Calidifontibacillus erzurumensis **TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Saadet Hilal ÖNDER

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

Calidifontibacillus erzurumensis TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

(Investigation of The Biological Activity of Exopolisacharide Produced by *Calidifontibacillus erzurumensis*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saadet Hilal ÖNDER

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Saadet Hilal ÖNDER tarafından hazırlanan "*Calidifontibacillus erzurumensis* Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması" başlıklı çalışması 02/01/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç Dr. Burak ALAYLAR *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa Özkan BALTACI *Atatürk Üniversitesi*	Aslı ıslak imzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "*Calidifontibacillus erzurumensis* Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	**30**
Kuramsal Temeller	6	**30**
Materyal ve Yöntem	14	**35**
Araştırma Bulguları ve Tartışma	4	**20**
Sonuç ve Öneriler	3	**20**
Tezin Geneli	11	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Saadet Hilal ÖNDER	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2.1.2023	2.1.2023
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecinde engin bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, her türlü laboratuvar imkânlarını sağlayan ve tezin deneysel aşaması ve kurgusunda bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, tez sürecinde destek olan Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a

Her türlü sorumda kapılarını çaldığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan Baltacı'ya Sayın. Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a ve Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU hocalarıma

Başta Berrin ALGÜL olmak üzere Elifnur MERAL ve kıymetli laboratuvar arkadaşlarıma

Hayatımın her alanında bana inanan, güvenen, beni destekleyen sevgili aileme ve kıymetli dostum Öznur ALTUNLU'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Saadet Hilal ÖNDER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Calidifontibacillus erzurumensis TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Saadet Hilal ÖNDER

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Erzurum ili Ilıca kaplıcasından izole edilen, yeni cinsin tip türü olarak literatüre kazandırılan *Calidifontibacillus erzurumensis'*ten ekzopolisakarit (EPS) üretmek ve üretilen EPS'nin biyolojik, kimyasal özelliklerini incelemektir.

Yöntem: EPS üretimi, 100 mL tripton soya suyu (TSB) içeren 250 mL'lik şişelerde gerçekleştirildi. Optimizasyon deneyleri sırasında, EPS üretimini artırmak için farklı pH'lar, sıcaklıklar ve inkübasyon süreleri test edildi. Ortam koşulları optimize edildikten sonra üretilen EPS, TCA işlemi, etanol çökeltme ve santrifüjleme işlemi uygulanarak saflaştırıldı. Elde edilen EPS'nin toplam karbonhidrat ve protein içerikleri sırasıyla fenol sülfürik asit ve Bradford yöntemlerine göre belirlendi. Ayrıca EPS örneğinin protein yüzdesi 230, 260 ve 280 nm'de alınan UV spektrumları kullanılarak, Warburg Christian yöntemine göre belirlendi. EPS'nin çözünürlüğü, su ve organik çözücüler (Distile su, izopropanol, etanol, metanol, aseton, kloroform, DMSO, petrol eteri, formaldehit, hekzan) içinde test edildi. Saflaştırılmış EPS'nin fonksiyonel gruplarını analiz etmek için FTIR analizi yapıldı. EPS'nin monomer bileşimi, HPLC analizine göre belirlendi. EPS'nin potansiyel biyolojik aktivitelerine sahip olup olmadığını ortaya çıkarmak için antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri sırasıyla, disk difüzyon ve DPPH radikal yakalama yöntemine göre test edildi.

Bulgular: *C. erzurumensis*'ten EPS üretimi için en uygun koşullar; 55°C sıcaklık, 8 başlangıç pH'sı ve 48 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlendi. EPS'nin organik çözücülere kıyasla suda daha yüksek çözünürlük gösterdiği gözlemlendi. Saflaştırılan EPS'nin karbonhidrat ve protein içerikleri sırasıyla %82,3 ve %0,1 olarak belirlendi. Ayrıca FTIR analizi EPS'nin proteinlerin ve karbonhidratların varlığını gösteren fonksiyonel gruplara sahip olduğunu doğruladı. HPLC tabanlı monomer analizi, EPS'nin tekrarlanan galaktoz birimlerinden oluşan bir homopolisakkarit olduğunu ortaya çıkardı. Disk difüzyon yöntemi, EPS'nin test edilen patojenlerin hiçbirine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını gösterdi. DPPH radikal yakalama yöntemine göre, EPS'nin %21,3 oranında iyi bir antioksidan etkiye sahip olduğu belirlendi.

Sonuç: Bu çalışma ile yeni cinsin tip türü olarak literatüre kazandırılan *C. erzurumensis'*in, antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, suda çözünebilen, hücre dışı bir homopolisakarit üretebildiği ortaya konuldu. Bu EPS'nin antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle; biyoteknolojik ve tıbbi amaçlar için faydalı model olarak kullanılabileceğini biza gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Calidifontibacillus erzurumensis*, mikrobiyal ekzopolisakkarit, homopolisakkarit, antioksidan, antimikrobiyal

Ocak 2023, 69 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION of THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXOPOLISACHARIDE PRODUCED by *Calidifontibacillus erzurumensis*

Saadet Hilal ÖNDER

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: The aim of this study is to produce exopolysaccharide (EPS) from *Calidifontibacillus erzurumensis*, which was isolated from Erzurum province Ilıca thermal spring and added to the literature as a type species of the new genus, and to examine the biological and chemical properties of the EPS produced.

Method: EPS production was carried out in 250 mL bottles containing 100 mL of tryptone soy water (TSB). During the optimization experiments, different pHs, temperatures and incubation times were tested to increase EPS production. After the ambient conditions were optimized, the EPS produced was purified by TCA treatment, ethanol precipitation and centrifugation. Total carbohydrate and protein contents of the EPS obtained were determined according to phenol sulfuric acid and Bradford methods, respectively. In addition, the protein percentage of the EPS sample was determined according to the Warburg Christian method using UV spectra taken at 230, 260 and 280 nm. The solubility of EPS was tested in water and organic solvents (Distilled water, isopropanol, ethanol, methanol, acetone, chloroform, DMSO, petroleum ether, formaldehyde, hexane). FTIR analysis was performed to analyze the functional groups of the purified EPS. The monomer composition of EPS was determined by HPLC analysis. To reveal whether EPS has potential biological activities, antimicrobial and antioxidant activities were tested according to disk diffusion and DPPH radical capture method, respectively.

Findings: Optimal conditions for EPS production from *C. erzurumensis*; It was determined as a temperature of 55 °C, an initial pH of 8, and an incubation period of 48 hours. It was observed that EPS showed higher solubility in water compared to organic solvents. Carbohydrate and protein contents of the purified EPS were determined as 82.3% and 0.1%, respectively. In addition, FTIR analysis confirmed that EPS has functional groups indicating the presence of proteins and carbohydrates. HPLC-based monomer analysis revealed that EPS is a homopolysaccharide composed of repeating galactose units. The disk diffusion method showed that EPS had no antimicrobial activity against any of the pathogens tested. According to the DPPH radical capture method, it was determined that EPS had a good antioxidant effect at the rate of 21.3%.

Conclusion: With this study, it was revealed that *C. erzurumensis*, which was brought to the literature as a type species of the new genus, has antioxidant activity and can produce a water-soluble, extracellular homopolysaccharide. Because this EPS has antioxidant activity; showed us that it can be used as a useful model for biotechnological and medical purposes.

Keywords: *Calidifontibacillus erzurumensis*, microbial exopolysaccharide, homopolysaccharide, antioxidant, antimicrobial

January 2023, 69 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ xi
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 3
Makromoleküller 3
Karbonhidratlar 3
Monosakkaritler 3
Disakkaritler 3
Polisakkaritler 3
Polisakkaritlerin doğal kaynakları 4
Mikrobiyal polisakkaritler 5
Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS) 6
Homopolisakkarit 7
Selüloz 7
Dekstran 8
Kurdlan 8
Heteropolisakkaritler 9
Hiyalüronik Asit (HA) 9
Gellan 10
Ekzopolisakkarit biyosentezi 11
EPS Üretimini Etkileyen Faktörler 11
Karbon kaynağı 11
Sıcaklık 11
pH 12

Nitrojen kaynakları 12
İnkübasyon süresi 12
EPS üreten mikroorganizmalar 12
Calidifontibacillus erzurumensis'in EPS Üretim Yeteneği 13
EPS kullanım alanları 14
Literatür Taraması 15
MATERYAL ve YÖNTEM 18
Materyal 18
Kullanılan cihazlar 18
Kullanılan kimyasallar 18
Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması 19
Metot 20
Bakterinin canlandirilmasi 20
Ön kültürün hazirlanmasi 20
Ekzopolisakkarit Üretimi ve Optimizasyonu 20
Optimal sıcaklığın belirlenmesi 20
Optimal pH değerinin belirlenmesi 21
Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi 21
Ekzopolisakkaritin Total Üretimi 22
EPS' nin karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi 22
EPS' nin Protein İçeriğinin Belirlenmesi 22
Warburg-Christian yöntemi 22
Bradford (Coomassie blue) yöntemi 23
EPS'nin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 23
EPS'nin çözünürlüğünün belirlenmesi 23
Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi 23
HPLC analizi 23
Fonksiyonel grup analizi 24
EPS'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi 24
Antimikrobiyal aktivite 24
Antioksidan Aktivite 24
DPPH testi 24
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 26
Ekzopolisakkarit Üretiminde Optimum Şartların Belirlenmesi ve EPS Üretimi 26
EPS üretimi 26

Optimal Şartların Belirlenmesi 27
Optimum sıcaklık değerinin değerlendirilmesi 27
Optimum pH değerinin değerlendirilmesi 28
Optimum inkübasyon süresinin değerlendirilmesi 29
Ekzopolisakkaritin Total Üretimi 29
Karbonhidrat İçeriğinin Belirlenmesi 30
Fenol – Sülfürik asit yöntemi 30
Protein İçeriğinin Belirlenmesi 32
Warburg-Christian yöntemi 32
Bradford yöntemi 32
Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 33
Çözünürlüğün belirlenmesi 33
Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi 34
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi) analizi 34
FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi) yöntemi ile EPS'nin fonksiyonel grup analizi 35
Biyolojik aktivitenin analizi 37
Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 39
DPPH testi 39
SONUÇ VE ÖNERİLER 41
KAYNAKÇA 43
ÖZGEÇMİŞ 56

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar 13
Tablo 2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Markaları 18
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Bazı Kimyasallar ve Markaları 19
Tablo 4. Farklı Sıcaklık Değerlerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları 28
Tablo 5. Farklı pH Değerlerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları 29
Tablo 6. Farklı İnkübasyon Sürelerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları 29
Tablo 7. Standart İçin Ölçülen Absorbans Değerleri 31
Tablo 8. Protein Miktar Tayini İçin Spektrofotometik Sonuçlar 32
Tablo 9. Total Protein Tayini İçin Oluşturulan Standartın Spektofomotrik Sonuçları 32
Tablo 10. EPS'nin Farklı Çözücülerdeki Çözünürlük Sonuçları 33
Tablo 11. HPLC Analiz Sonucu 35
Tablo 12. DPPH Serbest Radikali Giderme Yeteneği Yüzdeleri 40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Polisakkaritlerin doğal kaynakları 5
Şekil 2. Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması 6
Şekil 3. Selülozun kimyasal yapısı 7
Şekil 4. Dekstran kimyasal yapısı 8
Şekil 5. Kurdlan kimyasal yapısı 9
Şekil 6. Hiyalüronik asit kimyasal yapısı 10
Şekil 7. Gellan kimyasal yapısı 10
Şekil 8. *Bacillus* cinsi bakterilerin 16S rRNA gen bölgesine göre oluşturulan filogenetik ağaç görüntüsü 14
Şekil 9. TSB besiyerinde EPS üretimi. a) TSB besiyerinde inkübasyon sonrası bakteri gelişimi b) Santrifüjle hücre uzaklaştırılması yapılmış süpernatatanta protein uzaklaştırması amacıyla TCA eklendi 26
Şekil 10. Üretilen EPS' nin saflaştırılması. a) Etil alkol muamaelesi sonrasında kısmen çökelmiş EPS b) Etil alkol ekleme, santrifüj ve liyofilizasyon işlemleri sonrasında elde edilen EPS 27
Şekil 11. Fenol sülfürik asit metodu sonrasında oluşan renk değişimi. Sol tarafta bulunan kontrol, sağ tarafta bulunan ise muamele sonrası EPS'nin renk değişimi 30
Şekil 12. EPS'nin içerisindeki glikoz miktarını belirlemek için oluşturulan standart grafik 31
Şekil 13. Bradford protein tayininde kullanılan BSA'nın standart grafiği 33
Şekil 14. *C. erzurumensis* tarafından üretilen HPLC kromatogramı 35
Şekil 15. *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin FT-IR sonucu 37
Şekil 16. *C. erzurumensis* yerel izolatından üretilen EPS'nin antimikrobiyal aktivite sonuçları 39

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

°C : Santigrat Derece
BSA : Bovine Serum Albumin
CPS : Kapsüler Polisakkarit
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DPPH : 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
EDTA : 2,2',2",2'"- (Ethane-1,2-diyldinitrilo) Tetraasetik asit
EPS : Ekzopolisakarit
EtOH : Etanol
FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
kDa : Kilodalton
LPS : Lipopolisakkarit
NaOH : Sodyum Hidroksit
OD : Optik Dansisite
pH : Potansiyel Hidrojen
TCA : Trikloroasetik Asit
TSA : Tryptone Soya Agar
TSB : Tryptone Soya Broth
µl : Mikrolitre

GİRİŞ

Mikrobiyal polisakkaritler; kapsüler polisakkaritler (CPS'ler), lipopolisakkaritler (LPS'ler) ve ekzopolisakkaritler (EPS'ler) olarak gruplanır. CPS'ler çoğunlukla bakterilerin patojenitesi ve virülans faktörleriyle ilişkilidir. LPS'ler gram negatif bakterilerin dış zarında bulunup ve virülans faktörü olarak işlev görmektedir. EPS'ler, hücre dışı polisakkaritler olarak bilinen polimerlerdir (Ergene ve Avcı 2016). Ekzopolisakkaritler yapılarında proteinler, glikoproteinler, nükleik asitler, hümik asitler, fosfolipitler, süksinat ve asetat gibi karbonhidrat olmayan bileşenler bulundurmaktadır (Silambarasan *et al*. 2018). Mikrobiyal EPS'lerin fizyolojik görevleri mikroorganizmayı fagositoza, faj saldırılarına ve ozmotik strese karşı korumaktır.

Ayrıca EPS'ler hücrede bulundukları konuma, kimyasal ve fiziksel özelliklerine ve görevlerine göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Mikrobiyal EPS' ler kimyasal yapılarına, molekül ağırlıklarına, işlevselliklerine ve bağ bağlantılarına göre sınıflandırılmaktadır. (Yildiz ve Karatas 2018). Monomerik bileşimlerine göre homopolimerik veya heteropolimerik olarak gruplandırılmaktadır. Homopolisakkaritler sadece tek tip, heteropolisakaritler ise iki veya daha fazla çeşit monosakkarit birimi içermektedir (Yildiz & Karatas, 2018). Homoopolimerik EPS'lere selüloz, dekstran, pullulan; heteropolimerik EPS'lere ise ksantan ve hyaluronik asit örnek olarak verilebilmektedir. (Lee *et al.* 2022)

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin önemli üreticileri arkeler, bakteriler, ipliksi mantarlar ve mayalardır (Saadat et al. 2021). *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Oenococcus* ve *Carnobacterium* cinsi bakterilerden, *Ganoderma lucidum, Cordyceps* sp., *Agaricus blazi, Grifola frondosa* ve *Lentinus edodes* mantar türlerinden üretilmektedir (Mahapatra and Banerjee 2013; Jin *et al.* 2019).

EPS'lerin üretildikleri çevresel faktörler, biyolojik işlevlerini destekler niteliktedir (Li *et al.* 2022). Yapılan çalışmalarda sıcaklık, karbon kaynağı, nitrojen kaynağı ve pH gibi çevresel faktörlerin EPS yapısını ve fermentasyon verimini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle ekzopolisakkaritlerin üretiminde ortam koşullarının optimizasyonu oldukça önem arz etmektedir Rana and Upadhyay 2020).

Yüksek moleküler ağırlıklı ve biyobozunur olmasından dolayı EPS'ler, çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bunlar arasında ilaç endüstrisi, çevre biyoteknolojisi, eczacılık,

fonksiyonel gıda üretimi, biyoremesiasyon, tekstil, herbisit ve kozmetik yer almaktadır (Nwodo *et al.* 2012; Mahmoud *et al*. 2021). Mikrobiyal EPS'lerin sağlık alanındaki önemli ilgi çekici özellikleri antitümör, antioksidan, antidiyabetik, antiviral, makrofaj aktivasyonu, prebiyotik, kolestrol düşürücü, immünomodülatör ve antiülser gibi biyolojik aktiviteleridir (Zannini *et al.* 2016).

(Adiguzel *et al.* 2020) tarafından yapılan çalışmada, Erzurum'da bulunan kaplıcalardaki su örneklerinden izole edilen bakteriler arasından yeni bir bakteri cinsi keşfedilmiş ve bu cinsin tip türü olan *Calidifontibacillus erzurumensis* olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte bu yeni cinsin biyoteknolojik özelliklerine yönelik herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır. Mevcut tez çalışmasında ise, *C. erzurumensis* izolatının ekzopolisakakrit üretim potansiyeli ve üretilen EPS'nin yapısal ve kimyasal özellikleri karaterize edilerek, biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Makromoleküller

Makromoleküller monomer gibi küçük birimlerin kovalent bağ ile bağlanması sonucu meydana gelen büyük yapılardır. Makromoleküller kendi arasında organik makromoleküller ve inorganik makromoleküller olmak üzere ikiye ayrılırlar. Organik makromoleküller lipid, protein, nükleik asit ve karbonhidratlardır. İnorganik makromoleküller ise, karbon nanotüp ve grafenlerdir (Mülhaupt *et al*. 2004; Shukla *et al.* 2022).

Karbonhidratlar

Makromoleküllerin dört ana sınıfından birini oluşturan karbonhidratlar; besin maddelerinin en önemlisidir. Yapısında karbon, hidrojen ve oksijen bulunan organik bileşiğin genel formülü $C_m(H_2O)_n$ şeklindedir (Jäntschi 2019). Hücre farklılaşması ve büyümesi, bakteri, protozoa, virüs enfeksiyonları, sinyal iletimi ve bağışıklık sistemi yanıtı gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Dahech *et al.* 2013). Karbonhidratlar kimyasal yapılarına göre; monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler şeklinde üç gruba ayrılmaktadır.

Monosakkaritler

Karbonhidrat grubunun en basit şeker birimi olan monosakkaritler, daha küçük alt birimlere hidrolize edilemezler. Monosakkaritler zincir uzunluklarına göre, beş karbonlu ve altı karbonlu şekerler olarak gruplara ayrılırlar. Beş karbonlu şekerlere; riboz, deoksiriboz ve heksozlar, altı karbonlu şekerlere ise; glikoz, fruktoz ve galaktoz örnek olarak verilebilir (Stylianopoulos 2013).

Disakkaritler

Disakkaritler**,** iki monosakkarit biriminin birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Disakkaritler sükroz β(1-2), laktoz β(1-4) ve maltoz α(1-4) olarak gruplara ayrılmaktadır. Sükroz D- glikozun ve D- fruktozun, laktoz D- galaktozun ve D- glikozun, maltoz ise iki tane D- glikozun bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Cole and Kramer 2016).

Polisakkaritler

Monosakkaritlerin polimerleri olan polisakkaritler birbirlerine glikozidik bağlarla bağlıdır ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Yapısal olarak ise, lineer veya dallanmış

olarak bulunabilmektedir. Polisakkaritler hidrolize edildiğinde glikoz, galaktoz, arabinoz, mannoz, üronik asit ve ksilozlardan oluşan basit şeker birimlerine ayrılmaktadır. Aynı zamanda biyouyumluluk, biyobozunurluk, düşük toksisite, suda çözünürlük ve kararlılık gibi bazı özelliklere sahiptir. Gıda, ilaç, biyobozunur ambalaj tekstil ve kağıt gibi alanlarda kullanılmaktadır (Udayan *et al.* 2017; Mozammil Hasnain *et al.* 2019)

Polisakkaritlerin doğal kaynakları

Polisakkaritler kaynaklarına göre beş gruba ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, bitki polisakkaritleridir. Bitki polisakkaritleri, aynı ya da farklı monosakkaritler birimlerinden oluşan α ve β glikozidik bağlarıyla birbirine bağlı makromoleküllerdir. Bitki kaynaklarından ekstrakte edilen polisakkaritler, biyobozunurlukları, sürdürülebilirlikleri, daha düşük işlem maliyeti ve doğada fazla olması nedeniyle endüstriyel alanda kullanılmaktadır. İmmünomodülatör, antitümör, antioksidan, anti inflamatuar ve antikoagülan etki göstermektedir. İkincisi olan hayvan polisakkaritleri, biyobozunur ve toksik olmamalarından dolayı doğal biyopolimer olarak kullanılmaktadır. Doku ve hücre matrisinin bir parçası olduğu için hayvanlarda yapısal ve deposal rol oynar. İlaç salınımı, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi dâhil pek çok biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Hayvansal polisakkaritlerin arasında, kitin ve kitosan, hiyalüronik asit, heparin, heparin sülfat ve keratin sülfat sayılmaktadır. Üçüncü sınıf olan mantar polisakkariti; hücre duvarının yapısında bulunur. Lineer ve dallanmış, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit yapılardan oluşmaktadır. Antioksidan ve antitümör etkileri bilinmektedir. Dördüncü sınıf olan alg polisakkaritleri; aljinat, fukoidan ve karajenan sağlık alanındaki avantajları nedeniyle dikkat çekmektedir. Antiviral, antitümör, antikoagülan, antioksidan ve immünomodülatör etkilere sahiptir. Son grup olan mikrobiyal polisakkaritler ise, hızlı ve yüksek verimli üretiminden dolayı, ticari üretimde diğer kaynaklara kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Mikrobiyal polisakkaritler; dekstran, pullulan, kurdlan, ksantan sakızı, bakteriyal aljinat ve sakızı olarak sınıflandırılmaktadır (Mozammil Hasnain *et al.* 2019; Ullah *et al.* 2019).



Şekil 1. Polisakkaritlerin doğal kaynakları (Katsarov *et al.* 2021)

Mikrobiyal polisakkaritler

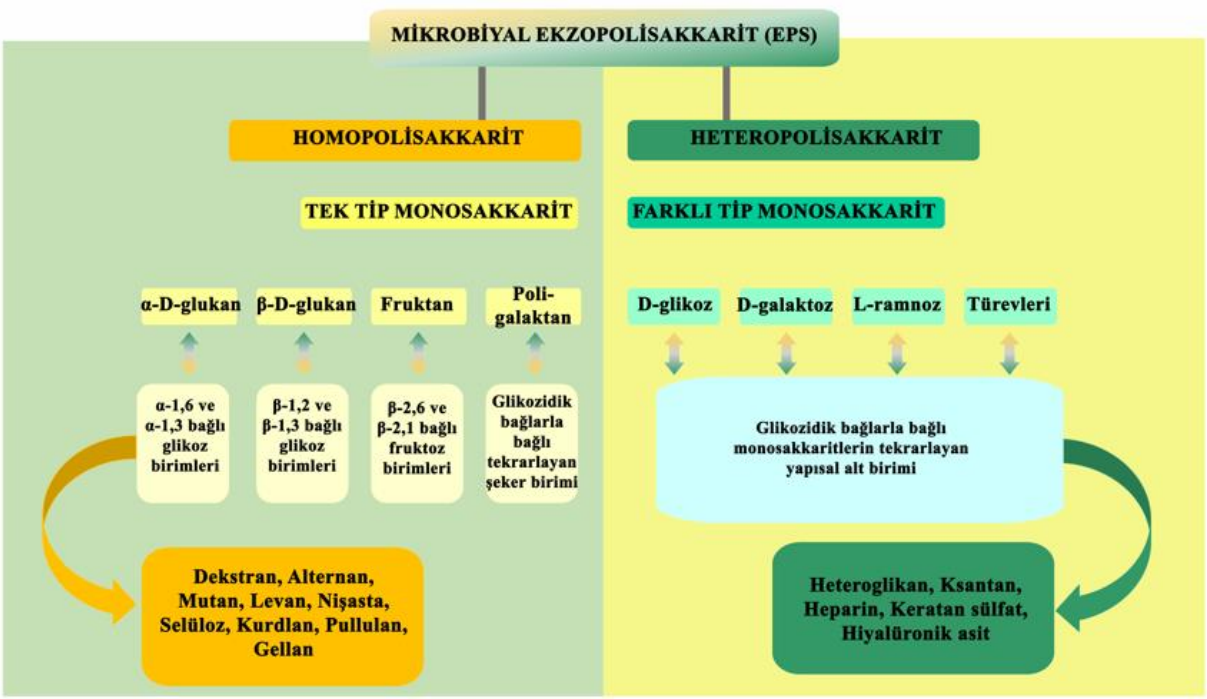
Birçok mikroorganizma tarafından üretilen polisakkaritler, yüksek ağırlığa sahip polimerlerdir. Mikrobiyal polisakkaritler hücredeki lokalizasyonuna göre; hücre içi (lipopolisakkarit), yapısal (CPS) ve hücre dışı polisakkaritler (EPS) olarak sınıflandırılırlar. LPS' ler, gram negatif bakterilerin hücre yüzeyinin önemli bileşenidir. Üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar: lipid A, lipid A'ya bağlı çekirdek oligosakkariti ve O- antijenidir. Bu polisakkaritler mantarlarada ve *Bacteriodes* gibi çeşitli bakterilerde bulunmaktaır. LPS'ler bakteriye gelebilecek zararlı moleküllere karşı bariyer oluşturmakta ve aynı zamanda virülans faktörü olarak işlev görmektedir. Kapsüler polisakkaritler (CPS) olarak adlandırılır. Hücre yüzeyine kovalent bağlar ile bağlanan polisakkarit çoğunlukla bakterilerin patojenitesi ve virülans faktörleriyle ilişkilidir (Zhang *et al.* 2019; Farhana *et al.* 2022).

Ekzopolisakkaritler olarak bilinen, yüksek moleküler ağırlığa sahip bu polisakkaritler, mikroorganizmalar tarafından olumsuz çevre şartlarında hayatta kalmak için üretilen en önemli maddelerden biridir (Ahmad *et al.* 2015; Shanmugam and Abirami, 2019). Hücre içi (intrasellüler) formda polisakkaritler; *Salmonella enterica, Cordyceps cicadae, Fomitopsis pinicola* gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenenbilmektedir. Hücre dışı formdaki (ekstrasülüler) polisakkaritler ise; *Xanthomonas, Leuconostoc, Pseudomonas, Alcaligenes, Sphingomonas* gibi bakterilerinde, *Aureobasidium pullulans*, maya ve *Sclerotium glucanicum* gibi küfler tarafından üretilmektedir (Mahapatra *et al.* 2013; Schmid *et al.* 2015).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS)

Mikroorganizmaların metabolik ürünü olan EPS'ler Louis Pasteur tarafınan 19. yüzyılın ortalarında ilk kez şarap örneklerinde keşfedilmiştir (Ziadi *et al.* 2018). EPS' ler bu organizmalarda biyofilm oluşumu, hücre-hücre iletişimi, hücre yapışması, suyun tutulması, koruyucu bariyer, organik ve inorganik bileşenlerin emilmesi gibi işlevlere sahiptir (Shukla *et al.* 2019). İlk keşfedilen mikrobiyal ürün dekstrandır. Bakteri, maya, fungus ve mikroalgler tarafından üretilerek çevreye salınan yüksek molekül ağırlıklı ekzopolisakkaritler (EPS), glikoz, galaktoz, ramnoz ve fruktoz gibi şekerleri ve türevlerini içermesinin yanı sıra aynı zamanda proteinleri ve nükleik asitleri de ihtiva eden polisakkarit türüdür (Nwodo *et al.* 2012; Tabernero and Cardea, 2020). Bakteriler hızlı gelişim göstermeleri nedeniyle en yaygın kullanılan EPS kaynağıdır. Farklı bakteri grupları özellikle laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler fermantasyon sırasında çok çeşitli karbonhidrat polimerleri üretir. EPS üretiminin bakteri fizyolojisine sağladığı faydalı etki hala tam olarak aydınlatılamamış olsa da pH, sıcaklık ve ozmotik stres gibi fermantasyon süreçleriyle ilgili streslere dayanmak için koruyucu bir matris olarak EPS ürettiği görülmektedir (Donot *et al.* 2012). Çok sayıda mikrobiyal EPS çeşidi olmasına rağmen sadece birkaç mikrobiyal EPS çeşidi ticari olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise yüksek üretim maliyetlerinin olmasıdır (Ates, 2015) (Krishnamurthy *et al.* 2020).

EPS'ler içerdikleri farklı şeker kompozisyonlarına göre gruplara ayrılmaktadır. Bunlar; homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılmaktadır.



Şekil 2. Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması (Bajpai *et al.* 2015)

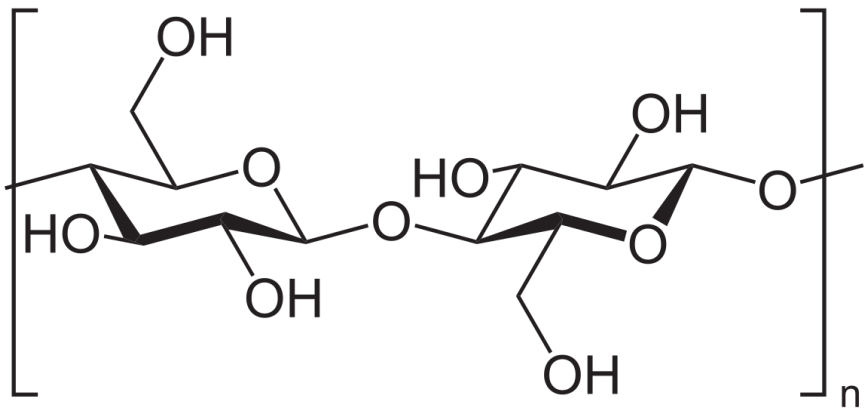
Homopolisakkarit

Homopolisakaritler tekrar eden tek tip monosakkaritlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktır. Poligalaktanlar, fruktanlar, β-glukanlar ve α-D-glukanlar olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır. Dallanmış ya da dallanmamış zincir oluşturabilmektedirler (Nwodo *et al.* 2012). α-D-glukanlar, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Streptococcus sobrinus*, β-glukanlar ise *Pediococcus* spp. ve *Streptococcus* spp., fruktanlar *Streptococcus salivarius* tarafından üretilmektedir. Glukanlar; dekstran, mutan, reuteran ve alternan olmak üzere alt bölümlere ayrılır. Fruktanlar (β) ise levan ve inülin benzeri olmak üzere iki farklı gruptan meydana gelmektedir (Zannini *et al.* 2016). Homopolisakkarit özelliğindeki mikrobiyal EPS' lerin en önemlilerine bakteriyal selüloz, kurdlan ve dekstran örnek verilebilir.

Selüloz

Selüloz, β 1-4 glikozidik bağıyla D- glukopiranoz birimlerinden oluşmaktadır. Doğada bulunan en yaygın polisakkarit türüdür (Li *et al.* 2020). Giyim, kâğıt sanayi, gıda, kozmetik, ilaç ve yapı malzemelerinde kullanılır. Bakteriler ve bitkiler dâhil olmak üzere birçok organizma tarafından üretilen yapısal polisakkarittir.

Bakteriyal selüloz (BC) ile bitki selülozunun arasındaki en önemli fark safsızlıktır. Bitki selülozu lignin, pektin ve hemiselüloz içermektedir. Bu nedenle, pratik uygulamalar için selüloz kullanılmadan önce ilave saflaştırma gerekli değildir. Ayrıca, BC'nin yapısal, fizikokimyasal ve mekanik özellikleri bitki selülozundan daha iyidir. Selüloz üreten bakteriler arasında *Gluconacetobacter xylinus'*tur. Yaygın olarak kullanılan ve bakteriyel selüloz (BC) olarak adlandırılan, *G. xylinus* tarafından üretilen selüloz (BC) biyomedikal ürünlerde kullanılmaktadır. Bu alandan en çok çalışılan alanlar dental implantlar ve yara pansuman malzemesi olmuştur (Ul-Islam *et al.* 2012; Tajima *et al.* 2022).

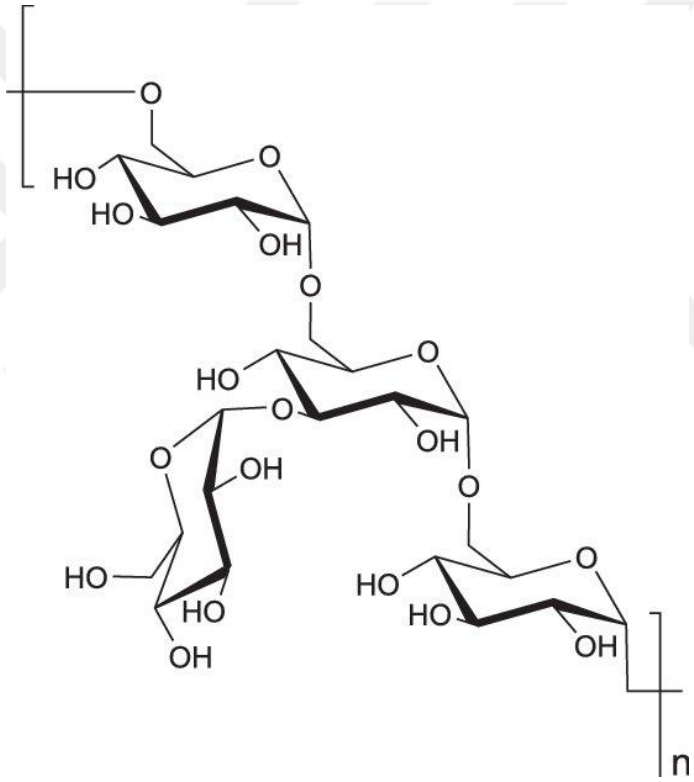


Şekil 3. Selülozun kimyasal yapısı (Farjadian *et al.* 2018)

Dekstran

19. yılın ortalarında Pasteur tarafından keşfedilen ve *Leuconostoc mesenteriodes* tarafından üretilen dekstan şarap örneklerinde keşfedilmiştir ve *Leuconostoc mesenteriodes* ilk dekstran üreticisi olan bakteriyel suş olarak tanımlanmaktadır. Dekstranlar α 1-6 glikozidik bağlarla oluşan monomeri glikoz olan bir homopolisakkarittir. Dekstran, sükraz veya fruktan sükrazlar tarafından kataliz edilmektedir (Fels *et al.* 2018). *Streptococcus* ve *Acetobacter* gibi bazı bakteriler dekstranı glukan sükroz kullanarak üretmektedirler.

Dekstran biyobozunur ve biyouyumludur. Aynı zamanda biyosensör materyali, gıda stabilizatörü, metal kaplama prosesi ve metal nanopartikül oksidasyonuna karşı koruyucu ve stabilize edici kaplama gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Dekstran ve türevi siklodekstran ilaç sanayinde anti- HIV, anti-ülser ve karyostatik ajan olarak kullanılmaktadır (Ates 2015).

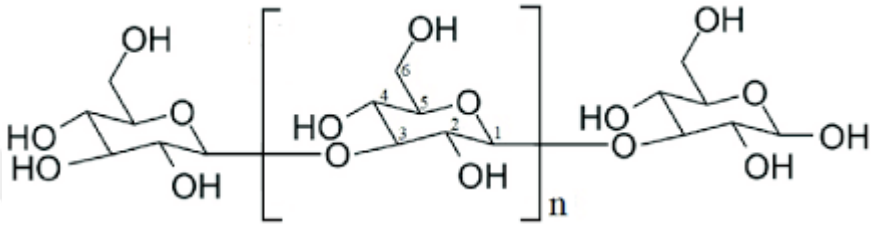


Şekil 4. Dekstran kimyasal yapısı (Delattre *et al.* 2008)

Kurdlan

Kurdlan *Alcaligenes faecalis* bakterisi tarafından hücre dışı olarak üretilen, β 1-3 glikozik bağlarıyla ve glikoz biriminden oluşan bir homopolisakkarittir. Kurdlan'ın ortalama moleküler ağırlığı 5,3 × 10^4 ila 2,0 × 10^6 arasında değişmektedir. Kurdlan, suda ve alkolde çözünmeyen ancak alkalide çözünen tatsız, renksiz, kokusuz bir homopoisakkarittir (Chaudhari et al. 2021).

Rhizobium, Agrobacterium, Alcaligenes, Cellulomonas ve Bacillus türlerine ait bakterilerin kurdlan ürettiği bilinmektedir. Bu cinsler arasında, *Agrobacterium* sp. kurdlan üretiminde en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubu olarak bilinmektedir. Kurdlanın temel özelliklerinden biri, biyolojik olarak parçalanabilir olmasının yanı sıra insanlar ve çevre için toksik olmamasıdır. Bu sebeple çok sayıda uygulamaya yol açmaktadır. İlaç ve biyomedikal sektörleri gibi gıda ve gıda dışı endüstrilerde de önemli olan kurdlan, gıda maddelerinde koyulaştırıcı ve jelleştirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalarda stabilizatör olarak kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde teofilin, prednizolon ve indometasin gibi bazı ilaçların kapsüllenmesinde kullanılmaktadır (Aquinas *et al.* 2022). Kurdlan ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1992 yılında onaylanmıştır (Mangolim *et al.* 2017).



Şekil 5. Kurdlan kimyasal yapısı (Gieroba *et al.* 2020)

Heteropolisakkaritler

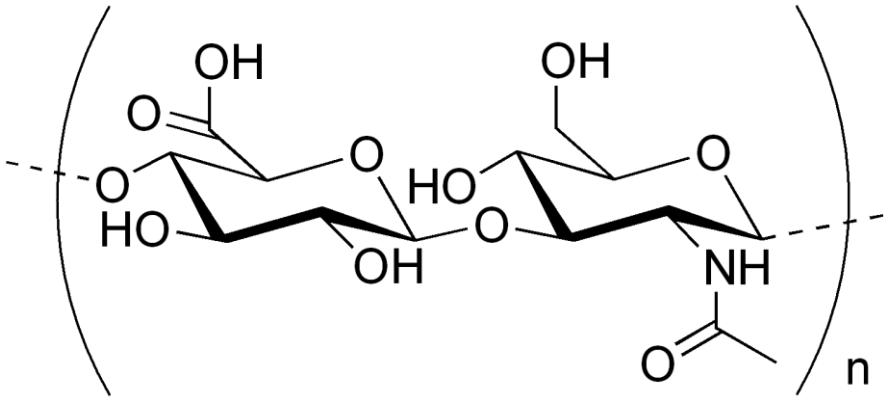
İki veya defa fazla farklı monosakkaritin bir araya gelmesiyle oluşan heteropolisakkaritler (HePs) 10^4 ile 10^6 Da arasında molekül ağırlığına sahip doğrusal ve tekrarlanan dallanmış alt birimlerden meydana gelmektedir (Fraunhofer 2017).

Heteropolisakkaritlerin şeker bileşimi, zincir uzunluğu ve bağlantı tipi, EPS'nin özelliklerini ve verimliliğini etkilemektedir, Heteropolisakaritler, hyalüronik asit (HA), ksantan, aljinat (ALG), kefiran ve gellan gibi birden fazla monosakarit ünitesinden oluşan polimerlerdir (Nehal *et al.* 2019).

Hiyalüronik Asit (HA)

Hereropolisakkarit yapıda olan hiyalüronik asit, uzun zincirli ve karmaşık bir yapıdadır. HA bileşenleri β-D (1-4) N- Asetilglikozamin birimi ve β-D (1-3) glukuronik asit polisakkaritidir (Necas *et al.* 2008). Moleküler ağırlığı yaklaşık 0,4 kDa olan HA, yüksek biyouyumluluğa sahip olması, immünojenik olmaması ve degrade olduğunda toksik ara ürünler oluşturmamasından dolayı tıpta (cerrahide ve romatolojide), biyomedikal sektöründe, gıda ve kozmetik sektörlerinde kullanılmaktadır (de Oliveira *et al.* 2016; Li *et al.* 2020). HA, ilk olarak Karl Meyer ve John Palmer tarafından 1934 yılında sığır gözlerinin vitröz salgısında keşfedilmiştir. HA, omurgalılarda ve bazı mikroorganizmalarda bulunan bulunmaktadır. HA' nın bitkilerde ve böceklerde varlığı tespit edilememiştir. HA'nın mikrobiyal yolla üretiminde

esas olarak *Streptococcus* suşları özellikle de *S. zooepidemicus* bakterisi kullanılmaktadır. HA ayrıca *S. pyogenes, S. uberis, Pasteurella multocida* ve *Cryptococcus neoformans* dâhil olmak üzere diğer patojenik bakteriler tarafından da doğal olarak üretilmektedir (Arslan ve Doymuş, 2021; Samadi *et al.* 2022).

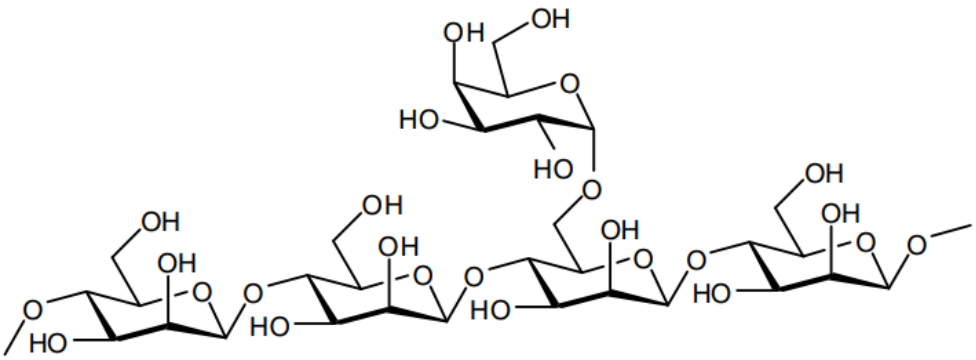


Şekil 6. Hiyalüronik asit kimyasal yapısı (Zhai *et al.* 2020)

Gellan

Gellan *Sphingomonas elodea* bgram negatif bir akterisi tarafından üretilen, suda çözünen, tetrasakkarit yapıdaki bir heteropolisakkattir. Yapısal olarak bir tane α-L- ramnoz, bir tane β-D-glukuronik asit ve iki tane β-D-glikoz birimlerinden oluşmaktadır (Sarkar *et al.* 2017).

Biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen yapıya sahip olan gellan doku mühendisliği, biyomedikal alanlarda ve kozmetik ilaç endüstirsinde kullanılmasının yanı sıra mikrobiyoloji alanında da termostabil yapıya sahip olduğundan agar muadili olarak kullanılabilmektedir. Termostabil yapısının kattığı bir diğer kullanı alanı ise gıdalardır. Gıdalarda koyulaştırıcı ajan olarak ve remediasyonda teknolojisinde de kullanılmaktadır (Raghunandan *et al.* 2018; Wang *et al.* 2020).



Şekil 7. Gellan kimyasal yapısı (Kohajdová and Karovičová, 2009)

Ekzopolisakkarit biyosentezi

Mikroorganizmalar, çeşitli biyosentez yolaklar ile EPS üretirler. EPS biyosentezi çevresel faktörlere bağlı olarak farklı evrelerde üretilebilmektedir (Ayyash *et al.* 2020). Bu yolaklar hücre dışı ve hücre içi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. EPS biyosentezinde önemli iki enzim grubu vardır. Bunlardan ilki, metabolik yolda kullanılan nükleobaz sentezi için gereklidir. Diğer grup ise EPS'ye özgü enzimleri içermektedir (Kumar *et al.* 2020; Korcz & Varga, 2021).

EPS biyosentezinde Wzx/Wzy'ye bağlı yol, ATP bağlayıcı sentez (ABC) taşıyıcıya bağlı yol, hücre dışı sentez ve sentaza bağımlı yol olmak üzere dört temel basamak vardır. Bu yollar arasında hücre dışı sentez yolu, homopolisakkaritleri sentezlemek için kullanılmaktadır (Zhou *et al.* 2019).

EPS biyosentezinde kullanılan enzimler tüm adımlarda kullanılmakta ve hücrenin farklı lokalizasyonlarında bulunmaktadırlar. Bu enzimler dört gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan ilki metabolik süreçlerde yer alan heksokinaz gibi hücre içi enzimdir. İkincisi UDP-glikoz pirofosforilaz'dır. Üçüncü grup ise hücre periplazmik zarından bulunur ve glikozil transferaz olarak adlandırılmaktadır. Dördüncü grup enzim ise hücre zarı ve hücre duvarı dışından yer alan enzimdir (Suresh Kumar *et al.* 2007)

EPS Üretimini Etkileyen Faktörler

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, mikroorganizmaları olumsuz çevresel şartlarına karşı korumak için üretilmektedir (Poli *et al.* 2010; Hassan & Ibrahim, 2017) Mikrobiyal ekzopolisakaritlerin fermentasyon verimi, karbon kaynağı, sıcaklık, pH nitrojen kaynağı gibi çevresel faktörlere göre değişmektedir (Sutherland 1997).

Karbon kaynağı

Birçok mikroorganizma üretim ortamında bulunan farklı karbon kaynaklarına bağlı olarak farklı türde EPS sentezlemektedir. Karbon kaynağının türü ve konsantrasyonu, üretilen EPS'nin verimini etkilemektedir (Macedo *et al.* 2002). EPS üretiminde glikoz, sükroz, laktoz, maltoz ve sorbitol en çok kullanılan karbon kaynakları olarak belirtilmektedir. Bunun yanı sıra melas, hurma şurubu (Moosavi and Karbassi, 2010), peynir altı suyu (Silva *et al.* 2009) ve biyodizel atıkları (Reis *et al.* 2010) gibi karbon kaynakları da kullanılmaktadır.

Sıcaklık

EPS üretimini etkileyen bir diğer faktör sıcaklıktır. EPS üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların türüne göre optimum sıcaklık değeri farklılık göstermektedir. Bu konuda

yapılan bir çalışmada (Zhao and Li, 2022) kullanılan mikroorganizmanın düşük sıcaklıkta en iyi verimde EPS ürettiği rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise *Bacillus mycoides* bakterisi için optimum gelişim gösterdiği sıcaklık değerinde en verimli EPS üretimi rapor edilmiştir (Farag *et al.* 2020).

pH

Mikroorganizmaların pek çoğu nötral pH değerlerinde optimum üretimi gerçekleştirmektedir. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda kullanılan mikroorganizma türlerine göre pH değerinin değiştiği gösterilmiştir (Suresh Kumar *et al.* 2007). Yapılan bir diğer çalışmada ise asidik pH değerlerinde de yüksek verimde EPS üretildiği rapor edilmiştir (Koçberber Kiliç ve Dönmez, 2019).

Nitrojen kaynakları

EPS üretiminde nitrojen kaynağı olarak pepton, amonyum sülfat, maya ekstraktı ve sodyum nitrat kullanılmaktadır. En çok kullanılan kaynaklar arasında amino asitler ve amonyum tuzları bulunmaktadır. Organik nitrojen kaynaklarının kullanımı genellikle daha yüksek bir büyüme oranı ve ekzopolisakkarit üretimi ile sonuçlanmaktadır. Ortama eklenen nitrojen kaynağı (mikrobiyal büyümeyi teşvik ederek) C:N oranındaki artışa katkı sağlamaktadır bu sayede de EPS üretimini desteklemektedir (Ates 2015).

İnkübasyon süresi

EPS üretimi mikroorganizmalarda logaritmik fazın sonlarında ya da durağan fazda gerçekleşmektedir. (Caccamo *et al.* 2020). Mikroorganizma gruplarına göre farklılık gösteren bu süre EPS üretimine etki etmektedir. İnkübasyon süresinin artması ya da azalması EPS verimini etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda farklı inkübasyon sürelerinin EPS veriminde farklılıklara sebep olduğu belirtilmiştir (Hereher *et al.* 2018; Yousef *et al.* 2020).

EPS üreten mikroorganizmalar

Ekzopolisakkaritler hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir ancak bu canlalar arsında en çok tercih edilen grup mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalar arasından EPS üreticisi olarak bilinenler bakteriler, arkeler ve mantarlardır. Arkealar, bakteriler ve mantarlar pH, aşırı sıcaklık ve tuz gibi çevresel faktörlere maruz kaldıklarında EPS üretmektedir. Bu mikroorganizlar pek çok biyolojik aktivite göstermektedir (Donot *et al.* 2012).

Aşağıdaki tabloda (Tablo 1) bazı mikroorganizmlar ve ürettikleri EPS'nin biyolojik aktivitesi verilmektedir.

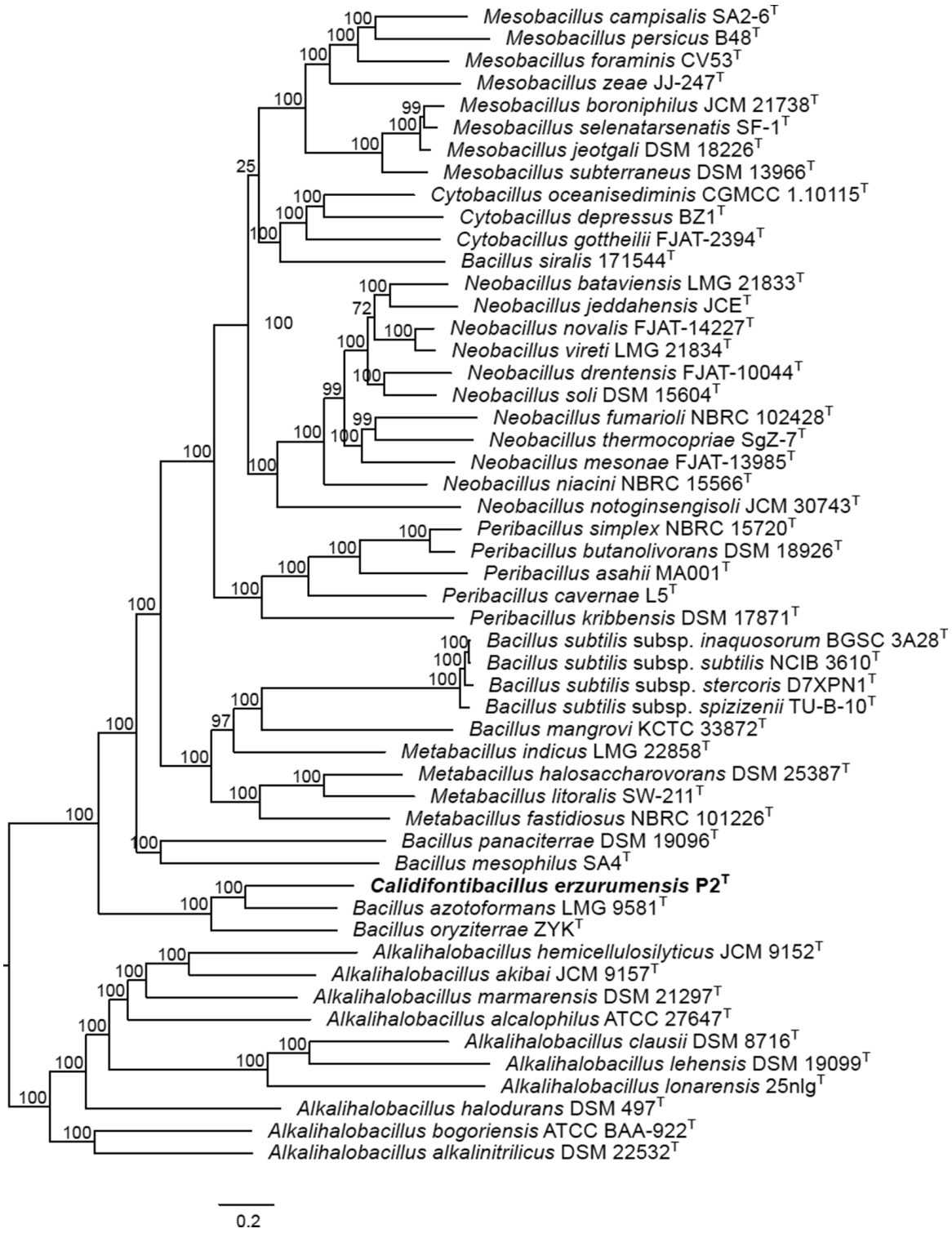
Tablo 1. Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar

EPS Üreten Mikroorganizlar	Biyolojik Aktivite	Referanslar
Bakteri		
Bacillus sp. S-1	Antioksidan Etki	(Hu *et al.* 2019)
Acetobacter pateurianus	Antioksidan Etki	(Luang-In *et al.* 2018)
Enterococcus faecium WEFA 23	Antioksidan Etki Biyofilm inhibisyonu	(Jia *et al.* 2019)
Leuconostoc mesenteroides	Antioksidan Etki	(Taylan *et al.* 2019)
Bacillus flexus	Anti tümör Etki	(Abdelnasser *et al.* 2017)
Halolactibacillus miurensis	Antioksidan Etki	(Arun *et al.* 2017)
Leuconostoc pseudomesenteroides YB-2	Antibakteriyel	(Ye *et al.* 2019)
Paenibacillus polymyxa CCM 1465	İmmünomadülatör Etki	(Yegorenkova *et al.* 2018)
Lactobacillus paracasei M7	Antioksidan Etki Antibiyofilm ve Hipokolesterolemik Etki	(Bhat & Bajaj, 2019)
Lactobacillus plantarum HY	Antioksidan Etki	(T. Liu *et al.* 2019)
Lactobacillus plantarum LRCC5310	Anti-viral Etki	(Kim *et al.* 2018)
Lactobacillus helveticus LZ-R-5	İmmünomodülatör Etki	(You *et al.* 2020)
Arkea		
Haloterrigena turkmenica	Antioksidan Etki	(Squillaci *et al.* 2016)
Mantarlar		
Polyporus umbellatus	Antioksidan Etki İmmünomodülatör Etki	(G. Liu *et al.* 2019)
Neopestalotiopsis sp. SKE15	Antibakteriyal, Antioksian ve Antikanser Etki	(Fooladi *et al.* 2019)
Aspergillus terreus	İmmünomodülatör Etki	(Costa *et al.* 2019)

Calidifontibacillus erzurumensis'in EPS Üretim Yeteneği

2020 yılında Erzurum-Ilıca kaplıcalarından izole edilerek fenotipik ve filogenetik araştırmaları yapılan *Bacillaceae* ailesine ve *Bacillus* cinsine ait yeni cins bu bakteri *C. erzurumensis* olarak adlandırılarak literatüre kazandırılmıştır.

Yerel izolat olan bu bakterinin optimum büyüme şartları 45°C, pH 8 ve %2 NaCl olarak belirlenmiştir. *C. erzurumensis*; gram pozitif, hareketli, çubuk, endospor oluşturan, oksidaz pozitif, katalaz negatif ve aerobik bir bakteri olarak belirlenmiştir (Adiguzel *et al.* 2020).



Şekil 8. *Bacillus* cinsi bakterilerin 16S rRNA gen bölgesine göre oluşturulan filogenetik ağaç görüntüsü (Adiguzel *et al.* 2020)

EPS kullanım alanları

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, yenilenebilir ve biyobozunur polimerlerdir. Ekzopolisakkariterin en önemli özelliklerinden biri de, biyouyumlu olmalarıdır. Bu sebepten dolayı ise ilaç dağıtım sistemleri, tıbbi cihazlar için kaplama malzemeleri ve cerrahi dolgu macunları gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarında kullanılmaktadır. Aynı zamanda da tıp,

gıda endüstrisinde, kozmetik, tekstil ve pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Levan, kurdlan, gellan ve hiyalüronik asit bu alanda kullanılan önemli EPS türleridir (Freiats *et al.* 2014) (Suryawanshi *et al.* 2022). Ekzopolisakkarilerin, antiviral ve antiinflamatuar gibi biyolojik etkilerinin olduğu ortaya çıkarıldı (Ljubic *et al.* 2022). Örneğin *Bacillus flexus*, *Leuconostoc mesenteriodes* ve *Lactobacillus plantarum* gibi bakteriler, *Polyporus umbellatus* ve *Neopestalotiopsia* sp. gibi funguslar ile *Haloterrigena turkmenica* arkeası tarafından üretimi gerçekleştirilen EPS'lerin antitümör, antioksidan, antiviral, antimikrobiyal ve immünomodülatör gibi biyolojik aktiviteleri yapılan çalışmalarda ortaya konuldu (Squillaci *et al.* 2016; Abdelnasser *et al.* 2017; Fooladi *et al.* 2019; Taylan *et al.* 2019).

Literatür Taraması

Spanò *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, hidrotermal çukurdan izole edilen *Bacillus licheniformis* T14'ün en verimli hücre büyümesini ve EPS üretimini gerçekleştirdiği ortam %5 sükrozun bulunduğu besiyeri olarak belirlenmiştir. Üretilen EPS 1,0:0,75:0,28 oranda fruktoz/fukoz/glikoz/galaktozamin/mannoz içeriyordu ve üretilen EPS'nin moleküler ağırlığı 1000 kDa olarak belirlendi.

Rani *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada tavuklardan izole edilen *Bacillus tequilensis* FR9'un suşu tarafından EPS üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirildi. Üretilen EPS'nin şeker kompozisyonu araştırıldığında heteropolisakkarit (mannoz, ksiloz, glikoz, arabinoz, galaktoz) yapıda bir EPS olduğu belirlendi. Biyolojik aktivesini belirlemek amacıyla antioksidan etkisi araştırıldı.

Banerjee *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada kaplıcadan *Bacillus anthracis* PFAB2 izole edilerek EPS üretimi araştırıldı. 7, 66 g/L ile EPS veriminin en yüksek olduğu üretim ortamında karbon ve nitrojen kaynağının sırasıyla %2 glikoz ve %1 pepton olarak belirlendi. Üretilen EPS sadece glikoz biriminden oluşan bir homopolisakkarit olup, antioksidan etkisi araştırıldığında ise, güçlü bir antioksidan etki gösterildiği rapor edilmiştir.

Nambiar *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, insan anne sütünden izole edilen *Lactobacillus plantarum* bakterisinden ekzopolisakkarit üretilerek saflaştırıldı. Reolojik ile kimyasal aktivitelerine bakıldı. İncelemeler sonucunda glikoz ve galaktoz içeren heteropolisakkarit yapısında olan, asidik ortamda ve düşük sıcaklıkta viskozite gösteren ekzopolisakkarit üretimi gerçekleştirildi.

Riaz Rajoka *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada Çin kefirinden izole edilen *Lactobacillus kefiri* mikroorganizması ile üretilen ekzopolisakkaritin karakterizasyonu ve antitümör aktivitesi araştırıldı. Karakterizasyon sonucunda heteropolisakkarit yapısında olduğu

bildirilen ekzopolisakkaritin insan kolon kanseri hücre hattı (HT-29)'nda denenerek, antitümör özelliğinin bulunduğu gözlemlendi.

Nehal *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, deve sütünden izole edilen *Lactococcus lactis* F-mou bakterisinden üretilen levan ve galaktoglukan polisakkaritlerinden oluşan ekzopolisakkarit 301g/L olarak yüksek bir miktar ile üretildi. Aynı zamanda bu EPS'nin *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Proteus mirabilis, Acinetobacter baumannii, Enterobacter cloacae* ve *Candida albicans* gibi patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterildi

Petrova *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus licheniformis* 24 suşundan farklı substratlarla EPS 1 ve 2 üretildi. Genel olarak EPS'nin içeriği; galaktoz, glikoz ve mannozdan oluştuğu bildirilken, glikozdan üretilen EPS 1'in içeriği; %54 galaktoz, %39 glikoz ve %7 mannoz; fruktozdan üretilen EPS 2'nin içeriği ise; %51 glikoz, %31 mannoz ve %18 galaktoz içerdiği belirlenmiştir. Üretilen EPS miktarları sırasıyla 2,2-2,6 gr/L ve 1,90- 2,11 gr/L olarak rapor edilmiştir.

Ravi *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, Hindistan'da toplanan toprak örneklerinden bakteri izolasyonu ve tanılanması gerçekleştirilerek rk1 kodlu mevcut bakterinin *Bacillus aerophilus* olduğu ortaya konuldu. *B. aerophilus* 30 °C'de 72 saat boyunca kültüre edilerek EPS üretimi gerçekleştirildi. Ardından üretilen EPS'nin karakterizasyon çalışmaları yapılarak antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile belirlendi.

Binmad *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, Taylan bataklık orman topraklarından örnekler toplandı ve bu örneklerden bakteri izolasyonu yapılarak karakterizasyonu gerçekleştirildi. Tanılaması yapılan *Bacillus velezensis* P1 bakterisi için çift kültür yapılarak mevcut bakteri tarafından üretilen EPS'nin güçlü antifungal aktivite göstererek mangonun raf ömrünü uzattığı rapor edildi.

Banerjee *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus haynesii* CamB6 bakterisi tarafından üretilen EPS'nin karbonhidrat içeriği HPLC ve GPC teknikleriyle analiz edildi. Bu analiz sonucuna göre EPS'nin mannoz (%66), glikoz (%20) ve galaktozdan (%14) oluşan düşük moleküler ağırlıklı bir heteropolisakkarit olduğu tespit edildi.

Elmansy *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, Romi peynirinden izole edilen *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 tarafından üretilen EPS'nin karakterizasyonu yapılarak, antioksidan etkisi ve yara iyileştirme tedavisinde kullanılabilirliği araştırıldı. Örneklerden izole edilen 17 farklı bakterinin EPS üretme yeteneği rapor edildi. Bunlar arasında en yüksek verimde

EPS üreten bakteri OL757866 erişim numalaralı ve RO30 kodlu izolat olarak belirlenmiştir. Bu bakterinin ürettiği EPS'nin şeker içeriği 2,2:0,1:0,5:0,1 oranda sırasıyla glikuronik asit, mannoz, glikoz ve arabinozdan oluştuğu bildirildi. Üretlen bu EPS'nin moleküler ağırlığı 4,96 x 10^4 olarak belirlendi. Karakterizasyon çalışmaları ardından bu EPS'nin antioksidan aktivitesinin olduğu gösterildi. Yara iyileşmesi çalışmalarının kapsamında model organizma olarak kullanılan Albino Wiltar sıçanlarında yanık yarası iyileltirici etkisinin %0,5 (w/w) konsantrasyonda olduğu gösterilarak EPS'nin, yanık yarası iyileştirici ajan olarak faydalı olabileceği düşünüldü.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan bakteri tez danışmanı tarafından Erzurum-Ilıca kaplca suyundan izole edilmiştir (Adiguzel *et al.* 2020).

Kullanılan cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları

Tablo 2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Cihazın Adı	**Marka**
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Çeker Ocak	Fume Hood Mikrotest
Otoklav	Hmc Hiramaya
Dondurucu (-86)	Glacier Ultralow Freezer
Buzdolabı (+4/ - 20)	Vestel
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Spektrofotometre	Beckman coulter DU – 730
Etüv	Redline by – BINDER
İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
Hassas Terazi	Ohaus Pioneer
pH Metre	Mettler Toledı FiveEasy Plus
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific Eppendorf

Kullanılan kimyasallar

Çalışma kullanılan kimyasalların ve üretici firmaları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Bazı Kimyasallar ve Markaları

Kimyasalın Adı	Marka
Tryptone Soya Agar (TSA)	Oxoid
Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid
Sülfürik Asit	Fluka Biochemika
Askorbik Asit	Fluka Biochemika
Kloroform	Carlo Erba Reagents
Etanol	İso-Lab Chemicals
Metanol	İso-Lab Chemicals
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
DMSO	Sigma Aldrich
Aseton	Sigma Aldrich
Trichloroacetic Asit	Sigma Aldrich
DPPH	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g TSA besiyeri tartılarak 1 litre distile su içerisinde manyetik karıştırıcı vasıtasıyla homojen hale getirildi. 15 dak süre ile 121°C'de 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak, steril petrilere döküldü. Çalışma başlayana kadar +4°C' de muhafaza edildi

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g TSB besiyeri tartılarak, 1 litre distile su içerisinde manyetik karıştırıcı vasıtasıyla homojen hale gelene kadar karıştırıldı. 15 dak süre ile 121°C'de 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak, çalışma başlayana kadar +4°C' de muhafaza edildi.

%95'lik EtOH: 95 mL alınan EtOH, 5 mL distile su ile son hacmi 100 mL olacak şekilde hazırlandı

1X Bradford çözeltisi: 0,02 gr Coomasie Brillant Blue G-250 tartılarak, %95'lik hazırlanan EtOH'den 10 mL ve %85'lik fosforik asitten 20 mL alınarak karıştırıldı. Karışımın son hacmi 250 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Hazırlanan solüsyon filtre kağıdından geçirilerek kullanıldı.

2M Sülfürik asit çözeltisi: %95'lik sülfürik asit çözeltisinden 5,61 ml alındı ve son hacmi 50 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

5M NaOH çözeltisi: 2 g NaOH tartılarak, 8 ml distile suda çözdürüldü.

0,0001 M DPPH-EtOH çözeltisi: 0,0004 g DPPH tartıldı ve %95'lik 10 mL EtOH içerisinde çözdürüldü.

Metot

Bakterinin canlandirilmasi

Calidifontibacillius erzurumensis aktivasyonu için hücreler ilk önce %20 gliserol içeren TSB stoğundan alınarak, TSA besiyerine çizgi ekim yapıldı ve ardından 24 saat süreyle 45°C'de inkübasyona bırakıldı (Adiguzel *et al.* 2020)

Ön kültürün hazirlanmasi

Ön kültürün hazırlaması için 100 mL'lik erlene 50 mL olacak şekilde TSB hazırlandı ve otoklanlandı. 24 saatin sonunda TSA besiyeri üzerinde gelişen bakterinin tek kolonisi alınarak, ön kültüre inoküle edildi. Erlen 24 saat boyunca 45°C'de inkübasyona bırakıldı. Optik dansisite (OD_{600}) değeri 0,5 olana kadar inkübe edildi.

Ekzopolisakkarit Üretimi ve Optimizasyonu

Bakterinin üretildiği ön kültürden 1 mL alınarak TSB fermentasyon ortamına ekim yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik süre sonunda kültür 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, çöken bakteriler uzaklaştırıldı. Süpernatantın içerisine %4 trikloroasetik asit (TCA) eklenerek, 4 saat inkübasyona bırakıldı (Sharma *et al.* 2020). İnkübasyon sonrasında çöken protein kirlilikleri 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Ekzopolisakkaritin çökmesi için süpernatant hacminin 2 katı kadar etil alkol eklenerek, 48 saat süre sonunda 6000 rpm'de 10 dakika santifüjlenerek, alkol uzaklaştırıldı. Çöken EPS daha sonra sonra miktar tayini için liyofilize edildi.

Optimal sıcaklığın belirlenmesi

Ekzopolisakkarit üretiminde sıcaklık önemli bir faktördür. Bu sebepten dolayı EPS üretiminde optimal şartları belirleyebilmek için sıcaklık denemesi yapıldı. Bakteri canlandırması için önce TSA besiyerine çizgi ekim yapıldı. 24 saat boyunca 45°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tek koloni alınarak, ön kültüre ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 45°C'de inkübe edildi. Ön kültürden alınan 1 mL örnek, önceden 250 mL' lik erlen içerisindeki 100 mL besiyerlerine (pH 8) inoküle edildi. Erlenler daha sonra farklı sıcaklıklarda (40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C) çalkalamalı inkübatörlerde 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kültürlere sırasıyla; hücre çöktürmesi (santrifüj), TCA ile protein çöktürmesi ve etanol muamelesi yapılarak, EPS örnekleri saflaştırıldı ve en son olarak

liyofilize hale getirildi. Liyofilize edilen örneklerin miktarına göre en uygun sıcaklık belirlendi ve çalışmanın takip eden aşamaları için bu değer kullanılarak yapıldı.

Gerek önceki ilk çalışmada gerekse mevcut tez çalışmasında katı ve sıvı kültürde en iyi hücre büyümesinin 45°C'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu yüzden, TSA besiyeri veya TSB' de hücre aktivasyonu veya önkültür hazırlanmasıyla alakalı hücre geliştirme çalışmalarının tamamı 45°C' de yürütülmüştür. Ancak, sıcaklık optimizasyonu sonrasında EPS üretimi için en uygun sıcaklık 55°C olarak tespit edilmiştir. Bu yüzden, aktivasyon ve ön kültür hazırlama deneyleri için optimal sıcaklık 45°C, takip eden aşamalarda EPS üretimi içinse 55°C olarak seçilmiştir.

Optimal pH değerinin belirlenmesi

Optimum pH değerinin belirlenebilmesi için ilk olarak bakteri TSA besiyerine çizilerek, 24 saat boyunca 45°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tek koloni alınarak önkültüre inoküle edildi ve 24 saat boyunca 45°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ön kültürün 1 mL' si farklı pH değerlerine ayarlanmış (pH 5,6,7,8 ve 9) 250 mL' lik erlenler içerisinde bulunan besiyerlerine (100 mL) inokule edildi. Erlenler daha sonra 48 saat süreyle çalkalamalı inkübatörde optimum sıcaklık değerinde (55°C olarak belirlenmiştir) inkübe edildi. Süre sonunda sırasıyla kültürlere hücre çöktürmesi (santrifüj), TCA ile protein çöktürmesi ve etanolle muamele yapılarak EPS' nin saflaştırılması gerçekleştirildi. Sonrasında saflaştırılan EPS liyofilize hale getirildi. Liyofilize örneklerin ağırlığı belirlendi ve daha fazla EPS üretimi sağlayan pH değeri çalışmanın takip eden aşamaları için seçildi.

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum inkübasyon süresinin berlirlenebilmesi için TSA'da canlandırılan bakteriden tek koloni alınarak TSB besiyerine ekim yapıldı. Optimal pH'da ve optimal sıcaklıkta hazırlanan TSB fermentasyon ortamına 24, 48, 72 ve 96 saat olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sırasıyla kültürlere hücre çöktürmesi, TCA ile protein çöktürmesi ve etanolle EPS çöktürme işlemleri uygulandı. Saflaştırılan EPS daha sonra liyofilize edildi ve tartıldı. Üretilen EPS mikatarlarına göre en uygun inkübasyon süresi belirlendi.

Bu aşamada, optimal olarak belirenen kültür koşulları altında EPS' nin daha büyük hacimde (toplam 3 L besiyerinde, 250 mL' lik erlenelerde) üretimi gerçekleştirildi. Üretilen EPS yukarıda da belirtilen adımlar uygulanarak saflaştırıldı ve liyofilize hale getirildi. Daha sonra, elde edilen EPS' nin fizyolojik ve bazı kimyasal analizleri yapıldı.

Ekzopolisakkaritin Total Üretimi

EPS üretimi için optimal koşullar altında toplam 3 litre hacminde TSB besiyerinde gerçekleştirildi. Gelişen kültür 6000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılarak süpernatant üzerine %4 oranında TCA eklendi ve +4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek proteinler uzaklaştırıldı. Süpernatantın üzerine iki katı hacimde şekilde saf ve soğuk etanol eklenerek +4°C'de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda örnekler 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek EPS elde edildi. EPS liyofilize edilerek karakterizasyon çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

EPS' nin karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

EPS'nin karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol sülfürik asit yöntemi kullanıldı. Standart grafiğini belirleyebilmek için 1 mg/mL olacak şekilde glikoz stok solüsyonu hazırlarak seri dilüsyon yapıldı. Dilüsyon 0,1 mg/mL 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL olarak ayarlandı ve her birinden 100 µL alınıp üzerlerine % 0,6 konsantrasyonda 1 mL ve %100 konsantrasyonda 5 mL konsantre sülfürik asit eklenerek 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Oda ısısına gelen stok solüsyondan 490 nm'de absorbans ölçülerek standart grafik oluşturuldu. Daha sonra distile su içerisinde çözünmüş 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS numunesinden 100 µL alınıp üzerine 1 mL % 0,6 konsantrasyonda fenol ve %100 konsantrasyonda 5 mL konsantre sülfürik asit eklenerek oda sıcaklığında 10 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler soğutularak spektrofotometre ile 490 nm dalga boyunda %0,6 konsantrasyonda 1 mL fenol ve %100 konsantrasyonda 5 mL sülfürik asit eklenip 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Kör tüp için EPS'nin çözücüsü olan solventten 100 µL alınarak, üzerine %0,6'lık 1mL fenol ve %100'lük 5 mL sülfürik asit eklenerek basamaklar takip edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüpler hızlıca soğutularak 490 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (DuBois *et al.* 1956; Karadayi *et al.* 2020).

EPS' nin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Warburg-Christian yöntemi

Kolay ve hızlı sonuç veren Warburg – Christian yöntemi numunedeki yaklaşık protein miktarı ölçmek için kullanıldı. Temelde proteinlerin tirozin ve triptofan grupları maksimum 280 nm'de absorbans gösterirken nükleik asitler ise 260 nm'de maksimum absorbans verirken 230 nm ise karbonhidratlar için absorbans verir.

Liyofilize formdaki 5 mg EPS örneği 1 mL distile su içinde vortekslenerek homojenize edildi. Daha sonra bu karışımın 230nm ve 260 nm ve 280 nm'de spektrofotometre absorbas alındı (Daştan vd 2012).

Bradford (Coomassie blue) yöntemi

Bradford tayin yöntemiyle üretilen EPS'nin protein içeriği belirlendi. Bradford reaktifinin içeriğinde bulunan commassie brilliant blue boyası proteinlere bağlanarak tayin gerçekleştirildi. Bradford reaktifini hazırlamak için Commassie brilliant blue boyasından 100 mg tartılarak %95'lik 50 mL etil alkol ve %85'lik H_3PO_4 (fosforik asit) içerisinde çözdürülerek filtre kağıdından geçirildi. Standart grafiği hazırlamak için 0.1 mg/mL olacak şekilde bovine serum albumin (BSA) hazılanarak 595 nm'de absorbans ölçüldü. Numunelerin tayini için uygun çözücüde çözünen EPS örneklerinden 0.5 mL alınarak 1 mL bradford reaktifinin içerisinde çözüldü. Kör için EPS'nin çözündüğü solventten 0.5 mL alınarak 1 mL boya içerisinde çözüldü ve 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (Martina & Vojtech, 2015).

EPS'nin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

EPS'nin çözünürlüğünün belirlenmesi

Liyofilize haldeki EPS'den 5 mg alınarak 1 mL saf su, izopropanol, etanol, metanol, aseton, kloroform, dimetilsülfoksit (DMSO) ve formaldehit gibi solventler içerisinde çözünürlüğü test edildi. Bu amaçla liyofilize haldeki EPS örneği (5 ve 10 mg/mL konsantrasyonda) farklı çözücüler içerisine aktarıldı. Her süspansiyon 1 dk boyunca vorteks islemine tabi tutulmuş ve ardından 25°C'de 5 dk boyunca 12000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 0,5 mL alınmış ve şeker içeriğinin analizi için kullanıldı. EPS' nin çoğunluğunu karbonhidratlar oluşturduğu için EPS' nin çözünürlüğünü belirlerken çözücüye geçen karbonhidratların toplam miktarı göz önüne alındı. Bunun içinde süpernatant fraksiyonlarında yukarıda da belirtildiği gibi fenol sülfirik asit yönetemi ile total şeker analizi yapıldı. Çözünürlük oranları yüzde (%) olarak verilmiştir.

Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi

HPLC analizi

Şeker kompozisyonu belirlemek için saflaştırılmış liyofilize EPS örneği sülfürik asit (H_2SO_4) içerisinde hidroliz edilerek monomerlerine ayrılması sağlandı. Bunun için, EPS örneği (5 mg) 2M H_2SO_4 ile hidrolize edilmiş ve ardından 2M NaOH kullanılarak nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Hidroliz fraksiyonu santrifüj edilmiş (4,500 rpm, 10 dakika) ve daha sonra safsızlıkların giderilmesi için 0.45 um şırınga filtresiyle süzüldü ve son olarak hazırlanan numune, analiz için HPLC kolonuna yerleştirildi. Monosakkaritlerin analizi, 40°C'de bir Inertsil NH_2 kolonu (5 um, 250 mm x 4.6 mm) ve RID detektör sistemi ile donatılmış bir Prominence LC-20A HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirildi. Hareketli faz

olarak belirlenen Asetonitril:su (4:1) karışımı 1 mL/dk akış hızında kolona verildi. Monomer standartları olarak, mannoz, glikoz, sukroz, fruktoz, laktoz, arabinoz, galaktoz, glukuronik asit ve ksiloz kullanıldı. HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından gerçekleştirildi (Yu *et al.* 2016).

Fonksiyonel grup analizi

FT-IR spektroskopisi, polisakkaritlerin organik gruplarının tanımlanmasında kullanılmaktadır. Üretilen ekzopolisakkaritin Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopi analizi için 5mg liyofilize EPS numunesi Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'ne gerçekleştirildi.

EPS'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite

Üretilen EPS'nin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla disk difüzyon testi yapıldı. Bunun için *Bacillus cereus* (ATCC 33019), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) bakterileri ve *Candida albicans* (ATCC 10231) mayası kullanıldı. Öncelikle TSA üzerine ekilen bakteriler, TSB sıvı besiyerine alınarak bir gece inkübasyona bırakıldı. *Candida albicans* mikroorganizmasını geliştirmek için, PDA (Potato Dextrose agar) besiyeri kullanıldı. İnkübasyonun ardından OD ölçümü yapıldı ve 0,5 olacak şekilde fizyolojik suyla süspanse edilen solüsyonlardan 100'er µl alınarak petrilere aktarıldı. Drigalski özesi yardımıyla petrilerin her tarafına iyice dağıtıldı. Daha sonra bu besiyerlerinin üzerine boş diskler yerleştirildi. Liyofilize EPS örnekleri distile su içerisinde son yoğunlukları 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 20 µl alınarak boş disklerin üzerine aktarıldı. Aynı şekilde negatif kontrol olarak yine distile sudan 20 µl alınarak bir diğer boş diske konuldu ve petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. EPS'lerin antimikrobiyal etkileri oluşan petrilerin zon çapları ölçülerek belirlendi (Nofal *et al.* 2024).

Antioksidan Aktivite

DPPH testi

0.1 mM'lık DPPH-etanol solüsyonu hazırlandı ve EPS örneği 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan solüsyondan 500 µL alınıp, 500 µL DPPH-etanol solüsyonu ile karıştırıldı. Daha sonra 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra, spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Kör olarak metanol, standart olarak ise askorbik asit kullanıldı. Standart grafik oluşturmak için 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 1

mg/mL olan çözeltiler hazırlandı aynı işlemler uygulandı (Khan *et al.* 2013; Imran *et al.* 2016). DPPH serbest radikalini giderme testi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$(\%) = (A_{kontrol} - A_{örnek}) * 100 / A_{kontol}$$

$A_{örnek}$: örneğin absorbans değeri

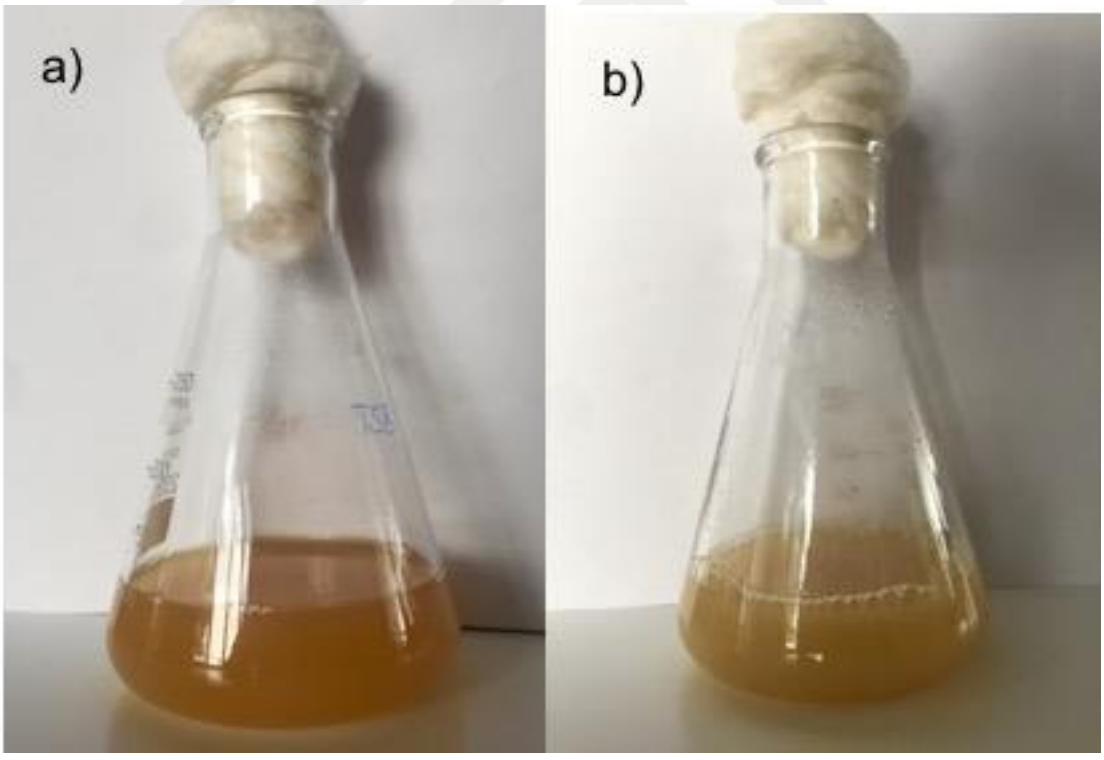
$A_{kontrol}$: kontrolün absorbans değeri

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Ekzopolisakkarit Üretiminde Optimum Şartların Belirlenmesi ve EPS Üretimi

EPS üretimi

Bu çalışmada kullanılan *Calidifidontibacillus erzurumensis* bakterisinin identifikasyonu, karakterizasyonu ve optimal şartları bir önceki çalışma (Adiguzel *et al.* 2020) ile belirlendi. Bu araştırma sonucunda bakterinin en iyi gelişim gösterdiği sıcaklık 45°C ve TSA ile TSB olarak tespit edildiği için mevcut çalışma bu veriler baz alınarak gerçekleştirildi. Literatürde, bu yerel izolatın EPS üretme dâhil hiçbir biyoteknolojik özelliği ile ilgili bir çalışma bulunmadığından mevcut çalışmada EPS üretme potansiyeli araştırıldı. EPS üretme yeteneğinin belirlenmesi için ilk olarak TSB besiyerinde ön deneme yapıldı (Şekil 9a). Bakteri büyümesi tespit edildikten sonra kültür ortamından hücreler uzaklaştırılarak, TCA muamelesi yapılan kültür ortamı Şekil 9b'de gösterilmiştir.



Şekil 9. TSB besiyerinde EPS üretimi. a) TSB besiyerinde inkübasyon sonrası bakteri gelişimi b) Santrifüjle hücre uzaklaştırılması yapılmış süpernatatanta protein uzaklaştırması amacıyla TCA eklendi

TCA muamelesi ile proteinler çöktürülüp, ardından soğuk etil alkol ile çöktürülen EPS Şekil 10a'da gösterilmiştir. Bu durum, bakterinin EPS üretebileceğinin ön delili olarak

değerlendirildi. Daha sonra ise, erlen içerisindeki süpernatant santrifüj edildiğinde EPS' nin tüp altında toplandığı gözlemlendi. Üretilen EPS, daha sonra liyofilize edilerek, suyu uzaklaştırıldı (Şekil 10b). Tüm bu görsel sonuçlara dayanı, yenlarak bakteri cinsine ait tip türün potansiyel EPS üreticisi olduğu kanaatine varıldı. Bu yüzden çalışmanın takip eden aşamalarında EPS üretimini artırmak için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Literatür araştırmaları sonucunda, yapılan çalışmalarda *Alcalibacillus* sp. W3, *Bacillus aerophilus* rk1 ve *B. licheniformis* tarafından üretilen EPS veriminin kültür koşullarının optimize edilmesi ile artırıldığı tespit edildi (Asgher *et al.* 2021; Ravi *et al.* 2021; Arayes *et al.* 2023). Bu bilgiler ışığında mevcut tez çalışmasında EPS'nin verimini arttırmak için optimizasyon çalışmaları yapılarak verimin arttırılması amaçlandı.



Şekil 10. Üretilen EPS' nin saflaştırılması. a) Etil alkol muamaelesi sonrasında kısmen çökelmiş EPS b) Etil alkol ekleme, santrifüj ve liyofilizasyon işlemleri sonrasında elde edilen EPS

Optimal Şartların Belirlenmesi

Optimum sıcaklık değerinin değerlendirilmesi

EPS üretimini etkileyen faktörler arasında karbon kaynağı, sıcaklık, pH, nitrojen kaynağı ve inkübasyon süresi olduğu belirlendi. Bu etkenler arasında sıcaklık, EPS üretimin etkileyen en önemli faktörlerden biri olarak belirlendi (Babiak and Krzemińska, 2021). Yapılan mevcut çalışmada, izolatın TSB besiyerinde 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörlerde inkübasyonu gerçekleştirildi. Farklı sıcaklık değerlerinde üretilen EPS miktarları tespit edildi (Tablo 4). Bakteri gelişimi en fazla 45°C'de gözlemlenirken, maksimum EPS üretimi 55°C'de tespit edildi. Sonraki optimizasyon çalışmaları için sıcaklık değeri olarak 55°C kullanıldı.

Yapılan bir çalışmada (Wang *et al.* 2019) termofilik bakterilerin EPS üretimi üzerine yapılan optimizasyon çalışmalarında, 55°C/ 65°C arası optimum sıcaklık değerinin olduğu ve

bu sıcaklıklarda en verimli EPS ürettimini gerçekleştirdi. Yapılan bir diğer çalışmada ise (Poli *et al.* 2006), *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov. termofilik bakterisi 61°C'de maksimum miktarda EPS ürettiği rapor edilmiştir. Bu yapılan araştırmalar göz önüne alındığında, termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda daha fazla EPS ürettiği kanıtlanmıştır.

Yüksek sıcaklık değerlerinde üretim yapan termofilik bakteriler bu sıcaklıklara direnç göstererek stabil bir EPS ürettiği ve bu bakterilerden üretilen termoprotein ve termoenzim gibi makromoleküllerin zorlu çevre şartlarına dayanma yeteneğinde olduğu bildirilmiştir. Mevcut tez çalışmasın ise kullanılan *C. erzurumensis* termofilik bakteri literatür ile uyumlu bir şekilde optimum büyüme koşullarından daha yüksek sıcaklık derecede maksimum EPS ürettiminin gerçekleştiği gözlemlendi. Bu kapsamda bakteri önem arz etmektedir.

Tablo 4. Farklı Sıcaklık Değerlerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları

Sıcaklık Değerleri (°C)	Üretim Miktarı (g/L)	Biyokütle (g/L)
40	0,18	0, 128
45	0,36	0, 295
50	0,41	0, 287
55	0,45	0, 274
60	0,40	0, 269
65	0,32	0, 241

Optimum pH değerinin değerlendirilmesi

EPS üretim verimini etkileyen bir diğer faktör pH'dir. Bu çalışmada, diğer basamaklarda da uygulandığı gibi bakteri canlandırılması, ön kültüre inokülasyonu gerçekleştirildi ve 45°C'de inkübasyona bırakıldı. 250 mL'lik erlenmayerler içerisinde 100 mL olacak şekilde hazırlanan fermantasyon ortamlarının pH'ları 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlanarak, çalkalı inkübatörde 55°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda farklı pH'larda üretilen EPS miktarları belirlendi (Tablo 5).

Önceki çalışmalarda, mikroorganizmalar EPS üretiminde farklı pH aralıklarının kullanıldığı bildirilmiştir (Li *et al*. 2022; Tregubova *et al.* 2023). Ayrıca mikroorganizmalar, optimum hücre büyümesi gösterdikleri fermantasyon ortamlarında maksimum seviyede EPS üretebilmektedir. Mevcut tez çalışmasında ise, *C. erzurumensis*'in maksimum hücre büyümesi gösterdiği pH değeri 8 olup, EPS üretimi için de aynı değer optimum olarak belirlenmiştir. Bu büyüme pH'sı açısından önceki yapılan çalışma ile uyum göstermektedir (Adiguzel *et al.* 2020). Devam eden çalışmalarda, pH değeri 8 olarak kullanılmıştır.

Tablo 5. Farklı pH Değerlerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları

pH Değerleri	Üretim Miktarı (g/L)	Biyokütle (g/L)
pH 5	0,58	0,02
pH 6	0,653	0,03
pH 7	0,760	0,457
pH 8	0,910	0,582
pH 9	0,870	0,679

Optimum inkübasyon süresinin değerlendirilmesi

Üretimi etkileyen bir diğer faktör de inkübasyon süresidir. Örneğin, (Ravi *et al.* 2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, maksimum EPS üretimi 72 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada (Zhang *et al.* 2020) ise, 22 saatlik inkübasyon sonunda maksimum EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Tüm bu veiler ışığında, EPS üretim prosesleri optimum inkübasyon süresi bakımından mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir (Khalid *et al*. 2022).

Bu etkenin tespiti için, izolat belirlenen optimum sıcaklık ve optimum pH değerinde 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle inkübasyona bırakılarak, sırasıyla inkübasyon süreleri sonrasında EPS ekstraktsiyonu ve saflaştırması yapıldı. Mevcut çalışmada da saflaştırma basamakları sonrasında en iyi üretim sağlanan inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlendi. Bu yönden çalışmamız literatür verileriyle çalışmamız, uyum sağlamaktadır.72 ve 96. saatlerde elde edilen EPS miktarında düşüş olduğu gözlemlendi. Buna sonuçlara göre, EPS miktarındaki düşüşün sebebi olarak fermantasyon süresi uzadıkça, mikroorganizmanın ortamda bulunan EPS'yi besin kaynağı olarak kullandığı sonucuna varıldı.

Tablo 6. Farklı İnkübasyon Sürelerinde Üretilen EPS ve Biyokütle Miktarları

İnkübasyon Süresi	Üretim Miktarı (g/L)	Biyokütle (g/L)
24	0,65	0,463
48	1,064	0,997
72	1,052	1,118
96	1,039	1,105

Ekzopolisakkaritin Total Üretimi

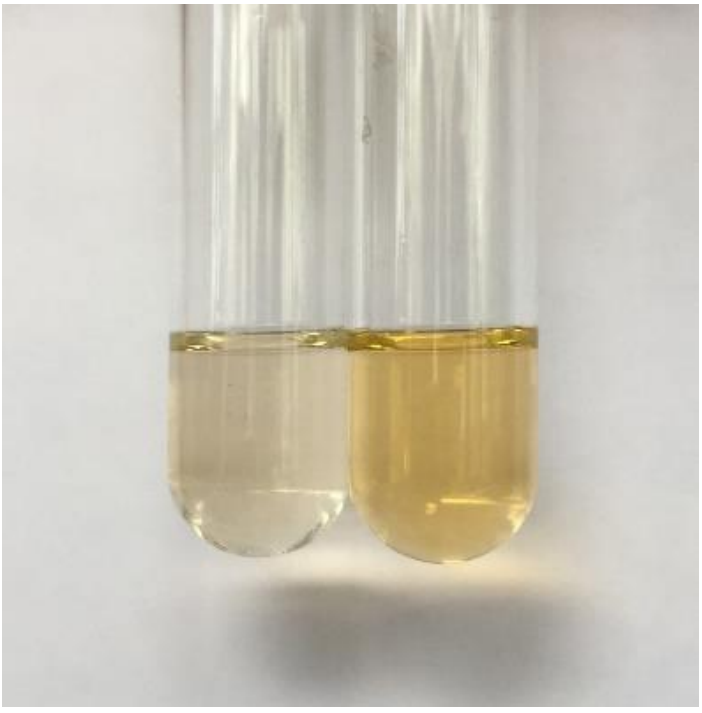
Optimize edilen ortam şartlarından sonra EPS üretimi TSB besiyeri, 55°C sıcaklıkta, pH 8'de ve 48 saatlik inkübasyon süresinde içerisinde 100 mL TSB besiyeri bululnan 250 mL'lik erlenmayerlerde toplam 3 litre hacim olacak şekilde üretim gerçekleştirildi, sırasıya hücre çöktürmesi, TCA muamelesi, etil alkol çöktürmesi ve EPS saflaştırılması yapıldı. Son olarak EPS liyofilize hale getirilerek, karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Karbonhidrat İçeriğinin Belirlenmesi

Fenol – Sülfürik asit yöntemi

Numunedeki karbonhidrat miktarını belirlemek için fenol sülfürik asit yöntemi kullanıldı. Kolorometrik bir metot olan fenol sürfürik asit yöntemi; oligosakkaritler, proteoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidlerdeki nötr şekerleri ölçmek için en kolay ve en güvenilir yöntemdir. Fenol-sülfürik asit yöntemi, duyarlılığı ve basitliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Masuko *et al.* 2005). Literatürde üretimi gerçekleştirilen EPS'lerin total karbonhidrat miktarlarının belirlenmesinde fenol sülfürik asit yöntemi yaygın olarak kullanılmıştır. Örneğin literatür araştırması sonucunda; (Wang et al. 2021)'de yaptığı çalışmada, termofilik bakteri olan *Geobacillus* sp.'den üretilen EPS 1 ile EPS 2'nin fenol sülfürik asit muamelesi sonucu, içeriğinde bulunan karbonhidrat miktarı sırasıyla %93,3 ve %92,7 olarak ortaya konumuştur. (Yang et al. 2023) ise *Debaryomyces hansenii* DH-1 bakterisinden saflaştırılan, S1 ile S2 olarak adlandırılan EPS örneklerinin karbonhidrat miktarını sırasıyla %95,18 ve %92,05 olarak rapor etmiştir.

Yapılan çalışmada liyofilize haldeki EPS örneği 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanarak, fenol sülfürik asit metodu uygunlandı. Kör olarak EPS'nin çözücüsü olan distile su kullanıldı ve kabonhidrat miktarı absorbans ölçümüyle belirlendi.



Şekil 11. Fenol sülfürik asit metodu sonrasında oluşan renk değişimi. Sol tarafta bulunan kontrol, sağ tarafta bulunan ise muamele sonrası EPS'nin renk değişimi

Bu çalışmada standart oluşturmak için 6 farklı konsantrasyonda glikoz kullanıldı. Oluşturulan standart örneklerine fenol sülfürik asit metodu uygulanarak, 490 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Tablo 7. Standart İçin Ölçülen Absorbans Değerleri

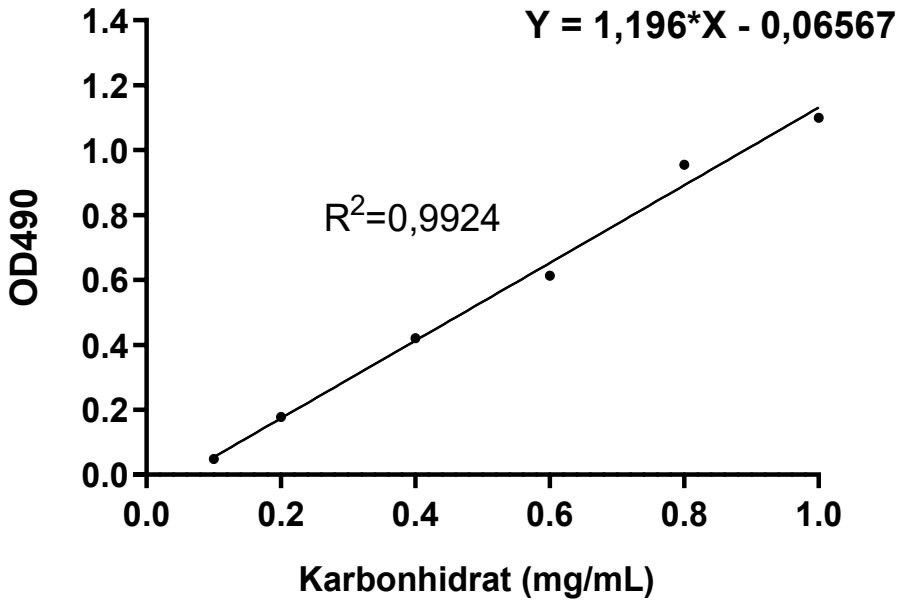
Glikoz Konsantrasyonu mg/mL	**Ölçülen Absorbans**
0,1	0,048
0,2	0,178
0,4	0,421
0,6	0,613
0.8	0,955
1	1,1

Glikoz standartları için oluşturulan grafikten aşağıdaki gibi bir denklem elde edildi.

$$y = 1{,}196x - 0{,}06567$$

1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS numunesinin 490 nm'de alınan absorbans değeri 1,05 olarak ölçüldü. Formülde y yerine EPS numunesinin absorbans değeri yazılarak, karbonhidrat miktarı belirlendi.

Bu formülden yola çıkarak EPS'nin karbonhidrat miktarı 1 mg/mL konsantrasyonda 0,823 mg/mL olarak tespit edildi. Bu sonuçlar da liyofilize 1 mg/mL EPS örneğinin %82,3 oranda karbonhidrat içerdiğini ortaya koydu.



Şekil 12. EPS'nin içerisindeki glikoz miktarını belirlemek için oluşturulan standart grafik

Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Warburg-Christian yöntemi

Yapılan bu yöntemde EPS örneğinin içerdiği karbonhidrat, protein ve nükleik asit miktarı belirlenmiştir. 230 nm'de alınan absorbans değerine göre, üretilen EPS'nin kayda değer oranda karbonhidrat içerdiği belirlenmiştir. 260 ve 280 nm'lerde alınan absorbans değerlerine göre ise EPS içeriğinin düşük miktarlarda protein ve nükleik asit içerdiği ortaya konulmuştur. Absorbans değerleri toplam protein miktarını belirmek için veriler formüle yerine yazılarak hesaplandı.

$$(1{,}55\times A_{280}) - (0{,}76\times A_{260}) = \text{mg protein/mL}$$

Liyofilize haldeki 5 mg EPS numunesinin içerisinde yaklaşık 0.307 mg/mL protein konsantrasyonu bulundu. Bu yöntem ile EPS'nin içerisinde bulunan protein miktarı yaklaşık olarak belirlendi.

Tablo 8. Protein Miktar Tayini İçin Spektrofotometik Sonuçlar

Ölçülen Absorbans	230nm	260nm	280 nm
Numune	1,107	0,540	0,463

Bradford yöntemi

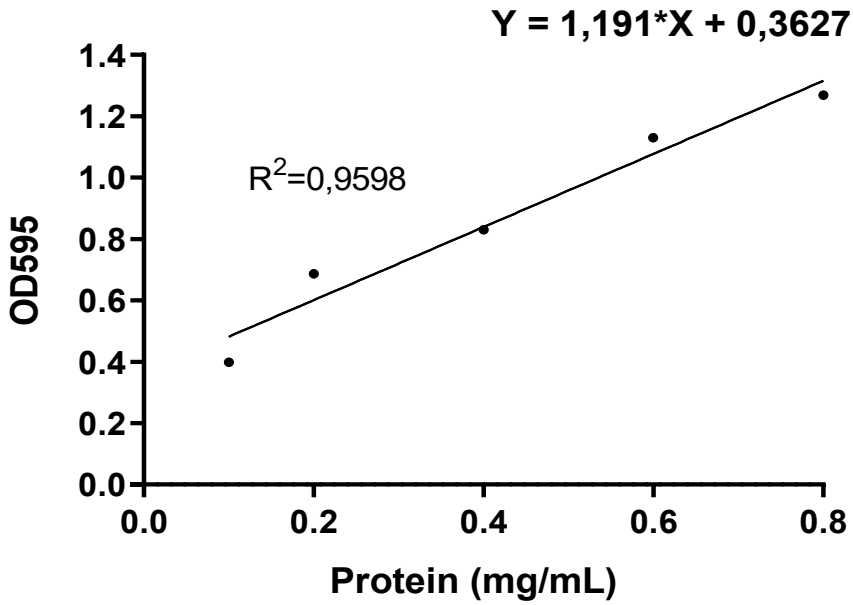
EPS örneğinin total protein analizi Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Standart olarak Bovine Serum Albumin, boya olarak ise Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanıldı. Bradford yönteminde 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı ve farklı konsatrasyonlarda hazırlanan standartların absorbansı alınarak, grafik oluşturuldu.

Tablo 9. Total Protein Tayini İçin Oluşturulan Standartın Spektofomotrik Sonuçları

BSA Konsantrasyonu	Ölçülen Absorbans
0,8 mg/mL	1,269
0,6 mg/mL	1,130
0,4 mg/mL	0,830
0,2 mg/mL	0,687
0,1 mg/mL	0,398

Bradford çözeltisi ile muamele edilen 15 mg/mL olarak hazırlanan EPS numunesinin 595 nm'de verdiği absorbans 0,593 olarak ölçüldü. Alınan absorbans değerlerinden toplam protein miktarını belirmek için, grafik kullanarak oluşan formülde bulgular yerine yazıldı ve total protein miktarı %0,1 olarak elde edildi.

$$y = 1.191x + 0.3627$$



Şekil 13. Bradford protein tayininde kullanılan BSA'nın standart grafiği

Literatürde bulunan çalışmalar ile karşılaştırıldığında mevcut EPS'nin uyuyumluluk gösterdiği belirlendi. Örneğin (Haddar et al. 2021) tarafından yapılan çalışmada üretilen EPS %98,5 oranlarda karbonhidrat içerirken, protein konsantrasyonu az olduğu için ölçülemedi. Benzer bir diğer çalışmada (Gao *et al.* 2022) ise *Bacillus thuringiensis* bakterisinden üretilen EPS'nin %91.29 ± 3.71 ve % 1,31 ± 0.27oranlarda sırasıyla karbonhidrat ve protein içerdiği belirlendi.

Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çözünürlüğün belirlenmesi

Ekzopolisakkaritlerin farklı çözücülerdeki çözünürlüğü temelde yapısındaki polisakkaritin hidrofobik ve hidrofilik uçlarından kaynaklanmaktadır. Böylece EPS'nin yapısında hidrofilik uç yoğunsa polar, hidrofobik uç yoğunsa apolor çözücüde çözünür.

Liyofilize haldeki EPS, iki farklı konsantrasyonda (5 ve 10 mg) hazırlanarak distile su, DMSO, izopropanol, etanol, metanol, aseton, formaldehit gibi polar ve kloroform, hekzan gibi apolar çözücülerde çözünürlükleri belirlendi (Patil and Shirsath 2015).

Tablo 10. EPS'nin Farklı Çözücülerdeki Çözünürlük Sonuçları

Çözücü	Çözünürlük Derecesi
Distile Su	++++
DMSO	+++
Formaldehit	++
Metanol	++
Etanol	-

Tablo 10. (Devamı)

İzopropanol	-
Aseton	-
Petrol Eteri	-
Kloroform	-
Hekzan	-

EPS'nin çözünürlüğü sırasında kullanılan hekzan, kloroform, izopropanol ve etanol gibi çözücülerin çeşitli yan etkileri bildirildi. Bunların arasında etanolün emboli ve periferik nöropatiye sebep olduğu bildirildi. Bu sebepten dolayı *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin suda çözünmesi sahip olduğu en önemli avantajdır Karadayi et al. 2021).

Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi) analizi

Literatürde, mikrobiyal polisakkaritlerin monomer tipine göre ikiye ayrıldığı belirtilmektedir. Tek tipte monomerlerden oluşanlara homopolisakakrit, birden çok tip monomerden oluşanlara heteropolisakakrit adı verilmektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada (Karadayi et al. 2021), *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinin ürettiği EPS'nin ksiloz, glukoz, galaktoz ve sükroz monomerlerinden meydana gelen bir heteropolisakkarit olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Anoxybacillus sp.* R4-33 kaynaklı EPS'nin heteropolisakakrit özelliğinde olduğu ve glukoz ve mannoz'dan meydana geldiği belirtilmiştir (Zhao *et al.* 2014). Anne sütünden izole edilen *Lactobacillus paraplantarum* KM1 bakterisinden ise izole edilen EPS'nin glikoz, mannoz ve galaktoz içeren bir heteropolisakkarit olduğu ortaya konulmuştır (Sharma *et al.* 2020). Literatürde, bakterilerin homopolisakkarit ürettiği de belirtilmiştir. Örneğin, *Leuconostoc mesenteroides* TDS2-19 ve *Acetobacter tropicalis* bakterilerinin glikozdan meydana gelen dekstran isimli homopolisakkaritleri (Van Hijum *et al.* 2006; Semor *et al.* 2018) ürettiği rapor edilmiştir. Yine, *Limosilactobacillus reuteri* (Fraunhofer *et al.* 2018)'in glikozdan meydana gelen glukan isimli, *Lactobacillus rhamnosus* (Polak-Berecka *et al.* 2014) ve *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 (Ni et al. 2018)' un ise fruktoz monomerlerinden meydana gelen inulin isimli homopolisakkaritleri ürettiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, *Weissella confusa* bakterisinin üretmiş olduğu galaktan isimli homopolisakkaritinin sadece galaktozdan oluştuğu gösterilmiştir (Kavitake *et al.* 2016). Yapılan çalışmalarda (Miao *et al.* 2015) *Lactobacillus reuteri* SK24.003 tarafından üretilen EPS'nin yüksek moleküler ağırlığa sahip bir homopolisakkarit olduğu ortaya konulmuştur. Yine *Weisella cibaria* FMy 2-21-1 tarafından üretilen EPS'nin dekstran tipi bir homopolisakkarit olduğu rapor edilmiştir (Lobo *et al.* 2022). Aynı zamanda laktik asit

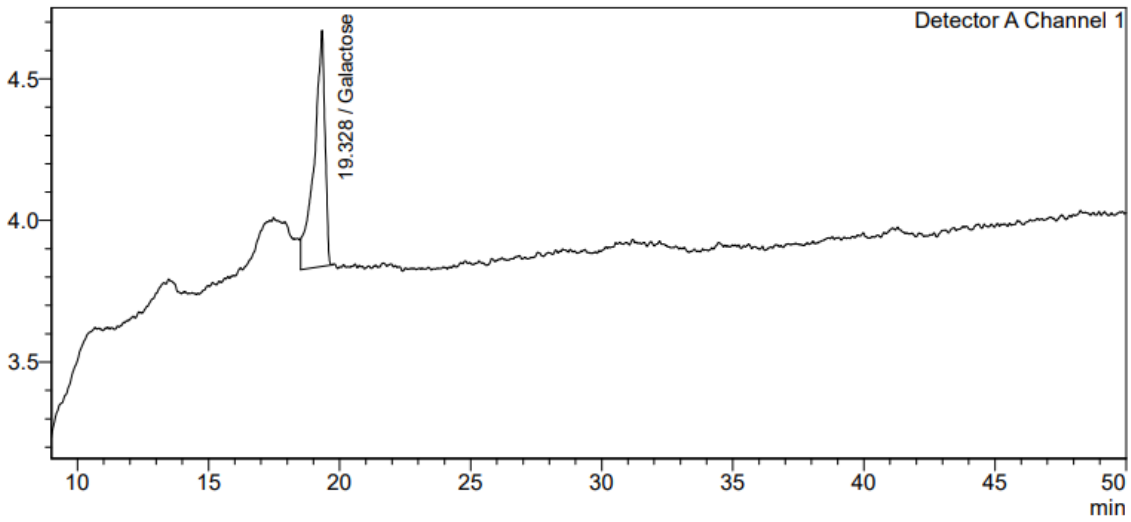
bakterileri tarafından da mutan üreten *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus*; alternan üreten *Leuconostoc mesenteroides* ve levan üreten *Streptococcus salivarius* bakterileri mevcuttur (Ruas-Madiedo *et al.* 2002).

Calidifontibacillus erzurumensis bakterisinden elde ettiğimiz EPS'nin şeker kompozisyonu HPLC metodu ile analiz edilmiş ve bu EPS' nin karbonhidrat bileşiminin sadece galaktozdan oluştuğu tespit edilerek sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. HPLC Analiz Sonucu

Kompozisyon	**Alıkonma Süresi(Dakika)**	**İçerik (mg/L)**
Galaktoz	19,328	583,858

Sadece galaktoz içermesinden dolayı EPS'nin homopolisakkarit yapısında olduğu düşünülmüştür (Şekil 14). *Calidifontibacillus* cinsinin ilk tanımlanan tip türü C. *erzurumensis* dir (Adiguzel *et al.* 2020). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bu türün EPS üretme yeteneği ve EPS' nin kimyasal yapısı hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Diğer taraftan, galaktozdan oluşan homopolisakkaritlerin varlığı genellikle *Weissella confusa* bakterisi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilmiştir (Kavitake *et al.* 2016; Devi *et al.* 2021). Bu yüzden, C. *erzurumensis* izolatının sentezlediği EPS'nin bilimsel literatür açısından son derece önemli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 14. *C. erzurumensis* tarafından üretilen HPLC kromatogramı

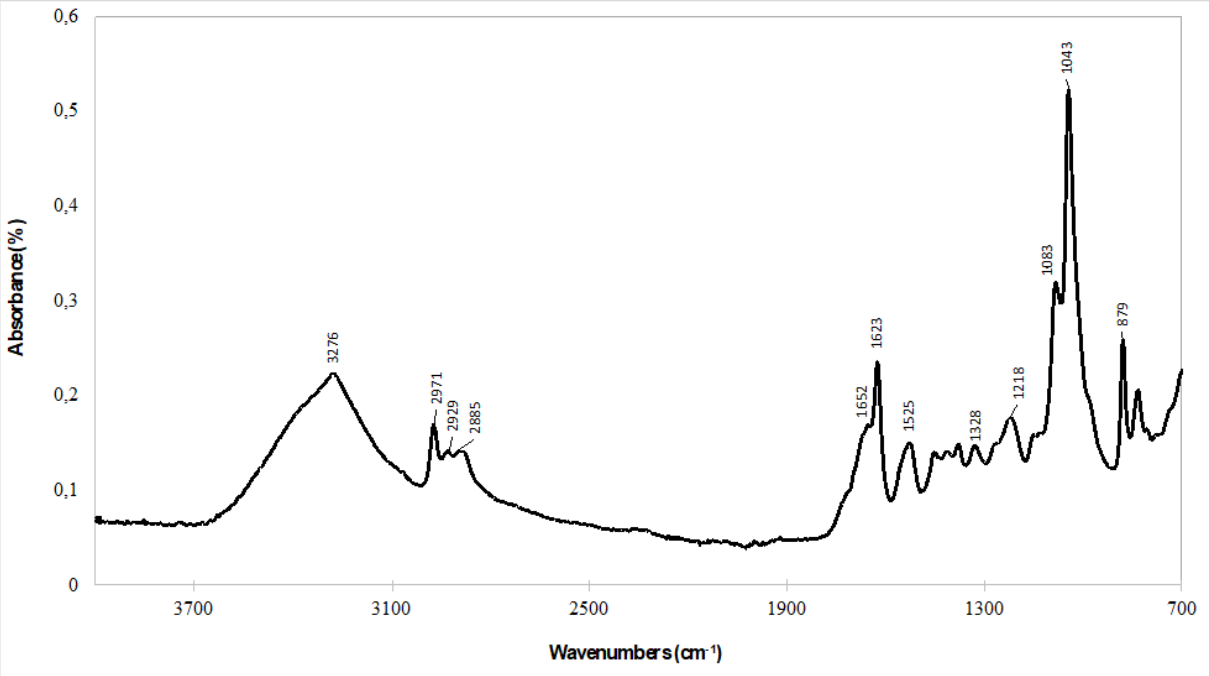
FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi) yöntemi ile EPS'nin fonksiyonel grup analizi

Bu çalışmada, *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin fonksiyonel grup analizi için bu yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem sonucunda olaşan pikler literatür verilerine göre

değerlendirilmiştir. Oluşan pikler değerlendirildiğinde anlamlı ve güçlü bantların 3276, 2971, 2929, 2888, 1652, 1623, 1525, 1328, 1218, 1083, 1043 ve 879 cm^{-1} bölgelerinde olduğu belirlenmiştir. Bu pikler arasında 3276 cm^{-1} bölgesinde oluşan bant, literatürde verilen değerler arasında olup (3600-3200 cm^{-1}), hidrojen bağlarının ve -OH gerilme titreşiminin varlığını göstermiştir (Kayar *et al.* 2021). Yapılan önceki çalışmalar kapsamında hidroksil grubunun varlığı EPS'nin suda çözünürlüğünü gösterdiği bildirilmiştir (Castellane *et al. 2015*; Karadayi *et al.* 2021). Oluşan 2971, 2929 ve 2885 cm^{-1} bantları ise karbonhidratlar ve/veya lipitlerdeki fonksiyonel grupların C-H germe titreşimi ($-CH_3$ > $-CH_2$ >CH-) ile kanıtlanmıştır. Oluşan pikler incelendiğinde 1700- 1770 cm^{-1} arasında belirgin bant olmadığı gözlemlenmiştir. Bu pik, monomerler arasında glukuronik asit yokluğunu düşündürmüştür (Wang *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Hospodarova *et al.* 2018; Nandiyanto *et al.* 2019; Karadayi *et al.* 2021). Proteinlerin varlığını amid bantları göstermektedir. Amid I, II ve II olarak ayrılan pikler arasında ikincil proteine en duyarlı spektral bölge Amid I'in olduğu bilinmektedir. Amid I bandı, C=O (yaklaşık %80) ve C-N gruplarının gerilme titreşimi ile ilişkilidir ve 1600 ila 1700 cm^{-1} aralığında bantlara sahiptir. N-H bükülme (%40-60) ve C-N germe titreşimi (%18-40) ile ilgili olan Amid II bandı ise 1480-1575 cm^{-1} aralığında bulunur. Son olarak Amid III bandı, 1200 ile 1350 cm-1 aralığında absorbans gösterir (Naumann *et al.* 1982; Kong and Yu, 2007; Hashim *et al.* 2010; Aboul-Enein *et al.* 2014; Dawood *et al.* 2020; Ji *et al.* 2020).

Bu kapsamda *C. erzurumensis* tarafından üretilen ve saflaştırılan EPS için, tespit edilen 1652 ve 1623 cm-1, 1525 cm-1, 1328 ve 1218 cm-1 bantların sırasıyla Amid I,II ve II'e ait olduğu düşünülmüştür. Yukarıda bahsedildiği üzere Amid II, N-H bükülmeyi sağlamaktadır. Aynı zamanda bantlar kıyaslandığında Amid II bandının Amid I' e göre daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda EPS örneğinin protein içeriğinin düşük olduğu düşünülmüştür. Potein miktarının düşük olmasındaki en önemli etkenlerin başında eksktraksiyon aşamasında gerçekleştirilen TCA ile protein uzaklaştırması gelmektedir. Ancak bu uzaklaştırma adımına rağmen EPS yapısında protein tespit edilmiştir ve bu protein EPS'nin bileşenlerinden olduğu tespit edilmiştir. Pikler arasında oluşan 1200-800 cm^{-1} bant aralığı bölgesi polisakkaritler için parmak izi olarak bilinmektedir (Copikova *et al.* 2006). Üretilen EPS için 1083, 1043 ve 879 cm^{-1}'de bulunan değerler güçlü bant olarak belirlenmiş olup bu değerler arasında en güçlü bant 1043 cm^{-1}olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değer, üretilen EPS'nin yüksek oranda karbonhidrat içeridiği anlamına gelmektedir. Anomerik bölgede (1200–1000 cm^{-1}) oluşan 1043 cm-1'deki güçlü absorpsiyon, EPS'deki C–C ve C–O gerilme modlarına ve glikozidik bağların (C–O–C) titreşimini açıklamaktadır (Vijayabaskar *et al.* 2011; Sardari *et al.* 2017). 879 cm^{-1} bölgesinde oluşan bant ise polisakkaritin β-konfigurasyonuna sahip olabileceği anlamına gelmektedir (Muhidinov *et al.* 2020) . RNA veya DNA' ya ait fosfat grupları ise 1230 ve 980

cm^{-1}'de bant vermektedir. Üretilen EPS'nin analizleri sonucunda belirtilen iki bölgede de bant meydana gelmediğinden dolayı üretim esnasında bakteri hücrelerin uzaklaştırıldığı ve ortamdaki nükleik asitin belirlenemeyecek oranda olduğu belirtilmiştir.



Şekil 15. *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin FT-IR sonucu

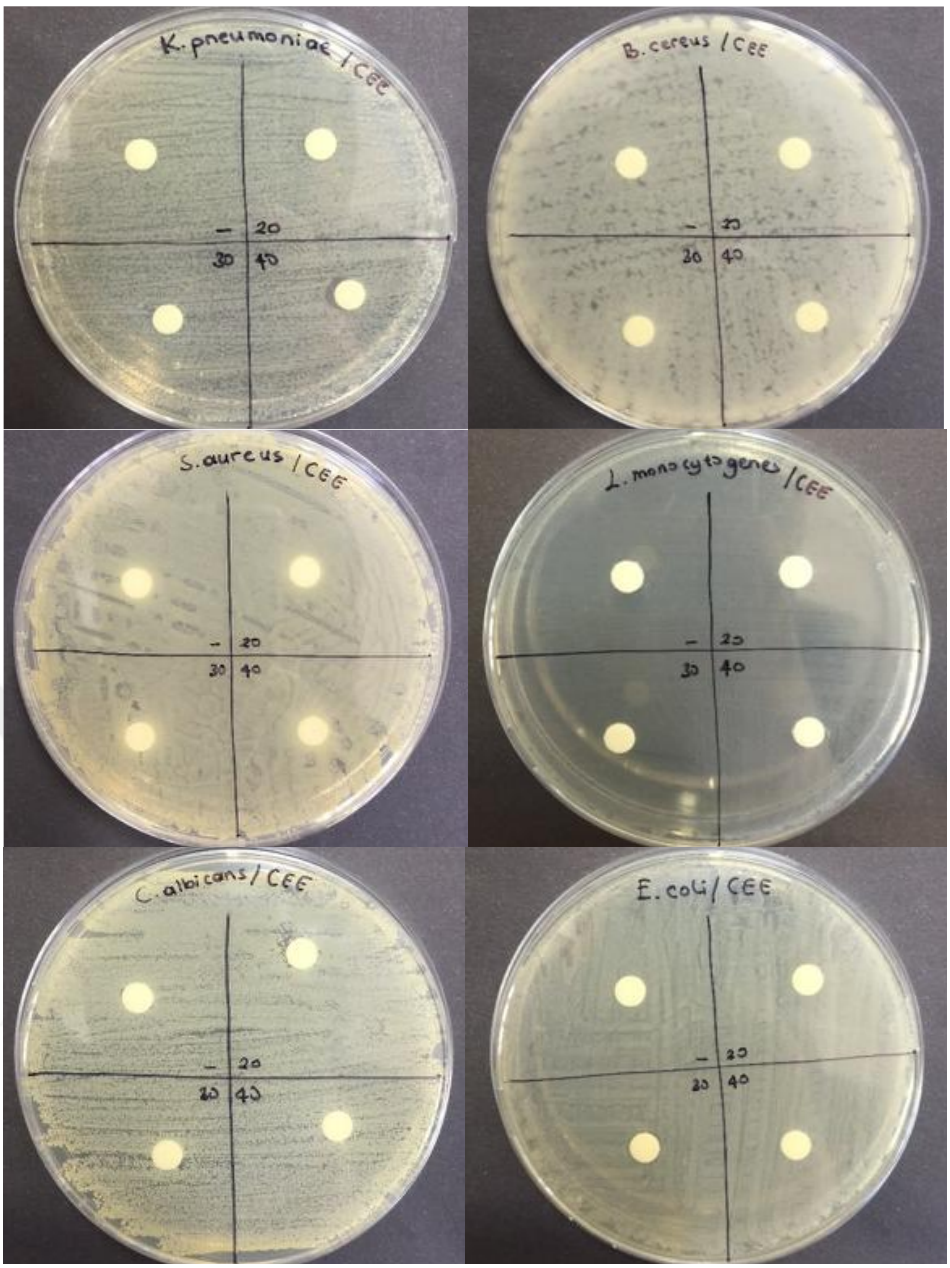
Biyolojik aktivitenin analizi

Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı EPS'ler, gıdadan biyomedikal endüstrilere kadar çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (S. Li *et al.* 2014). Örneğin, yapılan bazı çalışmalarda (Abdalla *et al.* 2021; Petrova *et al.* 2021), laktik asit bakterileri ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada (El-Ghonemy 2021) ise, *Aspergilus* sp. fungusundan elde edilen EPS'lerin laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'ler gibi antimikrobiyal aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Başka bir çalışmada ise (Surve *et al.* 2022) *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen EPS'nin *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Escherichia coli* MTCC 728, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 mikroorganizmlarının üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak ise üretilen EPS'nin en yüksek mikrobiyal inhibisyonunun *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı ve en düşük inhibisyonunun ise *E. faecalis* ATCC 14506 patojenine karşı olduğu görülmüştür. Bu çalışmaların aksine, (Genc *et al.* 2021) yaptığı çalışmada *Anoxybacillus pushchinoensis* bakterisinden elde edilen EPS'nin *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Aeromonas*

hydrophila ATCC 35654, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak mikrobiyal EPS'lerin antimikrobiyal aktiviteleri değişkenlik göstermektedir.

C. erzurumensis yerel izolatından üretilen EPS numunelerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite için *B. cereus* (ATCC 33019), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 43894), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *L. monocytogene* (ATCC 7644) *ve C. albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmalarının standart suşları kullanıldı. Son konsantrasyonları 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL olacak şekilde EPS numuneleri disklere emdirildi. Metot kısmında anlatıldığı üzere EPS'nin antimikrobiyal etkisi test edildi. Yapılan tez çalışması sonucunda, elde edilen EPS'nin herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gözlemlendi (Şekil 16). Bu sonuç, bakteri kaynaklı bazı EPS'lerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olamayabileceği gerçeği ile uyuşmaktadır (Karadayi *et al.* 2021; Genc *et al.* 2021)



Şekil 16. *C. erzurumensis* yerel izolatından üretilen EPS'nin antimikrobiyal aktivite sonuçları

Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

DPPH testi

Yapılan çalışmalarda üretilen EPS'lerin antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Örneğin, (Choi *et al.* 2021) yaptığı çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 bakterisinden elde edilen EPS örneğinin antioksidan aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Benzer bir diğer çalışmada (Adelekan *et al.* 2020) da, ticari yoğurt örneklerinden izole edilen laktik asit bakterinden üretilen EPS örneğinin antioksidan aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında ise 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan EPS'nin antioksidan aktivitesi test edilmiştir. Standart olarak askorbik asitin ve EPS' nin dörf farklı konsantrasyonu (0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 1 mg/mL) kullanılmıştır. Metot kısmında da belirtildiği gibi hazırlanan EPS ve askorbik asit üzerine DPPH çözeltisi eklenerek yarım saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 517 nm'de hem EPS örneği hem de askorbik asit için absorbans ölçümü yapılmıştır (Tablo 11). Spektral sonuçlara göre askorbik asit için standart grafik oluşturulmuştur. *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin antioksidan aktivitesinin olduğu ve konsantrasyon artışına bağlı olarak antioksidant aktivitesinin arttığı belirlendi (Tablo 12). 1 mg/mL konsantrasyondaki EPS'nin antioksidan aktivitesi %21,3 olarak tespit edildi. Literatürde, galaktoz içeren EPS'lerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Andrew and Jayaraman 2020). Bu yüzden, mevcut çalışmada test edilen EPS'nin antioksidan aktivitesinin içeriğindeki galaktozdan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS, antioksidan aktivitesinden dolayı gıda sektörü gibi pek çok önemli alanlarda kullanılabileceği öngörülmektedir.

Tablo 12. DPPH Serbest Radikali Giderme Yeteneği Yüzdeleri

	0,25 mg/mL	**0,50 mg/mL**	**0,75 mg/mL**	**1 mg/mL**
Askorbik Asit	% 93,8	% 94,2	% 94,2	% 94,6
EPS	% 5,3	% 10,6	% 15,9	% 21,3

SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekzopolisakkaritler, endüstriyel açıdan büyük öneme ve yüksek moleküler ağırlığa sahip biyomalzemelerdir. Son yıllarda, benzersiz yapıları ve birçok yeni fonksiyonel özellikleri nedeniyle mikrobiyal EPS'lere olan ilgi artmıştır. Bu nedenle EPS'ler, endüstriyel açıdan önemli metabolitlerdir

Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışmasında, güncel ve önemli bir konu olan ekzopolisakkarit üretiminde yerel izolat olan *Calidifontibacilllus erzurumensis*'in ilk kez EPS üretme yeteneği araştırıldı. TSB besiyerinde kültüre edilen izolat ilk olarak santrifüjlenerek, hücreler uzaklaştırıldı. Ardından TCA muamelesi ve etil alkol ile EPS çöktürmesi yapılarak üretimi sağlanan EPS liyofilize hale getirildi. EPS'nin üretim veriminin artırılması amacı ile kültür koşulları (sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi) optimize edildi. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda EPS miktarının 48 saatlik inkübasyon süresinde, pH 8 ve 55°C sıcaklık değerlerinde maksimum olduğu ortaya konuldu. Optimum koşullarda üretilen EPS liyofilize edilerek, sonraki karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

Karakterizasyon çalışmalarında EPS'nin fizyolojik özellikleri araştırıldı. *C. erzurumensis*'in ürettiği EPS'nin çözünürlüğü distile su, etanol, metanol, kloroform, izopropanol, aseton, DMSO, petrol eteri, formaldehit ve hekzan gibi polar ve apolar çözücülerde incelendi. Sonuç olarak izolatın ürettiği EPS'nin en iyi distile suda çözündüğü gözlemlendi. Suda çözünmesinin en önemli avantajlarından biri, kullanılan alanlarda toksik etki oluşturmaması olup, kozmetikten biyomedikal endüstriye kadar geniş bir uygulama alanına sahip olacağı düşünülmektedir.

Karbonhidat içeriğinin belirlenmesinde fenol sülfürik asit yöntemi uygulandı. Uygulama sonunda üretimi gerçekleştirilen EPS'nin hem renk değişimi hem de spektral veriler incelendiğinde önemli miktarda karbonhidrat içerdiği tespit edidi. Standart glikoz grafiği ile kıyaslandığında 1 mg/mL EPS'nin 0.823 gr karbonhidrat içerdiği gözlemlendi. Bu da EPS'nin %82,3 karbonhidrat içerdiğini gösterdi.

Protein içeriğinin belirlenmesinde hızlı yöntemlerden biri olan Warburg-Christian yöntemi kullanıldı ve mevcut EPS'nin içeriğindeki protein miktarının önemsenmeyecek kadar az olduğu tespit edildi

Protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem Bradford'dur. Bu yöntemde ise, EPS'nin içeriğinde bulunan total protein miktarı BSA standart grafiği ile kıyaslandığında, 15 mg/ml EPS'nin % 0,1 protein içerdiği belirlendi. Elde edilen bu sonuçlara göre mevcut EPS'nin protein miktarı gözardı edilecek seviyede olup, Warburg-Christian yöntemi ve literatür ile uyum sağladı.

Monomer kompozisyonunu belirlemek için HPLC analizi gerçekleştirildi. EPS'nin içeriğine bakıldığında, karbonhidrat içeriğinin galaktozdan oluşan bir homopolisakkarit olduğu rapor edildi. İçeriğin belirlenmesinde kullanılan fenol-sülfürik asit, Bradford, Warburg-Christian ve FT-IR yöntemiyle örtüşen sonuçlar elde edildi.

Biyolojik aktivitenin belirlenmesi için ilk olarak antimikrobiyal aktivitenin araştırılması amacıyla disk difüzyon yöntemi uygulandı. Üretilen EPS'nin *E. coli* (ATCC 43894), *B. cereus* (ATCC 33019), *K. pneumonia* (ATCC 13883*), S. aureus* (ATCC 25923), *L. monocytogenes* (ATCC 7644) ve *C. albicans* (ATCC 10231) mikroorganizmalarına karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivitesinin bulunmadığı gözlemlendi.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ise, DPPH analizi yapılmıştır. Analiz için 1 mg/mL EPS ve dört farklı konsantrasyonda (0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/mL) hazırlanan askorbik asit ile karşılaştırıldığında; %21,3 oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.

Tüm yapılan çalışmalar sonucunda, *C. erzurumensis* tarafından üretilen EPS'nin, yüksek sıcaklıklara ve geniş pH aralığına tolerans gösteren bir metabolit olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca bu EPS'nin en büyük avantajının distile su içerisinde çözünebilir olmasıdır. Çözücülerden bazılarının toksik olması ve ek olarak yan etki göstermesinden dolayı, distile suda çözünen EPS'lerin biyomedikal ve ilaç endüstrisindeki uygulamaları mevcuttur. Antioksidan aktivite göstermesi gıda endüstrisinde kullanılan stabilizatörlere bir alternatif olarak bu EPS'nin kullanılabileceğini gösterdi. Bu EPS antioksidan aktivitesinden dolayı gıda stabilizatörü olmaya bir aday olabilir. Gıda uygulamalarının yanı sıra kozmetik, herbisit ve insektisit gibi tarımsal ilaçlarda ve petrol endüstrisinde kullanılmaktadır. Üretilen bu EPS'nin çeşitli uygulama alanlarında kullanılabilecek olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., & Holley, R. (2021). Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 664395. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395

Abdelnasser, S. M., M Yahya, S. M., Mohamed, W. F., S Asker, M. M., Abu Shady, H. M., Mahmoud, M. G., & Gadallah, M. A. (2017). Antitumor exopolysaccharides derived from novel marine *Bacillus*: ısolation, Characterization Aspect and Biological Activity. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *18*(7). https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.7.1847

Aboul-Enein, Y., Bunacıu, A., & Fleschın, S. (2014). Evaluation of the protein secondary structures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Gazi University Journal of Science, 27(1), 637–644.

Adelekan, A. O., Olurin, T. O., & Ezeani, A. O. (2020). Antioxidant activities of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria ısolated from commercial yoghurt samples. *Advances in Microbiology*, *10*(08), 359-374. https://doi.org/10.4236/aim.2020.108026

Adiguzel, A., Ay, H., Baltaci, M. O., Akbulut, S., Albayrak, S., & Omeroglu, M. A. (2020). Genome-based classification of *Calidifontibacillus erzurumensis* gen. Nov., sp. Nov., isolated from a hot spring in Turkey, with reclassification of *Bacillus azotoformans* as *Calidifontibacillus azotoformans* comb. Nov. and *Bacillus oryziterrae* as *Calidifontibacillus oryziterrae* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(12), 6418-6427. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004549

Ahmad, N. H., Mustafa, S., & Che Man, Y. B. (2015). Microbial polysaccharides and their modification approaches: A Review. *International Journal of Food Properties*, *18*(2), 332-347. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561

Aquinas, N., Bhat M, R., & Selvaraj, S. (2022). A review presenting production, characterization, and applications of biopolymer curdlan in food and pharmaceutical sectors. *Polymer Bulletin*, *79*(9), 6905-6927. https://doi.org/10.1007/s00289-021-03860-1

Andrew, M., & Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbonhydrate Research*. 487

Arayes, M.A., Mabrouk, M.E.M., & Sabry, S.A. (2023). Exopolysaccharide production from *Alkalibacillus* sp. w3: statistical optimization and biological activity. *Biologia* 78, 229–240. https://doi.org/10.1007/s11756-022-01233-1

Arun, J., Selvakumar, S., Sathishkumar, R., Moovendhan, M., Ananthan, G., Maruthiah, T., & Palavesam, A. (2017). In vitro antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus miurensis*. *Carbohydrate Polymers*, *155*, 400-406. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.085

Asgher, M., Rani, A.,Khalid, N., Qamar, S.A., & Bilal, M. (2021). Bioconversion of sugarcane molasses waste to high-value exopolysaccharides by engineered *Bacillus licheniformis. Case Studies in Chemical and Enviromental Engireering*. 3.

Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200

Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Almazrouei, N., Galiwango, E., Esposito, G., Hunashal, Y., Hamed, F., & Najjar, Z. (2020). Exopolysaccharide produced by the potential probiotic *Lactococcus garvieae* C47: Structural characteristics, rheological properties, bioactivities and impact on fermented camel milk. *Food Chemistry*, *333*, 127418. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127418

Babiak, W., & Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: a review of factors affecting eps synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, *14*(13), 4007. https://doi.org/10.3390/en14134007

Banerjee, A., Rudra, S. G., Mazumder, K., Nigam, V., & Bandopadhyay, R. (2018). Structural and functional properties of exopolysaccharide excreted by a novel *Bacillus anthracis* (Strain PFAB2) of hot spring origin. *Indian Journal of Microbiology*, *58*(1), 39-50. https://doi.org/10.1007/s12088-017-0699-4

Banerjee, A., Mohammed Breig, S. J., Gómez, A., Sánchez-Arévalo, I., González-Faune, P., Sarkar, S., Bandopadhyay, R., Vuree, S., Cornejo, J., Tapia, J., Bravo, G., & Cabrera-Barjas, G. (2022). Optimization and Characterization of a novel exopolysaccharide from *Bacillus haynesii* camb6 for food applications. *Biomolecules*, 12(6), 834. https://doi.org/10.3390/biom12060834

Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S. C., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Lim, J., & Park, Y.-H. (2015). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *11*(1), 1. https://doi.org/10.3329/bjp.v11i1.23819

Bhat, B., & Bajaj, B. K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *19*, 100191. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100191

Binmad, S., Kaewtatip, K., Kantachote, D., Sukhoom, A., & Nookongbut, P. (2022). Exopolymeric substance from *Bacillus velezensis* P1 as an antifungal additive in chitosan coating to prolong the shelf life of mangoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *219*, 1155-1162. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.184

Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., & Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, *145*, 77-83. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163

Castellane, T. C. L., Otoboni, A. M. M. B., & Lemos, E. G. de M. (2015). Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobia species. Revista Brasileira de Ciência Do Solo, 39, 1566–1575.

Chaudhari, V., Buttar, H. S., Bagwe-Parab, S., Tuli, H. S., Vora, A., & Kaur, G. (2021). Therapeutic and ındustrial applications of curdlan with overview on ıts recent patents. *Frontiers in Nutrition*, 8, 646988. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.646988

Choi, I. S., Ko, S. H., Lee, M. E., Kim, H. M., Yang, J. E., Jeong, S.-G., Lee, K. H., Chang, J. Y., Kim, J.-C., & Park, H. W. (2021). Production, characterization, and antioxidant activities of an exopolysaccharide extracted from spent media wastewater after *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 fermentation. *ACS Omega*, *6*(12), 8171-8178. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06095

Cole, L., & Kramer, P. R. (2016). Macronutrients. *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine* (ss. 157-164). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00005-0

Čopíková, J., Barros, A. S., Šmídová, I., Černá, M., Teixeira, D. H., Delgadillo, I., Synytsya, A., & Coimbra, M. A. (2006). Influence of hydration of food additive polysaccharides on FT-IR spectra distinction. *Carbohydrate Polymers*,63(3), 355–359.

Costa, C. R. L. de M., Menolli, R. A., Osaku, E. F., Tramontina, R., de Melo, R. H., do Amaral, A. E., Duarte, P. A. D., de Carvalho, M. M., Smiderle, F. R., Silva, J. L. da C., & Mello, R. G. (2019). Exopolysaccharides from *Aspergillus terreus*: Production, chemical elucidation and immunoactivity. *International Journal of Biological Macromolecules, 139*, 654-664. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.039

Dahech, I., Fakhfakh, J., Damak, M., Belghith, H., Mejdoub, H., & Belghith, K. S. (2013). Structural determination and NMR characterization of a bacterial exopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules, 59,* 417-422. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.036

Daştan, S. D., Zonus, N., Yalçin, İ., & Daştan, T. (2012). Bazı Meşe ve Gül Türlerinin Galli ve Galsiz Bireylerindeki, Total Protein. 19.

Dawood, D. H., Elmongy, M. S., Negm, A., & Taher, M. A. (2020). Extraction and chemical characterization of novel water-soluble polysaccharides from two palm species and their antioxidant and antitumor activities. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 141–158.

de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 119. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4

Delattre, C., Laroche, C., & Michaud, P. (2008). Production of bacterial and fungal polysaccharides. 41.

Devi, P. B., Kavitake, D., Jayamanohar, J., & Shetty, P. H. (2021). Preferential growth stimulation of probiotic bacteria by galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 143, 110333. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110333

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers, 87*(2), 951-962. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083

DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry, 28*(3), 350-356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

El-Ghonemy, D. H. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides produced by a novel *Aspergillus* sp. DHE6 under optimized submerged fermentation conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 36,* 102150. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102150

Elmansy, E. A., Elkady, E. M., Asker, M. S., Abdou, A. M., Abdallah, N. A., & Amer, S. K. (2022). Exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 isolated from Romi cheese: Characterization, antioxidant and burn healing activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(12), 245. https://doi.org/10.1007/s11274-022-03439-6

Ergene, E., & Avcı, A. (2016). *Mikrobiyel ekzopolisakkaritler*. 10.

Farag, M. M. S., Moghannem, S. A. M., Shehabeldine, A. M., & Azab, M. S. (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycoides*. *Microbial Pathogenesis*, *140*, 103947. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103947

Farhana., A. & Khan., Y.S. (2022). Biochemistry Lipopolysaccharides. StatPearls.

Farjadian, F., Moghoofei, M., Mirkiani, S., Ghasemi, A., Rabiee, N., Hadifar, S., Beyzavi, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2018). Bacterial components as naturally inspired nano-carriers for drug/gene delivery and immunization: Set the bugs to work? *Biotechnology Advances*, *36*(4), 968-985. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.016

Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, *189*, 296-303. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037

Fooladi, T., Soudi, M. R., Alimadadi, N., Savedoroudi, P., & Heravi, M. M. (2019). Bioactive exopolysaccharide from *Neopestalotiopsis* sp. strain SKE15: Production, characterization and optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 127-139. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.

Fraunhofer, M. E. (2017). *Characterization of EPS-producing brewery-associated lactobacilli*. 109.

Fraunhofer M.E., Geissler A.J., Wefers D., Bunzel M., Jakob F., & Vogel R.F. (2018). Characterization of β-glucan formation by *Lactobacillus brevis* TMW 1.2112 isolated from slimy spoiled beer. *Int. J. Biol. Macromol.* 107:874–881.

Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A., Crespo, J. G., & Coelhoso, I. M. (2014). Microbial polysaccharide-based membranes: Current and future applications. Journal of Applied Polymer Science, 131(6), n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/app.40047

Ravi, Gangalla., Sampath, G., Beduru, S., Sarika, K., Kaveriyappan Govindarajan, R., Ameen, F., Alwakeel, S., & Thampu, R. K. (2021). Optimization and characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus aerophilus* rk1 and its in vitro antioxidant activities. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(5), 101470. https://doi.org/10.1016/j.jksus.101470

Zexin., Gao, Chuanchao., Wu, Jianrong., Wu, Li., Zhu, Minjie., Gao, Zichao., Wang, Zhitao., Li,& Xiaobei Zhan. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aminoglycan-rich exopolysaccharide from the submerged fermentation of *Bacillus thuringiensis*, International Journal of Biological Macromolecules. (220) 1010-1020,

Genc, B., Taskin, M., & Adiguzel, A. (2021). Exopolysaccharide of *Anoxybacillus pushchinoensis* G11 has antitumor and antibiofilm activities. *Archives of Microbiology*, *203*(5), 2101-2118. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02185-x

Gieroba, B., Sroka-Bartnicka, A., Kazimierczak, P., Kalisz, G., Pieta, I. S., Nowakowski, R., Pisarek, M., & Przekora, A. (2020). Effect of Gelation Temperature on the Molecular Structure and Physicochemical Properties of the Curdlan Matrix: Spectroscopic and Microscopic Analyses. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6154. https://doi.org/10.3390/ijms21176154

Anissa., H, Mariem., H, Amir., B, Rita., B, Elisabete., C, Manuel., A,& Coimbra., M.A. (2021). Structural elucidation and interfacial properties of a levan isolated from *Bacillus mojavensis*, Food Chemistry. (343)

Hassan, S. W. M., & Ibrahim, H. A. H. (2017). Production, Characterization and Valuable Applications of Exopolysaccharides from Marine *Bacillus subtilis* SH1. *Polish Journal of Microbiology*, *66*(4), 449-462. https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7001

Hashim, D., Man, Y. C., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., & Syahariza, Z. (2010). Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. Food Chemistry, 118(3), 856–860.

Hereher, F., ElFallal, A., Abou-Dobara, M., Toson, E., & Abdelaziz, M. M. (2018). Cultural optimization of a new exopolysaccharide producer "*Micrococcus roseus*". *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *7*(4), 632-639. https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.07.007

Hospodarova, V., Singovszka, E., & Stevulova, N. (2018). Characterization of cellulosic fibers by FTIR spectroscopy for their further implementation to building materials. American Journal of Analytical Chemistry, 9(6), 303–310.

Hu, X., Pang, X., Wang, P. G., & Chen, M. (2019). Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. *Carbohydrate Polymers, 204*, 9-16. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.069

Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N. S., & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 731-745. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007

Jäntschi, L. (2019). Structure–property relationships for solubility of monosaccharides. *Applied Water Science*, *9*(2), 38. https://doi.org/10.1007/s13201-019-0912-1

Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components. ACS Omega, 5(15), 8572–8578.

Jia, K., Tao, X., Liu, Z., Zhan, H., He, W., Zhang, Z., Zeng, Z., & Wei, H. (2019). Characterization of novel exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infant and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *128*, 710-717. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.245

Jin, H., Jeong, Y., Yoo, SH. et al. Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. Microb Cell Fact 18, 110 (2019). https://doi.org/10.1186/s12934-019-1158-1

Karadayi, Y. I., Aykutoglu, G., Arslan, N. P., Baltaci, M. O., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2021). Production of water-soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *96*(5), 1258–1266. https://doi.org/10.1002/jctb.6638

Katsarov, P., Shindova, M., Lukova, P., Belcheva, A., Delattre, C., & Pilicheva, B. (2021). Polysaccharide-based micro- and nanosized drug delivery systems for potential application in the pediatric dentistry. *Polymers*, *13*(19), 3342. https://doi.org/10.3390/polym13193342

Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2011). Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. Biofouling, 27(3), 309–317.

Kavitake D., Devi P.B., Singh S.P., Shetty P.H. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;86:681–689.

Kayar, F., Doymus, M., Ozkan, H., Arslan, N. P., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2022). Preparation of chitosan with high antibacterial efficiency from *Penicillium crustosum* TZ18. Journal of Polymers and the Environment, 1–11.

Khan, M. A., Rahman, A. A., Islam, S., Khandokhar, P., Parvin, S., Islam, M. B., Hossain, M., Rashid, M., Sadik, G., Nasrin, S., Mollah, M. N. H., & Alam, A. K. (2013). A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Research Notes*, *6*(1), 24. https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-24

Kim, K., Lee, G., Thanh, H. D., Kim, J.-H., Konkit, M., Yoon, S., Park, M., Yang, S., Park, E., & Kim, W. (2018). Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, *101*(7), 5702-5712. https://doi.org/10.3168/jds.2017-14151

Koçberber Kiliç, N., & Dönmez, G. (2019). Farklı ortam koşullarının *Micrococcus* sp. ekzopolisakkarit üretimine etkisi. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, *19*(1), 40-46. https://doi.org/10.35414/akufemubid.387249

Kohajdová, Z., & Karovičová, J. (2009). Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers*, *63*(1). https://doi.org/10.2478/s11696-008-0085-0

Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39(8), 549–559.

Korcz, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 375-384. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014

Krishnamurthy, M., Jayaraman Uthaya, C., Thangavel, M., Annadurai, V., Rajendran, R., & Gurusamy, A. (2020). Optimization, compositional analysis, and characterization of exopolysaccharides produced by multi-metal resistant Bacillus cereus KMS3-1. *Carbohydrate Polymers*, *227*, 115369. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115369

Kumar, R., Bansal, P., Singh, J., & Dhanda, S. (2020). Purification, partial structural characterization and health benefits of exopolysaccharides from potential probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252. *Process Biochemistry*, *99*, 79-86. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.028

Lee, M.-G., Joeng, H., Shin, J., Kim, S., Lee, C., Song, Y., Lee, B.-H., et al. (2022). Potential Probiotic Properties of Exopolysaccharide-Producing *Lacticaseibacillus paracasei* EPS DA-BACS and Prebiotic Activity of Its Exopolysaccharide. Microorganisms, 10(12), 2431. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10122431

Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., & Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315. *Journal of Dairy Science*, *97*(12), 7334-7343. https://doi.org/10.3168/jds.2014-7912

Li, J., Qiao, M., Ji, Y., Lin, L., Zhang, X., & Linhardt, R. J. (2020). Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 199-206. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.214

Li, F., Hu, X., Sun, X. et al. Effect of fermentation pH on the structure, rheological properties, and antioxidant activities of exopolysaccharides produced by *Alteromonas australica* QD. Glycoconj J 39, 773–787 (2022). https://doi.org/10.1007/s10719-022-10087-3

Li, J., Ai, L., Xu, F., Hu, X., Yao, Y., & Wang, L. (2022). Structural characterization of exopolysaccharides from *Weissella cibaria* NC516.11 in distiller grains and its improvement in gluten-free dough. *International Journal of Biological Macromolecules*, *199*, 17-23. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.089

Liu, G., Li, N., Song, S., Zhang, Y., & Wang, J. (2019). Three exopolysaccharides from the liquid fermentation of *Polyporus umbellatus* and their bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *132*, 629-640. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.057

Liu, T., Zhou, K., Yin, S., Liu, S., Zhu, Y., Yang, Y., & Wang, C. (2019). Purification and characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HY isolated from home-made Sichuan Pickle. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 516-526. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.010

Ljubic, V., Milosevic, M., Cvetkovic, S., Stojanovic, M., Novovic, K., Dinic, M., & Popovic, M. (2022). The new exopolysaccharide produced by the probiotic strain L. reuteri B2: Extraction, biological properties, and possible application for Ni2+ ion removal from the contaminated water. *Biomass Conversion and Biorefinery*. https://doi.org/10.1007/s13399-022-03292-5

Lobo, R. E., Orrillo, P. A., Ribotta, S. B., de Valdez, G. F., García, M. S., Cabello, J. C. R., & Torino, M. I. (2022). Structural characterization of a homopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* FMy 2-21-1 and its potential application as a green corrosion inhibiting film. International Journal of Biological Macromolecules, 212, 193-201. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.105

Lu, M. K., Lin, T. Y., & Chang, C. C. (2018). Chemical identification of a sulfated glucan from *Antrodia cinnamomea* and its anti-cancer functions via inhibition of EGFR and mTOR activity. *Carbohydrate polymers*, *202*, 536-544.

Luang-In, V., Saengha, W., Yotchaisarn, M., Halaslova, M., Udomwong, P., & Deeseenthum, S. (2018). Microbial strains and bioactive exopolysaccharide producers from Thai Water Kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *46*(4), 403-415. https://doi.org/10.4014/mbl.1804.04019

Macedo, M. G., Lacroix, C., & Champagne, C. P. (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium. *Biotechnology Progress*, *18*(2), 167-173. https://doi.org/10.1021/bp0101637

Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. Microbiology insights, 6, 1–16. https://doi.org/10.4137/MBI.S10957

Mahmoud, Y. A.-G., El-Naggar, M. E., Abdel-Megeed, A., & El-Newehy, M. (2021). Recent advancements in microbial polysaccharides: Synthesis and applications. Polymers, 13(23), 4136. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/polym13234136

Mangolim, C. S., Silva, T. T. da, Fenelon, V. C., Koga, L. N., Ferreira, S. B. de S., Bruschi, M. L., & Matioli, G. (2017). Description of recovery method used for curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and its relation to the morphology and physicochemical and technological properties of the polysaccharide. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171469

Martina, V., & Vojtech, K. (2015). *A Comparıson Of Bıuret, Lowry And Bradford Methods For Measurıng The Egg's Proteıns*. 5.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69-72. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001

Miao, M., Ma, Y., Huang, C., Jiang, B., Cui, S. W., & Zhang, T. (2015). Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from Lactobacillus reuteri SK24.003. *Carbohydrate Polymers*, *131*, 377-383. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.066

Moosavi, A., & Karbassi, A. (2010). Bİoconversİon of sugar-beet molasses ınto xanthan gum. *Journal of Food Processing and Preservation*, *34*(2), 316-322. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00376.x

Mozammil Hasnain, S. M., Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2019). Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications (ss. 1-14). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00001-7

Muhidinov, Z. K., Bobokalonov, J. T., Ismoilov, I. B., Strahan, G. D., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., & Liu, L. (2020). Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan. Food Hydrocolloids, 105, 105768.

Mülhaupt, R. 2014. Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 43:1054–63.

Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., Perumal, A. B., Sadiku, E. R., Phiri, G., & Jayaramudu, J. (2018). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*, *73*, 15-22. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.018

Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscope of organic material. Indonesian Journal of Science and Technology, 4(1), 97–118.

Naumann, D., Barnıckel, G., Bradaczek, H., Labıschınskı, H., & Gıesbrecht, P. (1982). Infrared spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan: Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin. European Journal of Biochemistry, 125(3), 505–515.

Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinární Medicína*, *53*(No. 8), 397-411. https://doi.org/10.17221/1930-VETMED

Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S., & Mohammed, S. (2019). Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microbial Pathogenesis*, *132*, 10-19. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.018

Ni D., Zhu Y., Xu W., Bai Y., Zhang T., Mu W. Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;109:1209–1218.

Khalid, N., Asgher, M., Hussain, F. et al. Exopolysaccharides production from marine *Bacillus strains* and their antioxidant and bio-flocculant capacities. Arch Microbiol 204, 250 (2022). https://doi.org/10.1007/s00203-022-02851-8

Nofal, A., Azzazy, M., Ayyad, S., Abdelsalm, E., Abousekken, M. S., & Tammam, O. (2024). Evaluation of the brown alga, *Sargassum muticum* extract as an antimicrobial and feeding additives. *Brazilian Journal of Biology*, *84*, e259721. https://doi.org/10.1590/1519-6984.259721

Nwodo, U., Green, E., & Okoh, A. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences, 13*(12), 14002-14015. https://doi.org/10.3390/ijms131114002

Patil, S. Shirsath L., 2015. Production of exopolysaccharide by an osmotolelant thermostable and metal resistant *Bacillus subtillis*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4(2), 965-971.

Petrova, P., Arsov, A., Ivanov, I., Tsigoriyna, L., & Petrov, K. (2021). New exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* 24 display substrate-dependent content and antioxidant activity. *Microorganisms, 9*(10), 2127. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102127

Polak-Berecka M., Waśko A., Kubik-Komar A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Pol. J. Microbiol.* 2014;63:253–257. doi: 10.33073/pjm-2014-034.

Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, *8*(6), 1779-1802. https://doi.org/10.3390/md8061779

Raghunandan, K., Kumar, A., Kumar, S., Permaul, K., & Singh, S. (2018). Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. *3 Biotech*, *8*(1), 71. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1096-3

Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 7.

Rani, R. P., Anandharaj, M., Sabhapathy, P., & Ravindran, A. D. (2017). Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. International Journal of Biological Macromolecules, 96, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122

Reis, E. C., Almeida, M., Cardoso, J. C., Pereira, M. de A., de Oliveira, C. B. Z., Venceslau, E. M., Druzian, J. I., Mariano, R., & Padilha, F. F. (2010). Biopolymer Synthesized by Strains of *Xanthomonas* sp Isolate from Brazil Using Biodiesel-Waste. *Macromolecular Symposia*, *296*(1), 347-353. https://doi.org/10.1002/masy.201051048

Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Fang, H., Padhiar, A. A., Zeng, X., Khurshid, M., He, Z., & Zhao, L. (2019). Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiri* isolated from Chinese kefir grains. *Journal of Functional Foods*, *63*, 103588. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103588

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 12(2-3), 163-171. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1

Saadat, R.Y., Yari Khosroushahi, A. & Gargari P. B. (2021). Yeast exopolysaccharides and their physiological functions. Folia Microbiol 66, 171–182. https://doi.org/10.1007/s12223-021-00856-2

Samadi, M., Khodabandeh Shahraky, M., Tabandeh, F., Aminzadeh, S., & Dina, M. (2022). Enhanced hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidemicus* by an optimized culture medium containing hyaluronidase inhibitor. Preparative biochemistry & biotechnology, 52(4), 413–423. https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1955710

Sardari, R. R. R., Kulcinskaja, E., Ron, E. Y. C., Björnsdóttir, S., Friðjónsson, Ó. H., Hreggviðsson, G. Ó., & Karlsson, E. N. (2017). Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. Carbohydrate Polymers, 156, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.062

Sarkar, D., Nandi, G., Changder, A., Hudati, P., Sarkar, S., & Ghosh, L. K. (2017). Sustained release gastroretentive tablet of metformin hydrochloride based on poly (acrylic acid)-grafted-gellan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *96*, 137-148. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.022

Schmid, J., Sieber. V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. Front. Microbiol. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496

Semor N., Azmi W., Gautam M. Characterization and structural analysis of unique dextran synthesized by purified dextransucrase of newly isolated *Acetobacter tropicalis*. *Curr. Biotechnol.* 2018;7:376–386.

Shanmugam, M., & Abirami, R. G. (2019). Microbial polysaccharides chemistry and applications. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, *9*(1), 73-78. https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1571944

Sharma, K., Sharma, N., Handa, S., & Pathania, S. (2020). Purification and characterization of novel exopolysaccharides produced from *Lactobacillus paraplantarum* KM1 isolated from human milk and its cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *18*(1), 56. https://doi.org/10.1186/s43141-020-00063-5

Shukla, A., Mehta, K., Parmar, J., Pandya, J., & Saraf, M. (2019). Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. *European Polymer Journal*, *119*, 298-310. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.044

Shukla., S. Century Impact of Macromolecules for Advances of Sensing. (2022) Sciences Chemistry Africa. 1-23.

Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., & Kannan, V. R. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. International journal of biological macromolecules, 121, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016

Silva, M. F., Fornari, R. C. G., Mazutti, M. A., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Cichoski, A. J., Cansian, R. L., Di Luccio, M., & Treichel, H. (2009). Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 119-123. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.010

Spanò, A., Laganà, P., Visalli, G., Maugeri, T. L., & Gugliandolo, C. (2016). In vitro antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. *Current Microbiology*, *72*(5), 518-528. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0981-9

Squillaci, G., Finamore, R., Diana, P., Restaino, O. F., Schiraldi, C., Arbucci, S., Ionata, E., La Cara, F., & Morana, A. (2016). Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(2), 613-623. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6991-5

Stylianopoulos, C. (2013). Carbohydrates: Chemistry and classification. *Encyclopedia of Human Nutrition* (ss. 265-271). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00041-6

Suresh Kumar, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides a perception. *Journal of Basic Microbiology*, *47*(2), 103-117. https://doi.org/10.1002/jobm.200610203

Suryawanshi, N., Naik, S., & Jujjawarapu, S. E. (2022). Exopolysaccharides and their Applications in Food Processing Industries. *Food Science and Applied Biotechnology*, *5*(1), 22. https://doi.org/10.30721/fsab2022.v5.i1.165

Surve, S., Shinde, D. B., & Kulkarni, R. (2022). Isolation, characterization and comparative genomics of potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from Indian foods. *Scientific Reports*, *12*(1), 1940. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05850-3

Sutherland, I. W. (1997). Microbial exopolysaccharides structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemistry*, *69*(9), 1911-1918. https://doi.org/10.1351/pac199769091911

Tabernero, A., & Cardea, S. (2020). Microbial Exopolysaccharides as Drug Carriers. *Polymers*, *12*(9), 2142. https://doi.org/10.3390/polym12092142

Tajima, K., Imai, T., Yui, T., Yao, M., & Saxena, I. (2022). Cellulose-synthesizing machinery in bacteria. *Cellulose*, *29*(5), 2755-2777. https://doi.org/10.1007/s10570-021-04225-7

Taylan, O., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2019). Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 436-444. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.078

Tregubova, K.V., Yegorenkova, I.V., Grinev,S.V., & Fomin, A.S. (2023). Biological activity of silver nanoparticles synthesized with *Paenibacillus polymyxa* exopolysaccharides. Enzyme and Microbial Technology.164.

Udayan, A., Arumugam, M., & Pandey, A. (2017). Nutraceuticals from algae and cyanobacteria. *Algal Green Chemistry* (ss. 65-89). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00004-7

Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, *88*(2), 596-603. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006

Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., & Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, *8*(8), 304. https://doi.org/10.3390/foods8080304

Van Hijum S.A., Kralj S., Ozimek L.K., Dijkhuizen L., Van Geel-Schutten I.G. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006;70:157–176.

Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T., & Anandapandian, K. (2011). Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). Adv Biol Res, 5(2), 71–76.

Wang, R., Chen, P., Jia, F., Tang, J., & Ma, F. (2012). Optimization of polysaccharides from *Panax japonicus* CA Meyer by RSM and its anti-oxidant activity. International Journal of Biological Macromolecules, 50(2), 331–336.

Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. Carbohydrate Polymers, 125, 16–25.

Wang, J., Goh, K.M., & Salem, D.R. (2019). Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1. Sci Rep 9, 1608. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36983-z

Wang, D., Kim, H., Lee, S., Kim, D.-H., & Joe, M.-H. (2020). Improved gellan gum production by a newly-isolated *Sphingomonas azotifigens* GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. *Process Biochemistry*, *95*, 269-278. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.020

Yang, Y., Chen, G., Zhao, X., Cao, X., Wang, L., Mu, J., Qi, F., et al. (2022). Structural characterization, antioxidant and antitumor activities of the two novel exopolysaccharides produced by *Debaryomyces hansenii* DH-1. International Journal of Molecular Sciences, 24(1), 335. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/ijms24010335

Ye, G., Li, G., Wang, C., Ling, B., Yang, R., & Huang, S. (2019). Extraction and characterization of dextran from *Leuconostoc pseudomesenteroides* YB-2 isolated from mango juice. *Carbohydrate Polymers*, *207*, 218-223. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.092

Yegorenkova, I. V., Fomina, A. A., Tregubova, K. V., Konnova, S. A., & Ignatov, V. V. (2018). Immunomodulatory activity of exopolysaccharide from the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* CCM 1465. *Archives of Microbiology*, *200*(10), 1471-1480. https://doi.org/10.1007/s00203-018-1564-5

Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, *72*, 41-46. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009

You, X., Li, Z., Ma, K., Zhang, C., Chen, X., Wang, G., Yang, L., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q., & Li, W. (2020). Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5. *Carbohydrate Polymers*, *235*, 115977. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115977

Yousef, R. H., Baothman, O. A. S., Abdulaal, W. H., Abo-Golayel, M. K., Darwish, A. A., Moselhy, S. S., Ahmed, Y. M., & Hakeem, K. R. (2020). Potential antitumor activity of exopolysaccharide produced from date seed powder as a carbon source for *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, *170*, 105853. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105853

Yu, L. Xu S. Deng C. Li H. Yang Q. Xu Z. Chen J., 2016. Preparation and partial structural characterization of the exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01. Carbohydrate Polymers, 146, 217-223**.**

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(3), 1121-1135. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2

Zhang, J., Wen, C., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Advance in Cordyceps militaris (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *132*, 906-914. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.020

Zhang, L., Zhao, B., Liu, CJ. (2020). Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test. Indian J Microbiol 60, 334–345. https://doi.org/10.1007/s12088-020-00865-8

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu,Y., Sun, H., & Li, X, (2020). The Application of Hyaluronic Acid in Bone. *International Journal of Biological Macromolecules. 151*, 1224-1239.

Zhao, S., Cao, F., & Zhang, H. (2014). Structural Characterization and Biosorption of Exopolysaccharides from *Anoxybacillus* sp. R4-33 Isolated from Radioactive Radon Hot Spring. Appl Biochem Biotechnol 172, 2732–2746. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0680-6

Zhao, D., & Li, C. (2022). Multi-omics profiling reveals potential mechanisms of culture temperature modulating biosynthesis of carotenoids, lipids, and exopolysaccharides in oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis ZHK. *LWT, 171*, 114103. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114103

Zhou, Y., Cui, Y., & Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, *207*, 317-332. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093

Ziadi, M., Bouzaiene, T., M'Hir, S., Zaafouri, K., Mokhtar, F., Hamdi, M., & Boisset-Helbert, C. (2018). Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by three lactic acid bacteria. *BioMed Research International*, *2018*, 1-11. https://doi.org/10.1155/2018/1896240

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Saadet Hilal ÖNDER
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Fatih Anadolu Lisesi Erbaa/Tokat
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta