 levan kullanılan ekmeklerin kontrol grubuna göre %18-26 daha yumuşak olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [59].

Pastacılıkla ilgili alınan bir patentte levan dahil olmak üzere fruktandan kalp ve sindirim sistemi için yararlı şekerleme elde edilmiştir [60].

Biyolojik temelli gıda ambalaj malzemelerine, daha güvenli, daha sağlıklı ve daha çevreci olduğu için ihtiyaç duyulmaktadır. Levanın uzun ve esnek kısımları olmadan elde edilen filmler pratik kullanıma çok uygun olmayıp çabuk kırılma göstermektedir. Bu filmlere eklenen kil ya da diğer plastikleştiriciler ise bu sorunu ortadan kaldırmaktadır [61].

İnceltilmiş montmorillonit ve levan arasındaki etkileşim titiz bir analizle ele alındığında, iki yapının bir araya gelmesiyle elde edilen etkileşim kuvvetinin levan bazlı filmlerde şeffaflık, esneklik ve sağlamlık kattığı sonucuna varılmıştır [62].

B.subtilis'ten elde edilen levan, ağırlıkça %1, %5 ve %10 oranında sodyum montmorillonit püskürtülerek karıştırılmıştır. Ultrasonikasyondan sonra viskoz süspansiyonların üretilmesi amacıyla su kısmen buharlaştırılmıştır. Kalınlaştırılmış sıvılar Mylar tabakalarıyla kaplanıp kurutulmuştur. Formülasyonda %1 oranında sodyum montmorillonit bulunması termal kararlılığı arttırmış ancak dökme filmlerin mekanik özelliklerinde önemli bir artış sağlamamıştır. Aslında bu olumsuz etki kilin levanın yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır. %10 sodyum montmorillonit içeren film saf levandan oluşan filme göre %424 daha fazla çekme kuvvetine ve %485 daha fazla dayanıklılığa sahiptir. Teoriye göre, %10 sodyum montmorillonit içeren yapılarda levan ile kil moleküllerinin hizalanıp yakınlığı söylenmektedir. Levanın moleküler ağırlığıyla paralel çalışan montmorillonit mekanik güçlendirmede katkı sağlamıştır. FTIR spektrumları bu etkileşimin, levan hidroksil grupları ile montmorillonit yüzeyindeki oksijen molekülleri arasındaki hidrojen bağı sayesinde olduğunu göstermektedir [62].

Levan bazlı filmleri cazip kılan bir diğer özellik ise oksijen bariyeri sağlamalarıdır. %10 oranında montmorillonit ve %5 PEG ile formüle edilen levan bazlı filmlerin oksijen geçirgenliği $<0,05 \text{ cm}^3/\text{m}^2 - \text{gün}$ olmaktadır [31].

2.3. Bentonit

Bentonit endüstrisi, 70 yaşın üzerindedir. Bentonit adı, Knight tarafından 1948 yılının erken döneminde Fort Benton yakınlarındaki Wyoming'te,

yüksek derecede plastik özellik gösteren bir materyal olarak ortaya çıkmıştır [63]. Chisholm'a göre ilk ticari bentonit 1888 yılında "taylorit" adı altında nakledilmiştir [64]. Önceleri bentonit üretimi yılda sadece birkaç ton kadar yapılmaktayken son zamanlarda bu sayı bir milyon tonu aşmaktadır.

Bentonitin çeşitli tanımları literatürde yer almaktadır. Genel olarak bu tanımların tümü bentonitin, büyük oranda kil minerali montmorillonitten oluşan, doğal olarak bulunan, çok ince taneli kaya olduğu görüşündedir. Bentonit, montmorillonite ilaveten genellikle kuvars, feldispat, volkanik cam, organik madde, jips (alçı taşı) veya pirit içermektedir.

Kimyasal olarak montmorillonit, az miktarda alkali toprak metalleri içeren sulu aliminyum silikat olarak tanımlanmaktadır. Yapısal olarak ise iki temel yapıtaşından oluşur; aliminyum oktahedral tabaka ve silika tetrahedral tabaka.

Montmorillonit, yaklaşık 70-100 meq/100 gr kilden oluşan bir katyon değiştirme kapasitesine sahiptir. Kütle hareket yasalarına göre değiştirilebilir iyonlar killer üzerinde bulunabilmektedir. Montmorillonit ile ilişkilendirilen hem tip hem de miktarı değiştirilebilen katyonlar montmorillonitlerin fiziksel özelliklerinin kontrolünde büyük öneme sahiptir.

Montmorillonit uygun olduğunda suyu emer. En yüksek su adsorpsiyonu, kilin temel yüzeyleri üzerinde gerçekleşir, bitişik tanecikleri birbirinden ayırır ve böylece kilin toplam hacmi artar. Birçok organik materyal de montmorillonit tarafından, suya benzer şekilde adsorbe edilir.

Endüstriden bentonitin sıkça kullanılması daha çok, şişme özelliğinden kaynaklanmaktadır. Su ve bentonit kombinasyonları endüstride çok imkân sağlamaktadır. Çünkü fiziksel özellikleri su/kil oranı değıştikçe değışir. Kilin şişme kapasitesi birinci derece önemlidir. Bu özellik, değışken iyon türleri tarafından kontrol edilir. Sodyum bentonitler, kalsiyum bentonite göre sulu süspansiyonlarda daha fazla genişir veya şişer [64].

Kalsiyum montmorillonit, smektit minerallerinin en baskınıdır ve dünyanın birçok yerinde bulunur. Sodyum montmorillonit, kalsiyum montmorillonit ile kıyaslandığında daha nadir bulunur [63].

Bentonitin önemli bir bileşeni olan montmorillonit, yapısal özellikleri ve farmasötik uygulamalarda kullanılabilme imkânı sayesinde yıllardır araştırılmaktadır. Montmorillonitlerin su varlığında meydana gelen katman genişleme teorisi 19. yüzyılda ortaya atılmış olmakla beraber yapılan araştırmalar doğrultusunda son yirmi yılda bu teori kabul edilmiştir [65].

Özellikle nano boyutlu montmorillonit, aflatoksizosinin önlenmesinde gıda takviyesi olarak, iyonik olmayan anyonik, katyonik boyalar için absorbent olarak, diş enfeksiyonlarında antimikrobiyal etkisi olan metal iyonlarında ve gıda ambalaj maddelerinde başarıyla kullanılmaktadır [66]–[72]. Bu kil minerallerinin nano boyuta dönüşümünün kolaylığı ve fizibilitesi ilgi çeken önemli iki faktördür. Polimer nanokompozit materyalleri ilaç geliştirilmesinde mikrokompozitlerin sınırlarını yenmek için uygun alternatifler olarak kullanılmaktadır [73].

Polimer matriksin içine %1-5 kadar montmorillonit eklenmesinin, nanomatriks boyutlarına ve yüksek en-boy oranına bağlı olarak mekanik güçlenmede belirgin bir iyileşme ile sonuçlandığı bilinmektedir.

Sodyum montmorillonitte bulunan hidrat sayısı kalsiyum montmorillonite göre daha fazla olduğundan, kalsiyum montmorillonit ilaç yüklemeleri ve ilaç salınımları sırasında sodyum kalsiyum montmorillonite dönüştürülür [74]-[76].

Kil minerallerinin çoğu gözenekli yapıya ve özel yüzey alanına sahiptir [77], [78].

Bentonit, genel olarak kolloidal silis yapıda, sert olmayan, gözeneklere sahip, kolayca şekil verilebilen, açık renkli bir kaya özelliği göstermektedir. Bentonitin yüzey alanının çok geniş olması, su içerisindeki üstün şişme yeteneği, asit ile aktive edilebilmesi petrol endüstrisinde sondaj çamuru olarak kullanılabilirliği açısından büyük önem taşımaktadır.

Negatif yüklü bentonit kil parçacıkları, yapılarını elektriksel açıdan nötr yapmak amacıyla pozitif iyon (katyon) adsorblarlar [73].

Montmorillonit, $Na_{0,2}Ca_{0,1}Al_2Si_4O_{10}(OH)_2(H_2O)_{10}$ kimyasal formülüne sahip, ampirik yapıda bir mineraldir. Beyaz, kahverengi, yeşil, sarı gibi farklı renklere sahip olabilmektedir. Tek başına montmorillonit kristalleri taneli, ince ve düzensiz dış çizgilere sahiptir. Bu kristaller, tiksotropi özelliği sayesinde su ile temas halinde jel, çalkalanma durumunda ise sıvı hale gelebilmektedir. Montmorillonit kristallerinin bu özelliği mühendislik alanında sıkça kullanılmaktadır [79].

Pülp halindeki bentonit kurutulduktan sonra yeniden pülp haline getirilebilir. Bu da bentonitin dehidratasyon özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Kullanılan suyun saf olması ve kurutma işleminin yüksek ısıda yapılmaması şartıyla bu işlem tekrar tekrar yapılabilir. Tekrarlanan bu işlemler sonucunda bentonitin herhangi bir özelliğinde bir değişiklik meydana gelmemektedir. %1-2 oranında bentonit, su içerisinde çalkalanırsa süspansiyon halinde kalmaktadır. Bu süspansiyon ancak elektrolitik bir etki ile dondurulabilmektedir. Kullanılan bentonitin çok iyi bir nitelikte olması durumunda, ortamdaki jel hemen sertleşmektedir [80].

Bentonitler, iğerdikleri sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) iyonlarına göre; sodyum bentonit, karışık bentonit (sodyum ve kalsiyum iğereren) ve kalsiyum bentonit olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Bentoniti oluşturan montmorillonit minerali katyon değiştirme işlemlerine en elverişli kil minerali olmasından dolayı birçok endüstri dalında tercih edilmektedir. Katyon değiştirme işlemleri uygulanarak bentonitleri birbirine dönüştürmek mümkündür [81].

Yüksek şişme özelliğine sahip Na-bentonitler "Wyoming" tipi olarak da adlandırılmaktadırlar. Bu tip bentonitler şişmeyen bentonitlere göre daha az bilinmektedir. Na-bentonitler su içine konulunca şişmekte ve jelleşme özelliği göstermektedir. Bentonit, bu davranışıyla suyu absorbe etmektedir. Na-bentonitler su içerisinde kendi hacminin 15 katı kadar hacim artışı gösterebilirken su içerisinde de sürekli olarak süspansiyon şekilde kalabilmektedir. Düşük şişme kapasiteli Ca-bentonitler ise yaygın olarak "Ağartma Toprağı (Fuller's Earth)" olarak adlandırılırlar. Bu tip bentonit oluşumları, Na-bentonite oranla daha yaygın olarak bulunmaktadır. Az miktarda su absorblarlar, su içerisinde çabuk dağılırlar ve balmumu görünümündedirler [81].

Yüksek kalitedeki bentonitler kendi hacimlerinin 10-20, daha kaliteli bentonitler ise 25 hatta 30 kat şişme özelliği gösterebilmektedir. Değişebilen katyon olarak sodyum içeren montmorillonit, kalsiyum iyonu içeren montmorillonite göre çok daha fazla şişer. Bunun nedeni sodyumun yüksek oranda hidrate olabilmesi ve iyon yarıçapının daha küçük olmasıdır. Sodyum bentonitin şişme özelliğindeki bu farklılık, farklı kullanım alanlarında da önem kazanmaktadır [81].

Yapılan bir çalışmada poliglisidil metakrilat/Na⁺montmorillonit nanokompozitleri, disperse montmorillonit içeren glisidilmetakrilatın serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Glisidil metakrilatın konsantrasyonu değiştirilerek birkaç polimer/kil nanokompoziti hazırlanmış ve hazırlanan nanokompozitler X ışını kırınımı (XRD), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Termogravimetrik analiz (TGA) ile karakterize edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında kompozitlerin özelliklerinin önemli derecede geliştirildiği belirlenmiştir. Termogravimetrik analiz sonuçları ile nanokompozitin bozulma sıcaklığının saf polimerden daha yüksek olduğu, termal bozulma hızının ise daha düşük olduğu gösterilmiştir. Taramalı elektron mikroskopisi ile yapılan incelemeler sonucunda ise kil tabakalarının polimer matriksi içinde homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmiştir [82].

Son yıllarda polimer-kil nanokompozitleri hem kil hem de polimerin kimyasal, fiziksel ve yapısal özelliklerinin birlikte kombine edilebilmesinden dolayı önem kazanmıştır. Polimerlerin kil ile modifikasyonu sonucunda iyon değiştirme kapasiteleri, termal ve çözücü kararlılıkları gibi birçok özellikleri geliştirilebilmektedir. Bu tür mekanik özelliklerin geliştirilmesi ile bu kompozitler elektronik, iletişim, taşıma ve yapım gibi birçok alanda yer alabilmektedir [82].

Nanokompozitler, polimerin zincirleri kil tabakaları arasında dağılarak ya da kil tabakaları polimer matriksinde dağılarak elde edilebilir. Na⁺ montmorillonit kili bu tür amaçlar için kullanılan en yaygın silika yapılı kildir. Çok düşük oranda montmorillonit kullanılması ile polimerin fiziksel özellikleri çok büyük oranda geliştirilebilmektedir. Aynı zamanda, kil yüzeyinde bulunan hidrofilik gruplar organik polimer fazında homojen dağılmayı da sağlarlar [82].

2.3.1. Bentonitin Kullanım Alanları

Bentonitin yüksek plastisiteye sahip olması, su ile birlikteyken kolloidal yapıda olması, su ve bazı organik sıvılar içeren ortamlarda hacimsel şişme göstermesi sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Sondaj sanayiinde bentonitler, derin kuyu petrol ve su sondaları esnasında matkabın çalışması ile oluşan sürtünme ile oluşan ısının giderilmesi, yeraltından ayrılan kırıntıların yukarı taşınması, sondaj sırasında dönme momentinin azaltılması gibi nedenlerle sondaj çamuru olarak kullanılmaktadır. Bu alanda suya karşı geçirimsiz, yüksek su absorpsiyonuna sahip olan, tikrotsopi ve yüksek jel oluşturabilme kabiliyeti gösteren, Na-bentonitler kullanılmaktadır [79], [83]–[85].

Hayvan yemi sanayiinde, bentonit, özellikle tavuk ve diğer farklı kümes hayvanlarının besinlerine eklenerek hayvanların büyüme hızlarının ve yumurta verimlerinin arttırılması amacıyla kullanılmaktadır. Büyükbaş hayvanların yemlerine ilave edilen bentonit, hayvanların büyümesini hızlandırmakta ve dışkılarında oluşan kötü kokuyu gidermektedir. Hayvan yemlerine bentonit eklenmesi ile yemlerin sindirimi daha kolay olmakta, sulu yemlerde bulunan yüksek konsantrasyondaki amonyumun toksik etkisi azaltılmakta, yemin tüketilme hızının azaltılarak besinlerin daha kolay sindirilmesini sağlanmaktadır. Hayvan yemine ilave madde olarak

Na⁺ bentonit kullanılabilir. %1-1.5 arasında değişen oranlarda eklenen bentonit katkılı yemler sayesinde kümes hayvanlarının canlı ağırlığında %35'lik, yumurta verimlerinde ise %15'lik artışlar gözlenmektedir [83].

Un ve undan yapılan gıdalara %0,025-1,25 oranlarında katılan bentonit gıdalardaki bayatlamayı geciktirmekle beraber, sütlere karışmış kanserojen aflatoksin M1'in uzaklaştırılmasını da sağlamaktadır [86].

Az ya da çok her kilin bir ağartma gücü vardır. Bentonitler, bazı kimyasal işlemler sonucu çeşitli özellikleri değiştirildikten sonra, yağların rengini gidermede ve ağartma toprağı olarak kullanılabilir. Bitkisel ve hayvansal yağların ağartma işlemlerinde kullanılan bentonit; ksantofil, klorofil α - ve β - karoten, gosipol ve antosiyan gibi renk verici pigmentleri absorbe edebilmektedir. Uygunsuz depolama ve üretim sebebiyle oksidatif etkiyle oluşan hidroksi ya da polikatenatik asitler ile diğer renk verici maddelerin giderilmesinde de yine bentonitin absorbe etme özelliğinden yararlanır. Ağartmada kullanılan bentonitler % 75 veya daha fazla şişmeyen Ca-montmorillonit minerali içeren killerdir [87].

Bentonit, şarap, bira ve meyve suları gibi çeşitli içeceklerin berraklaştırılmasında da kullanılmaktadır. Bentonitler su, meyve suyu gibi sıvı ortamlar içerisinde hidrate olup negatif yüklü bentonitler bulanıklığa sebep olan meyve, tahıl gibi tortulu taneciklerle birleşerek floküle olur ve ortamın berraklaşması sağlanır. Berraklaştırma sürecinde şişme özelliği düşük olan kalsiyum bentonitler kullanılır [79], [83].

Alkali bentonit kâğıda kayganlık verir. Ayrıca, sakızlı maddelere yaptığı emülsiyonla kâğıt endüstrisinde kullanılan süzgeçlerin tıkanmasını ve kâğıt hamurunda bulunan reçinelerin etkisiyle makinelerin kirlenmesini engeller. Bentonit, hem absorpsiyon gücü ve emülsiyonlaştırıcı özelliği

hem de negatif yüklü olması sayesinde (+) yüklü karbonu çekerek eski gazete gibi atık kâğıtların değerlendirilmesinde kullanılır. Bu alanda kullanılan bentonitler ince taneli, kuvarssız, beyaz renkli, sabun kayganlığında, alkali, saf bentonitlerdir [79].

Na-bentonitin geçirgenliği çok düşüktür. Eser miktarda Na-bentonit ilave edilen kumlarda geçirgenlik büyük ölçüde azalmaktadır. Ca-bentonitin ise geçirgenliğin üzerindeki etkisi oldukça azdır. Bentonitler, geçirgenliği engellemeleri sayesinde barajların ve göletlerin inşaatında, heyelan önlemek için oluşturulan yapıların inşaatında, sızdırmazlık perdesi inşaatında, tünel inşaatlarının yapımında, kazı şevleriyle bina temellerinin desteklenmesinde ve köprü, üst geçit ayaklarının inşaatında diyafram duvarları oluşturmada kullanılmaktadır. Baraj yapılırken su kaçaklarını önlemek için Na-bentonitin şişme özelliğinden ve jel oluşturmasından yararlanılmaktadır [79].

Sepiyolit, bentonit, atapulgit gibi absorban özelliğe sahip killer kedi kumu olarak tercih edilmektedir. Bu killer, yüksek yoğunluklu (bentonit) ve düşük yoğunluklu (sepiyolit, atapulgit) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Kedi kumu pazarında, düşük yoğunluklu killerin kullanımı yüksek orandayken bentonitin payı da %25 civarındadır [79], [88].

Gübrelenmede, bentonitin koloidal özelliği ve katyon değişim kapasitesi önemli bir yer tutmaktadır. Bitki büyümesi için gerekli nemin sağlanması ve nemin uzun süre korunması, gübrede bulunan çözünabilir tuzların absorblaması bentonitin gübreye kazandırdığı önemli özelliklerdir. Bentonit sayesinde, suyun dengeli ve homojen aktarılması, toprağın havalanması ve verilen gübrenin sulama periyodunda orantılı olarak bitkiye verilmesi sağlanmaktadır. Bentonit aynı zamanda sıvı veya süspansiyon haldeki gübrelerin yapımında stabilizer olarak da kullanılmaktadır [89].

Merhemlerin içerisinde alkali bentonitler kullanılmaktadır. Bununla birlikte çok kuvvetli ilaçların seyreltilmesinde de alkali bentonitlerden yararlanılmaktadır. Alkali bentonitler, yapışkan özellikteki çeşitli ilaç hammaddelerine ilave edilerek hammaddelerin öğütölmelerinde yardımcı olur, çeşitli sıvılarla karıştırıldıklarında plastik ve homojen, temizleyici ve iyileştirici özelliği olan süspansiyonlar oluştururlar [89].

Bentonit, röntgen çekiminde kullanılan baryum sülfatın süspansiyon halinde tutulmasını sağlayan en önemli maddelerden birisidir. Bentonitler koloidal özellikleri nedeniyle deterjanlarda olduğu gibi nemi, tuzları, zehirli maddeleri vücut yüzeyinden uzaklaştırarak derideki gözenekleri açıp derinin daha kolay temizlenmesini sağlarlar. Bu nedenle de kozmetik sanayinde önemli bir yere sahiptirler [89].

Bentonit, ilaçlarda dolgu maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra, ilaçlı hayvan banyolarında kullanılmaktadır. İlaçlı hayvan banyolarındaki ilaç aktif maddelerinin sürekli olarak süspansiyon halinde kalmasını, kaplama özelliğinin ve yapışkanlığının artmasını, toksik etkisinin azalmamasını sağlarlar. Nikotin sülfat, pyrethrum, rotenone gibi zehirli maddelerin sulu ortamda püskürtölmeleri için hazırlanan ilaçların süspansiyonda kalmasında yardım eder. Ayrıca bentonit ile kükürdün koloidal karışımı funguslara karşı kullanılan çeşitli ilaçlar içerisinde de katılmaktadır [89].

2.4. Antimikrobiyal Peptidler

Sık kullanılan antibiyotiklere karşı artan bakteri direnci halk sağlığı için oldukça endişe vericidir. Direnç, 1950'lerin başında, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus sp.* gibi çok dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasıyla başlamıştır [90].

Bakteriyal direncin üstesinden gelmek amacıyla yeni antibiyotik sınıfları geliştirilmiş ve bu konuda birçok araştırma yapılmıştır. Antimikrobiyal

peptidlerin (AMP) yapısı ve işlevi üzerine odaklanma, son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. Antimikrobiyal peptidler, çoğu patojen mikroorganizmalara karşı olmak üzere, canlıların doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Doğrudan antimikrobiyal işlev görür ve ilk konakçı savunma mekanizması sağlar [91].

AMP'ler, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, funguslara ve protozoonlara karşı 0.25-0.4 µg/mL kadar düşük minimum inhibisyon konsantrasyonuna (MIC) ve geniş antimikrobiyal aktivite yelpazesine sahip olmaları ile büyük ilgi uyandırmaktadır [92]–[95].

Bazı katyonik peptidlerin influenza A, veziküler stomatitis virus (VSV), HIV-1 (Human Immunodeficiency Virüs) gibi zarflı virüslerin üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir [96]. Üstelik bu peptidlerin bakteri direncinin üstesinden gelme potansiyeli vardır. Bu nedenle antimikrobiyal peptid ve türevleri potansiyel olarak yeni bir antimikrobiyal ilaç sınıfını temsil edebilir [97].

Antimikrobiyal peptidler, boyutlarına, konformasyonel yapılarına ya da baskın aminoasit yapısına göre gruplandırılabilir. Bununla birlikte bu moleküllerin çeşitliliği o kadar fazladır ki genel olarak kabul gören bir sınıflandırmaya koymak çok zordur. 3 boyutlu yapılarına dayanarak antimikrobiyal peptidleri dört ana grupta sınıflandırabiliriz. İlk iki grup doğada en yaygın bulunan gruptur [95].

- ✘ Grup I: Disülfür köprüleri ile stabilize edilmiş β tabakalı yapılar
- ✘ Grup II: Sarmal yapıya sahip doğrusal peptidler
- ✘ Grup III: Genişletilmiş peptidler
- ✘ Grup IV: İlmek yapıları olan peptidler

Antimikrobiyal peptidlerin antimikrobiyal mekanizması henüz tam olarak belli değildir. Ancak, katyonik AMP'lerin elektrostatik kuvvetle bakteriyel

zar üzerindeki negatif yüklü fosfolipidlerle etkileşime girerek antimikrobiyal etki gösterdiği genel olarak kabul edilmektedir. Bu etkileşim karmaşık olup gözeneklerin oluşmasına ve membran bozulmasına neden olur. Önerilen birkaç mekanizmadan "fıçı tahtası (barrel-stave)" mekanizması, "halı (carpet)" mekanizması, "toroidal gözenek" mekanizması en çok kabul görenlerdir.

"Fıçı tahtası (barrel-stave)" modeli, hidrofobik yüzeylerin zar fosfolipidlerinin alifatik zinciri ile etkileşme girdiği ve hidrofilik kısımların su içeren yerlerde gözenek oluşturmasını tarif eder [98]. "Halı (carpet)" modelinde, iki katmanlı yüzey üzerinde peptidler birikir. Peptidler, zarın yüzeyini halı benzeri bir şekilde örten elektrostatik anyonik baş grupları çekmektedir. Yüksek peptid konsantrasyonlarında, yüzey yönelimli peptidler deterjan gibi davranarak misel oluşumuna neden olmakta ve iki tabaka bu şekilde bozulmaktadır [99]. "Toroidal gözenek" modelinde antimikrobiyal peptid helezonları membranlara yerleştirilir ve lipid monotabakalarının gözenek boyunca sürekli bükülmesine neden olur. Böylece, su göbeği hem sokulan peptidler hem de lipid baş grupları tarafından astarlanır. Bu transmembran gözenek türü magaininler, protegrinler ve melittin tarafından indüklenir [100], [101].

Doğada bitkiler ve yumuşakçalar da dâhil olmak üzere pek çok organizma ilk savunma mekanizmalarının bir parçası olarak antimikrobiyal peptidleri (AMP) sentezler. Günümüze kadar bu tip yüzlerce peptid tanımlanmış olması bu peptidlerin doğal savunma sisteminde ne kadar önemli olduğunu bize göstermektedir [102], [103].

Antimikrobiyal peptidlerin ifade edilmesi kendiliğinden olabileceği gibi enfeksiyon ya da enflamasyon öncesi sitokinler, bakteriler veya doğal

bağışıklığı uyaran liposakkaritler gibi bakteriden kaynaklanan moleküllerle de enflamasyon uyarısı ile de olabilmektedir [102], [103].

AMP'lerin bazıları güçlü antimikrobiyal ajanlardır. Antimikrobiyal etki göstermeyenlerin antimikrobiyal etkisi, seyreltilmiş ortamlarda oldukça belirgin olmasına rağmen mikroorganizma öldürme etkileri tek değerlikli veya çift değerlikli katyonların konsantrasyonlarından, proteazların etkilerinden ve çok değerlikli anyonlardan (heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlardan) ve düşük lokal peptid konsantrasyonlarından etkilenir. Bu peptidler doğal bağışıklığın önemli efektör molekülleridir [104], [105]. AMP'ler fagositozu arttırırlar, prostoglandin salınımını uyarırlar, LPS'lerin septik etkilerini nötralize ederler, bağışıklık hücrelerinin enflamasyon alanında toplanmasını sağlarlar [106], [107] ve anjiyojenezi uyarak yara iyileşme sürecini başlatırlar.

Memeli kaynaklı antimikrobiyal peptidler, monositler ve T lenfositleri kemotaktik olarak uyarak immün cevabın oluşmasını sağlarlar. Adjuvan ve polarlaştırıcı etki göstererek dendritik hücre gelişimini arttırırlar [108]. Bu peptidler bakteri, virüs veya fungusların membranlarını veya diğer doğal yapılarını bozarak ya da bu yapıları kararsız hale getirerek doğrudan etki göstermekle kalmayıp doğal bağışıklığın ve enflamasyon cevabının düzenlenmesini de sağlarlar [109]. Bu yüzden AMP'ler için "savunma peptidleri" terimi sık sık kullanılmaya başlanmıştır.

AMP'ler, antimikrobiyal etkilerini, mikroorganizma membranları ile etkileşime girerek göstermektedirler. Membran ile etkileşime giren antimikrobiyal peptidler hücrenin dengesi bozmakta ve bu şekilde hücre ölümü gerçekleşmektedir. Antimikrobiyal özellikteki katyonik peptidlerin hidrofobik olması ve pozitif (+) yük taşıması bakteri membranıyla olan etkileşimler açısından önemli bir faktördür. Gram negatif bakterilerde dış

membranda bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ve Gram pozitif bakterilerdeki lipoteikoik asit, (+) yüklü antimikrobiyal peptitlerin bağlanabilmesi için gerekli olan (-) yükü temin eder. Aynı zamanda, bakterilerdeki fosfolipit yapıya sahip iç membranın da (-) yüke sahip olması antimikrobiyal etkinin daha kolay bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır [110].

Katyonic peptidlerin viral enfeksiyonları da engelleyebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Zarfsız adenovirüs dışında zarflı RNA ve DNA virüsleri de bu peptidlerden etkilenmektedir. Antimikrobiyal peptidlerin antiviral etkisi virüslerin tutunma ve vücuda giriş aşamasında etkilidir ya da bu etki virüsün doğrudan zarfına yöneliktir.

AMP'ler her çeşit hayat formunun savunma sisteminde bulunurlar. İlk yayınlanan ve ilk karakterize edilen AMP'ler bakteriyel kaynaklı olanlardır. Bakterilerini klasik anlamdaki enfeksiyona karşı korumazlar ancak bakterinin etrafında bulunan ve besin kaynaklarını tüketen diğer bakterileri öldürerek rekabeti ortadan kaldırır ve bakterilerin hayatta kalmasını sağlarlar. Bakteriosin olarak adlandırılan bakteriyel antimikrobiyal peptidlerin birçoğu bakteriler tarafından sentezlenir ve ökaryatlara göre çok daha fazla etkindirler. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen, bir lantionin sınıfı antimikrobiyal peptid olan nisin, elli yıldan beri gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır ve bu peptide karşı bakterilerde kayda değer bir direnç henüz gelişmemiştir. Nisin, nanomolar düzeyde bile Gram pozitif bakterilere karşı çok etkin antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Bitkilerde de AMP'lerin bakteri ve fungus enfeksiyonlarına karşı çok etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bitkilerde bu tür peptidleri kodlayan çok sayıda genin bulunması, çok sayıda bitki türünün *in vitro* ortamda

bakterisit ve fungusit etki göstermesi ve bir patojen varlığında gen seviyesinde peptidlerin ifade edilmelerinin artması bu görüşü destekleyen bulgulardır [111], [112].

Omurgasızlar, omurgalılarda bulunan doğal bağışıklık sistemine sahip değildir ve sadece doğal savunma sistemleri ile patojenlere karşı koyarlar. Omurgasızlarda tanımlanan çok sayıda peptidin patojenik organizmalardan korunmada anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin yengeç, midye ve karidesin hemositlerinde çeşitli peptidlerin varlıkları gösterilmiş olup AMP'lerin bu canlıların doğal bağışıklık sisteminin çok önemli bir parçası olduğu anlaşılmıştır. Sirke sineği olan *Drosophila melanogaster* üzerinde yapılan çeşitli araştırmalarda patojen tanıyıcı reseptörlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Memelilerde de böyle bir sistemin evrimsel olarak korunduğu belirlenmiştir.

Antimikrobiyal savunma sisteminde dolaylı ya da dolaysız etkileri olan bu peptidler, omurgalıların patojenler ile sürekli karşılaştıkları mukozal yüzeyler ve deride olduğu kadar bağışıklık sistemi hücrelerinin granüllerinde de bulunurlar. Deride bulunan bezler antimikrobiyal peptidlerin yoğun olarak bulunduğu yerlerdir ve yaklaşık 500'e yakın peptidin bu bölgelerden kaynaklandığı bildirilmiştir. İnsan derisinde yer alan antimikrobiyal peptidleri keratinositler, mast hücreleri, nötrofiller, sebositler ve merokrin (ekrin) epitelyal hücreler salgırlar [111], [112].

Memelilerde iki önemli antimikrobiyal peptid sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar defensinler ve katelisinlerdir. Defensinler yapısal olarak; katyonik, yaklaşık 30-40 aminoasitten oluşan, yüksek miktarda arjinin aminoasidi içeren, β -tabakalı katlanma yapan, 3.5-6 kDa moleküler ağırlığına sahip peptidlerdir. Bugüne kadar bulunmuş olan insan defensin genlerinin hepsi

telomer bölgesi yakınlarındaki p22-23.1 bölgesinde, 8. kromozomda bulunmaktadır [113], [114].

Katelisidinler de omurgalı antimikrobiyal peptidlerini oluşturan büyük ve yaygın bir gruptur ve iyi korunmuş bir N-terminal (cathelin) ile karakterize edilirler. N-terminal proteolitik olarak kırılarak olgun ve aktif bir peptidi oluşturur. Bu peptidler ortak N-terminallerinin yanı sıra α -sarmal, saç tokası şeklinde, prolin ve arjinince zengin peptidlerdir. Yapısal farklılıklarının yanında geniş bir spektrumlu bir mikroorganizma öldürücüsü ve bağışıklık sistemi düzenleyicisidir. Katelisidinler fare, tavşan, koyun, at ve insanlar gibi pek çok pek çok memeli türünden izole edilmiştir. Bazı memelilerde örneğin büyük baş hayvanlarda katelisidinlerin birçok türevi bulunur bu da bu antimikrobiyal peptidlerin savunma sisteminde pek çok rolü olduğunu düşündürmektedir. Katelisidinler, çoğunlukla propeptid olarak dolaşımdaki granüllü bağışıklık hücrelerinde depolanırlar. Nötrofil salgı granülleri katelisidinlerin en önemli kaynağı olup herhangi bir enflamasyon varlığında ağız, akciğer, genital yollarda, idrar yollarında ve deri keratinositlerinde sentezlenirler. İnsan LL-37 (hCAP18) katelisidini bu gruba dâhildir [115], [116].

2.4.1. LL-37 Peptidi

İnsanlarda 2 büyük grup antimikrobiyal peptid bulunmaktadır: defensinler ve katelisidinler. Bütün katelisidinler yaklaşık 100 amino asit dizisi bulunan, yüksek korunmuş N-terminal bölgeye sahip benzer bir yapıdadır [117], [118].

İnsanlarda bugüne kadar bulunan katelisidin ailesinin tek üyesi CAMP geni (GeneBank ID 820) tarafından kodlanan LL-37/ hCAP18'dir. İlk kez 1995 yılında kemik iliği hücrelerinde tanımlanmıştır. hCAP18 adı, tavşanda bulunan ve 18kDa'luk bir molekül ağırlığa sahip olan ve dolayısıyla

katyonik antimikrobiyal peptid CAP18 olarak adlandırılan peptid ile yakın ilişkisi nedeniyle seçilmiştir. İnsan katelisinin hCAP18 geni, kromozom 3'te bulunan, 1963 baz çiftine sahip bir gen olup 4 ekzondan oluşur. 1., 2., 3. ekzonlar sinyal dizisi ve kateletin alanı kodlarken ekzon 4 antimikrobiyal peptidi kodlar [117], [118]. Bu antimikrobiyal peptid iki lösinle başlayan (NH₂-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) 37 aminoasit dizilimine sahip olduğundan LL-37 olarak adlandırılmaktadır. Herhangi bir sistein ya da triptofan içermez ve yaklaşık ~4,5 kDa ağırlığındadır. Peptid, elastaz tarafından parçalanan birçok katelisidinden farklı olarak hCAP18'in C terminal ucundan proteinaz 3'ün ekstraselüler proteoliziyle üretilir [119].

Fizyolojik pH değerinde LL-37'nin net yükü +6'dır. Peptid, 11 pozitif yük taşıyan β -lizin ve 5 arginin içerirken 5 negatif yük taşıyan 3 glutamat ve 2 aspartat aminoasidine sahiptir. Sulu çözeltide düzensizdir ancak lipid zarla temas gibi durumlarda amfipatik α -heliks katlanır [120].

LL-37 başlangıçta antimikrobiyal özellikleriyle tanınmıştır. Bununla beraber bağışıklık sisteminin kemoçekici hücrelerini uyararak yara veya enfeksiyon üzerine çekmesi, yara kapanmasını teşvik etmesi gibi ek savunma rolleri de üstlenmektedir. LL-37'nin antimikrobiyal aktivitesi genellikle sentetik peptidler kullanılarak incelenmiştir. LL-37'nin bildirilen aktiviteleri tuz, pH, bakteri konsantrasyonu gibi farklılıklara duyarlı olduğunu göstermektedir [121].

LL-37 (hCAP-18) literatürde insanda bulunan tek katelisinin olarak bilinmektedir. hCAP-18, LL-37 antimikrobiyal peptidini oluşturmak için proteinaz-3 enzimi tarafından parçalanır. LL-37, iki lösin ile başlayan 37 amino asit dizisine sahiptir ve 4.5 kDa ağırlığındadır. Fizyolojik pH'ta, pozitif yüklüdür. İnsan katelisinin hCAP18 geni, kromozom 3 'te yer alan

1963 baz çifti içeren bir kompakt genidir ve bu gen dört eksondan oluşmaktadır. LL-37 amfipatik, α -sarmal peptittir, hem planktonik hem de biyofilmler içerisinde kalan bakterilere, HIV gibi virüslere ve funguslara karşı etkilidir.

Domuz ve sığır gibi memelilerde pek çok katelisinidin geni bulunurken insanlarda sadece bir tane gen (CAMP) bulunmaktadır. İnsandaki öncü protein olan insan katelisinidin antimikrobiyal protein 18 (hCAP18) deride bulunan keratinosit, mast hücre, nötrofil ve ekrin bezlerin duktal hücreleri gibi pek çok hücre tarafından üretilmektedir. Nötrofil proteazları hCAP18'i ekstrasellüler olarak etken molekül olan LL-37'e parçalar. Katelisinidin antimikrobiyal peptid (CAMP) proteinin C-terminal ucundan salınan ve 37 aminoasit içeren iki lösin ile başlayan aktif antimikrobiyal peptid olduğu için LL-37 olarak isimlendirilmiştir. LL-37 güçlü antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkisi nedeniyle kutanöz konak savunmasında önemli rol oynamaktadır. Katelisinidinlerin üretimi normal şartlar altında çok düşük miktardayken mikrobiyal etkenler, enfeksiyon, enflamasyon ve yaralanma ile artış gösterir. LL-37 antimikrobiyal peptidi ayrıca mediatör salınmasını başlatarak derinin doğal bağışık yanıtında yardımcı roller oynar. Ayrıca anjiogenez ve reepitelizasyonu uyarıcı etkileri sayesinde yara iyileşmesinde de önemli rol almaktadır [112], [122].

LL-37 antimikrobiyal etkisinin yanı sıra etkilenen cilt bölgesinde lokal vazodilatasyon, anjiogenez ve enflamatuvar hücrelerin kimyasal cezbedilmesi ile perivasküler ödem ve diğer enflamatuvar değişikliklere neden olarak rozase (gül hastalığı) bulgularının ortaya çıkmasını ve artmasını sağlar [123].

Yapılan sinüs epitel hücre kültüründe hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bakterilerin LL-37 üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Bağırsakta

bulunan bakteri mikroflorasının ürettiği butirat, LL-37' nin üretimini arttırmaktadır. LL-37, patojenleri ortadan kaldırarak enfeksiyonlara karşı vücudu savunmada önemli rol oynamaktadır. Ayrıca LL-37, bir seri hücre ile kemokin üretimini, sitokinleri, kemoçekicilik ile immune efektör hücrelerini ve mezenkimal kök hücrelerini düzenleyerek doğal ve adaptif bağışıklığa katılır. Vitamin D ile birlikte otofaji düzenleyerek anjiyogenez ve yara iyileşmesini uyarır [124].

Diyabet hastalarının genellikle ayak tabanlarında, biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu ülserleşmiş yaralar oluşur. Biyofilm tabakasının giderilmesi hastalarda yaraların iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar antimikrobiyal peptidlerin biyofilm oluşmasını engelleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. İnsan katelesidin LL-37 peptidinin pek çok Gram pozitif ve Gram negatif patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği, biyofilm oluşumunu engellediği ve yara iyileştirme özelliği olduğu gösterilmiştir. Topikal olarak uygulandığında biyofilm oluşumunu engelleme ve yara iyileştirme özelliklerinin olması, LL-37'yi mikroorganizmalar tarafından enfekte olmuş yaraların iyileştirilmesinde oldukça etkin hale getirmiştir [125], [126].

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Mikroorganizma İzolasyonu

Çalışmada levan üreten mikroorganizmaların izolasyonu için çeşitli bölgelerden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Her bir toprak örneğinden yaklaşık 5 g alınarak %0,9 NaCl içeren steril serum fizyolojiğe eklenmiş ve 1 gece etüvde bekletilmiştir. Levan pozitif mikroorganizmaların belirlenebilmesi için Nutrient Agar ortamına %5 oranında sukroz eklenerek besiyeri hazırlanmış ve hazırlanan besiyeri otoklavda steril edilerek petrilere dökülmüştür. Etüvden alınan toprak örnekleri, hazırlanmış olan besiyerlerine tek koloni ekim tekniği ile inoküle edilmiştir. İnoküle edilen örnekler ayrı ayrı hem oda sıcaklığında hem de 37°C etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası alınan petrilere incelendiğinde kubbe şeklinde olan mukoid kolonilerin levan sentezleyen mikroorganizmalar olduğu ön görülmüştür.

3.2. Mikroorganizma Türlerinin Belirlenmesi

İzole edilen mikroorganizmalar, türlerinin belirlenmesi için 16S rRNA analizine gönderilmiştir.

3.3. Biyopolimer Eldesi

Elde edilen saf kültürden levan üretebilmek amacıyla %5 sukroz ilaveli Nutrient Broth besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri 121°C'de, 1,5 atm'de otoklavda steril edilmiştir. Her bir kültür 1 McFarland standardında, %10 v/v olacak şekilde saf kültürle inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme sonrası sıvı kültür 4000 rpm'de 15dk santrifüj edilerek canlı kültürün sıvıdan ayrılması sağlanmıştır. Süpernant ayrılarak üzerine 1:2 oranında etanol ilave edilmiş ve pH 10'a ayarlanarak polimerin prespite olması sağlanmıştır. Etanolün uzaklaştırılması için sıvı

tekrar 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve çöken polimer petri kabına alınarak kuruması sağlanmıştır.

3.4. Biyopolimer Karakterizasyonu

Elde edilen polimerin levan olup olmadığının anlaşılması için karbon analizi (^{13}C NMR), proton analizi (^1H NMR) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) yapılmış ve literatürdeki levan verileriyle karşılaştırılmıştır.

3.5. Biyopolimer Üretim Optimizasyonları

Üretim besiyeri içeriği (g/L) olarak; K_2HPO_4 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, sukroz 100, hazırlanmış ve otoklavda steril edilerek kullanılmıştır. Her bir inokülasyon 1 McFarland standardında %10 v/v olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Levan Sentezi İçin Uygun İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi

Mikroorganizmanın yüksek miktarda levan ürettiği inkübasyon zamanını belirlemek amacıyla inkübasyonun belirli zaman aralıklarında örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 600 nm'de ölçülerek üreme eğrisi çıkartılmış ve üreme eğrisi doğrultusunda üretilen biyopolimer değerlendirilmiştir.

3.5.2. Üreme Ortamındaki Azot Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi

Türü belirlenen mikroorganizmanın hangi azot kaynaklarında daha fazla levan üretimi gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla Üre, Amonyum nitrat, Sodyum nitrat, Maya özütü, Pepton, Tripton, Amonyum karbonat, Malt, Amonyum sülfat, Kazein ve Amonyum okzalat olmak üzere 11 çeşit farklı azot kaynağı kullanılmıştır. Bunun için her bir besiyerinde içerik

sabit olup sadece azot kaynağında değişiklik yapılmıştır. İnokülasyon sonrası besiyerleri 48 saat 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.3. Levan Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

Yüksek verimde levan eldesi için uygun pH'yı belirlemek amacıyla mikroorganizma 3,4,5,6,7,8,9,10 pH değerlerinde hazırlanan besiyerlerine inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası besiyerleri 48 saat 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.4. Üretim Ortamı Sıcaklığının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Mikroorganizmanın sıcaklığa göre biyopolimer üretim verimini belirlemek amacıyla kültürler inokülasyondan sonra 25°C, 30°C, 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çalkalamalı inkübasyonun yanı sıra kültürler aynı zamanda 25°C, 30°C, 37°C'de statik olarak 48 saat inkübe edilmiştir.

3.5.5. Levan Üretimi İçin Uygun Sukroz Miktarının Belirlenmesi

Yüksek miktarda levan eldesi için besiyerleri %1, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 oranında sukroz içeriğinde hazırlanarak uygun sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiştir.

3.5.6. Üreme Ortamındaki Karbon Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi

Besiyerlerine karbon kaynağı olarak %15 içeriğinde Glukoz, Fruktoz, Sukroz, Mannitol, Glukoz+Fruktoz, Glukoz + Sukroz, Fruktoz+Sukroz ve

Glukoz+Fruktoz+Sukroz, Sukroz+Mannitol ilave edilerek kültürler uygun sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.6.1. Üreme Ortamındaki Mannitol Miktarının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

%0,5, %1, %1,5, %2, %2,5, %3 mannitol ilave edilerek hazırlanan %15 sukroz içerikli besiyerleri uygun sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmış ve üretilen levan miktarı değerlendirilmiştir.

3.6. Levan Verimi

3.6.1. İndirgen Şeker Analizi

Çeşitli optimizasyonlar sonucu elde edilen levanın fruktoz miktarının (indirgen şekerin) belirlenmesi amacıyla dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi [180] kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 0.09, 0.18, 0.27, 0.36 mg/mL fruktoz içeren standart çözeltiler hazırlanmış ve okumalar spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.6.2. Toplam Şeker Analizi

Fermentasyondan sonra levana etil alkolle çöktürülerek ayrılmıştır. Süpernatanda bulunan kalan şeker miktarının tespiti için Fenol-Sülfirik Asit yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 20, 40, 60, 80, 100 mg/L sukroz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve okumalar spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.6.3. Levan Üretiminde Verimlilik Hesapları

Dönüşüm verimi, fermentasyon sonucu elde edilen levana ile besiyeri içerisinde substrat olarak kullanılan sukrozun birbirine yüzdesel oranı şeklinde tanımlanmaktadır. Bu değer ile fermentasyonda kullanılan sukrozun kaçta kaçının levana üretimi için harcadığı belirlenebilmektedir. Substrat (sukroz), ürünün (levana) yanı sıra mikroorganizmal

metabolizma için de harcanabileceği için, harcanan substrat başına oluşan ürünün hesaplanması bu durumda önem kazanmaktadır. Verimlilik hesapları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Dönüşüm verimi, \%} = P / (S_0 - S)$$

P: Fermantasyon sonucu oluşan levan (ürün), g/L
S₀: Başlangıçta ortamda bulunan sukroz (substrat), g/L
S: Fermantasyon sonunda kullanılmadan kalan sukroz, g/L

$$\text{Efektif Verim} = P / S_0$$

P: Fermantasyon sonucu oluşan levan (ürün), g/L
S₀: Başlangıçta ortamda bulunan sukroz (substrat), g/L

3.7. Film Örneklerinin Hazırlanması

Antimikrobiyal yüzey olarak kullanılması düşünülen filmler %1 asetik asit çözeltisinde çeşitli kompozisyonlarda hazırlanmıştır (Çizelge 3.1.) Plastikleştirici olarak polietilen glikol (PEG 1500, Sigma) ve gliserol (%99,5, Sigma) kullanılmıştır. Sodyum bentonit kil KarBen Kimya Enerji Madencilik Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi tarafından temin edilmiştir. Kilin XRD ve XRF özellikleri Ek 1.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Polimer katkılı farklı kompozisyonlardaki film örnekleri içerikleri.

	POLİMER (g)	GLİSEROL (mL)	PEG (g)	SODYUM BENTONİT (g)	%1 ASETİK ASİT (mL)
GLG1	5,0	2,0	-	-	50,0
GLG2	5,0	-	-	2,0	50,0
GLG3	2,5	1,0	-	0,5	25,0
GLG4	2,5	-	1,0	0,5	25,0
GLG5	5,0	-	1,0	0,5	25,0
GLG6	5,0	1,0	-	2,0	50,0
GLG7	5,0	1,0	-	3,0	50,0
GLG8	5,0	1,0	-	4,0	50,0
GLG9	5,0	2,0	-	2,0	50,0
GLG10	10,0	2,0	-	2,0	50,0
GLG11	5,0	3,0	-	2,0	50,0
GLG12	5,0	1,5	-	2,5	50,0

3.8. Film Örneklerinin Karakterizasyonu

3.8.1. Su Buharı Geçirgenliği

Hazırlanan filmlerin su buharı geçirgenlik özellikleri ASTM (American Society for Testing and Materials)'nin belirlemiş olduğu prosedür B, E96-66 yöntemine göre test edilmiştir. Deney kabı olarak su buharı geçirmeyen numune kapları tasarlanmıştır. Tasarlanan deney kaplarının içerisine deney kabının üçte ikisi kadar su koyulduktan sonra hazırlanmış olan örnek filmler yerleştirilmiş, kapların kapakları sıkıca kapatılmış ve parafilmelenmiştir (Şekil 3.1.). Hazırlanan örnekler (kap+film+su) ayrı ayrı hassas terazide tartılmıştır. Örnekler sodyum aljinat içeren 23°C'deki

desikatöre yerleştirilmiş ve 24,48,72,96 ve 120 saat dilimlerinde tartılarak kaybettikleri su miktarı ölçülmüştür. Su buharı geçirgenliği;

$$WVT = \frac{g}{t \times a}$$

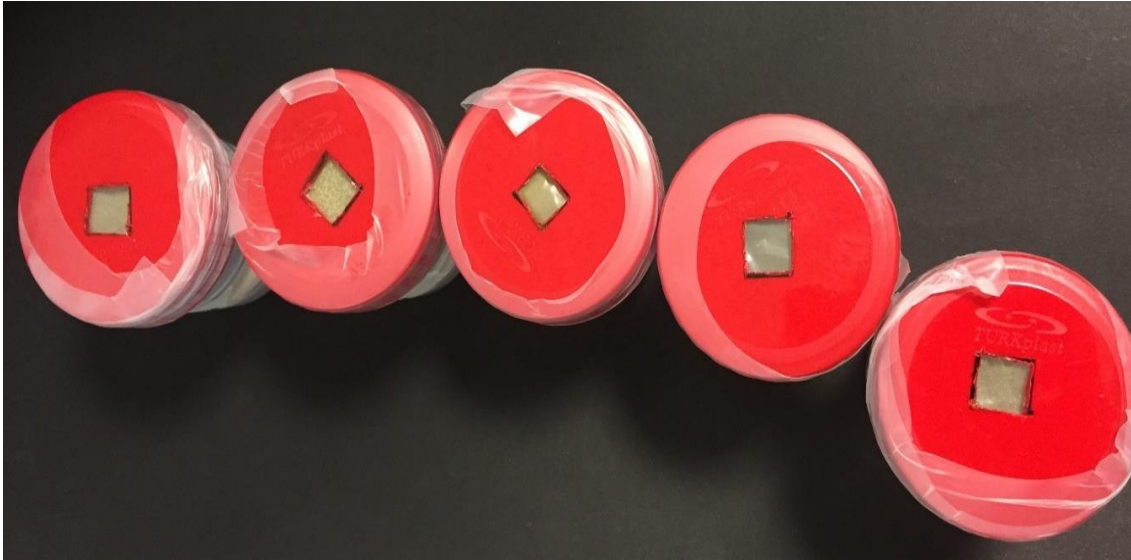
eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Burada;

WVT (water vapor transmission): Su buharı geçirgenliği

g: kaybedilen kütle miktarı (g)

t (time): zaman (saat)

a: film alanı (m²)



Şekil 3.1. Su buharı geçirgenliği testi için tasarlanan numune kapları.

3.8.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Film örnekleri azot gazı atmosferinde, dakikada 10°C ısıtma hızıyla 0-600°C arasında analiz edilmiştir.

3.9. Antimikrobiyal Etki

Yapılan analizler doğrultusunda en uygun film kompozisyonu belirlenerek 1 mg'ı 1 mL steril distile suda çözülen LL-37 antimikrobiyal peptidi çeşitli konsantrasyonlarda (5 µg/µL, 20 µg/µL, 100 µg/µL, 300 µg/µL, 500 µg/µL) bu kompozisyona ilave edilmiş ve homojenize oluncaya kadar karıştırılmıştır. Elde edilen karışım petrilere dökülerek 37°C'de kurumaya bırakılmıştır. Hiç LL-37 antimikrobiyal peptidi içermeyen film kompozisyonu kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saat kurutma sonrası alınan filmler antibiyotik diski boyutunda kesilerek (5 mm) UV altında sterilizasyona bırakılmıştır.

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır [181]. Bu amaçla Gram pozitif örnek olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Gram negatif örnek olarak *E. coli* ATCC 35218, maya olarak *Candida albicans*, küf olarak ise *Aspergillus niger* kullanılmıştır. *E. coli* ve *S.aureus* 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanmış ve Muller Hinton Agar (MHA, Merck)'a 0,1 mL miktarında inoküle edilmiştir. *Candida albicans* suşu da 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanmış ve Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)'a 0,1 mL inoküle edilmiştir. 1×10^6 /mL spor içeren *Aspergillus niger* kültüründen 0,1 mL alınarak Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)' a inoküle edilmiştir. Yayma ekim yapılan petri plaklarına UV'de steril edilmiş olan LL-37 içeren ve içermeyen filmler antibiyotik diski gibi yerleştirilmiş ve bakteri örnekleri 37°C'de, fungus örnekleri 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

LL-37 ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki film örneklerinin antimikrobiyal etkileri çeşitli antibiyotikler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Karşılaştırma için kullanılan antibiyotikler, çeşitli yara/yanık kremlerinde ve merhemlerde yer alan antibiyotiklerden seçilmiştir. Çalışmada Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için kullanılan antibiyotikler; Fusidic acid (FA) (10 mcg), Bacitracin (B) (10

u), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg), Cephalexin (CL) (30 mcg), Mupirocin (MUP) (5 mcg), Metronidazole (5 mcg) (MET)'dür. Funguslar için ise Voriconazole (VOR) (1 mcg), Flucytosine (5FC) (1 mcg), Miconazole (MCZ) (10 mcg), Ketoconazole (KTC) (10 mcg) antibiyotikleri LL-37 antimikrobiyal peptidi içeren farklı konsantrasyonlardaki filmlerin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

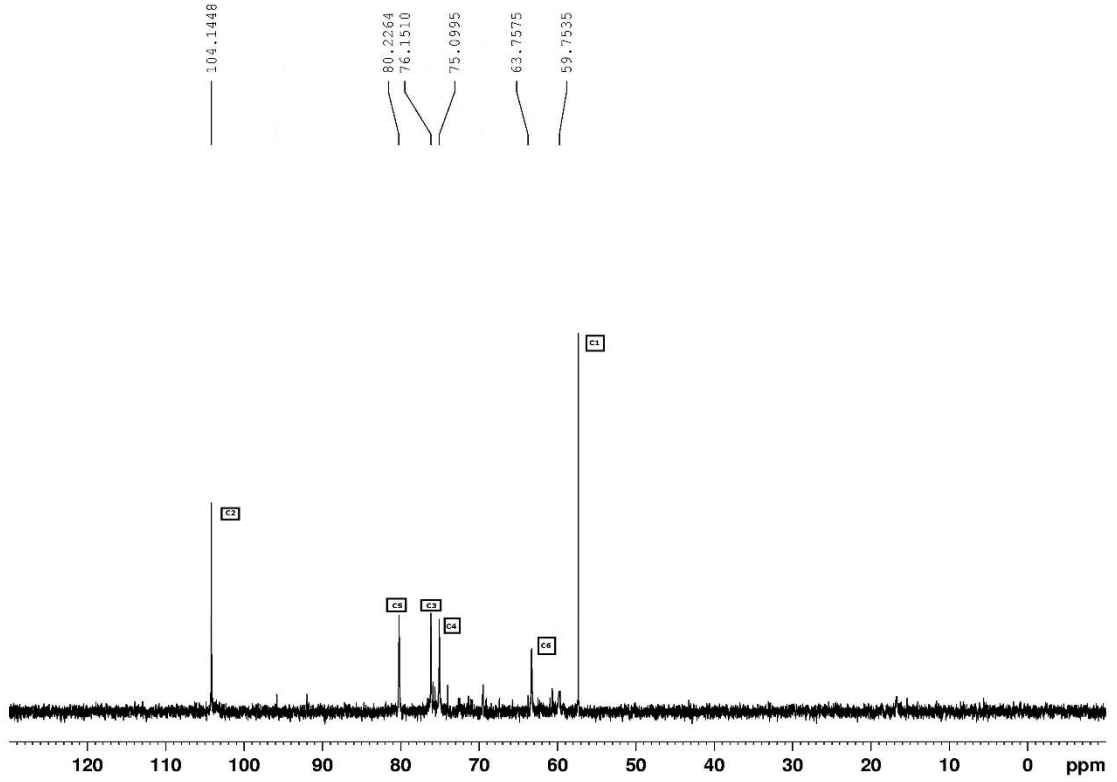
Çeşitli bölgelerden alınan toprak örnekleri %5 sukroz içeren Nutrient Agar besiyerlerine inoküle edilmiş ve inkübasyon sonrası elde edilen koloniler incelenmiştir. Levan üreten mikroorganizmalar kubbe şeklinde mukoid özellikte koloniler oluşturmuştur. Üreme sonrası en fazla mukoid özellik gösteren ve büyük kubbe şeklinde olan 3 mikroorganizma saflaştırılarak, saf kültür elde edilmiş ve kültürler tür tayinine gönderilmiştir.

4.1. Mikroorganizma Türünün Belirlenmesi

İzole edilen mikroorganizma türlerinin belirlenmesi için kültürler 16S rRNA analizine gönderilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların analiz sonucu %99 benzerlikle *Paenibacillus polymyxa*, %81 benzerlikle *Bacillus licheniformis*, %94 benzerlikle *Pseudomonas mandelii* olduğu belirlenmiştir. Literatür taraması yapıldığında *Pseudomonas mandelii* ile ilgili levan üretimine dair bu prosedürde hemen hemen hiç çalışmaya rastlanmadığı için çalışmanın özgünlüğü açısından araştırmamıza bu mikroorganizma ile devam edilmesi uygun görülmüştür.

4.2. Biyopolimer Karakterizasyonu

Pseudomonas mandelii'den levan üretim prosesi sonucunda elde edilen polimerin karakterizasyonu için karbon analizi (^{13}C NMR) (Şekil 4.1.) ve proton analizi (^1H NMR) (Şekil 4.2.) Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümünde, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (Şekil 4.3.) Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır. Sonuçlar çeşitli levan verileriyle karşılaştırılmış (Çizelge 4.1.) ve elde ettiğimiz polimer piklerinin karşılaştırılan levan pikleri ile örtüştüğü gözlemlenmiştir.

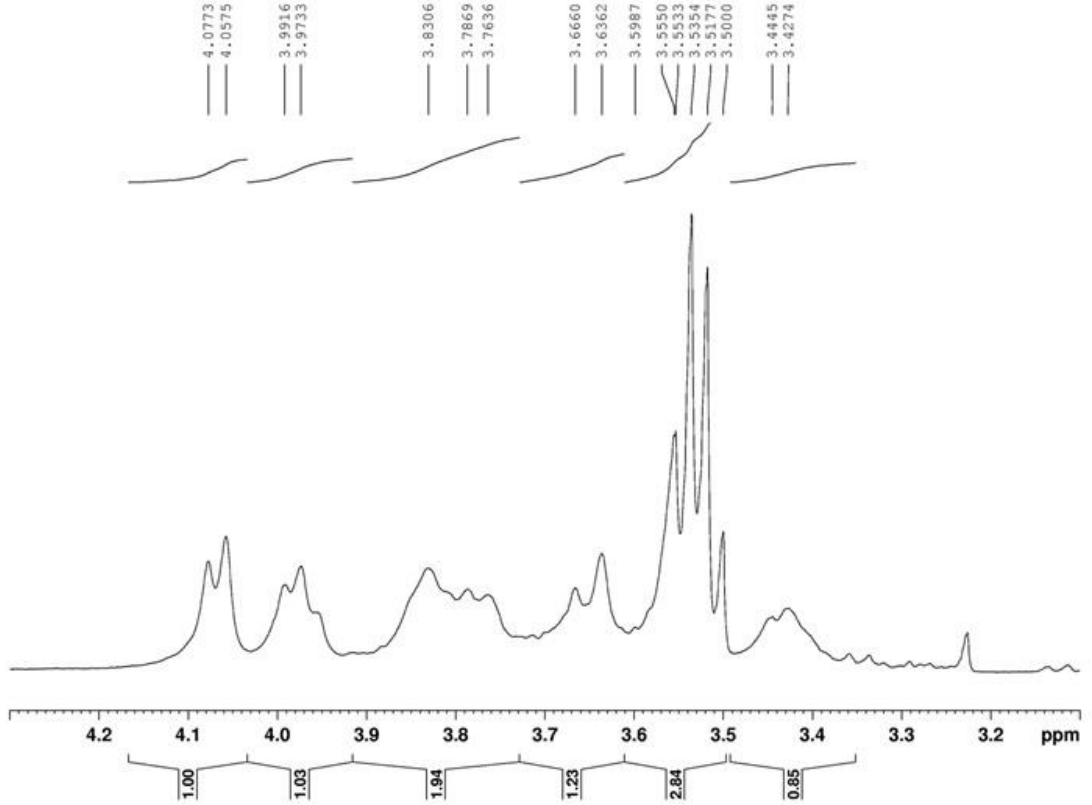


Şekil 4.1. *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levanın ^{13}C NMR analizi.

Çizelge 4.1. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen levanın karbon kimyasal kaymalarının karşılaştırılması.

LEVAN ÜRETELEN MİKROORGANİZMALAR	İZOLE EDİLEN LEVANIN KARBON KİMYASAL KAYMALARI (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>Zymomonas mobilis</i>	60.767	104.641	77.683	75.754	80.783	63.957
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	60.435	104.696	76.770	75.783	80.880	63.978
<i>Bacillus licheniformis</i>	59.78	104.18	76.18	75.12	80.26	63.35
<i>Pseudomonas mandelii</i>	59.753	104.144	76.151	75.099	80.226	63.757

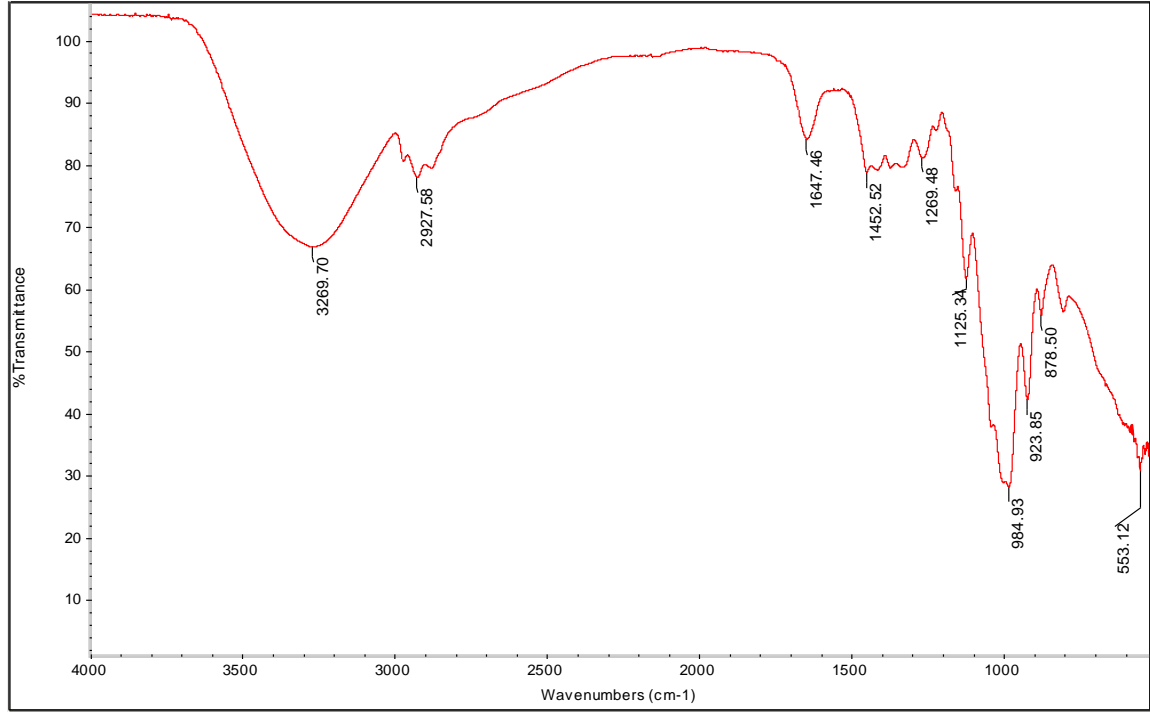
Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen levanın ^{13}C NMR sonuçları karşılaştırıldığında, tüm levan spektrumlarındaki karbon sinyalleri [128], [129] *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levanla kimyasal kaymalar açısından benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.2. *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levanın ^1H NMR analizi.

^1H NMR spektrumu *Pseudomonas mandelii* ile üretilen polisakkarit (2 → 6) fruktofuranosidin, levan tipi olduğunu belirten 3.4 ve 4.2 ppm arasında yedi protona sahip olduğunu göstermektedir. Anomerik bölgede (5.3 ile 4.3 ppm) herhangi bir sinyal gözlenmemiş olup anomerik protonların olmadığı doğrulanmıştır. Spektrumun sadeliği, bu polisakkaridin, fruktozun bir homopolimeri olduğunu yansıtmaktadır. *Erwinia herbicola*, *Acetobacter xylinum* ve *Bacillus subtilis* (Natto) gibi

mikroorganizmalardan elde edilen levan, NMR analizinde aynı yapı özelliklerini göstermektedir [130]–[132].



Şekil 4.3. *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levanın FTIR analizi.

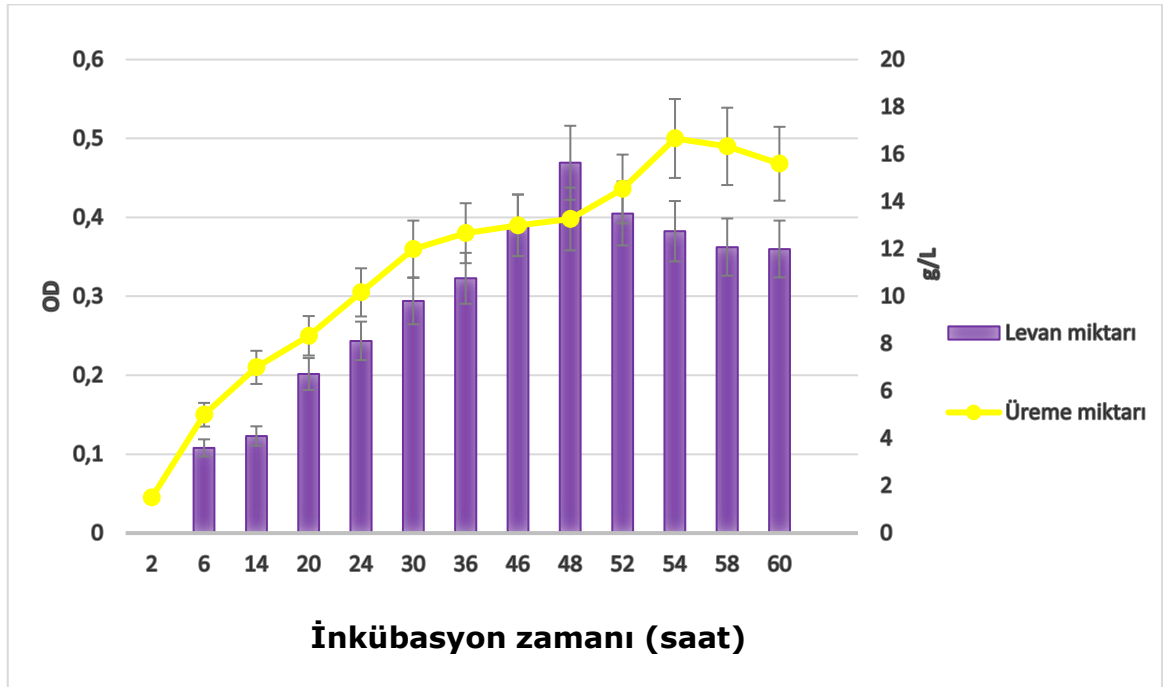
Bu biyopolimerin, saf ve ticari levan ile benzerliğine dayanarak levan tipi bir polisakkarit olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, Barone ve Medynets tarafından özetlenen örnek spektrum ile elde edilen bu FTIR spektrumundaki karakteristik piklerin yüksek miktarda uyuşma sağladığı gösterilmektedir [133].

Yapılan ^{13}C NMR, ^1H NMR ve FTIR analizleri ile elde edilen biyopolimerin levan olduğu literatür karşılaştırmaları yapılarak doğrulanmıştır.

4.3. Biyopolimer Üretim Optimizasyonu

4.3.1. Levan Sentezi İçin Uygun İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi

Mikroorganizmanın yüksek miktarda levan ürettiği inkübasyon zamanını belirlemek amacıyla örnekler farklı zamanlarda 600 nm’de ölçülmüş, örneklerin üreme eğrisi çıkartılmış ve üreme eğrisi ile birlikte elde edilen biyopolimer değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *Pseudomonas mandelii*'nin kültür ortamında zamana göre üreme ve levan üretme miktarı.

Yapılan ölçümler değerlendirildiğinde en yüksek üremenin 54. saate, en yüksek levan üretiminin ise 48. saatte 15,64 g/L olarak gerçekleştiği görülmektedir. Başlangıç pH'sı 7.0 olan besiyerinin inkübasyon sonunda 5.6 ± 0.5 değerine düştüğü ölçülmüştür.

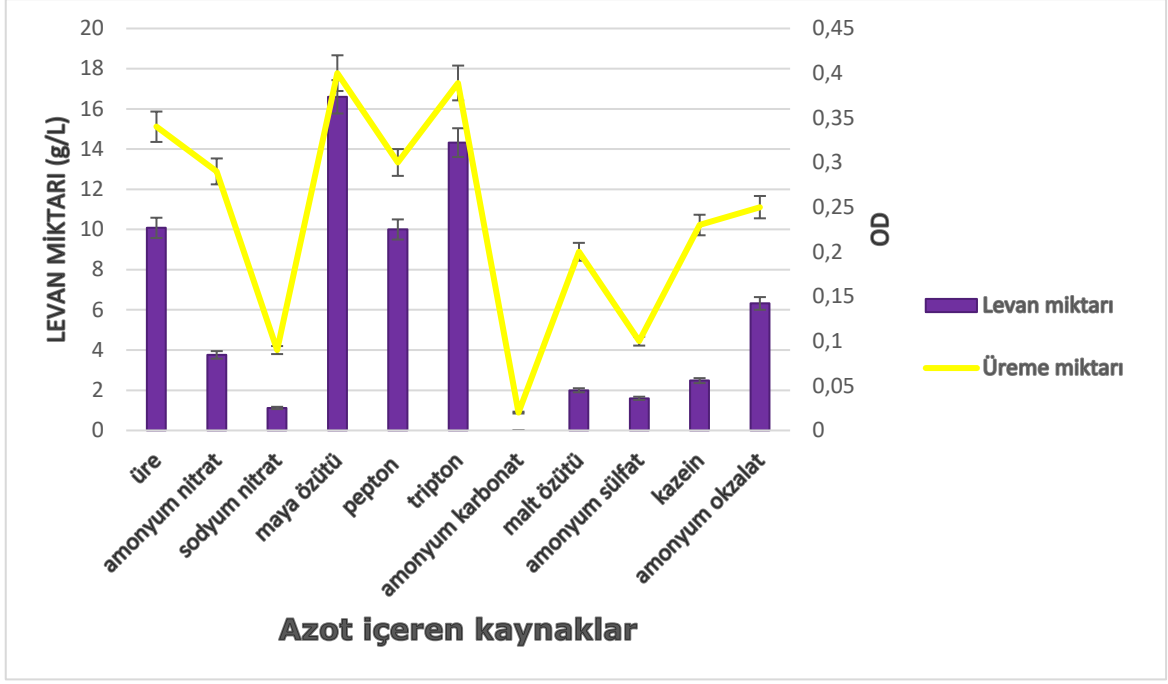
Szwengiel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada besiyerinde %10 sukroz içeren deney ortamında levanın zamana göre artışı incelenmiştir. 32°C'de inkübasyona bırakılan *Bacillus subtilis DSM 347*, en yüksek levan üretimini 9,55 g/L olmak üzere 56. saatte, 37°C'deki inkübasyonunda ise 42,24 g/L olarak 36. saatinde gerçekleştirmiştir [134]. Çalışmamızda inkübasyonun 48. saatinde elde edilen değerlerin bu veriler arasında yer alması hem üretim sıcaklığı hem de mikroorganizma farkı nedeniyle olabileceği ileri sürülebilir.

Şilbir ve arkadaşları 2013'te *Zymomonas mobilis*'ten levan üretimi gerçekleştirmişlerdir. %15 sukroz içeren ortamda 48. saate kadar levan miktarında artış gözlenmiş daha sonra levan miktarında düşüş tespit edilmiştir. 48. saatte elde edilen levan miktarı $15,52 \pm 0,43$ g/L olarak belirlenmiştir [135]. Buradan elde edilen levan miktarı çalışmamızdaki verime yakın bir değerde gerçekleşmektedir.

Bekers ve arkadaşları, kültür ortamındaki levanın bozulmasını asit hidrolizi ile açıklamaktadır. *Zymomonas mobilis* tarafından üretilen organik asitlerin pH'yı düşürdüğü ve levanı hidrolize ettiği, indirgen şekere dönüşen levanın da karbon kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir [136]. Bu durum üretimimiz sonucunda ortam pH değerinin düştüğünü gözlemlediğimizi destekleyen bir bulgudur.

4.3.2. Üreme Ortamındaki Azot Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi

Pseudomonas mandelii, kullanılan azot içeren kaynaklar içerisinde en fazla levan üretimini maya özütü içeren ortamda gerçekleştirmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Çeşitli azot kaynaklarının levana sentezine etkisi.

48 saat inkübasyon sonrası *Pseudomonas mandelii*'nin azot kaynağı olarak maya özütü kullanarak ürettiği levana miktarı 16,6 g/L olarak belirlenmiştir. Maya özütünden sonra en yüksek levana üretimi ise azot kaynağı olarak kullanılan triptonda 14,32 g/L olarak ölçülmüştür. Maya özütünde ve triptonda gerçekleşen üreme miktarları birbirine oldukça yakındır. Sırasıyla üre (10,08 g/L), pepton (10 g/L), amonyum okzalit (6,32 g/L), amonyum nitrat (3,76 g/L), kazein (2,48 g/L), malt özütü (2 g/L), amonyum sülfat (1,6 g/L), sodyum nitrat (1,12 g/L) azot kaynaklarının ise kullanılan maya özütüne göre daha düşük levana verimi gösterdiği belirlenmiştir. Amonyum karbonatta hem üreme ve buna bağlı olarak levana üretimi kullanılan azot kaynakları içerisinde en düşük miktarda gerçekleşmiştir. Şekil 4.5.'te görüldüğü gibi sentez ile üreme miktarları arasında doğrusal bir ilişkiden söz edilebilir.

Bekers ve arkadaşlarının çalışmasında çeşitli üretim ortamlarında *Zymomonas mobilis* ile etil alkol ve levana üretimini incelenmiştir. Çalışmada, azot kaynağı olarak maya özütü, piriç destilatı ve şeker

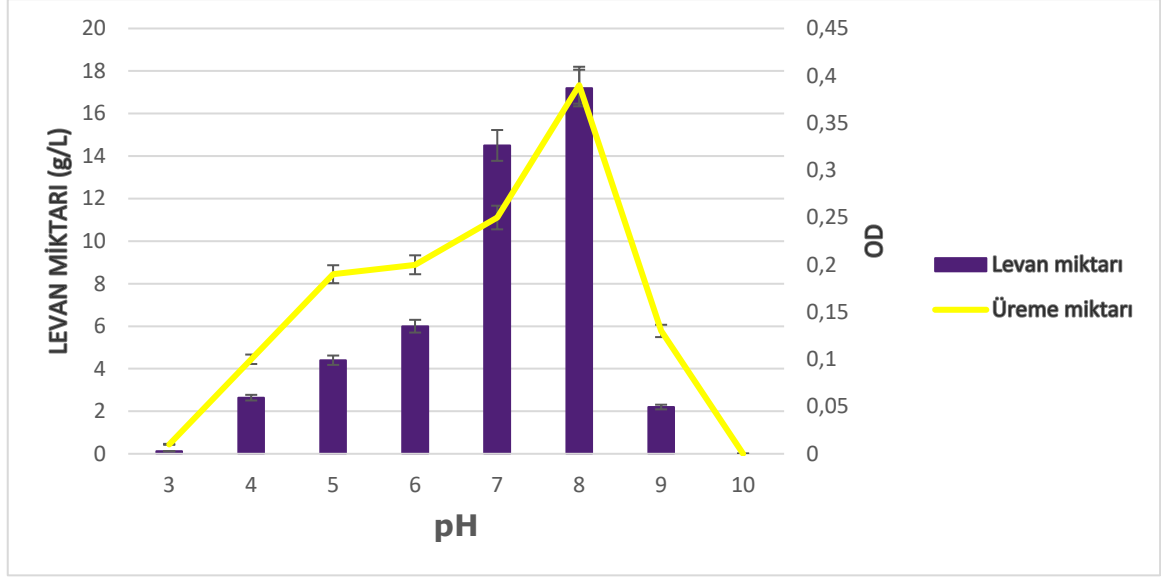
pancarından elde edilen melas sukroz içeren üretim ortamına ilave edilmiş, bu kaynakların levan ve etil alkol üretimine olan etkileri araştırılmıştır. En yüksek etanol ve levan üretimi sırasıyla melas ve maya özütü kullanıldığı ortamlardan elde edilmiştir [137].

Mikroorganizmaların üremesi ve enzim üretimi azot kaynağından etkilenmektedir. Dahech ve arkadaşlarının çeşitli termofilik bakterilerle yaptığı levan üretim çalışmasında maya özütü, sodyum nitrat, tripton, üre, amonyum sülfat ve bunların çeşitli kombinasyonları azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışma bulgularına göre en iyi verim %2 oranında maya özütü ve sodyum nitrat içeren üreme ortamında gerçekleşmiştir [138].

Wahyuningrum ve arkadaşlarının 2015'teki çalışmasında levan üretimi için *Bacillus licheniformis* BK AG21 suşu kullanılmıştır. Levan üretim besiyerinde maya özütü, sığır özütü, tripton, pepton, amonyum sülfat, amonyum klorid, sodyum nitrat ve üre azot kaynağı olarak yer almaktadır. Maya özütü ve pepton içeren ortamda levan üretiminin en yüksek olduğu görülmektedir [139]. Bu çalışmalar, azot kaynağının levan üretimini etkilediğini göstermektedir.

4.3.3. Levan Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

Yüksek verimde levan elde etmek için farklı pH değerlerinde hazırlanan besiyerlerine inoküle edilen *Pseudomonas mandelii*, inkübasyon sonrası en yüksek levan verimini pH 8'de göstermiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Farklı pH değerlerinde levan verimi ve üreme miktarları.

Üretim besiyerinin pH 8'de olduğu koşullarda *Pseudomonas mandelii*'nin ürettiği levan miktarı 17,2 g/L olarak bulunmuştur. pH 3 değerinde üreme miktarı buna bağlı olarak levan üretimi de düşük miktardadır. pH 10'da ise üreme gerçekleşmemiş olup levan üretimi de söz konusu değildir.

Ananthalakshmy ve Gunasekaran, *Zymomonas mobilis* B-4286 suşu ile yaptıkları çalışmada farklı başlangıç pH değerlerinde levan üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar en yüksek levan verimini 150 g/L sukroz konsantrasyonunda ve pH 5'te 14.5 g/L olarak ölçmüşlerdir. Kullanılan mikroorganizmanın pH 4'ün altında üremesinin düşük olması levan üretimini de etkilemiştir [140].

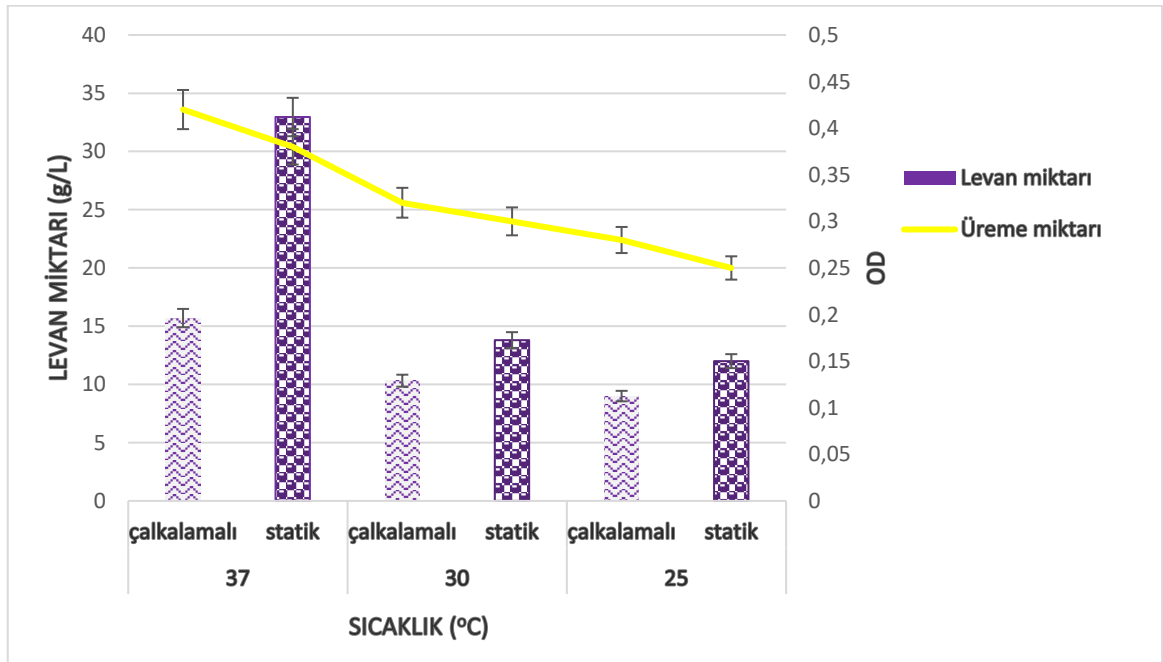
Shanter AL-Qaysi ve arkadaşlarının 2016'da yaptıkları çalışmada, topraktan *Pseudomonas brassicacearum* izole ederek bu mikroorganizmadan levan üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada levan üretiminin çeşitli optimizasyonlarına yer vermişlerdir. Levan üretiminde pH 7, 7.5, 7.8, 8, ve 8.5 denenerek pH'nın etkisi

incelenmiştir. En yüksek levan üretimi pH 7.8'de 7.77 ± 0.05 g/L olarak bulunmuştur [141].

İnkübasyon ortamı pH'sının hücre zarını, besin maddelerinin alınımını ve EPS biyosentezini etkileyebilecek önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Biyokütle ve polisakkarit üretimi için farklı optimum pH koşullarına ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin, Liu ve arkadaşlarının *P. polymyxa* EJS-3'ün levan üretimi için buldukları optimum başlangıç pH'sı 8.0 iken bakteri üremesi için bulunan pH 6.0'dır [147].

4.3.4. Üretim Ortamı Sıcaklığının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Mikroorganizmanın sıcaklığa göre levan üretim verimini belirlemek amacıyla hem farklı sıcaklıklar denenmiş hem de statik ya da çalkalamanın etkisi incelenmiştir. *Pseudomonas mandelii* 37°C sıcaklıkta ve statik koşulda en fazla levan üretimini gerçekleştirmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Levan üretiminde sıcaklık optimizasyonu.

Pseudomonas mandelii 37°C sıcaklıkta ve statik koşullarda üretildiğinde elde edilen levan miktarı 32,96 g/L olmaktadır. Grafikler değerlendirildiğinde, sıcaklık düştükçe polimer üretiminde azalma görülmektedir. Çalkalamalı koşullar da levan üretim verimini düşürmektedir. Çalkalamalı koşullarda üremenin devam ediyor olması levan üretime henüz geçilememiş olabileceğini göstermektedir.

Ernandes ve Garcia-Cruz'un yaptıkları çalışmada, *Z. mobilis* CCT 4494 litrede 200 gram sukroz içeren besiyerine, pH 8'de inoküle edilmiş ve sıcaklıklar 25°C, 30 °C, 35 °C'ye ayarlanarak inkübasyona bırakılmıştır. 25°C'de 55.7 (± 0.1) g/L, 30 °C'de 68.8, 35 °C'de ise 37.3 g/L olmak üzere en yüksek levan verimi 30 °C'de görülmüştür [143].

Melo ve arkadaşları, levan üretim optimizasyonları sırasında levan üretiminde sıcaklığın ve çalkalama hızının etkisini de incelemiştir. Çalışmada 50, 75 ve 100 rpm çalkalamada ve 20 °C sıcaklıkta çalkalama hızını 50 rpm'den 100 rpm'e arttırmanın levan üretiminde 5.6 g/'lik bir artışı sağladığını, 30 °C sıcaklıkta ise çalkalamanın levan üretiminde önemli bir artış sağlamadığını belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda levan üretiminde optimum koşulların 100 rpm çalkalama hızı, 20°C sıcaklıkta olması gerektiğine karar vermişlerdir [144].

Ishikawa ve arkadaşları fermantasyon mekanizmasını incelemiştir. Çalkalama, mikroorganizmanın substrata ulaşmasını kolaylaştırdığı gibi aynı zamanda oksijenlenmeyi de arttırmaktadır. Çalkalamanın azalması (≤ 100 rpm) levan verimini arttırmaktadır. 100 rpm'e kadar olan çalkalama ortama gerekli olan oksijeni sağlamaktadır. *Zymomonas mobilis*'e bakıldığında oksijen bu mikroorganizmanın asetaldehitten etanol ve levan üretim metabolik yolunu değiştirmektedir [145].

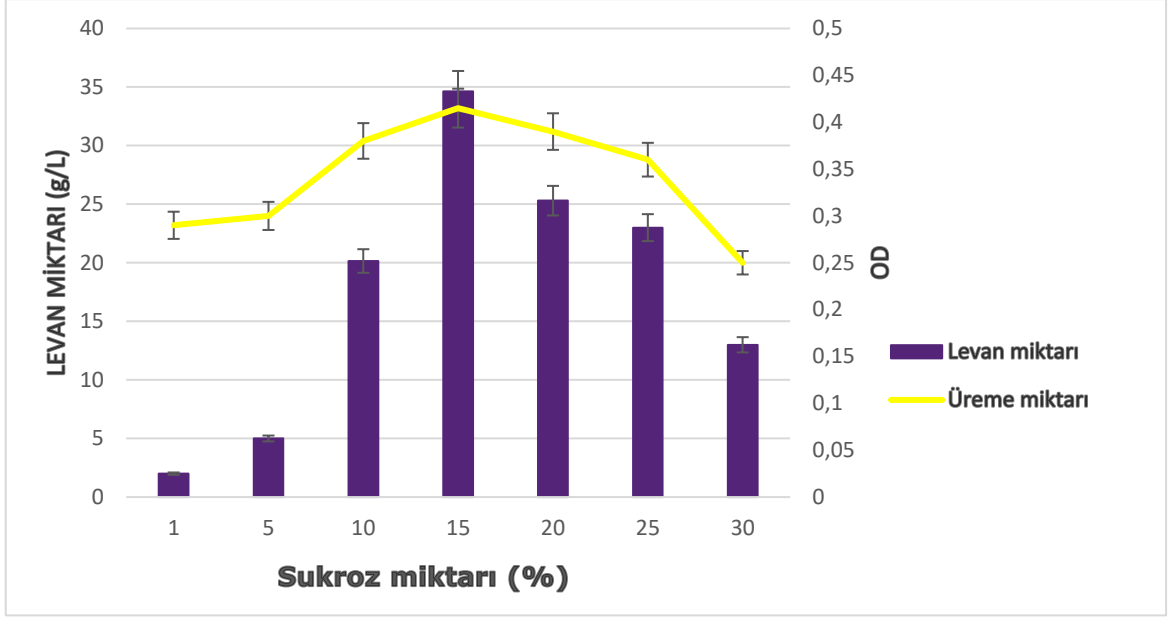
Kekez ve arkadaşlarının 2015'te yaptıkları çalışmada da *B. licheniformis* NS032 suşunda en yüksek levam üretim verimi çalkalama olmaksızın elde edilmiştir [146].

Çalkalamalı üretimle ilgili olarak, levam üreten birçok suş için fermantasyon, orta derecede çalkalama ile gerçekleştirilmiş ve böylece mikrobiyal üreme ve polisakkarit üretimi arasında denge sağlanmıştır. Ayrıca Abdel-Fattah ve arkadaşları çalkalamanın *P. polymyxa* EJS-3 tarafından levansukraz üretimini değil sadece levam verimini etkilediğini bulmuşlardır. Bu, mikrobiyal üremenin en yüksek olduğu koşullarda mutlaka maksimum miktarda metabolit üretme zorunluluğunun olmadığı gerçeğine uygundur. Bunun dışında bazı araştırmacılar da biyoüretim sırasında çalkalama olmaksızın etkili levam üretimi bildirmişlerdir [38], [129], [135], [144], [147], [148].

4.3.5. Levam Üretimi İçin Uygun Sukroz Miktarının Belirlenmesi

Pseudomonas mandelii'den en yüksek verimde levam üretmek amacıyla değişik miktarlarda sukroz içeren besiyerleri hazırlanmıştır. *Pseudomonas mandelii* 34,64 g/L olmak üzere en yüksek levam üretimini %15 sukroz içeren besiyerinde gerçekleştirmiştir. En düşük levam üretimi ise %1 sukroz içeren besiyerinde ölçülmüştür. (Şekil 4.8.).

Optimize edilmediyse başlangıç sukroz konsantrasyonu fermantasyon sürecinde şekerin eksik kullanılmasına neden olabilir [135], [149]. Sukroz konsantrasyonunun levam verimliliği üzerinde önemli bir etkisi olduğu bulunmuştur ve dolayısıyla levam üretim verimini arttırmak sukroz optimizasyonu dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Örneğin, *Bacillus subtilis*, sukroz açısından zengin besiyerinde üretilirse daha fazla levam elde edilebilir [132], [150], [151].



Şekil 4.8. Levan üretiminde sukroz miktarının optimizasyonu.

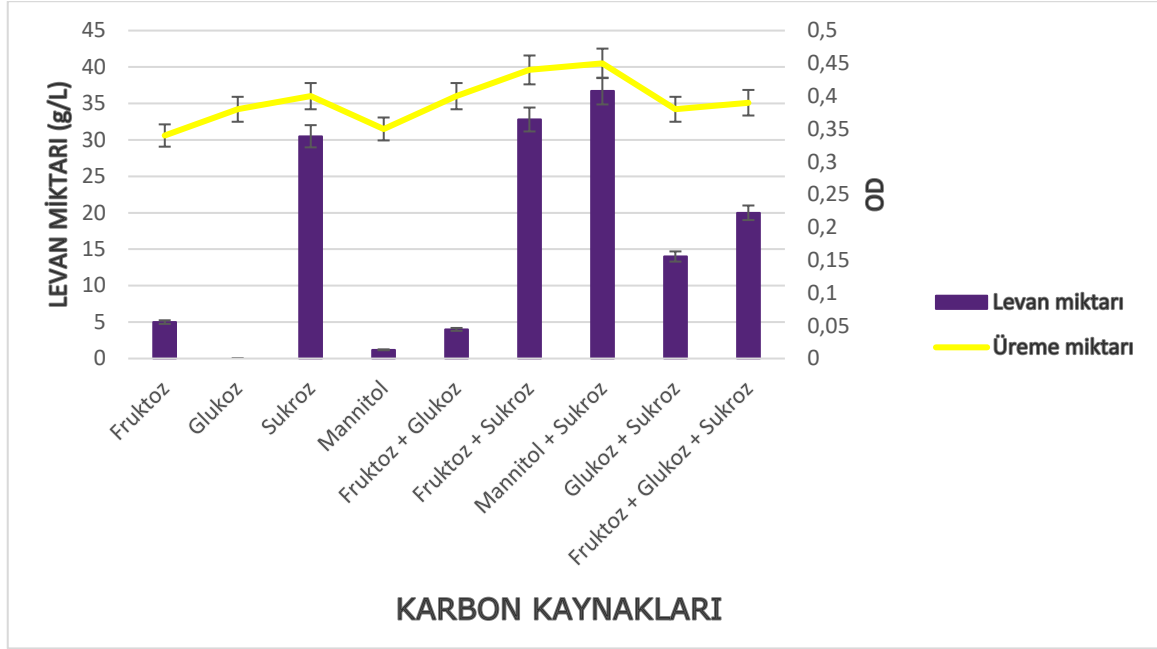
Lazaridou ve arkadaşları, yüksek şeker konsantrasyonunun, ozmotik basıncı etkilemesi ve düşük su aktivitesine neden olmasından dolayı mikrobiyal polisakkaritlerin üretimini düşürdüğünü rapor etmişlerdir [152], [155].

Srikanth ve arkadaşlarının 2015'teki çalışmaları *Acetobacter xylinum* NCIM2526 suşundan levan üretmek üzerine olmuştur. Araştırmacılar levan üretim koşullarını optimizasyonunda sukrozun da etkisini incelemişlerdir. 50 g / L ve 60 g / L sakkaroz konsantrasyonunda sırasıyla 1.45 g / L ve 1.88 g / L verimle elde edilen levanda belirgin bir artış görülmüştür. Sukrozun 70 g/L ve 80 g /L kullanılmasıyla verim sırasıyla 1,65 g/L ve 1,47 g /L levana düşmüştür [153].

4.3.6. Üreme Ortamındaki Karbon Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisinin Belirlenmesi

Besiyerlerine karbon kaynağı olarak %15 oranında farklı karbon kaynakları ilave edilmesinden sonra en yüksek levan verimi %15 sukroz + mannitol içeren ortamda gerçekleşmiştir. Karbon kaynağı olarak

sadece glukoz içeren besiyerinde mikroorganizma levan üretimi gerçekleştirilememektedir (Şekil 4.9.).



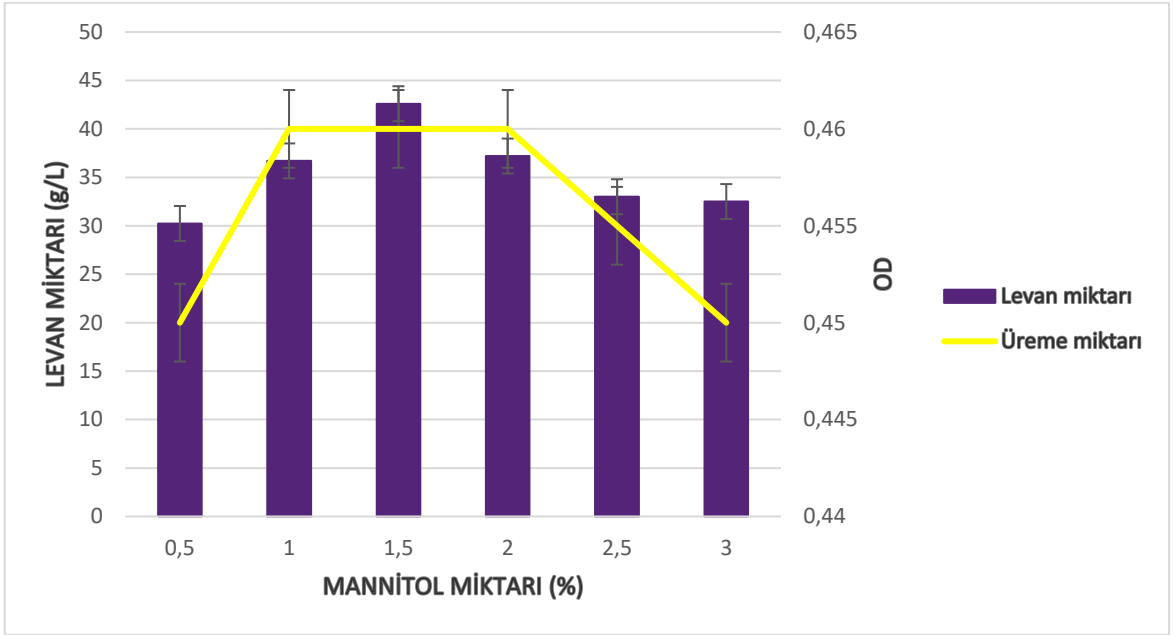
Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının levan verimi ve üreme miktarları üzerindeki etkisi.

Monomerik şekerlerin birikmesi levan üretimini düşürmektedir [154]. Ananthalakshmy ve arkadaşının yaptığı çalışmada ortama 150 g/L glukoz eklenmesi levan üretimini 12.6 g/L'den 2.8 g/L'ye düşürmüştür [140].

Altı karbonlu, siklik olmayan polioller olan manitol, bitkilerde iyi bilinen bir osmotik uyarıcıdır. Mannitol, fruktoza manitol 2-dehidrogenaz enzimi (EC 1.1.1.67) ile dönüştürülebilir. Yapılan çalışmalarda manitolün *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter xylinus* KCCM 4143171, *Burkholderia cepacia* BTS13 suşları tarafından EPS üretimi ve levan biyosentezi için karbon kaynağı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [156]–[159].

4.3.6.1. Üreme Ortamındaki Mannitol Miktarının Levan Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Levan üretiminde uygun mannitol miktarının belirlenmesi için %15 sukroz içerikli besiyerlerine farklı oranlarda mannitol ilave edildikten sonra uygun sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiş ve en yüksek levan veriminin %1,5 mannitol içeren ortamda gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Değişik mannitol miktarlarının levan verimi ve üreme üzerindeki etkisi.

%15 sukroz ve %1,5 mannitol içeren ortamda *Pseudomonas mandelii*'nin 42,6 g/L levan ürettiği belirlenmiştir. Kullanılan mannitol oranlarına göre mikroorganizmanın üreme miktarları ise birbirine yakın olarak bulunmuştur.

Ateş ve arkadaşlarının 2013'te yaptığı çalışmada halofilik bir mikroorganizma olan *Halomonas smyrnensis AAD^T* levan üretimi için kullanılmıştır. Çalışmada sukroz ve mannitol miktarlarının levan üretimindeki verimi incelenmiştir. Çalışmaya göre en yüksek levan

üretimi 50 g/L sukroz ve 30 g/L mannitol içeren ortamda gerçekleşmiştir [159].

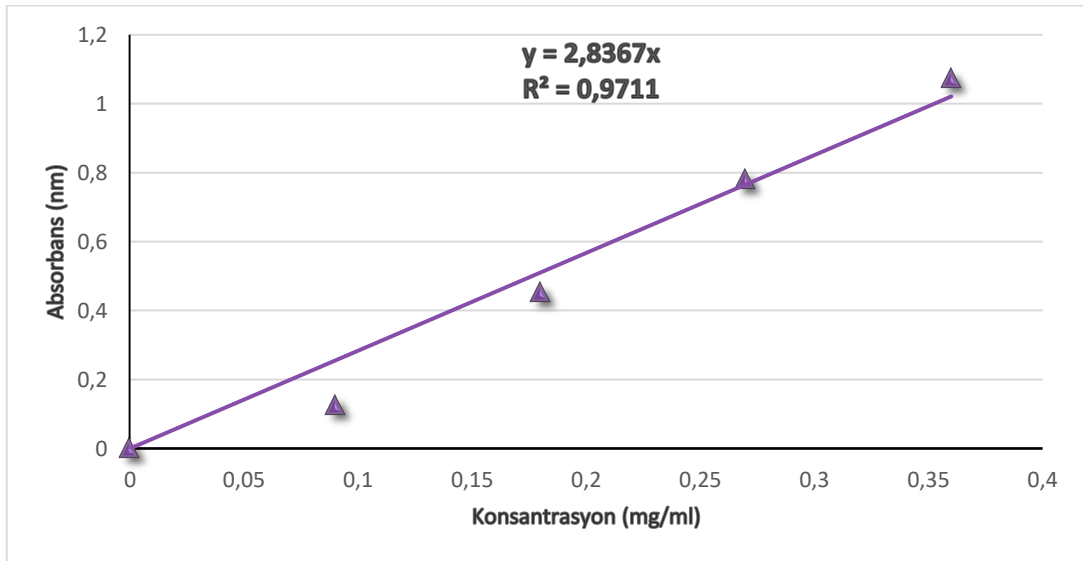
Gluconacetobacter xylinus KCCM 41431 suşunun kullanıldığı benzer bir çalışmada da sukroz ve mannitolün levan biyosentezini uyardığı rapor edilmektedir [157].

Söz edilen veriler ve bizim çalışmamız da göstermektedir ki; besiyeri ortamına mannitol ilavesi sukroz hidrolizini ve indüklenmekte ve glukoz birikimini etkilemektedir [159].

4.4. Levan Verimi

4.4.1. İndirgen Şeker Analizi

Optimizasyonlar sonrası elde edilen levandaki fruktoz miktarı (indirgen şeker) standart grafik (Şekil 4.11.) elde edilerek dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmiştir.

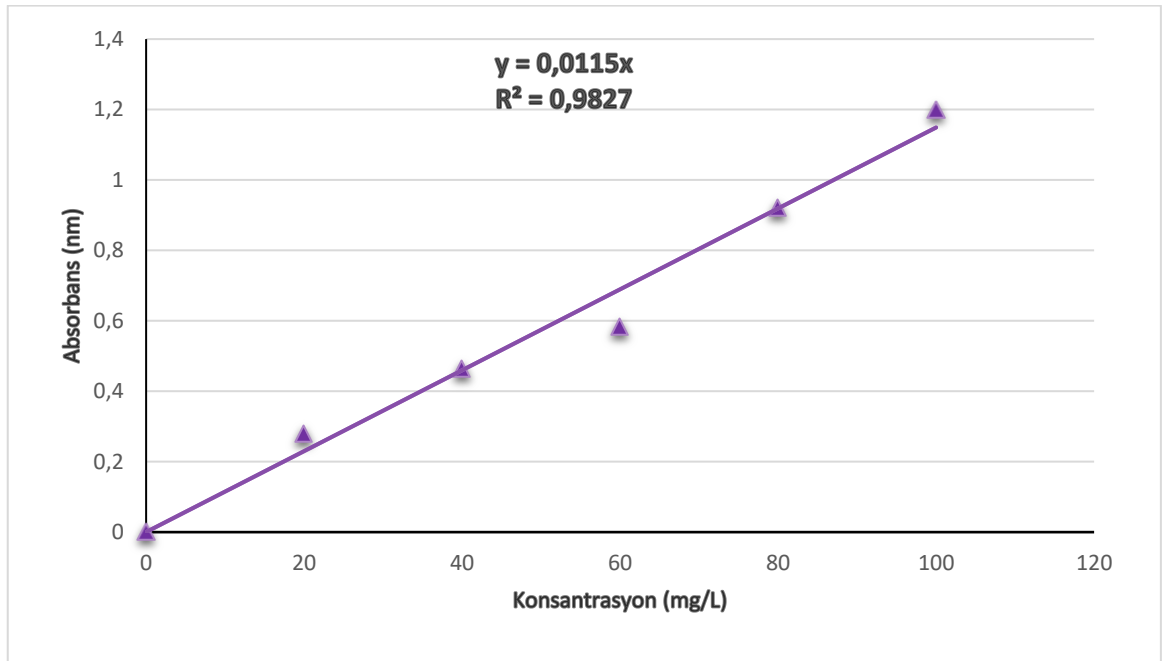


Şekil 4.11. İndirgen şeker analizi standart grafiği (Dalga boyu 540 nm).

Standart grafik incelendiğinde *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levanın 9,58 mg/mL fruktoz içerdiği belirlenmiştir.

4.4.2. Toplam Şeker Analizi

Fermentasyon sonrası levam etil alkolle çöktürülerek ayrılmış ve geriye sıvıda bulunan kalan şeker miktarı standart grafik elde edilerek (Şekil 4.12.) Fenol-Sülfirik Asit yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Kalan şeker analizi standart grafiği (Dalga boyu 490 nm).

Standart grafik incelendiğinde *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levam çöktürüldükten sonra, kalan sıvıdaki sukroz miktarı 40 g/L olarak hesaplanmıştır.

4.4.3. Levam Üretiminde Verimlilik Hesapları

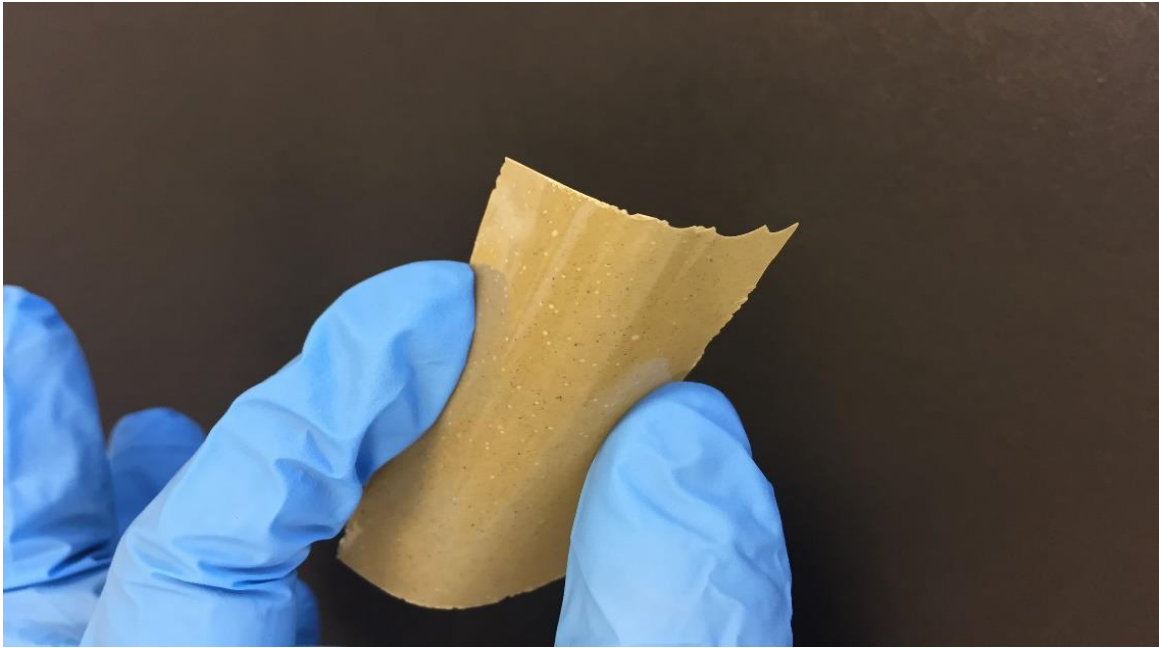
Fermentasyonda kullanılan sukrozun ne kadarının levam üretimi için harcadığı belirlemek amacıyla dönüşüm verimi ve efektif verim hesaplanmıştır.

Pseudomonas mandelii ile fermantasyonda ürün dönüşüm verimi 48.saatin sonunda %37,8 olarak bulunmuştur. Yani besiyerindeki sukrozun %37,8'i levana dönüşmüştür. Efektif verim ise yine 48. saatin sonunda %27,7 olarak bulunmuştur.

Şilbir'in yaptığı çalışmada *Zymomonas mobilis subspecies mobilis NRRL B-806* ile levan üretimi gerçekleştirilmiş, en yüksek ürün dönüşüm verimi fermantasyonun 60. Saatinde %9.29, en yüksek efektif verim 48. saatte % 4.98 olarak hesaplanmıştır [160].

4.5. Film Örneklerinin Hazırlanması

Film örnekleri çeşitli kompozisyonlarda hazırlanmış ve plastikleştirici olarak polietilen glikol ve gliserol kullanılmıştır. Hazırlanan bütün film örnekleri petri kabına dökülerek 37°C'de kurumaya bırakılmıştır. Örnekler değerlendirildiğinde polietilen glikol ile hazırlanmış film örneklerinin petride kurutulduktan sonra çok kırılgan olduğu belirlenmiştir. Gliserol ile hazırlanan film örnekleri (Şekil 4.13.) kurutma sonrası çeşitli esneklikler gösterdiği için çalışmaya gliserolle hazırlanan örneklerle devam edilmiştir.

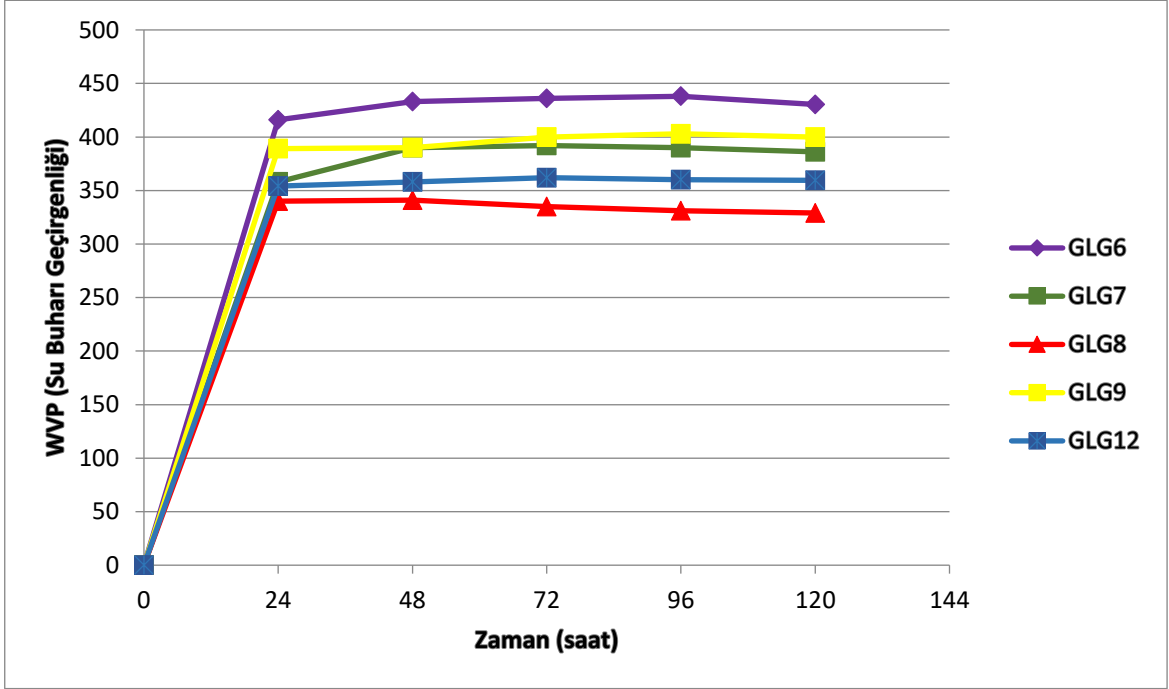


Şekil 4.13. Gliserol ile hazırlanan film örneği.

4.6. Film Örneklerinin Karakterizasyonu

4.6.1. Su Buharı Geçirgenliği

Hazırlanmış olan gliserol içerikli filmlerin su buharı geçirgenlikleri ASTM (American Society for Testing and Materials)'nin belirlemiş olduğu prosedür B, E96-66 yöntemine göre belirlenmiştir (Şekil 4.14.)



Şekil 4.14 Gliserol içerikli filmlerin su buharı geçirgenlikleri.

Su buharı geçirgenliklerine bakıldığında su buharını en verimli şekilde geçiren örneğin GLG6 içerikli film olduğu belirlenmiştir. GLG9 içerikli film içeriğine baktığımızda GLG6'ya göre daha fazla gliserol içerdiği ve gliserol içeriğinin su buharı geçirgenliğinde önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. GLG7'deki kil içeriği GLG6'ya göre daha yüksektir.

Bütün veriler değerlendirildiğinde kil miktarındaki artışın su buharı geçirgenliğindeki etkisi gliserol miktarındaki artışa göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Su buharı geçirgenliği, filmlerde olası kütle transfer mekanizması ve ve polimer etkileşimleri hakkında bir bilgi sağlamaktadır [161].

Gliserol nispeten küçük, hidrofilik bir moleküldür. Polimerik zincirler arasına sokulabilir, moleküller arası kuvvetleri azaltır ve film yapısındaki moleküllerin hareketliliğini arttırır. Artan hareketlilik sayesinde filmin içindeki su buharı moleküllerinin göçü kolaylaşmaktadır [162].

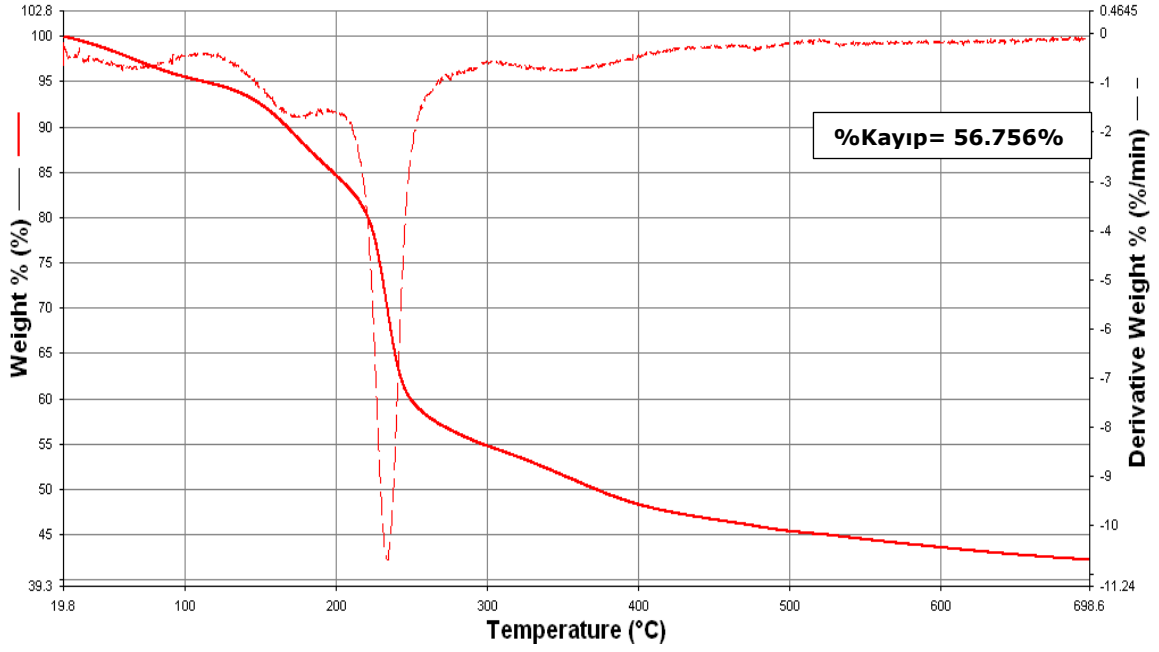
Ghasemlou ve arkadaşları, çeşitli plastikleştirici konsantrasyonlarının film özelliklerine etkisini incelemiş ve farklı plastikleştirici konsantrasyonlarıyla hazırlanan filmlerin su buharı geçirgenliği değerleri arasında önemli bir fark yarattığını belirtmişlerdir [163].

Genel olarak, polimer/kil nanokompozit filmlerin su buharı geçirgenliğinin, kil içeriğindeki artış veya kilin boyutunun artmasıyla katlanarak azaldığı bilinmektedir. Polimer/kil kompozit filmlerin su buharı geçirgenliğini azaltma nedeni temel olarak, polimer matrisinde dağılan geçirimsiz kil katmanlarına bağlı etkin difüzyon yolunun uzunluğunun artmasına dayanmaktadır [164]–[166].

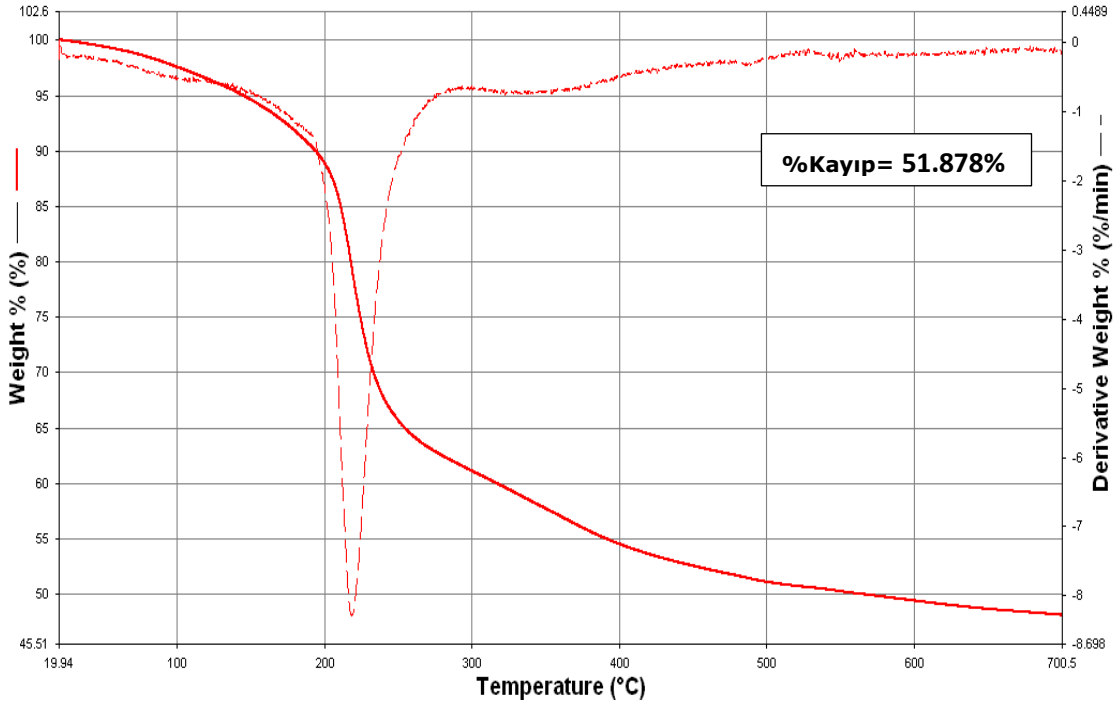
4.6.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Elde edilen filmlerin termogravimetrik analizleri Şekil 4.15. , Şekil 4.16. , Şekil 4.17. , Şekil 4.18. , Şekil 4.19'da gösterilmektedir.

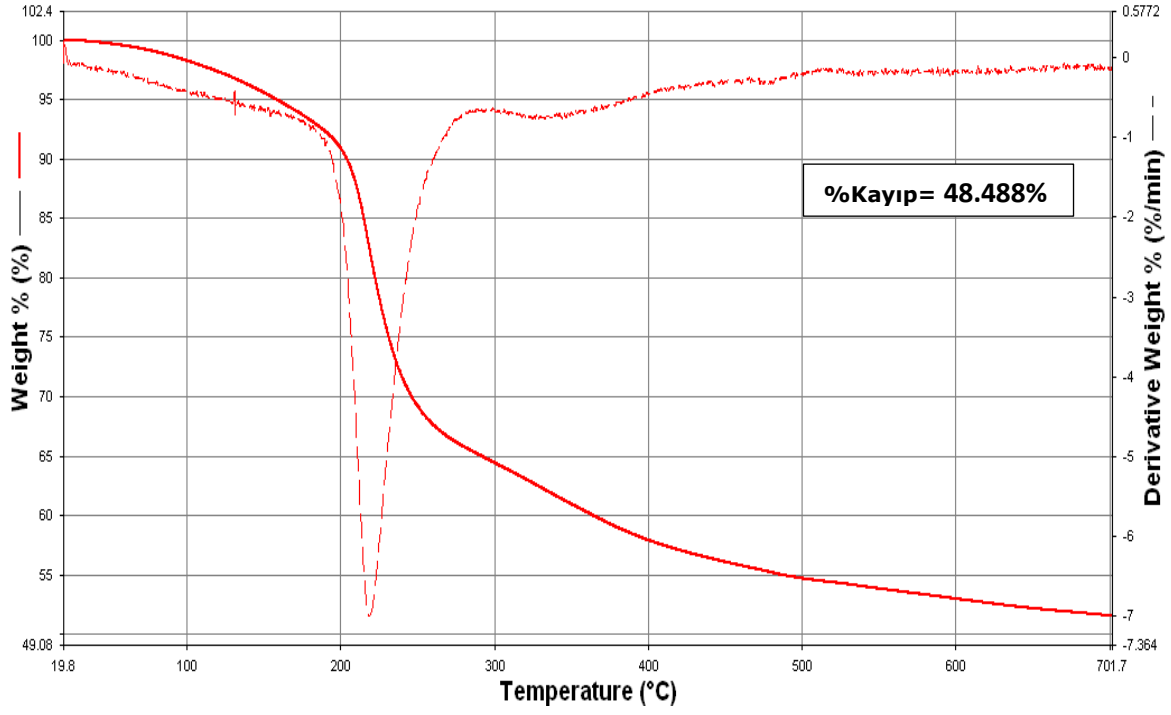
TGA, numunenin gaza dönüştüğü sıcaklıkları ölçmemizi sağlayan termal analiz türüdür. Filmler yüksek sıcaklıklarda ayrışmaya başladığında, grafik eğri içinde bir düşüş göstererek örnek kütlesi kaybına işaret eder. Degradasyonun düşmesi ve başlangıcı farklı polimerler için değişiklik gösterir [167].



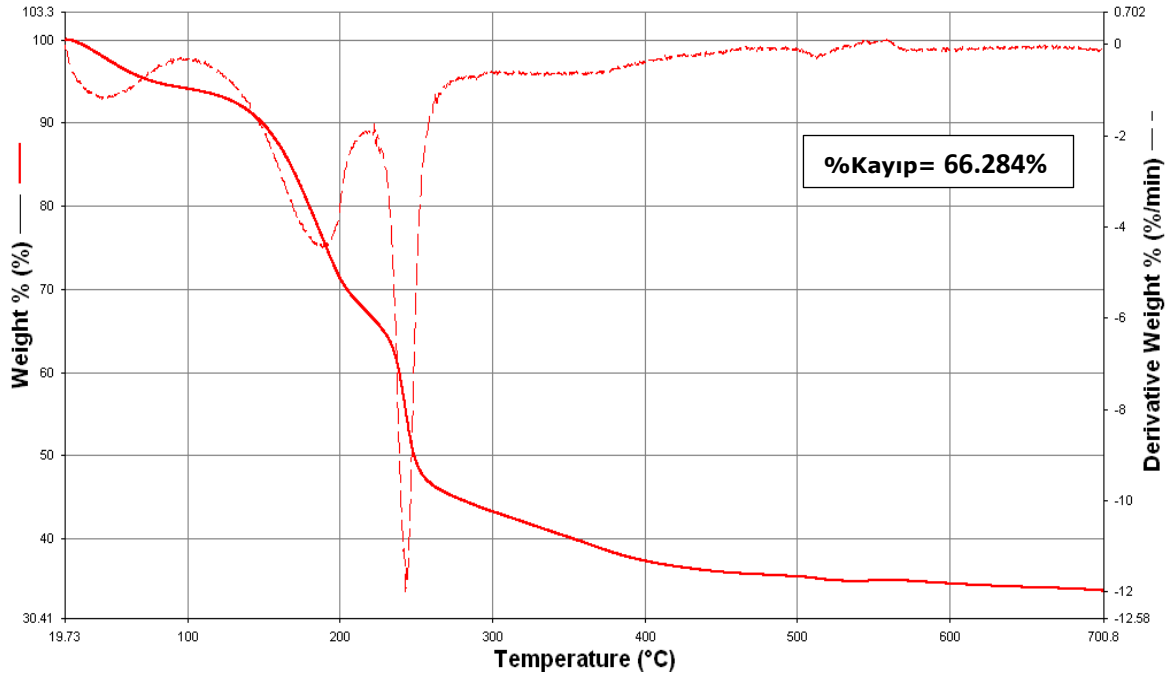
Şekil 4.15. GLG6'nin TGA termogramı.



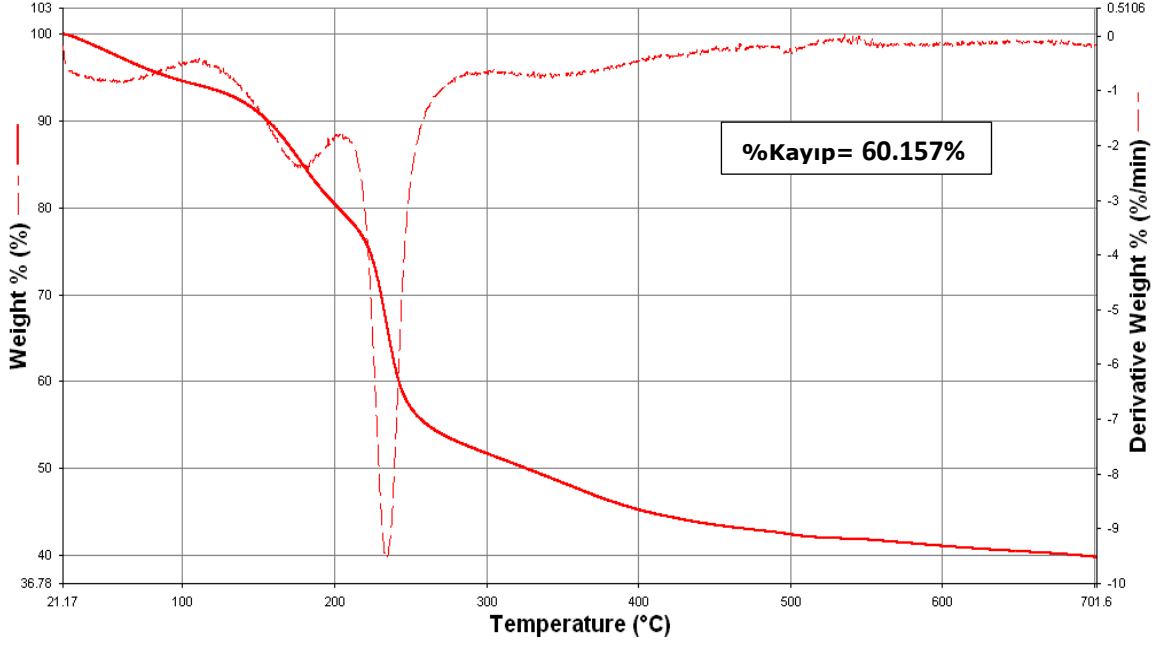
Şekil 4.16. GLG7'nin TGA termogramı.



Şekil 4.17. GLG8'in TGA termogramı.



Şekil 4.18. GLG9'un TGA termogramı.



Şekil 4.19. GLG12'nin TGA termogramı.

Analizlere dayanarak, bu yeni polimerik materyalin yüksek bozunma sıcaklıklarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Analizler değerlendirildiğinde anitibakteriyel yüzey olarak kullanılması hedeflenen filmlerin 200-300°C'ye kadar bozulmadan kalmıyor olması vücut sıcaklığında da bozulmadan etkili bir şekilde çalışacağına göstergesidir.

Antimikrobiyal yüzey olarak kullanılması hedeflenen filmlere bakıldığında su buharı geçirgenliği yapılan analizler arasında en önemli değere sahiptir. Analizler değerlendirildiğinde GLG6 kompozisyonundaki film en yüksek su buharı geçirgenliğine sahiptir. Antimikrobiyal değerlendirmeler de bu film üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.7. Antimikrobiyal Etki

1 mg'ı 1 ml steril distile suda çözülen LL-37 antimikrobiyal peptidi 5 µg/µl, 20 µg/µl, 100 µg/µl, 300 µg/µl, 500 µg/µl konsantrasyonlarında GLG6 film kompozisyonuna eklenmiş ve homojenize oluncaya kadar manyetik

karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra petrilere dökülerek kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen filmler antibiyotik diski boyutunda kesilerek (5 mm) UV altında sterilizasyona bırakılmış ve uygun besiyerlerinde disk difüzyon yöntemi ile filmlerin antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Antimikrobiyal etkinin karşılaştırılması amacıyla çeşitli antibiyotikler de benzer şekilde disk difüzyon yöntemi ile denenmiş ve ortaya çıkan zon çapları (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4.) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Hazırlanan filmlerin antimikrobiyal zon çapları (mm).

		FİLM ÖRNEKLERİ (mm)					
		Film örneği	Film örneği + 5µl LL-37	Film örneği + 20µl LL-37	Film örneği + 100µl LL-37	Film örneği + 300µl LL-37	Film örneği + 500µl LL-37
MİKROORGANİZMALAR	<i>E.coli</i>	8,5	10,0	12,0	15,0	17,0	19,5
	<i>S.aureus</i>	8,0	9,0	10,5	12,0	17,5	18,0
	<i>C.albicans</i>	7,0	7,0	9,0	10,5	11,0	12,5
	<i>A.niger</i>	7,5	8,0	10,5	11,0	12,0	13,0

Çizelge 4.3. Bakteriler için kullanılan farklı antibiyotiklerin antimikrobiyal zon çapları (mm). [**FA:** Fusidic acid, **B:** Bacitracin, **MUP:** Mupirocin, **AMC:** Amoxicillin/clavulanic acid, **CL:** Cephalexin, **MET:** Metronidazole]

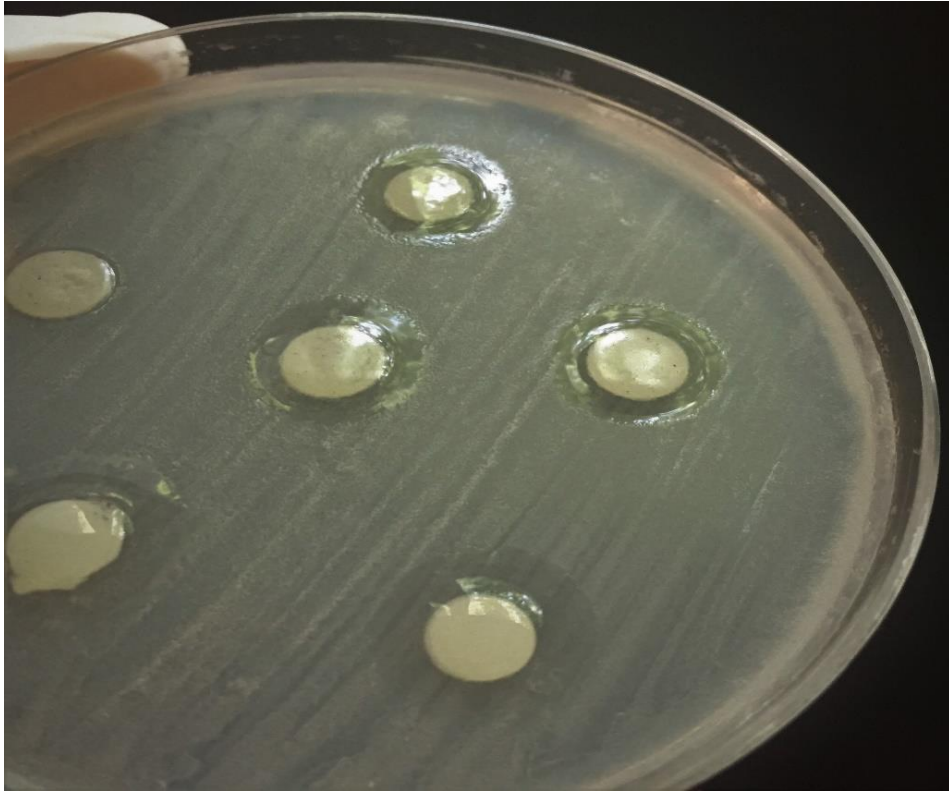
		ANTİBİYOTİKLER (mm)					
		FA	B	MUP	AMC	CL	MET
MİKROORGANİZMALAR	<i>E.coli</i>	8,0	9,0	10,0	20,0	14,0	12,0
	<i>S.aureus</i>	17,0	10,0	30,0	28,0	25,0	5,5

Çizelge 4.4. Funguslar için kullanılan farklı antifungal maddelerin antimikrobiyal zon çapları (mm). [**VOR:** Voriconazole, **5FC:** Flucytosine, **MCZ:** Miconazole, **KTC:** Ketoconazole]

		ANTİBİYOTİKLER (mm)			
		VOR	5FC	MCZ	KTC
MİKROORGANİZMALAR	<i>C.albicans</i>	10,0	6,0	9,0	9,0
	<i>A.niger</i>	26,0	15,0	19,0	21,0

Farklı içeriklerde LL-37 içeren GLG6 kompozisyonundaki film örneklerinin antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Kontrol olarak kullanılan ve LL-37 antimikrobiyal peptidi içermeyen film örneğinin de kullanılan tüm mikroorganizmalar üzerinde etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.20.). Byun ve arkadaşlarının 2014'te yaptıkları bir çalışmada *Zymomonas*

mobilis'ten üretilen levanın antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Elde edilen test sonuçlarına göre %3 ve üstündeki konsantrasyonlarda kullanılan levan ile *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* son derece güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. %1 oranındaki konsantrasyonlarda ise levan *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir [168].



Şekil 4.20. Levan içelikli film örneklerinin antimikrobiyal etkisi.

Çalışma kapsamında denenmiş olan en yüksek antimikrobiyal etki GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 antimikrobiyal peptidi ilave edilerek hazırlanmış film örneklerinde ve *E.coli* üzerinde ölçülmüştür. *E.coli* üzerinde elde edilen zon çapı 19,5 mm olarak belirlenmiştir.

S.aureus, *C.albicans* ve *A. niger*'de de yine en yüksek antimikrobiyal etki 500 µl LL-37 içerikli filmlerde gerçekleşmiştir. Zon çapları *S.aureus* için 18 mm, *C.albicans* için 12,5 mm, *A. niger* için ise 13 mm olarak ölçülmüştür.

Choi ve arkadaşlarının 2017'de yapmış oldukları çalışmada LL-37'nin *E.coli* üzerindeki etkisinden söz edilmektedir. Çalışmaya göre, saldırıda ilk adım, katyonik LL-37'nin anyonik lipopolisakkarit (LPS) tabakasına bağlanması ve hemen ardından mikroorganizmanın dış zarını geçirgen hale getirilmesidir. Farklı üreme koşulları bakteri membran değişimini etkileyebileceği için önemlidir [169].

Noore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LL-37'nin, bakteriyel enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biri olan hem hücre dışı hem de hücre içi *S. aureus*'a karşı hızlı ve sağlam öldürme etkisine sahip olduğu bulunmuştur [170]. Yapılan diğer çalışmalarda çoğunlukla nazofarenksi kolonize eden dış çürüğünün başlıca etiyolojik ajanı olan ve *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus mutans*'ın klinik suşlarına karşı LL-37 ve katyonik lipidlerin güçlü antimikrobiyal aktivitesi doğrulanmıştır [171].

Wang ve arkadaşları, insan katelisinin LL-37'nin katyonik gruplarının farklı bakteri suşlarına karşı potansiyel rollerini ortaya çıkarmışlardır. İnsan cathelicidin LL-37'nin ana antimikrobiyal bölgesinin katyonik yan zincirleri parçalanmış ve bu zincirlerin işlevsel rolleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Yan zincirlerden 17 ila 32'yi içeren GF-17 fragmanının etkisinin, in vitro olarak dokunulmamış LL-37'ye kıyasla metisiline dirençli *S. aureus*'a karşı daha güçlü olduğu bulunmuştur. Ayrıca amino asitlerin lizinlerden (K) argininlere (R) dönüştürülmesinin peptidin *S. aureus*'u öldürme kabiliyetini arttırdığını belirtilmektedir. Dolayısıyla, LL-37'nin GF-

17 fragmanının kullanımı düşük dozajlara ve dolayısıyla toksisitenin azalmasına neden olabilir [172].

Şimdiye kadar bilinen iyi bilinen iki peptid (LL-37 ve Histatin-5) tıbbi açıdan önemli funguslara karşı, fungusidal mekanizmaları için incelenmiştir. İnsanlarda üretildiği bilinen tek katelisin peptidi olan LL-37'nin *Aspergillus spp* ve *Candida albicans*'a karşı fungusid etkisi olduğu bilinmektedir [173]–[175]. Yapısal olarak, LL-37 amfipatiktir ve net pozitif yük ile sarmal bir yapıya sahiptir Hertog ve arkadaşları tarafından [174] LL-37'nin *C. albicans* hücre zarındaki faaliyeti incelenmiştir. Buna göre, LL-37 membranı hedef alarak membranın tamamen bozulmasına neden olmaktadır. Buna karşılık, histatin ailesinden iyi tanımlanmış bir fungusidal tükrük peptidi olan Histatin-5, işlevini yerine getirmek için sitoplazmaya translokasyona ihtiyaç duyar [176].

Bugüne kadar LL-37'nin *C. albicans* üzerindeki etkileri ile ilgili yapılmış olan çalışmaların sayısı bir hayli azdır. AMP'lerin *Candida*'lar üzerindeki inhibe edici aktivitesine ilişkin bir çalışmada, LL-37'nin *C. albicans* hücre yüzeyi ile ilişkide kalmaya devam ettiği, oysa diğer AMP'lerin (örneğin Histatin-5) membrandan translokasyonla girdiği ve hücre içinde biriktiği belirtilmektedir [173].

Hücre adhezyonu, *C. albicans*'ın konakçı dokulardaki kolonizasyonu sırasında ilk adımdır ve enfeksiyon için gereklidir. Yapışma, *C. albicans* adhesinlerinin konakçı hücre yüzeyi üzerindeki amino asit veya şeker tortularına bağlanması ile sağlanır. Adhesinler, abiyotik substratlara, örneğin plastik protezlere ve kateterlere hücre bağlanmasını da teşvik edebilir [177]. Tsai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *C. albicans* hücrelerinin 5 mg/ml LL-37 antimikrobiyal peptidi ile muamele edildikten

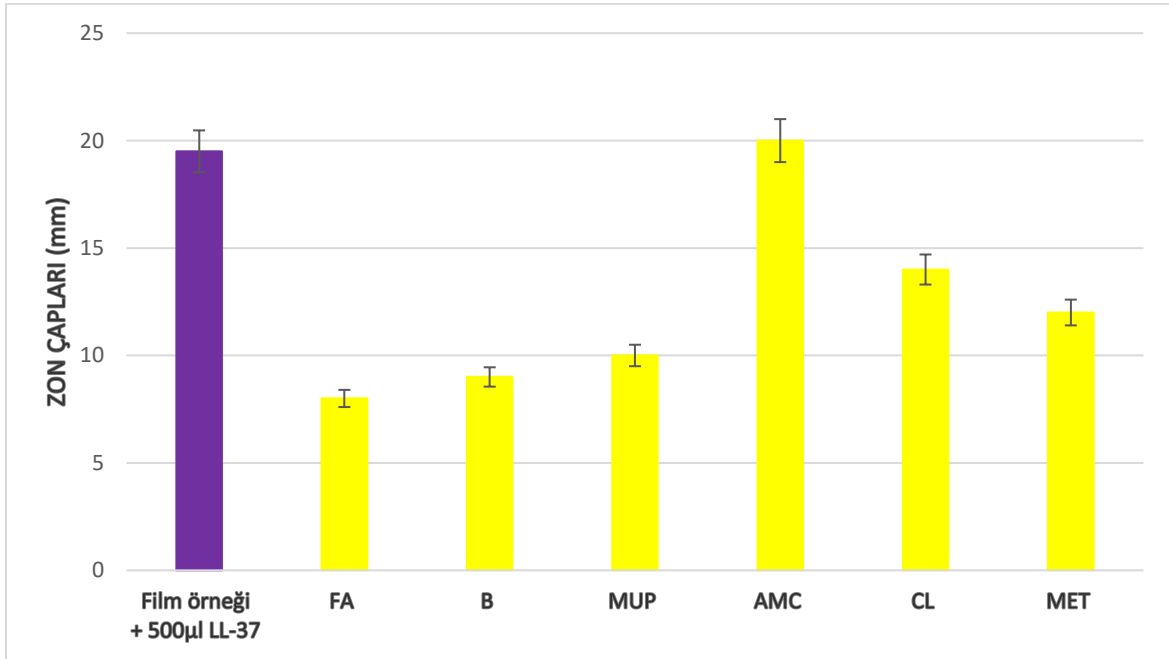
sonra daha kolay santrifüjlendiğini ve santrifüj tüplerine yapışmadığı bulunmuştur [178].

LL-37 ile hazırlanan filmlerin *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerinde bakterilere oranla daha düşük oranda antimikrobiyal etki gösterdiği görülmektedir. Shi ve çalışma arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu çalışmada *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* hücrelerinin sahip oldukları ökaryotik hücre zarı sayesinde *Escherichia coli* hücrelerine göre daha dayanıklı olduğu ve inhibasyonun daha zor olduğu belirtilmektedir [179].

LL-37 ile hazırlanan filmlerin antimikrobiyal aktivitesi antibiyotiklerle karşılaştırılmıştır. GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 eklenerek hazırlanan filmlerde *E.coli*'de ölçülen zon çapı 19,5 mm'dir. Buna karşılık Fusidic acid (FA) (10 mcg) için 8 mm, Bacitracin (B) (10 u) için 9 mm, Mupirocin (MUP) (5 mcg) için 10 mm, Cephalexin (CL) (30 mcg) için 14 mm, Metronidazole (5 mcg) (MET) için 12 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmada hazırlanan filmin antimikrobiyal etkisi bu değerlerden daha yüksektir. Sadece Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) 20 mm zon çapıyla, hazırlanan filme göre daha yüksek değerde antimikrobiyal etki göstermiştir (Şekil 4.21.).

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) standartlarına göre [181] *E.coli*'nin Fusidic acid (FA) (10 mcg) duyarlılığı ≤ 17 mm'de dirençli ≥ 26 mm'de hassastır. *E.coli* LL-37 ile hazırlanan film örneğine 19,5 mm zon çapı ile ılımlı etki gösterirken Fusidic acid (FA) (10 mcg) antibiyotiğine 8 mm zon çapı ile direnç göstermektedir. *E.coli*'nin Bacitracin (B) (10 u) duyarlılığı < 8 mm'de dirençli, 9-12 mm aralığında ılımlı ve ≥ 13 mm zon çapında ise hassastır. Bacitracin (B) (10 u) antibiyotiği, örnek mikroorganizma *E.coli* üzerinde 9 mm zon çapı göstererek ılımlı etki

yaratırken LL-37 ile hazırlanan film örneğine hassas duyarlılık göstermektedir. Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) CLSI standartları doğrultusunda *E.coli* üzerinde <14 mm dirençli, 14-17 mm ılımlı, >18 mm zon çaplarında hassastır. Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) örnek mikroorganizma *E.coli* üzerinde filme göre daha yüksek antimikrobiyal etki göstermesine rağmen *E.coli*'nin hem LL-37 ile hazırlanan film örneğine hem de Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) antibiyotiğine hassas olduğu görülmektedir. Cephalexin (CL) (30 mcg) örneği CLSI standartlarında değerlendirildiğinde *E.coli*'nin duyarlılığı ≤ 14 mm'de dirençli, ≥ 18 mm'de hassastır. *E.coli*, Cephalexin (CL) (30 mcg) antibiyotiğine direnç göstermekteyken LL-37 ile hazırlanan film örneğine hassas duyarlılık göstermektedir.



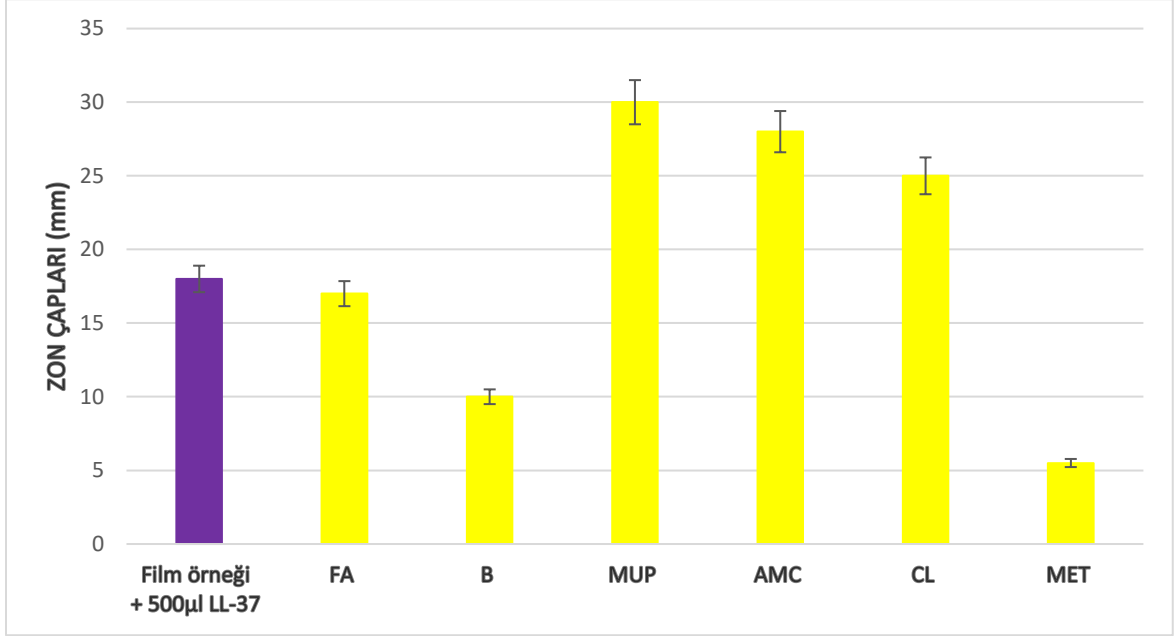
Şekil 4.21. Film örneği ile antibiyotiklerin *E.coli* üzerindeki etkisi. [**FA:** Fusidic acid, **B:** Bacitracin, **MUP:** Mupirocin, **AMC:** Amoxicillin/clavulanic acid, **CL:** Cephalexin, **MET:** Metronidazole]

GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 eklenerek hazırlanan filmlerde *S.aureus* üzerindeki antimikrobiyal etki incelendiğinde ölçülen zon 18

mm'dir. Buna karşılık Fusidic acid (FA) (10 mcg) 17 mm, Bacitracin (B) (10 u) için 10 mm, Metronidazole (5 mcg) (MET) için 5,5 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmada hazırlanan filmin antimikrobiyal etkisi bu değerlerden daha yüksektir. Ancak *S.aureus* üzerinde Mupirocin (MUP) (5 mcg) 30 mm, Cephalexin (CL) (30 mcg) 25 mm, Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) ise 28 mm zon çapı ölçülmüştür. Bu antibiyotiklerin etkisi, hazırlanan film kompozisyonuna göre daha yüksektir (Şekil 4.22.).

S.aureus'un Bacitracin (B) (10 u) duyarlılığı CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) standartlarına göre [181] <10 mm zon çapında dirençlilik gösterirken >18 mm zon çapında hassas duyarlılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan *S.aureus* örneği Bacitracin (B) (10 u)'e direnç göstermekteyken LL-37 ile hazırlanan film örneğinde hassas hale gelmiştir. *S.aureus*'un Fusidic acid (FA) (10 mcg) duyarlılığı <15 mm'de dirençli, ≥ 22 mm'de ise hassastır. *S.aureus*, hem Fusidic acid (FA) (10 mcg) antibiyotiği üzerinde hem de hazırlanan film örneğinde ılımlı duyarlılık göstermektedir. Mupirocin (MUP) (5 mcg) antibiyotiğinin *S.aureus* üzerindeki duyarlılığına baktığımızda ≤ 18 mm'de dirençli, 19-29 mm arasında ılımlı, >30 mm zon çapında ise hassas duyarlılık göstermektedir. LL-37 ile hazırlanan film örneği ile Mupirocin (MUP) (5 mcg) antibiyotiği kıyaslandığında, *S.aureus* Mupirocin (MUP) (5 mcg) antibiyotiğine hassas duyarlılık gösterirken hazırlanan film örneğine dirençlilik göstermektedir. Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg) CLSI standartları doğrultusunda *S.aureus* üzerinde <14 mm'de dirençli, ≥ 21 mm zon çapında ise hassastır. Çalışmada kullanılan *S.aureus* örneği Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (20/10 mcg)'e hassas duyarlılık gösterirken LL-37 ile hazırlanan film örneğine ılımlı duyarlılık göstermektedir. Cephalexin (CL) (30 mcg) örneği CLSI standartlarında değerlendirildiğinde *S.aureus*'un duyarlılığı <12 mm'de dirençli, ≥ 18 mm'de hassastır. *S.aureus*, hem Cephalexin (CL) (30 mcg) antibiyotiğine

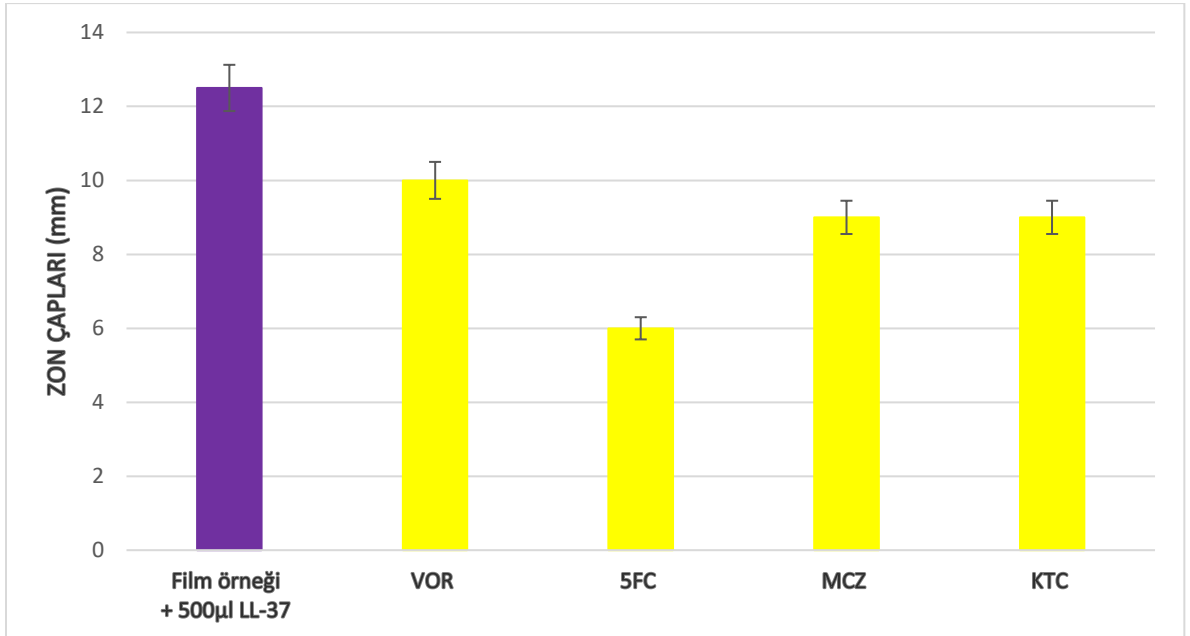
hem de LL-37 ile hazırlanan film örneğine hassas duyarlılık göstermektedir.



Şekil 4.22. Film örneği ile antibiyotiklerin *S.aureus* üzerindeki etkisi. [FA: Fusidic acid, B: Bacitracin, MUP: Mupirocin, AMC: Amoxicillin/clavulanic acid, CL: Cephalexin, MET: Metronidazole]

Candida albicans için GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 eklenerek hazırlanan filmlerin gösterdiği en yüksek zon çapı 12,5 mm olarak ölçülmüştür. Kullanılan antifungallerden Voriconazole (VOR) (1 mcg) için 10 mm, Flucytosine (5FC) (1 mcg) için 6 mm, Miconazole (MCZ) (10 mcg) için 9 mm, Ketoconazole (KTC) (10 mcg) için 9 mm zon çapları ölçülmüştür. Çalışmada hazırlanan film örneklerinin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırma yapılan tüm antibiyotiklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23.).

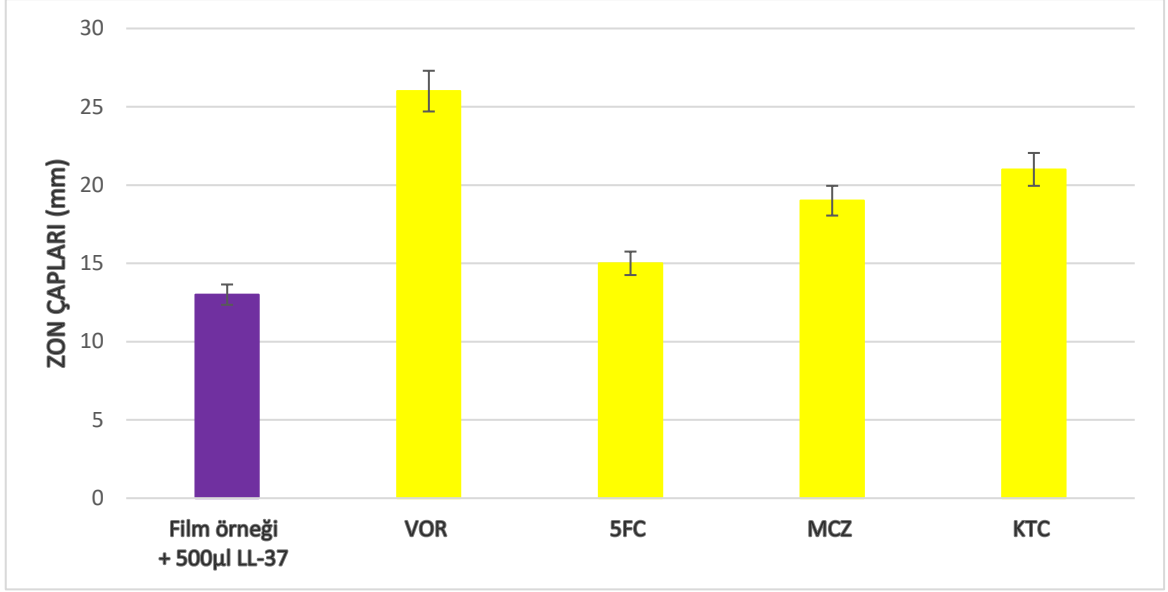
CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)'nin belirlemiş olduğu standartlara göre [181] *Candida albicans* Voriconazole (VOR) (1 mcg)' e ≤ 13 mm'de direnç, 14-16 mm arasında ılımlılık, ≥ 17 mm zon çapında ise hassas duyarlılık, Flucytosine (5FC) (1 mcg) antifungaline ≤ 14 mm'de direnç, 15-18 mm arasında ılımlılık, ≥ 19 mm'de hassas duyarlılık, Ketoconazole (KTC) (10 mcg) antifungaline ise ≤ 22 mm'de direnç, 23-29 mm arasında ılımlılık, ≥ 30 mm zon çapında ise hassas duyarlılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan *Candida albicans* bu standartlara göre Voriconazole (VOR) (1 mcg), Flucytosine (5FC) (1 mcg), Ketoconazole (KTC) (10 mcg) antifungallerine ve LL-37 ile hazırlanan film örneğine direnç göstermektedir. Miconazole (MCZ) (10 mcg) antifungalinin *C.albicans* üzerindeki duyarlılığına baktığımızda ≤ 11 mm zon çağında dirençli, 12-19 mm zon çapında ılımlı, ≥ 20 mm zon çapında ise hassas özellik göstermektedir. *C.albicans* LL-37 ile hazırlanan film örneği üzerinde ılımlı duyarlılık göstermekteyken, Miconazole (MCZ) (10 mcg) antifungaline dirençlidir.



Şekil 4.23. Film örneği ile antifungallerin *C.albicans* üzerindeki etkisi. [VOR: Voriconazole, 5FC: Flucytosine, MCZ: Miconazole, KTC: Ketoconazole]

Hazırlanan GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 eklenerek hazırlanan filmlerin *Aspergillus niger* üzerindeki en yüksek antifungal etkisi 13 mm olarak ölçülmüştür. Kullanılan antifungallerden Voriconazole (VOR) (1 mcg) için 26 mm, Flucytosine (5FC) (1 mcg) için 15 mm, Miconazole (MCZ) (10 mcg) için 19 mm, Ketoconazole (KTC) (10 mcg) için 21 mm zon ölçümü yapılmıştır. Ölçülen değerler hazırlanan filmdeki zon çaplarına göre yüksektir (Şekil 4.24.).

Aspergillus niger'in Voriconazole (VOR) (1 mcg) antifungaline karşı CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)'nin belirlemiş olduğu duyarlılıklarına baktığımızda >18 mm'de hassas duyarlılık gösterdiği görülmektedir. *Aspergillus niger* LL-37 ile hazırlanan film örneği üzerinde dirençliyen Voriconazole (VOR) (1 mcg) antifungaline karşı hassas duyarlılık göstermektedir. *Aspergillus niger* standartlara göre Flucytosine (5FC) (1 mcg) üzerinde <16 mm'de direnç, 16-20 mm arasında ılımlılık, ≥20 mm'de hassas duyarlılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan *Aspergillus niger*, Flucytosine (5FC) (1 mcg), ve film örneğine karşı dirençlilik göstermektedir. Miconazole (MCZ) (10 mcg) antifungallinin *Aspergillus niger* üzerindeki duyarlılığına baktığımızda <14 mm zon çağında dirençli, 14-17 mm zon çapında ılımlı, ≥18 mm zon çapında ise hassas özellik göstermektedir. *Aspergillus niger* LL-37 ile hazırlanan film örneği üzerinde dirençli duyarlılık gösterirken, Miconazole (MCZ) (10 mcg) antifungaline hassastır. *A. niger*, Ketoconazole (KTC) (10 mcg) antibiyotiğine <14 mm'de direnç, 14-17 mm arasında ılımlılık, ≥18 mm'de hassas duyarlılık göstermektedir. Hazırlanan film örneği üzerinde *Aspergillus niger* dirençlilik gösterirken Ketoconazole (KTC) (10 mcg) antifungaline hassas duyarlılık göstermektedir.



Şekil 4.24. Film örneği ile antifungallerin *A.niger* üzerindeki etkisi. [VOR: Voriconazole, 5FC: Flucytosine, MCZ: Miconazole, KTC: Ketoconazole]

Sonuç olarak;

- ✓ Yapmış olduğumuz çalışmada, çok geniş kullanım alanına sahip olduğu kadar oldukça da pahalı bir polimer olan levanın mikroorganizmalardan üretimi ve antimikrobiyal yüzey olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.
- ✓ Toprakta, levan üreten mikroorganizmalar uygun besiyeri hazırlanarak izole edilmiş ve levan üretme verimliliği yüksek olduğu düşünülen üç mikroorganizma seçilerek tür tayinine gönderilmiştir.
- ✓ Tür tayini sonrası belirlenen mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas mandelii*'nin literatürde yapılan bu çalışma prosesine benzer bir çalışmasının bulunmadığı tespit edilmiş ve polimer üretim aşamalarına *Pseudomonas mandelii* ile devam edilmiştir.

- ✓ Levan üretim basamakları ile *Pseudomonas mandelii*'den polimer üretimi gerçekleştirilmiş, elde edilen polimer karbon analizi (^{13}C NMR), proton analizi (^1H NMR) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiş ve bu polimerin levan olduğu doğrulanmıştır.
- ✓ Yüksek miktarda levan eldesi için; inkübasyon zamanı, azot kaynağı, pH, sıcaklık, şeker miktarı, karbon kaynağı, mannitol miktarı optimize edilmiş ve optimizasyonlar sonrası *Pseudomonas mandelii*'den elde edilen levan miktarı 42,6 g/L olarak bulunmuştur.
- ✓ Levan üretim verimlilikleri çeşitli formüllerle hesaplanmış ve dönüşüm verimi %37,8, efektif verim ise %27,7 olarak bulunmuştur.
- ✓ Elde edilen polimerin antimikrobiyal yüzey olarak kullanılabilmesi için çeşitli kombinasyonlarda film örnekleri hazırlanmış olup gliserolün en uygun plastikleştirici olarak kullanılması uygun görülmüştür.
- ✓ Film örnekleri su buharı geçirgenliği ve termogravimetrik analiz açısından değerlendirilmiştir.
- ✓ Çalışılan kompozisyonlar arasından en uygun film örneğinin GLG6 kompozisyonu (5 gr levan + 1mL gliserol +2gr Sodyum bentonit + 50 mL %1 Asetik asit) olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Film örneklerine değişik miktarlarda LL-37 antimikrobiyal peptidi ilave edilerek antimikrobiyal özellikleri farklı mikroorganizmalar üzerinde belirlenmiştir.
- ✓ Elde edilen filmin yara bandı ya da yara örtüsü olarak kullanılabilirliği ise yaralarda kullanılan çeşitli antibiyotiklerin gösterdiği antimikrobiyal etki ile kıyaslanmıştır.
- ✓ Levanın tek başına, LL-37 antimikrobiyal peptidi olmadan da antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Çalışma kapsamında denenmiş olan en yüksek antimikrobiyal etki GLG6 kompozisyonuna 500µl LL-37 antimikrobiyal peptidi ilave edilerek hazırlanmış film örneklerinde ve *E.coli* üzerinde ölçülmüştür. Yaralarda kullanılan antibiyotiklerle kıyaslandığında film örneği sadece Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) antibiyotiğine göre düşük bir etki göstermektedir.
- ✓ *S.aureus* üzerinde Mupirocin (MUP), Cephalexin (CL), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) antibiyotikleri hariç diğer antibiyotikler hazırlanan film kompozisyonuna göre daha az etkiye sahiptir.
- ✓ Çalışmada hazırlanan film örneklerinin *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkisi karşılaştırma yapılan tüm antibiyotiklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Film örnekleri *Aspergillus niger* üzerinde Fusidic acid (FA), Bacitracin (B), Metronidazole (MET), Amoxicillin/clavulanic acid

(AMC) Cephalexin (CL) antibiyotikleri ile kıyaslandığında daha yüksek bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Bu çalışma ile medikal ve endüstriyel alanda önemli bir değere sahip olan levan biyopolimeri *Pseudomonas mandelii*'den üretilmiştir. Levan ve LL-37 antimikrobiyal peptidleri ile hazırlanan filmlerin, tıbbi önemi olan mikroorganizmalar üzerinde yüksek derecede antimikrobiyal etki gösterdiği görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen film içerikleri ilk defa bu çalışma doğrultusunda kullanılmıştır. LL-37 antimikrobiyal peptidinin yara tedavisindeki pozitif etkisi, hazırlanan filmlerin yara bandı, yara örtüsü ya da yara tedavisi için kullanılabilirliğini geçerli kılmaktadır. Filmlerin biyobozunur özellikte olması çevresel; mikroorganizmalardan elde edilmesi ekonomik; göstermiş olduğu antimikrobiyal etki ise medikal anlamda son derece büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Armentano, I., Bitinis, N., Fortunatia, E., Fortunatia, S., Mattioli, N., Rescignano, R., Verdejob, M., Lopez-Manchadob, A., Kenny, J., M., Multifunctional Nanostructured PLA Materials for Packaging and Tissue Engineering, *Progress in Polymer Science*, 38, 10–11, **2013**.
- [2] Sutherland, I., Food Biotechnology, 2. Baskı, *Biotechnology of Microbial Polysaccharides in Food*, Taylor & Francis Group, **2006**.
- [3] Donot, F., Fontana, A., Baccou, J., C., Schorr-Galindo, S., Microbial exopolysaccharides: Main Examples of Synthesis, Excretion, Genetics and Extraction, *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962, **2012**.
- [4] Rehm, B., H., A., Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications, *Nature Reviews Microbiology*, 8, 578–592, **2010**.
- [5] Nwodo, U., U., Green, E., Okoh, A., I., Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Erospects, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002–14015, **2012**.
- [6] Ernandes, F., Cruz, C., H., G., Sugarcane Juice Use for Levan Production by *Zymomonas mobilis* CCT4494, *A Ciência e Agrotecnologia*, 35, 354–360, **2011**.
- [7] Öner, E., T., Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass, *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, 35–56, **2013**.
- [8] Chanprateep, S., Current Trends in Biodegradable Polyhydroxyalkanoates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 621–632, **2010**.
- [9] Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Applications, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 233–247, **2007**.

- [10] Keshavarz, T., Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics With a Green Agenda, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 321–326, **2010**.
- [11] Freitas, F., Alves, V., D., Reis, M., A., M., Advances in Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Biotechnological Applications, *Trends in Biotechnology*, 29, 388–398, **2011**.
- [12] Esawy, M., A., Ahmed, E., F., Helmy, W., A., Mansour, N., M., El-Senousy, W., M., El-Safty, M., M., Production of Levansucrase From Novel Honey *Bacillus subtilis* Isolates Capable of Producing Antiviral Levans, *Carbohydrate Polymers*, 86, 823–830, **2011**.
- [13] Sutherland, I., W., Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides, *Advances in Microbial Physiology*, 23, 79–150, **1982**.
- [14] Purama, R., K., Goswami, P., Khan, A., T., Goyal, A., Structural Analysis and Properties of Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640, *Carbohydrate Polymers*, 76, 30–35, **2009**.
- [15] Sutherland, I., W., Bacterial Exopolysaccharides--Their Nature and Production, *Antibiotics Chemotherapy*, 42, 50–55, **1989**.
- [16] Lippmann, E., O., Ueber das Lävulan, Eine Neue, in Der Melasse der Rubenzuckerfabriken Vorkommende Gummiart, *Chemistry Central Journal*, 14, 669–671, **1881**.
- [17] Greig-Smith, R., G., The Gum Fermentation of Sugar Cane Juice, *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 26, 589–625, **1901**.
- [18] Rosell KG, B., D., An Inulin-like Fructan Produced by *Streptococcus mutans* Strain JC2, *Acta Chemica Scandinavica B*, 28(5), 589, **1974**.
- [19] Han, Y., W., Watson, M., A., Production of Microbial Levan From Sucrose, Sugarcane Juice and Beet Molasses, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 9, 257–260, **1992**.

- [20] Arvidson, S., A., Rinehart, B., T., Gadala-Maria, F., Concentration Regimes of Solutions of Levan Polysaccharide From *Bacillus* sp.," *Carbohydrate Polymers*, 65, 144–149, **2006**.
- [21] Runyon, J., R., Nilsson, L., Ulmius, M., Castro, A., Ionescu, R., Andersson, C., Schmidt, C., Characterizing Changes in Levan Physicochemical Properties in Different pH Environments Using Asymmetric Flow Field-flow Fractionation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 1597–605, **2014**.
- [22] Han, Y., W., Microbial Levan, *Advances in Applied Microbiology*, 35, 171–194, **1990**.
- [23] Sarilmiser, Kazak, H., Ates, O., Ozdemir, G., Arga, K., Y., Toksoy, Öner, E., Effective Stimulating Sactors for Microbial Levan Production by *Halomonas smyrnensis* AAD6^T, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119, 455–463, **2015**.
- [24] Dogsa, I., Brloznic, M., Stopar, D., Mandic-Mulec, I., Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms, *PLoS One*, 8, 4, **2013**.
- [25] Koczan, J., M., McGrath, M., J., Zhao, Y., Sundin, G., W., Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity, *Phytopathology*, 99, 1237–1244, **2009**.
- [26] Mehmood, A., Abdallah, K., Khandekar, S., Zhurina, D., Srivastava, A., Al-Karablieh, N., Alfaro-Espinoza, G., Pletzer, D., Ullrich, M., S., Expression of Extra-cellular Levansucrase in *Pseudomonas syringae* is Controlled by the in Planta Fitness-promoting Metabolic Repressor HexR.," *BMC Microbiology*, 15, 48, **2015**.
- [27] Hernández, L., Sotolongo, M., Rosabal, Y., Menéndez, C., Ramírez, R., Caballero-Mellado, J., Arrieta, J., Structural Levansucrase Gene (IsdA) Constitutes a Functional Locus Conserved in the Species *Gluconacetobacter* for Diazotrophicus, *Archives of Microbiology*, 174, 120–124, **2000**.
- [28] Velázquez-Hernández, M., L., Baizabal-Aguirre, V., M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M., J., Fuentes-Ramírez, L., E., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M., P., Valdez-Alarcón, J., J., *Gluconacetobacter diazotrophicus* Levansucrase is Involved in Tolerance to NaCl, Sucrose and Desiccation, and Biofilm Formation, *Archives of Microbiology*, 193, 137–149, **2011**.

- [29] Öner, E., T., Hernández, L., Combie, J., Review of Levan Polysaccharide: From a Century of Past Experiences to Future Prospects, *Biotechnology Advances*, 34, 827–844, **2016**.
- [30] Li, H., Ullrich, M., S., Characterization and Mutational Analysis of Three Allelic *lsc* Genes Encoding Levansucrase in *Pseudomonas syringae*, *Journal of Bacteriology*, 183, 3282–3292, **2001**.
- [31] Montano Polysaccharides Corp, www.polysaccharides.us (Ekim, **2017**).
- [32] Kim, K., H., Chung, C., B., Kim, Y., H., Kim, K., S., Han, C., S., Kim, C., H., Cosmeceutical Properties of Levan Produced by *Zymomonas mobilis*, *International Journal of Cosmetic Science*, 28, 231, **2006**.
- [33] Carson, J., <http://carsonproductdevelopment.com/>(Ocak, **2017**).
- [34] Kim, Y.,H., Kim, J.,G., Jang, J.,W., Lee, S.,Y., Heo,W.,B., Kim, K.,H., Study on the Synthesis of Modified Levan and Its Properties on the Hair, *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*, Johannesburg, South Africa, Poster Session 5, Number 302, **2012**.
- [35] Masayo, F., Takyuki, T., Beautifully whitening agent, *Japanese patent*, JP2006 052146A, **2006**.
- [36] Sturzoiu, C., Petrescu, M., Galateanu, B., Anton, M., Nica, C., Simionca(Iuri), G., Dinischiotu, A., Stoian, G., *Zymomonas mobilis* Levan is Involved in Metalloproteinases Activation in Healing of Wounded and Burned Tissues, *Animal Science and Biotechnology*, 44, 453–458, **2011**.
- [37] Sima, F., Axente, E., Sima, L., E., Tuyel, U., Eroglu, M., S., Serban, N., Ristoscu, C., Petrescu, S., M., Öner Toksoy, E., Mihailescu, I., N., Combinatorial Matrix-assisted Pulsed Laser Evaporation: Single-step Synthesis of Biopolymer Compositional Gradient Thin Film Assemblies, *Applied Physics Letters*, 101, 23, **2012**.
- [38] Abdel-Fattah, A., M., Gamal-Eldeen, A., M., Helmy, W., A., Esawy, M., A., Antitumor and Antioxidant Activities of Levan and Its Derivative From the Isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza, *Carbohydrate Polymers*, 89, 314–322, **2012**.

- [39] Sedgwick, A., D., Rutman, A., Sin, Y., M., Mackay, A., R., Willoughby, D., A., The Effects of Levan On the Acute Inflammatory Response, 215–222, **1984**.
- [40] Ah, K., S., Hong, K., Jang, K., Kim, S., Lee, K., H., Chang, B., Kim, C., Choue, R., Anti-obesity and Hypolipidemic Effects of Dietary Levan in High Fat Diet Induced Obese Rats, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 796–804, **2004**.
- [41] Oh, J., S., Lee, S. R., Hwang, K., T., Ji, G., E., The Anti-Obesity Effects Of the Dietary Combination of Fermented Red Ginseng With Levan in High Fat Diet Mouse Model, *Phytotherapy Research*, 28, 617–622, **2014**.
- [42] Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S., Yamaguchi, H., In Vitro Digestibility and Fermentability of Levan and Its Hypocholesterolemic Effects in Rats, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 13–18, **1999**.
- [43] Belghith, K., S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., Belghith, H., Hypolipidemic Effect of Diet Supplementation With Bacterial Levan in Cholesterol-fed Rats, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 1070–1074, **2012**.
- [44] Adamberg, S., Tomson, K., Vija, H., Puurand, M., Kabanova, N., Visnapuu, T., Jõgi, E., Alamäe, T., Adamberg, K., Degradation of Fructans and Production of Propionic Acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are Enhanced by the Shortage of Amino Acids, *Frontiers in Nutrition*, 1, 21, **2014**.
- [45] Adamberg, K., Tomson, K., Talve, T., Pudova, K., Puurand, M., Visnapuu, T., Alamäe, T., Adamberg, S., Levan Enhances Associated Growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in Fecal Microbiota, *PLoS One*, 10, 12, **2015**.
- [46] Toksoy, O., Arrizon, G.-A. M., Hernandez-moedano, J., in Vitro Prebiotic Activity of Fructans With Different Fructosyl Linkage for Symbiotics Elaboration, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9, 69–76, **2014**.
- [47] Porrás-Domínguez, J., R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, E., M., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., López Munguía, A., Levan-type FOS Production Using a *Bacillus Licheniformis* Endolevanase, *Process Biochemistry*, 49, 783–790, **2014**.

- [48] Sonnenburg, E., D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S., K., Firbank, S., J., Bolam, D., N., Sonnenburg, J., L., Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal Bacteroides Species Determines Diet-induced Microbiota Alterations, *Cell*, 141, 1241–1252, **2010**.
- [49] Visnapuu, T., Mardo, K., Alam, T., Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* Pathovar as Catalysts for the Synthesis of Potentially Prebiotic Oligo and Polysaccharides, *New Biotechnology*, 32, 597–605, **2015**.
- [50] Li, J., Kim, I., H., Effects of Levan-type Fructan Supplementation on Growth Performance, Digestibility, Blood Profile, Fecal Microbiota, and Immune Responses After Lipopolysaccharide Challenge in Growing Pigs, *Journal of Animal Science*, 91, 5336–5343, **2013**.
- [51] Zhao, P., Y., Wang, J., P., Kim, I., H., Evaluation of Dietary Fructan Supplementation on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Meat Quality, Fecal Microbial Flora, and Fecal Noxious Gas Emission in Finishing Pigs, *Journal of Animal Science*, 91, 5280–5286, **2013**.
- [52] Zhao, P., Y., Wang, J., P., Kim, I., H., Effect of Dietary Levan Fructan Supplementation on Growth Performance, Meat Quality, Relative Organ Weight, Cecal Microflora, and Excreta Noxious Gas Emission in Broilers, *Journal of Animal Science*, 91, 5287–5293, **2013**.
- [53] Rairakhwada, D., Pal, A., K., Bhatena, Z., P., Sahu, N., P., Jha, A., Mukherjee, S., C., Dietary Microbial Levan Enhances Cellular Non-specific Immunity and Survival of Common *Cyprinus carpio* Juveniles, *Fish Shellfish Immunology*, 22, 477–486, **2007**.
- [54] Sanjay, K., G., Asim, K., P., Narottam, P., S., Rishikesh, S., D., Akhtar, M., S., Asish, K., J., Kartik, B., Dietary Microbial Levan Enhances Tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) Juveniles to Thermal Stress, *Aquaculture*, 306, 398–402, **2010**.
- [55] Roberts, P., J., Garegg, E., J., Levan Derivatives, Their Preparation, Composition and Applications Including medical and Food Applications, **1998**.
- [56] Booten, A., De Soete, K., Fripiat, J., Fructan and/or Polydextrose-containing Dairy Powders, Process for Preparing Same and Their Use, Patent no: EP0821885 B1, **1998**.

- [57] Xiao, L., Feng, M., Lu, F., Preparation Method of Levan-Contained Yogurt, *Chinese patent CN103190478B*, **2014**.
- [58] Bondarenko, O., Ivask, M., A., Kahru, A., Vija, H., Titma, T., Visnapuu, M., Joost, U., Pudova, K., Adamberg, S., Visnapuu, T., Alamäe, T., Bacterial Polysaccharide Levan as Stabilizing, Non-toxic and Functional Coating Material for Microelement-nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 136, 710–720, **2015**.
- [59] Jakob, F., Meißner, D., Vogel, R., F., Comparison of Novel GH 68 Levansucrases of Levan-overproducing *Gluconobacter* species, *Acetic acid bacteria*, 1, 2, **2012**.
- [60] Cordero, M., L., B., Confectionery Composition, *Great Britain patent GB2430344B*, **2010**.
- [61] Vijayendra, S., V., N., Shamala, T., R., Film Forming Microbial Biopolymers for Commercial Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551, 1–20, **2013**.
- [62] Chen, X., Gao, H., Ploehn, H. J., Montmorillonite-levan Nanocomposites With Improved Thermal and Mechanical Properties, *Carbohydrate Polymers*, 101, 565–573, **2014**.
- [63] Grim, R., E., Clay Mineralogy, *McGraw-Hill Book Company*, 2. Baski, **1953**.
- [64] Clem, A., G., Doehler, R., W., Industrial Applications of Bentonite, *Clays and Clay Minerals*, 10, 272–283, **1961**.
- [65] Mooney, R., W., Keenan, A., G., Wood, L., A., Adsorption of Water Vapor by Montmorillonite. II. Effect of Exchangeable Ions and Lattice Swelling as Measured by X-Ray Diffraction, *Journal of the American Chemical Society*, 74, 1371–1374, **1952**.
- [66] Tan, D., Yuan, P., Annabi-Bergaya, F., Liu, D., He, H., Methoxy-modified Kaolinite as a Novel Carrier for High-Capacity Loading and Controlled-release of the Herbicide Amitrole, *Scientific Reports*, 5, **2015**.
- [67] Mura, P., Maestrelli, F., Aguzzi, C., Viseras, C., Hybrid Systems Based on Drug in Cyclodextrin in Nanoclays for Improving Oxaprozin Dissolution Properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 509, 8–15, **2016**.

- [68] Elmore, S., E., Mitchell, N., Mays, T., Brown, K., Cardona, A., M., Romoser, A., Phillips, T., D., Common African Cooking Processes Do not Affect the Aflatoxin Binding Efficacy of Refined Calcium Montmorillonite Clay, *Food Control*, 37, 27–32, **2014**.
- [69] Carraro, A., De Giacomo, A., Giannossi, M., L., Medici, L., Muscarella, M., Palazzo, L., Quaranta, V., Summa, V., Tateo, F., Clay Minerals as Adsorbents of Aflatoxin M1 From Contaminated Milk and Effects on Milk Quality, *Applied Clay Science*, 88–89, 92–99, **2014**.
- [70] Mkhabela, V., Ray, S., S., Biodegradation and Bioresorption of Poly (caprolactone) Nanocomposite Scaffolds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 186–192, **2015**.
- [71] Sajeendra, S., Augustine, A., Electrospun Nanocomposites for Dental Applications, *Journal of Siberian Federal University*, 2, 198–211, **2016**.
- [72] Hsu, S., H., Wang, M., C., Lin, J., J., Biocompatibility and Antimicrobial Evaluation of Montmorillonite/chitosan Nanocomposites, *Applied Clay Science*, 56, 53–62, **2012**.
- [73] Ray, S., S., Okamoto, M., Polymer/layered Silicate Nanocomposites: A Review From Preparation to Processing, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 28, 1539–1641, **2003**.
- [74] Tombácz, E., Szekeres, M., Colloidal Behavior of Aqueous Montmorillonite Suspensions: The Specific Role of pH in the Presence of Indifferent Electrolytes, *Applied Clay Science*, 27, 75–94, **2004**.
- [75] Sciascia, L., Turco Liveri, M., L., Merli, M., Kinetic and Equilibrium Studies for the Adsorption of Acid Nucleic Bases Onto K10 Montmorillonite, *Applied Clay Science*, 53, 657–668, **2011**.
- [76] Calabrese, I., Cavallaro, G., Lazzara, G., Merli, M., Sciascia, L., Turco Liveri, M., L., Preparation and Characterization of Bio-organoclays Using Nonionic Surfactant, *Adsorption*, 22, 105–116, **2016**.
- [77] Jia, Y., Reach on the Organics/sepiolite Fibers Composite Phase Change Heat-storage Materials, *Hebei University of Technology*, **2011**.

- [78] Sun D., Study on Preparation and Property of Paraffin Expanded Eerlite Chase Change Material, *Dalian University of Technology*, **2010**.
- [79] Akbulut, A., *Bentonit MTA Eğitim Serisi-32*, Ankara, **1996**.
- [80] Van Oss, C., J., Giese, R., F., The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals, *Clays and Clay Minerals*, 43, 474–477, **1995**.
- [81] Russell, A., Specialty Clays: Industrial Minerals, *Review Mining Engineering Magazine*, **1991**.
- [82] Çelik, M., Önal, M., Synthesis and Characterization of Polyglycidylmethacrylate/Na-montmorillonite Nanocomposites, *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 1532–1538, **2004**.
- [83] Çinku, Y., Bilge, K., Bentonit ve Aktivasyon Yöntemleri, *Kil*, 141–147, **2001**.
- [84] Güngör, N., Bentonitik Kil Minerallerinin Yapı ve Özellikleri Üzerine Değişebilen Katyonların Etkilerinin Fiziksel Yöntemlerle İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, **1981**.
- [85] Malayoğlu, A., Akar, U., Killerin Sınıflandırılması ve Kullanım Alanlarının Saptanmasında Aranılan Kriterlerin İrdelenmesi, *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, **1995**.
- [86] Uz, B., Bentonit, Mineraller, *Kristalografi-Mineraloji*, 413–415, **1990**.
- [87] Sarıkaya, İ., Ceylan, Y., Biçer, H., Biçer, C., Bozdoğan, N., Killerin Ağartıcı Özellikleri, 2. *Ulusal Kil Sempozyumu*, 507–512, **1985**.
- [88] Santaren J., Sepiolite: A Mineral Thickener and Rheology Additive, *Mod Paint Coat*, 98, 72, **1993**.
- [89] Çinku, K., Aktivasyon Yöntemleri ile Bentonitten Su Bazlı Kıvamlaştırıcı Üretimini Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü/Maden Mühendisliği, İstanbul **2008**.
- [90] Andrès, E., Dimarcq, J.-L., Cationic Antimicrobial Peptides: From Innate Immunity Study to Drug Development, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37, 194–9, **2007**.

- [91] Powers, J., P., S., Hancock, R., E., W., The Relationship Between Peptide Structure and Antibacterial Activity, *Peptides*, 24, 1681–1691, **2003**.
- [92] Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A., Amphipathic, Alpha-Helical Antimicrobial Peptides, *Biopolymers*, 55, 4–30, **2000**.
- [93] Ajesh, K., Sreejith, K., Peptide Antibiotics: An Alternative and Effective Antimicrobial Strategy to Circumvent Fungal Infections, *Peptides*, 30, 999–1006, **2009**.
- [94] Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M., E., Gillin, F., D., Killing of *Giardia lamblia* by Cryptdins and Cationic Neutrophil Peptides, *Infection and Immunity*, 62, 5397–5403, **1994**.
- [95] Hancock, R., E., W., Lehrer, R., Cationic Peptides: A New Source of Antibiotics, *Trends in Biotechnology*, 16, 82–88, **1998**.
- [96] Morimoto, M., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., Kunita, N., Niwa, M., Murakami, T., Iwanaga, S., Inhibitory Effect of Tachyplesin I on the Proliferation of Human Immunodeficiency Virus in Vitro, *Chemotherapy*, 37, 206–211, **1991**.
- [97] Reddy, K., V., R., Yedery, R., D., Aranha, C., Antimicrobial Peptides: Premises and Promises, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 536–547, **2004**.
- [98] Matsuzaki, K., Sugishita, K., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., Epanand, R., M., Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2, *Biochemistry*, 37, 11856–11863, **1998**.
- [99] Ladokhin, A., S., White, S. H., Detergent-like Permeabilization of Anionic Lipid Vesicles by Melittin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1514, 253–260, **2001**.
- [100] Yang, L., Harroun, T., A., Weiss, T., M., Ding, L., Huang, H., W., Barrel-Stave Model or Toroidal Model A Case Study on Melittin Pores, *Biophysical Journal*, 81, 1475–1485, **2001**.
- [101] Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K., An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation, *Biochemistry*, 35, 11361–11368, **1996**.

- [102] Hancock, R., E., Cationic Peptides: Effectors in Innate Immunity and Novel Antimicrobials, *Lancet Infectious Diseases*, 1, 156–164, **2001**.
- [103] Cunliffe, R., N., Mahida, Y., R., Expression and Regulation of Antimicrobial Peptides in the Gastrointestinal Tract, *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 49–58, **2004**.
- [104] Bowdish, D., M., E., Davidson, D., J., Lau, Y., E., Lee, K., Scott, M., G., Hancock, R., E., W., Impact of LL-37 on Anti-infective Immunity, *Journal of Leukocyte Biology*, 77, 451–459, **2005**.
- [105] Brown, K., L., Hancock, R., E., W., Cationic Host Defense (antimicrobial) Peptides, *Current Opinion in Immunology*, 18, 24–30, **2006**.
- [106] Elsbach, P., What is the Real Role of Antimicrobial Polypeptides That Can Mediate Several Other Inflammatory Responses, *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1643–1645, **2003**.
- [107] Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L., W., Oppenheim, J., J., Mammalian Defensins in Immunity: More Than Just Microbicidal, *Trends in Immunology*, 23, 291–296, **2002**.
- [108] Davidson, D., J., Currie, A., J., Reid, G., S., Bowdish, D., M., MacDonald, K., L., Ma, R., C., Hancock, R., E., Speert, D., P., The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-induced T cell Polarization, *Journal of Immunology*, 172, 1146–1156, **2004**.
- [109] Hancock, R., E., W., Diamond, G., The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences, *Trends in Microbiology*, 8, 402–410, **2000**.
- [110] Hancock, R., E., W., The Bacterial Outer Membrane as a Drug Barrier, *Trends in Microbiology*, 5, 37–42, **1997**.
- [111] Schwarz, T., Beissert, S., Milestones in Photoimmunology, *Journal of Investigative Dermatology*, 133, E7–E10, **2013**.
- [112] Rebat, E., M., H., Sumayah, J., T., K., Goldsmith, L., A., Katz, S., I., Gilchrest, B., A., Paller, A., S., Leffell, D., J., Disorders of Melanocyte, *Wolff Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8th Edition, 8. Baskı, McGraw-Hill-Company, New York, **2012**.

- [113] Froy, O., Regulation of Mammalian Defensin Expression by Toll-like Receptor-dependent and Independent Signalling Pathways, *Cellular Microbiology*, 7, 1387–1397, **2005**.
- [114] Fellermann, K., Stange, E., F., Defensins Innate Immunity at the Epithelial Frontier, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13, 771–6, **2001**.
- [115] Fromm, J., R., Hileman, R., E., Caldwell, E., E., O., Weiler, J., M., Linhardt, R., J., Differences in the Interaction of Heparin with Arginine and Lysine and the Importance of These Basic Amino Acids in the Binding of Heparin to Acidic Fibroblast Growth Factor, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323, 279–287, **1995**.
- [116] Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A., Zanettit, M., Biological Characterization of Two Novel Cathelicidin-derived Peptides and Identification of Structural Requirements for Their Antimicrobial and Cell Lytic Activities, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 28375–28381, **1996**.
- [117] Gudmundsson, G., H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., Salcedo, R., The Human Gene FALL39 and Processing of the Cathelin Precursor to the Antibacterial Peptide LL-37 in Granulocytes, *European Journal of Biochemistry*, 238, 325–332, **1996**.
- [118] Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H., G., Gudmundsson, G., H., FALL-39, A Putative Human Peptide Antibiotic, is Cysteine-free and Expressed in Bone Marrow and Testis., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 92, 195–9, **1995**.
- [119] Sørensen, O., E., Follin, P., Johnsen, A., H., Calafat, J., Tjabringa, G., S., Hiemstra, P., S., Borregaard, N., Human Cathelicidin, hCAP-18, is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3, *Blood*, 97, 3951–3959, **2001**.
- [120] Johansson, J., Gudmundsson, G., H., Rottenberg, M., E., Berndt, K., D., Agerberth, B., Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3718–3724, **1998**.
- [121] Turner, J., Cho, Y., Dinh, N., N., Waring, A., J., Lehrer, R., I., Activities of LL-37, A Cathelin-associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2206–2214, **1998**.

- [122] Nakatsuji, T., Gallo, R., L., Antimicrobial Peptides: Old Molecules With New ideas, *Journal of Investigative Dermatology's*, 132, 887–95, **2012**.
- [123] Metz, M., Siebenhaar, F., Maurer, M., Mast Cell Functions in the Innate Skin Immune System, *Immunobiology*, 213, 251–260, **2008**.
- [124] Leung, T., F., Ching, K. W., Kong, A., P., S., Wong, G., W., K., Chan, J., C., N., Hon, K., L., Circulating LL-37 is A Biomarker for Eczema Severity in Children, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26, 518–522, **2012**.
- [125] Sperandio, B., Regnault, B., Guo, J., Zhang, Z., Stanley, S., L., Jr., Sansonetti, P., J., Pédrón, T., Virulent *Shigella flexneri* Subverts the Host Innate Immune Response Through Manipulation of Antimicrobial Peptide Gene Expression, *Journal of Experimental Medicine*, 205, 1121–32, **2008**.
- [126] Nell, M., J., Tjabringa, G., S., Wafelman, A., R., Verrijck, R., Hiemstra, P., S., Drijfhout, J., W., Grote, J., J., Development of Novel LL-37 Derived Antimicrobial Peptides with LPS and LTA Neutralizing and Antimicrobial Activities for Therapeutic Application, *Peptides*, 27, 649–660, **2006**.
- [127] Dahech, I., Fakhfakh, J., Damak, M., Belghith, H., Mejdoub, H., Belghith, K., S., Structural Determination and NMR Characterization of a Bacterial Exopolysaccharide, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 417–422, **2013**.
- [128] Jathore, N., R., Bule, M., V., Tilay, A., V., Annapure, U., S., Microbial Levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Medium Optimization for Enhanced Production, *Food Science and Biotechnology*, 21, 1045–1053, **2012**.
- [129] Hangit, Y., W., Clarke, M., Production and Characterization of Microbial Levan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 93–396, **1990**.
- [130] Blake, J., D., Clarke, M., L., Jansson, P., E., McNeil, K., E., Fructan from *Erwinia herbicola*, *Journal of Bacteriology*, 151, 1595–1597, **1982**.

- [131] Tajima, K., Uenishi, N., Fujiwara, M., Erata, T., Munekata, M., Takai, M., The Production of a New Water-soluble Polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and Its Structural Analysis by NMR Spectroscopy, *Carbohydrate Research*, 305, 117–122, **1997**.
- [132] Shih, I. L., Yu, Y., T., Shieh, C., J., Hsieh, C., Y., Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8211–8215, **2005**.
- [133] Barone,, J. R., Medynets, M., Thermally Processed Levan Polymers, *Carbohydrate Polymers*, 69, 554–561, **2007**.
- [134] Szwengiel, C., Z., A., Czarnecka, M., Roszyk, H., Levan Production by *Bacillus subtilis* DSM 347 Strain, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, **2004**.
- [135] Şilbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Y., Levan production by *Zymomonas mobilis* in Batch and Continuous Fermentation Systems, *Carbohydrate Polymers*, 99, 454–461, **2014**.
- [136] Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R., Stability of Levan Produced by *Zymomonas mobilis*, *Process Biochemistry*, 40, 1535–1539, **2005**.
- [137] Bekers, M., Grube, M., Vulfa, L., Upite, D., Kaminska, E., Scherbaka, R., Vigants, A., Danilevich, A., Stillage as a Source of Growth Promoting Biofactors and a Stimulator of Levan and Extracellular Levansucrase Synthesis for *Zymomonas mobilis*, *Food Technology and Biotechnology*, 40, 305–310, **2002**.
- [138] Dahech, I., Ben Ayed, H., Ben Ayed, K., Belghith, S., Belghith, H., Mejdoub, H., Microbial Production of Levanase for Specific Hydrolysis of Levan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 128–133, **2013**.
- [139] Wahyuningrum, D., Hertadi, R., Isolation and Characterization of Levan from Moderate Halophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* BK AG21, in *International Symposium on Applied Chemistry*, **2015**.
- [140] Ananthalakshmy, V., K., Gunasekaran, P., Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 291–298, **1999**.

- [141] Shanter AL-Qaysi, S. B. K. A., Thabit, Z., A., Levan Production Using *Pseudomonas brassicacearum* Isolated from Rhizosphere Soil of Cowpea Farm in Iraq, *Iraqi Journal of Biotechnology*, 15, 83–96, **2016**.
- [142] Liang, T., W., Tseng, S., C., Wang, S., L., Production and Characterization of Antioxidant Properties of exopolysaccharide(s) from *Peaenibacillus mucilaginosus* TKU032, *Marine Drugs*, 14, 2, **2016**.
- [143] Ernandes, F., M., P., G., Garcia-Cruz, C., H., Nutritional Requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for Levan Production, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 589–600, **2011**.
- [144] Melo, I., R., Pimentel, M., F., Lope, C., E., Calazans, G., M., T., Application of Fractional Factorial Design to Levan Production by *Zymomonas mobilis*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 45–51, **2007**.
- [145] Ishikawa, H., Nobayashi, H., Tanaka, H., Mechanism of Fermentation Performance of *Zymomonas mobilis* Under Oxygen Supply in Batch Culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 34–40, **1990**.
- [146] Kekez, B., D., Gojgic-Cvijovic, G., D., Jakovljevic, D., M., Stefanovic Kojic, J., R., Markovic, M., D., Beskoski, V., P., Vrvic, M., M., High Levan Production by *Bacillus licheniformis* NS032 Using Ammonium Chloride as the Sole Nitrogen Source, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 3068–3083, **2015**.
- [147] Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng, X., Production, Characterization and Antioxidant Activities in Vitro of Exopolysaccharides from Endophytic Bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, *Carbohydrate Polymers*, 78, 275–281, **2009**.
- [148] Keith, J., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., Kaplan, D., Continuous Culture System for Production of Biopolymer Levan Using *Erwinia herbicola*, *Biotechnology & Bioengineering*, 38, 557–560, **1991**.
- [149] Viikari, L., Formation of Levan and Sorbitol from Sucrose by *Zymomonas mobilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 252–255, **1984**.
- [150] Kang, S., A., Jang, K., H., Seo, J., W., Kim, K., H., Levan: Applications and Perspectives, *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*, 145–161, **2009**.

- [151] Shih, I., L., Wang, T., C., Chou, S., Z., Lee, G. D., Sequential Production of Pwo Piopolymers-levan and Poly-lysine by Microbial Fermentation, *Bioresource Technology*, 102, 3966–3969, **2011**.
- [152] Lazaridou, A., Biliaderis, C., G., Roukas, T., Izydorczyk, M., Production and Characterization of Pullulan from Beet Molasses Using a Nonpigmented Strain of *Aureobasidium pullulans* in Batch Culture, *Applied biochemistry and biotechnology*, 97, 1–22, **2002**.
- [153] Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C., H., S., S., Harish, B., S., Janaki Ramaiah, M., Uppuluri, K., B., Antioxidant and Anti-inflammatory Levans Produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and Its Statistical Optimization, *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16, **2015**.
- [154] Viikari, L., Gisler, R., By-products In the Fermentation of Sucrose by Different *Zymomonas*-strains, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 240–244, **1986**.
- [155] Zhu, J., K., Hasegawa, P., M., Bressan, R., Bohnert, H., J., Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16, 253–277, **1997**.
- [156] Meneses, C., H., S., G., Rouws, L., F., M., Simoes-Araujo, J., L., Vidal, M., S., Baldani, J., I., Exopolysaccharide Production is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 24, 1448–58, **2011**.
- [157] Yoo, S., H., Yoon, E., J., Cha, J., Lee, H., G., Antitumor Activity of Levans Polysaccharides from Selected Microorganisms, *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 37–41, **2004**.
- [158] Cescutti, P., Impallomeni, G., Garozzo, D., Sturiale, L., Herasimenka, Y., Lagatolla, C., Rizzo, R., Exopolysaccharides Produced by a Clinical Strain of *Burkholderia cepacia* Isolated from a Cystic Fibrosis Patient, *Carbohydrate Research*, 338, 2687–2695, **2003**.
- [159] Ateş, Ö., Arga, K., Y., Öner, E., T., The Stimulatory Effect of Mannitol on Levans Biosynthesis: Lessons from Metabolic Systems Analysis of *Halomonas smyrnensis* AAD6T, *Biotechnology Progress*, 29, 1386–1397, **2013**.

- [160] S. Şilbir, *Zymomonas mobilis* ile Levan Üretimi ve Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, **2013**.
- [161] Bertuzzi, M., A., Castro Vidaurre, E., F., Armada, M., Gottifredi, J., C., Water Vapor Permeability of Edible Starch Based Films, *Journal of Food Engineering*, 80, 972–978, **2007**.
- [162] Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J., I., Combined Effect of Plasticizers and Surfactants on the Physical Properties of Starch Based Edible Films, *Food Research International*, 39, 840–846, **2006**.
- [163] Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., Yarmand, M., S., Development and Characterisation of a New Biodegradable Edible Film Made from Kefiran, an Exopolysaccharide Obtained from Kefir Grains, *Food Chemistry*, 127, 1496–1502, **2011**.
- [164] Cussler, E., L., Hughes, S., E., Ward, W., J., Aris, R., Barrier Membranes, *Journal of Membrane Science*, 38, 161–174, **1988**.
- [165] Sun, L., Boo, W., J., Clearfield, A., Sue, H., J., Pham, H., Q., Barrier Properties of Model Epoxy Nanocomposites, *Journal of Membrane Science*, 318, 129–136, **2008**.
- [166] Yano, K., Usuki, A., Okada, A., Kurauchi, T., Kamigaito, O., Synthesis and Properties of Polyimide–clay Hybrid, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31, 2493–2498, **1993**.
- [167] Hinkley, D., Qi, J., He, G., Molecular Dynamics Simulation of Thermal and Mechanical Properties of Polyimide–carbon-nanotube Composites, *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 13, 493–507, **2005**.
- [168] Byun, B., Y., Lee, S., J., Mah, J., H., Antipathogenic Activity and Preservative Effect of Levan (β -2,6-fructan), a Multifunctional Polysaccharide, *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 238–245, **2014**.
- [169] Choi, H., Yang, Z., Weisshaar, J. C., Oxidative Stress Induced in *E. coli* by the Human Antimicrobial Peptide LL-37, *PLoS Pathogens*, 13, 6, **2017**.
- [170] Noore, J., Noore, A., Li, B., Cationic Antimicrobial Peptide II-37 is Effective Against Both Extraand Intracellular *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 1283–1290, **2013**.

- [171] Aas, J., A., Griffen, A., L., Dardis, S., R., Lee, A., M., Olsen, I., Dewhirst, F., E., Leys, E., J., Paster, B., J., Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults, *Journal of clinical microbiology*, 46, 1407–1417, **2008**.
- [172] Wang, G., Epand, F., Mishra, B., Lushnikova, T., Thomas, V., C., Bayles, K., W., Epand, R., M., Decoding the Functional Roles of Cationic Side Chains of the Major Antimicrobial Region of Human Cathelicidin LL-37, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 845–856, **2012**.
- [173] Hertog, A., L., Marle, J., V., Veenh, A., Hof, W., Bolscher, J., G., M., Veerman, E., C., I., Nieuw Amerongen, A., V., Candidacidal Effects of Two Antimicrobial Peptides: Histatin 5 Causes Small Membrane Defects, but LL-37 Causes Massive Disruption of the Cell Membrane, *Biochemical Journal*, 388, 689–695, **2005**.
- [174] Mania, D., Hilpert, K., Ruden, S., Fischer, R., Takeshita, N., Screening for Antifungal Peptides and Their Modes of Action in *Aspergillus nidulans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7102–7108, **2010**.
- [175] Benincasa, M., Scocchi, M., Pacor, S., Tossi, A., Nobili, D., Basaglia, G., Buseti, M., Gennaro, R., Fungicidal Activity of Five Cathelicidin Peptides Against Clinically Isolated Yeasts, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 950–959, **2006**.
- [176] Ruissen, A., L., Groenink, J., Helmerhorst, E., J., Walgreen-Weterings, E., W., Hof, V., Veerman, E., C., Amerongen, A., V., N., Effects of Histatin 5 and Derived Peptides on *Candida albicans*, *Biochemical Journal*, 356, 361–8, **2001**.
- [177] Verstrepen, K., J., Klis, F., M., Flocculation, Adhesion and Biofilm Formation in Yeasts, *Molecular Microbiology*, 60, 5–15, **2006**.
- [178] Tsai, P., W., Yang, C., Y., Chang, H., T., Lan, C., Y., Human Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits Adhesion of *Candida albicans* by Interacting with Yeast Cell-wall Carbohydrates, *PLoS One*, 6, 3, **2011**.
- [179] Shi, L., Zhao, Y., Zhang, X., Su, H., Tan, T., Antibacterial and Anti-mildew Behavior of Chitosan/nano-TiO₂ Composite Emulsion, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25, 1434–1438, **2008**.
- [180] Miller, G., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426–428, **1959**.

- [181] Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18, vol. 28, no. 1, pp. 46–52, **2008**.

EK 1: Bentonit kiline ait XRD ve XRF analizleri



Certificate of Analysis

XRD ANALİZİ			
PERTEK			
XRD TÜMKAYA BİLEŞİMİ	SİLİKA GRUBU	Kuars	eser
		Cristobalit	2
	Feldspar		9
	Kalsit		1
	Toplam Kil		88
XRD KİL MINERAL BİLEŞİMİ	SMEKTİT GRUBU	17 A MONT.	85
		15 A MONT.	3
	İllit		eser
	Klorit		-
	Kaolinit		-

XRF ANALİZİ	
% (Ağırlıkça)	PERTEK
Na ₂ O	1,49
MgO	1,47
AhO ₃	15,97
SiO ₂	57,79
K ₂ O	0,75
CaO	2,6
Fe ₂ O ₃	3,35

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ

Doğum Yeri: ESKİŞEHİR

Medeni Hali: EVLİ

E-posta: gozdekosarsoy@gmail.com

Adresi: Esatoğlu mah. Esat cad. Ocak apt. 91/19 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise: Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Intermadiate

İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi (2011-)

Deneyim alanları

Biyoteknoloji, Mikrobiyoloji, Tıbbi mikrobiyoloji, Nanobiyoteknoloji

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Hızlı Destek Projesi,
FHD-2016-12723, 22007,44 (TL)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

A Study on Silk Cocoon Membranes of *A.lobata* and *A.bruennichi*:
Structural Characterization, Electricity and Bioactivity, Wei-Tsung
Chuang, Semra İde, U-Ser Jeng, Sevgi Bayarı, Ilghar Orujalipoor, Mustafa
F. Sargon, Gözde Koşarsoy Ağçeli, Nilüfer Cihangir, Tuncay Türkeş,
NSRRC 23rd Users' Meeting & Workshops /Taiwan, 5 – 8 Eylül, 2017,
poster sunumu



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/12/2017

Tez Başlığı / Konusu: Mikrobiyal Biyopolimer Üretimi ve Antimikrobiyal Yüzey Olarak Kullanımının Araştırılması
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 76 sayfalık kısmına ilişkin, 12/10/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ
Öğrenci No: N13145026
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: Biyoloji(Biyoteknoloji)-Doktora
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

12.12.17

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
THESIS/DISSERTATION ORIGINALITY REPORT

HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
TO THE DEPARTMENT OF BIOLOGY

Date: 12/12/2017

Thesis Title / Topic: PRODUCTION OF MICROBIAL BIOPOLYMER AND INVESTIGATION OF USING AS ANTIMICROBIAL SURFACE

According to the originality report obtained by myself/my thesis advisor by using the *Turnitin* plagiarism detection software and by applying the filtering options stated below on 12/10/2017 for the total of 76 pages including the a) Title Page, b) Introduction, c) Main Chapters, d) Conclusion sections of my thesis entitled as above, the similarity index of my thesis is 4 %.

Filtering options applied:

1. Bibliography/Works Cited excluded
2. Quotes ~~excluded~~ / included
3. Match size up to 5 words excluded

I declare that I have carefully read Hacettepe University Graduate School of Science and Engineering Guidelines for Obtaining and Using Thesis Originality Reports; that according to the maximum similarity index values specified in the Guidelines, my thesis does not include any form of plagiarism; that in any future detection of possible infringement of the regulations I accept all legal responsibility; and that all the information I have provided is correct to the best of my knowledge.

I respectfully submit this for approval.

Name Surname: GÖZDE KOŞARSOY AĞÇELİ

Student No: N13145026

Department: BIOLOGY

Program: Biology(Biotechnology)-Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Status: Masters Ph.D. Integrated Ph.D.

Date and Signature

12.12.17

ADVISOR APPROVAL

APPROVED.

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR