Caldibacillus pasinlerensis'in EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİM YETENEĞİNİNİN ARAŞTIRILMASI

Berrin ALGÜL

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2023

(Her hakkı saklıdır.)

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

*Caldibacillus pasinlerensis'*in EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİM YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

(Investigation of Exopolysaccharide Production Ability of *Caldibacillus pasinlerensis*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berrin ALGÜL

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Berrin ALGÜL tarafından hazırlanan "*Caldibacillus pasinlerensis*'in Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneğinin 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 Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "*Caldibacillus pasinlerensis*'in Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneğinin 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	4	**30**
Kuramsal Temeller	3	**30**
Materyal ve Yöntem	13	**35**
Araştırma Bulguları ve Tartışma	7	**20**
Sonuç ve Öneriler	2	**20**
Tezin Geneli	12	**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**
Berrin ALGÜL	**Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**
02.01.2023	**02.01.2023**
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* 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

Engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı ve desteği sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI, Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU ve Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a,

Hem sevincimi hem de hüznümü paylaştığım laboratuvar arkadaşlarım, Saadet Hilal ÖNDER, Elifnur MERAL ve Bahri AVCI'ya,

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Nesrin ALGÜL'e, babam İbrahim ALGÜL'e ve kardeşim Berfin ALGÜL'e,

Son olarak sağladıkları burs imkanından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Berrin ALGÜL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Caldibacillus pasinlerensis'in EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİM YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Berrin ALGÜL

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Erzurum ili Pasinler ilçesi kaplıcasından izole edilen *Caldibacillus pasinlerensis*'in ekzopolisakkarit (EPS) üretme potansiyeli, metabolitin biyolojik ve kimyasal bazı özelliklerinin ilk defa bu çalışma ile araştırılması amaçlanmaktadır.

Yöntem: Bu çalışmada, mevcut bakteri uygun besi ortamında geliştirilmiş ve EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. EPS üretimini artırma amacıyla besiyerinin karbon kaynağı, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi optimizasyonları yapılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen EPS'nin kimyasal (çeşitli kimyasallar ile çözünürlük, fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat içeriği, Bradford yöntemi ile protein içeriği, monomer kompozisyon, FTIR ile fonksiyonel grup analizi), biyolojik özelliklerinin (DPPH tayin yöntemi ile antioksidan, disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel) karakterizasyonu yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan analizler sonucunda *C. pasinlerensis*'in EPS üretiminde optimal koşulların pH 8, 60°C sıcaklık ve 48 saat fermantasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Daha sonra EPS örnekleri liyofilize hale getirilerek, karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır. EPS örneği karakterize edildiğinde; polar solventlerin çoğunda çözünerek en iyi çözünürlük gösterdiği çözücünün distile su olduğu, %85 oranda karbonhidrat ve % 2,14 oranda protein içerdiği gözlemlenmiştir. Biyolojik özelliklerinin belirlendiği çalışmalar sonucunda da; 1 mg/mL konsantrasyondaki EPS örneğinin % 12,7 oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: *C. pasinlerensis* tarafından üretilen ekzopolisakkaritin; başta sıcaklık uygulamalarının temel alındığı farklı endüstriyel prosesler olmak üzere değişken çevresel koşullara uyum sağlayabilecek bir polimer olup gıda, biyomedikal, kozmetik ve farmasötik uygulama alanlarında kullanılabilirliğinin yüksek olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Caldibacillus pasinlerensis*, termofilik bakteri, ekzopolisakkarit, antioksidan, antimikrobiyal

Ocak 2023, 73 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION ABILITY OF *Caldibacillus pasinlerensis*

Berrin ALGÜL

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: The exopolysaccharide (EPS) production potential of *Caldibacillus pasinlerensis* isolated from the thermal spring of Pasinler district in Erzurum province, certain biological and chemical properties of the metabolite will be investigated for the first time in this study.

Method: In this study, the bacteria were grown in proper media and EPS production was carried out. In order to increase EPS production, the carbon source, temperature, pH and fermentation time of the medium were optimized. The characterization of chemical (solubility with various chemicals, carbohydrate content by phenol-sulfuric acid method, protein content by Bradford method, monomer composition and functional group analysis by FTIR) and biological properties (antioxidant by DPPH determination method and antibacterial by disc diffusion method) of EPS obtained as a result of purification was carried out.

Findings: As a result of the analyzes, it was determined that the optimal conditions for EPS production of *C. pasinlerensis* were pH 8, 60°C temperature and 48 hours fermentation time. Afterwards, EPS samples were lyophilized and used for characterization studies. When the EPS sample is characterized, it was observed that the EPS is soluble in most polar solvents and the solvent in which it showed the best solubility is distilled water, it contain 85% carbohydrates and 2,14% protein. As a result of studies where biological properties were determined, it was determined that EPS sample at 1 mg/mL concentration had 12,7% antioxidant activity.

Results: It is predicted that exopolysaccharide produced by *C. pasinlerensis* is a polymer that can adapt to variable environmental conditions, especially different industrial processes based on temperature applications and its usability will be high in food, biomedical, cosmetic and pharmaceutical application areas.

Keywords: *Caldibacillus pasinlerensis*, thermophilic bacteria, exopolysaccharide, antioxidant, antimicrobial

January 2023, 73 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
Karbonhidratlar 3
Monosakkaritler 3
Disakkaritler 3
Trisakkaritler 4
Polisakkaritler 5
Polisakkaritlerin Doğal Kaynakları 5
Mikrobiyal Polisakkaritler 6
Mikrobiyal Ekzopolisakkarit 6
Ekzopolisakkarit'in İçeriği 6
Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar 7
Mikrobiyal Ekzopolisakkarit Çeşitleri 9
Selüloz 9
Levan 9
Pullulan 10
Kurdlan 10
Ksantan 11
Gellan 11
Aljinat 12
Hiyalüronik asit 12
Ekzopolisakkarit Üretimini Etkileyen Faktörler 13

Ekzopolisakkarit Üretiminde Biyosentetik Yol 14
Ekzopolisakkarit Üretiminde Termofilik Bakteriler 14
Caldibacillus pasinlerensis'in Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneği 15
Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları ve Yapılan Çalışmalar 17
MATERYAL VE METOT 20
Materyal 20
Çalışmada kullanılan cihazlar 20
Çalışmada kullanılan çözeltiler 20
Çalışmada kullanılan kimyasallar 21
Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması 21
Metot 22
Caldibacillus pasinlerensis için önkültür hazırlanması 22
Caldibacillus pasinlerensis ile ekzopolisakkarit üretimi 23
Ekzopolisakkarit Üretiminin Optimizasyonu 24
EPS üretiminde optimal besiyerinin belirlenmesi 24
EPS üretiminde optimal sıcaklığın belirlenmesi 24
EPS üretiminde optimal pH değerinin belirlenmesi 24
EPS üretiminde optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi 24
EPS'nin Total Üretimi ve Saflaştırılması 25
Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu 26
Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi 26
Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi 26
Protein içeriğinin belirlenmesi 26
Monomer kompozisyonunun belirlenmesi 27
Fonksiyonel grup analizi 27
Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi 28
Antimikrobiyal aktivite 28
Antioksidan Aktivite 28
DPPH serbest radikalini indirgeme etkisi 28
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 29
Caldibacillus pasinlerensis'in Ekzopolisakkarit Üretimi İçin En Uygun Besiyerinin Belirlenmesi 29
Optimum sıcaklık değerinin değerlendirilmesi 31
Optimum pH değerinin değerlendirilmesi 31
Optimum fermantasyon süresinin belirlenmesi 32

EPS'nin Total Üretimi 33
Farklı solventler içerisinde çözünürlüğünün değerlendirilmesi 33
Karbonhidrat içeriğinin değerlendirilmesi 34
Protein İçeriğinin Değerlendirilmesi 35
Warburg-Christian yöntemi 35
Bradford yöntemi 36
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile monomer kompozisyonunun değerlendirilmesi 37
Fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) ile saflaştırılan EPS'nin fonksiyonel grup analizi 39
Biyolojik Aktivitenin Değerlendirilmesi 41
Antimikrobiyal aktivite 41
Antioksidan aktivite 43
SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 60

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. En Yaygın Çalışılan Ekzopolisakkaritler ve Bazı Özellikleri 8
Tablo 2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Markaları 20
Tablo 3. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları 21
Tablo 4. Farklı Besiyeri Ortamlarında Üretilen EPS'nin Miktar Tayini 30
Tablo 5. Farklı Ortam Sıcaklıklarında Üretilen EPS'nin Miktar Tayini 31
Tablo 6. Farklı pH Değerlerinde Üretilen EPS'nin Miktar Tayini 32
Tablo 7. Farklı Fermantasyon Sürelerinde Üretilen EPS'nin Miktar Tayini 33
Tablo 8. Üretimi Gerçekleştirilen EPS'nin Çözünürlüğü 33
Tablo 9. Fenol-Sülfürik Asit Yöntemi Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları 35
Tablo 10. Toplam Protein Miktarı İçin Alınan Spektrofotometrik Sonuçları 36
Tablo 11. Bradford Yöntemi Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları 36
Tablo 12. *C. pasinlerensis*'in Ürettiği EPS'nin Monomer Kompozisyonu 38
Tablo 13. DPPH Serbest Radikali Giderme Yeteneği Yüzdeleri 44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Monosakkarit yapıları 3
Şekil 2. Disakkarit yapıları 4
Şekil 3. Trisakkarit yapısı 4
Şekil 4. Polisakkarit yapıları 5
Şekil 5. 16S rRNA gen dizilerine göre daha önce *Bacillus* cinsinde sınıflandırılan bakterilerin filogenetik ağaç görüntüsü 16
Şekil 6. TSA besiyeri ortamında geliştirilen *Caldibacillus pasinlerensis* 22
Şekil 7. TSB ve TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz sıvı besiyeri ortamlarında geliştirilen *Caldibacillus pasinlerensis* 23
Şekil 8. TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz besiyeri ortamına TCA muamelesi sonucu çöktürülen proteinler 23
Şekil 9. Hücre ve proteinlerin uzaklaştırılması sonucu besiyeri ortamı ve EPS çöktürmesi için alkol eklenen besiyeri ortamı 25
Şekil 10. Alkol muamelesi sonucu çöktürülen EPS ve liyofilize haldeki EPS 30
Şekil 11. *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin fenol-sülfürik asit muamelesi sonucu gözlemlenen renk değişimi 34
Şekil 12. Karbonhidrat tayininde kullanılan fenol-sülfürik asit yöntemi glukoz standart grafiği 35
Şekil 13. Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan BSA standart grafiği 37
Şekil 14. *C. pasinlerensis* tarafından üretilen galaktozun monomer bileşimini gösteren HPLC kromatogramı 39
Şekil 15. Saflaştırılan EPS'nin FT-IR spektrumu 41
Şekil 16. *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi 43

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

°C : Santigrat Derece
BSA : Bovine serum albümin
CPS : Kapsüler polisakkarit
DMSO : Dimetil sülfoksit
DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA : 2,2',2",2"'- (Ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraasetik asit
EPS : Ekzopolisakkarit
EtOH : Etil alkol
FT-IR : Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HePS : Heteropolisakkarit
HoPS : Homopolisakkarit
HPLC : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
kDa : Kilodalton
LPS : Lipopolisakkarit
NaOH : Sodyum hidroksit
pH : Potansiyel hidrojen
TCA : Trikloroasetik asit
TSA : Tryptone Soya Agar
TSB : Tryptone Soya Broth

GİRİŞ

Karbonhidratlar, doğada bol miktarda bulunan canlılık için büyük öneme sahip makromoleküllerden biridir. İçerdikleri şekerlere göre monosakkarit, disakkarit, trisakkarit ve polisakkaritler olmak üzere dört ana gruptan oluşmaktadır (Ali *et al.* 2018).

Polisakkaritler hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen karbonhidrat polimerleri hücre duvarı ile kovalent bağlı halde, hücre zarına gevşek bir şekilde bağlı veya besin ortamına salınmış halde olmak üzere bulundukları yere göre üç farklı gruba ayrılır. Hücre dışına salgılanan karbonhidrat polimerleri ise ekzopolisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. (Vijayendra & Shamala, 2014) Hücre içi polisakkaritler hücrenin ihtiyaç duyduğu enerjiyi karşılamakta, yapısal polisakkaritler hücre duvarının temel yapısını oluşturmakta ve hücre dışı polisakkaritler ise besin ortamına serbest veya kapsül şeklinde salınmaktadır. Bu ekzopolisakkaritler şeker içeriklerine göre; homopolisakkarit ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılır. (Donot *et al.* 2012)

Ekzopolisakkarit üretimi gerçekleştiren mikroorganizmaların başında bakteriler, ipliksi funguslar, algler ve mayalar gelmektedir. Mikrobiyal polisakkaritlerin üretimi çoğunlukla sıvı kültürlerde gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu polisakkaritlerin üretiminin pH, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu, karbon ve azot kaynakları gibi besinsel ve çevresel faktörlerden etkilendiği belirtilmektedir. Bu yüzden bu polisakkaritlerin üretiminde kültür şartlarının optimizasyonu büyük önem taşımaktadır (Rana & Upadhyay, 2020).

Ticari olarak üretimi gerçekleştirilen ve işlevsel olarak büyük öneme sahip mikrobiyal ekzopolisakkaritlerden birkaçı selüloz, levan, pullulan, kurdlan, ksantan, gellan, aljinat ve hiyalüronik asittir. Yenilenebilir, biyouyumlu ve doğada biyolojik olarak parçalanabilir olmaları nedeniyle mikrobiyal ekzopolisakkaritler çevre dostu moleküller olarak kabul edilmektedir. Bu avantajlı yönlerinden dolayı mikrobiyal ekzopolisakkaritler; stabilizatör, emülgatör, viskozlaştırıcı, jelleştirici, su bağlayıcı ve kapsülleme ajanı olarak gıdadan, kozmetiğe ve biyomedikal sektörüne kadar çok çeşitli endüstrilerde uygulama alanları bulmaktadır (Gerbersdorf *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2013; Simpson & Morris, 2014; Asgher *et al.* 2021; Xie *et al.* 2021; Banerjee *et al.* 2022). Örneğin, *Acetobacter* spp., *Xanthomonas* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Agrobacterium* sp., *Aeurobasidium pullulans* ve *Alcaligenes viscosus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen polisakkaritlerin antimikrobiyal, antikanser, antioksidan ve

yaşlanma karşıtı özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Dahech *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012; Zhan *et al.* 2012; Esawy *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2014; Srikanth *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016; Prakash *et al.* 2018).

Daha önceki bir çalışmada (Baltaci *et al.* 2020), Erzurum'un Pasinler ilçesinde bulunan kaplıcalardan toplanan su örneklerinden yeni bir bakteri türü keşfedilmiş ve bu tür *Caldibacillus pasinlerensis* olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte bu yeni türün biyoteknolojik özelliklerine yönelik herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada ise, ilk defa *C. pasinlerensis*'den ekzopolisakkarit üretimi gerçekleştirilmiş ve bu ekzopolisakkaritin yapısal ve kimyasal özellikleri karakterize edilerek, biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.

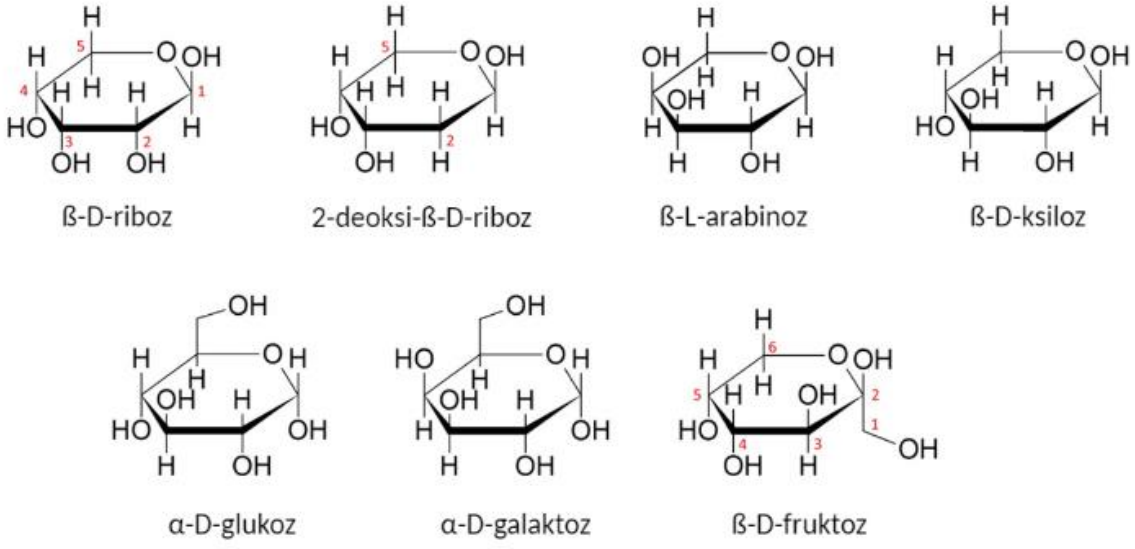
KURAMSAL TEMELLER

Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, biyolojik sistemlerde oldukça önemli bir yere sahiptir ve organizmaların temel yapı taşlarındandır. Kimyasal olarak monosakkaritler, disakkaritler, trisakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Wiercigroch *et al.* 2017).

Monosakkaritler

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (UIPAC)'ne göre monosakkaritler, diğer birimlerle glikozidik bağlantısı olmayan tek bir şekerdir. Temel monosakkaritler, üç veya daha fazla karbon atomuna sahip polihidroksi aldehitler veya polihidroksi ketonlardır (Dixon *et al.* 1997). Genellikle renksiz, kristal yapıya sahip katı maddelerdir. Polar özellik gösteren çözücülerde çözünmekte ve monosakkaritlerin çoğu tatlı bir tada sahip olmaktadır. Monosakkaritler, biyolojik süreçlerde oldukça önemli bir rol üstlenir. Örneğin, 2-deoksi-D-riboz şekeri nükleotidlerin temel yapı taşı olarak DNA'nın spiral konformasyonunun oluşumuna katkıda bulunur. Glukoz şekeri ise her yerde bulunabilen bir yakıt olmasının yanında oligo ve polisakkaritlerin temel birimidir (Wiercigroch *et al.* 2017).

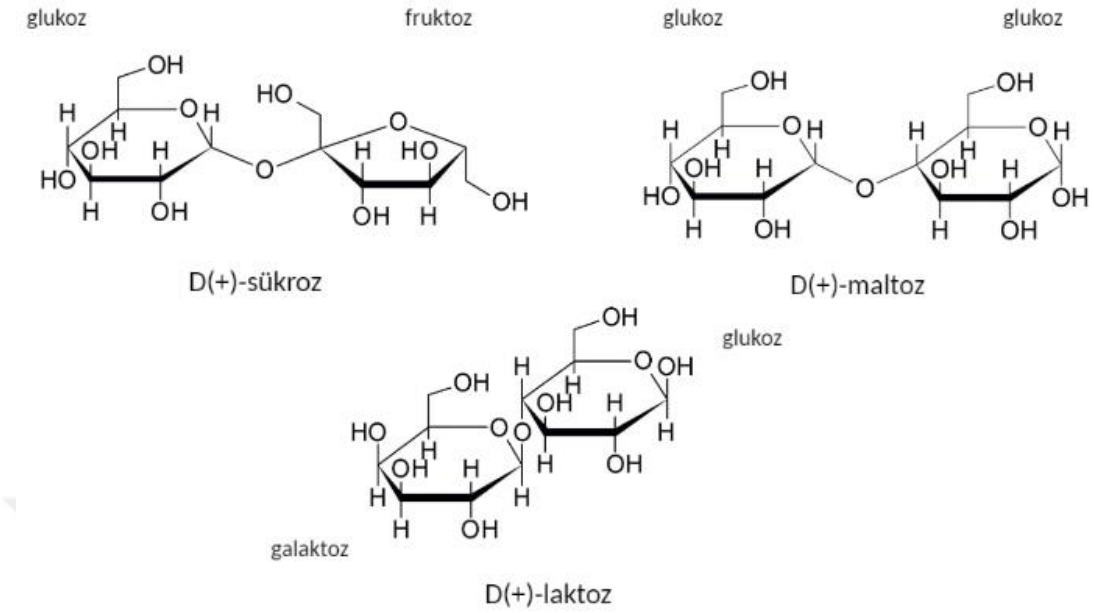


Şekil 1. Monosakkarit yapıları (Wiercigroch *et al.* 2017)

Disakkaritler

Disakkaritler, iki monosakkaritin glikozidik bağ ile birleşimi sonucu oluşmakta olup, disakkaridaz grubu enzimler tarafından parçalanarak, monosakkarit formuna dönüştürülür.

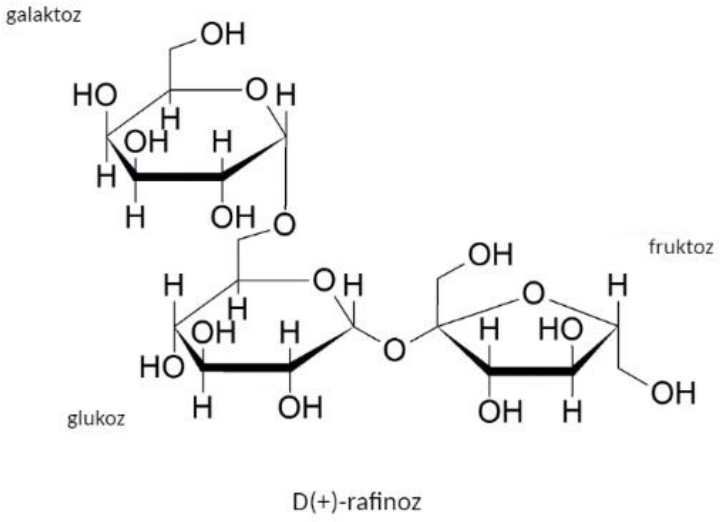
Canlı organizmalarda enerji kaynağı olarak kullanılan ve doğada en yaygın bulunan disakkaritler; sakkaroz, maltoz ve laktozdur (Cummings & Stephen, 2007).



Şekil 2. Disakkarit yapıları (Wiercigroch *et al.* 2017)

Trisakkaritler

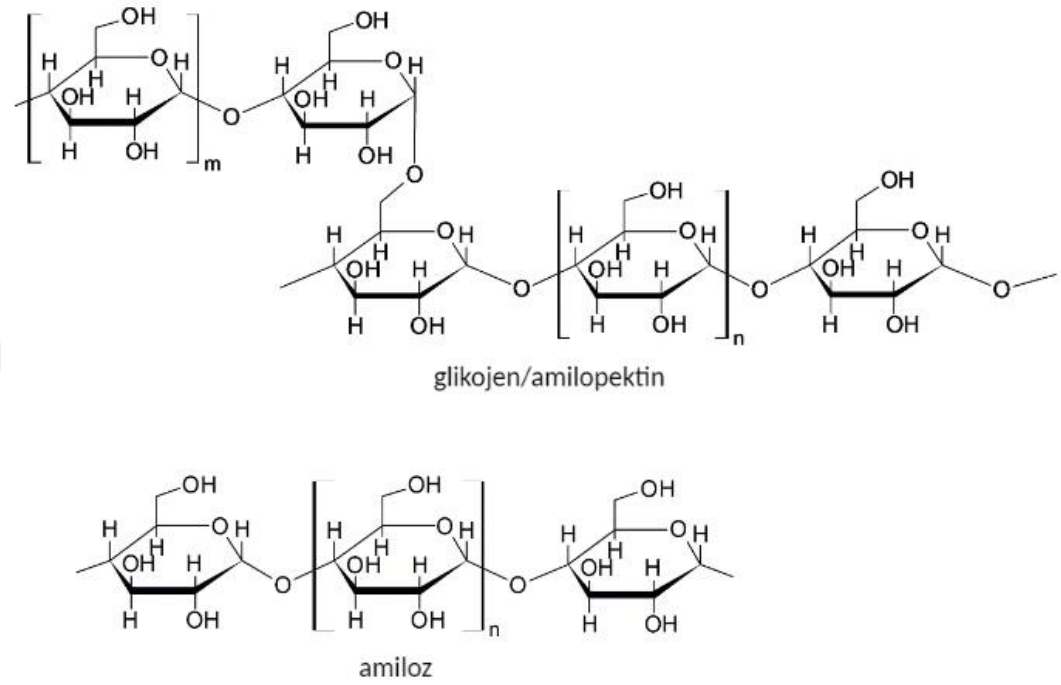
Genellikle yüksek bitkilerde bulunan trisakkaritler, üç monosakaritin glikozidik bağlarla birleşmesi ile oluşmaktadır. En iyi bilinen örneği olan rafinoz; galaktoz, glikoz ve fruktoz şekerlerinin glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan bir trisakkarittir (Jeffrey & Huang, 1990).



Şekil 3. Trisakkarit yapısı (Wiercigroch *et al.* 2017)

Polisakkaritler

Polisakkaritler, glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış çok sayıda (en az 10) monosakkaritin oluşturduğu makromolekül yapısıdır (Dixon *et al.* 1997). Yüksek bitkiler nişasta, selüloz ve pektin gibi polisakkaritleri üretme kabiliyetlerinden dolayı polisakkaritler için primer kaynak olarak bilinmektedir (Donot *et al.* 2012).



Şekil 4. Polisakkarit yapıları (Wiercigroch *et al.* 2017)

Polisakkaritlerin Doğal Kaynakları

Polisakkaritlerin üretiminde çok çeşitli canlı grupları rol oynarlar. Bu nedenle üretimi gerçekleştirilen polisakkaritler de yapısal olarak çeşitlilik göstermektedir (Chakraborty *et al.* 2019). Geleneksel uygulamalarda polisakkaritlerin birincil kaynakları bitkiler olup hayvanlar, algler, funguslar ve bakteriler de bu kaynaklar arasında yer almaktadır (Freitas *et al.* 2011).

Çeşitli sebze ve bitkiler tarafından üretilen bitki polisakkaritleri, doğada bol miktarda bulunmaları, yapısal çeşitlilikleri ve biyolojik aktiviteleri sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir. Örneğin, yapılan çalışmalarda bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlerin antitümör, immün sistem uyarıcı, antienflamatuar, antioksidan, antikoagülan ve fibrinojenik aktiviteleri ortaya konulmuştur (Chanda & Dave, 2009; Kanagasabapathy *et al.* 2011; Li *et al.* 2014; Zou *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Denman & Morris, 2015)

Polisakkaritlerin elde edildiği bir diğer önemli doğal kaynak ise mikroorganizma grubudur. Mikroorganizmalar, yapısal olarak oldukça çeşitlilik gösteren ve biyolojik olarak aktivite (antitümör, antioksidan, antimikrobiyal ve immüno modülatör) gösteren polisakkaritleri üretme yeteneğine sahiptir (Chakraborty *et al.* 2019).

Mikrobiyal Polisakkaritler

Birçok mikroorganizma tarafından üretilen polisakkaritler, uzun zincirli karbonhidrat polimerleridir. Mikrobiyal polisakkaritler hücre içindeki yerleşimlerine göre; (1) hücreye karbon ve enerji kaynağı sağlayan sitozolik polisakkaritler, (2) peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler dahil hücre duvarını oluşturan polisakkaritler ve (3) ekzopolisakkaritler olarak bilinen, hücre dışı ortama kapsül veya biyofilm şeklinde salınan polisakkaritler olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. Hücre duvarı ile bağlantılı olan polisakkaritler, peptidoglikan ipliklerin Mur*N*Ac bölgeleriyle kovalent bağ kurmuş olup, bu polisakkaritlere lipopolisakkaritler (LPS) adı verilmektedir. Hücre zarına bağlı veya yakın ilişkili kapsül oluşturan polisakkaritler, kapsüler polisakkarit (CPS) olarak adlandırılmaktadır. Yapılan tanımlamalara göre bir diğer polisakkarit çeşiti ise hücre dışı ortama salınan ekzopolisakkaritlerdir (EPS) ve hücre zarı ile kovalent bağ kurmadan besin ortamında serbest şekilde bulunmaktadır. Hücrelerin büyüme koşulları, hücre içi yoğunluk ve yerleşimleri gibi etkenlerden dolayı bu polisakkaritler arasındaki farkın ayırt edilmesi pek mümkün değildir (Kleerebezem *et al.* 2010; Badel *et al.* 2011).

Mikrobiyal Ekzopolisakkarit

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlere olan ilgi ve yönelimin artmasının temel sebebi mikroorganizma ürünlerine ulaşımın zamansal olarak avantaj sağlamasıdır. Bitkiler polisakkarit üretiminde birincil kaynak olmalarına rağmen yetiştirme süreleri ve bakımlarına gösterilmesi gereken itina nedeniyle uzun zamanlar alabilmektedir. Fakat bu durum mikroorganizmalarda uygun ortam koşulları sağlandığında çok daha kısa sürelerde üretim sağlanması demektir. Öyle ki, bitkilerde bir polisakkaritin üretilmesi ve elde edilmesi aylar alabilirken mikroorganizmalarda bu süre yalnızca birkaç gün olmaktadır. Avantajları olduğu gibi mikroorganizmalardaki EPS üretimini sınırlayan dezavantajlar da mevcuttur. Bu dezavantajların başında mikroorganizmaların üretim sağlamaları için gerekli olan substratlar ve biyoreaktörlerin maliyeti gelmektedir (Donot *et al.* 2012).

Ekzopolisakkarit'in İçeriği

Ekzopolisakkaritler fiziko-kimyasal ve biyolojik yapıları itibariyle oldukça çeşitlilik göstermektedir. Tek tip monosakkaritin birlikteliğiyle oluşan ekzopolisakkaritler homopolisakkarit (HoPS) (nişasta, glikojen vb.) olarak adlandırılırken, farklı tip monosakkaritleri veya bunların türevlerini (heparin, gama globülin ve hyaluronik asit) içeren polisakkaritler ise heteropolisakaritler (HePS) olarak adlandırılmaktadır (Wiercigroch *et al.* 2017). Doğada EPS üreten mikroorganizmaların çeşitliliği gibi üretilen EPS'ler de özellikleri

ve verimleri bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedir. Özelliklerindeki bu çeşitliliğe rağmen yapısal olarak polisakkarit ve protein olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadırlar. Polisakkaritlerin fiziksel ve fizyolojik özellikleri de bu iki ana gruba dayalı olarak moleküler ağırlık, dallanma frekansı, monosakkarit konsantrasyonu, konformasyon ve glikozidik bağlantı gibi yapısal parametreler tarafından belirlenmektedir (He *et al.* 2016). Genel olarak ham bir ekzopolisakkaritin kompozisyonunun %72,1 şeker (a/a), %23 protein (a/a) ve eser miktarda inorganik tuzdan oluştuğu rapor edilmektedir (Chen *et al.* 2022).

EPS'nin karbonhidrat içeriği üretimi gerçekleştiren mikroorganizmadan ekstraksiyon yöntemine kadar çok çeşitli faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle EPS üretiminde kullanılan mikroorganizma, ekstraksiyon yöntemi, çevresel koşullar, karbon ve azot kaynağı değiştikçe EPS'nin içeriği de değişmektedir. EPS'nin sahip olduğu protein içeriği ise EPS için oldukça önemli bir bileşenidir. Üretimde kullanılan karbon kaynağı ve diğer etkenlerden ziyade azot miktarının protein içeriğinde değişikliklere neden olduğu ortaya konulmuştur. Özellikle azot kaynağının kısıtlı olduğu fermentasyon ortamlarında EPS içeriğindeki protein miktarının arttığı gözlemlenmiştir (Hoa *et al.* 2004).

Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar genelde EPS üretimlerini büyüme fazından (logaritmik faz) sonra gerçekleştirirler. Bakteriyel EPS'lerin çoğu heteropolisakkarit yapıya sahip olmaktadır. Bu EPS'ler, mikroorganizmaların sıcaklık, pH, su aktivitesi, iyonik kuvvet ve ışık yoğunluğu gibi elverişsiz ortam koşullarına karşı koymalarını ve uyum sağlayabilmelerine fırsat vermektedir (Donot *et al.* 2012; Liao *et al.* 2022). Ayrıca yararlı mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler, fermente süt ürünleri ve bağırsak florası ortamlarında kolonizasyonu kolaylaştırma gibi pozitif etkilere sahiptir (Lynch *et al.* 2018).

EPS üretiminde en yaygın çalışılan mikroorganizma grupları ve üretimini sağladıkları EPS çeşitleri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. En Yaygın Çalışılan Ekzopolisakkaritler ve Bazı Özellikleri

EPS	EPS Tipi	Mikrobiyal Kaynak	Önemli Özellikleri	Referanslar
Selüloz	HoPS	*Acetobacter* spp. *Agrobacterium* spp. *Aerobacter* spp. *Achromobacter* spp. *Azotobacter* spp. *Rhizobium* spp. *Sarcina* spp. *Salmonella* spp. *Escherichia* spp. *Pseudomonas* spp.	Biyouyumluk, yenilenebilirlik, biyobozunurluk, toksik olmama, yüksek kristallik, polimerizasyon derecesi, su emme ve tutma kapasitesi, mekanik mukavemet ve güçlü biyolojik adaptasyon	(Berlemont *et al.* 2009; Isikgor & Becer, 2015; Xu *et al.* 2018; Gunduz *et al.* 2019; Kumar *et al.* 2019; Shoda & Sugano, 2005)
Levan	HoPS	*Alcaligenes viscosus* *Paenibacillus polymyxa* *Bacillus subtilis* *Zymomonas mobilis*	Doğal yapıştırıcı, yüzey aktif madde, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, yenilenebilirlik, esneklik, çevre dostu olma, antioksidan, antienflamatuar, antikanserojen, antiviral, hiperglisemik inhibitör özellik	(Dahech *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012; Esawy *et al.* 2013; Srikanth *et al.* 2015)
Pullulan	HoPS	*Aeurobasidium pullulans* *Tremella mesenterica* *Cyttaria harrioti* *Cyttaria darwinii* *Cyphonectria parasictica* *Eurotium chevalieri* *Teleoschistes flavicans* *Rhodotorula bacarum* *Rhodosporidium paludigenum*	Biyolojik olarak parçalanabilir, kullanımı güvenilir ve yaygın olarak bulunur	(Vijayendra *et al.* 2001; Gaur *et al.* 2010; Göksungur *et al.* 2011; Wani *et al.* 2021)
Kurdlan	HoPS	*Agrobacterium* sp. *Alcaligenes faecalis* *Rhizobium radiobacter* *Bacillus cereus*	İyi çözünürlük, biyolojik olarak parçalanabilir, toksik değil, antitümör, antienfektif, antienflamatuar ve antikoagülan aktivite	(Zhang *et al.* 2012; Zhan *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2014; Wang *et al.* 2016; Prakash *et al.* 2018)
Ksantan	HePS	*Xanthomonas* spp.	Biyobozunur, çevre dostu, yüksek viskozite, toksik değil, ekstrem koşullara (pH, sıcaklık, tuz) karşı dayanıklı	(Julianti *et al.* 2017; Sriprablom *et al.* 2019)
Gellan	HePS	*Pseudomonas elodea* *Sphingomonas paucimobilis*	Koyulaştırıcı, stabilize edici, emülsifiye edici, jelleştirici, süspanse edici, tekstüre edici, yüksek viskozite ve suda çözünürlük	(Bajaj *et al.* 2006; Banik *et al.* 2007; Wu *et al.* 2011; Prajapati *et al.* 2013; Riseh *et al.* 2022)

Tablo 1. (devamı)

Aljinat	HePS	*Azotobacter* spp. *Pseudomonas* spp	Stabilizatör, yoğunlaştırıcı ve jelleştirici ajan	(Clementi, 1997; Thu *et al.* 2012; Cervino *et al.* 2018)
Hiyalüronik Asit	HePS	*Streptococcus* spp. *Bacillus* spp. *Agrobacterium* spp. *Lactococcus* spp. *Escherichia coli* *Corynebacterium glutamicum* *Pasteurella multocida* *Pichia pastoris*	Biyouyumluluk, yüksek su tutma kapasitesi ve mükemmel viskozite	(Widner *et al.* 2005; Necas *et al.* 2008; Izawa *et al.* 2011; Jia *et al.* 2013; Jeong *et al.* 2014; Cheng *et al.* 2017; Mandawe *et al.* 2018)

Mikrobiyal Ekzopolisakkarit Çeşitleri

Selüloz

Bir homopolisakkarit türü olan selüloz, yeryüzünde en bol miktarda bulunan polimerdir. Yenilenebilir kaynaklara olan ilginin her geçen gün artmasıyla birlikte selülozla ilgili geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Ahşap, pamuk, kenevir ve bitki kaynaklı malzemelerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu maddelerden elde edilen selüloz yüzyıllardır gıda, kağıt üretimi, biyomateryaller, farmasötikler, ilaç dağıtımı, yara pansumanları, doku mühendisliği iskeleleri ve mühendislik malzemeleri gibi uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Kargarzadeh *et al.* 2018). Bu doğal polimerin dünya çapında yıllık üretimi yaklaşık 75-100 milyar ton olduğundan selüloz, petrol bazlı malzemeler için son derece iyi bir alternatif malzeme olmaktadır (Du *et al.* 2019). Ayrıca biyouyumluluğu, yenilenebilirliği, biyobozunurluğu ve toksik olmaması gibi çevre dostu özellikleri ile biyomedikal malzemelerin üretiminde ham madde olarak aday gösterilmektedir (Isikgor & Becer, 2015; Xu *et al.* 2018).

Selüloz üretimi bitkisel kaynakların yanı sıra mikroorganizmalar tarafından da yapılmaktadır. Bakteriyel selüloz, bitkisel selüloza kıyasla daha yüksek saflık, daha yüksek kristallik, daha yüksek polimerizasyon derecesi, daha yüksek su emme ve tutma kapasitesi, ıslak halde daha yüksek mekanik mukavemet ve daha güçlü biyolojik adaptasyon gibi birçok avantajlı fizikokimyasal ve mekanik özelliğe sahiptir (Gunduz *et al.* 2019).

Levan

Levan, hem birçok mikroorganizmadan hem de sınırlı sayıda bitki türünden yapısal olmayan depolama karbonhidratları olarak doğal olarak elde edilen fruktoz içeren bir homopolisakkarittir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 107 Da olup, doğal yapıştırıcı ve yüzey aktif madde özelliği göstermektedir (Srikanth *et al.* 2015). Biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, yenilenebilirlik, esneklik ve çevre dostu olma gibi genel özelliklere sahiptir.

Bunlara ek olarak antioksidan, antienflamatuar, antikanserojen, anti-AIDS ve hiperglisemik inhibitör gibi bazı önemli biyomedikal özellikleri de sunmaktadır. Bu polisakkarit tarım, gıda ve yem katkı maddeleri gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmektedir (Dahech *et al.* 2011; J. Liu *et al.* 2012). Mikroorganizmalardan elde edilen levanlar ise daha avantajlı, ekonomik ve endüstriyel olarak uygulanabilirdir (Franken *et al.* 2013).

Pullulan

Pullulan, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen, onları dehidrasyondan ve parazitik protozoanlardan koruyan bir homopolisakkarit çeşitidir (Cheng *et al.* 2011). Pullulan üretimi ilk olarak 1958 yılında yapılan bir çalışmada *Aeurobasidium pullulans* tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle bu mikroorganizma, ana pullulan üreticisi olarak bilinmekte olup, tatlı ve deniz suları, kayalar, ahşap yüzeyler, bitkilerin yaprakları ve çiçekleri gibi çeşitli habitatlar ve çevresel koşullarda bulunabilen bir fungus türüdür (Peterson *et al.* 2013; Prasongsuk *et al.* 2018). *A. pullulans*'a ek olarak, *Tremella mesenterica*, *Cyttaria harrioti*, *Cyttaria darwinii*, *Cyphonectria parasictica*, *Teleoschistes flavicans*, *Rhodotorula bacarum ve Rhodosporidium paludigenum* gibi diğer mikroorganizma türleri de pullulan üreticileri arasında yer almaktadır (Wani *et al.* 2021).

Pullulan, beyaz veya sarımsı beyaz renge sahip bir ekzopolisakkarittir. Biyolojik olarak parçalanabilir ve kullanım açısından güvenilir özelliktedir. Su, dimetil-sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünebilen formları mevcuttur. Erime noktası 250°C olup, moleküler ağırlığı 45-600 kDa arasında değişmektedir (Singh *et al.* 2019). Pullulan üretiminde kullanılan mikroorganizmaların her yerde bulunması ve büyüme koşulları bu ekzopolisakkaritin tercih edilmesi konusunda avantaj sağlamaktadır. Fakat üretimindeki yüksek maliyet ve ürünün az olması nedeniyle pullulan, diğer ekzopolisakkaritlere göre daha az tercih edilmektedir (Wani *et al.* 2021).

Kurdlan

Kurdlan, glukoz şekerinden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı bir homopolisakkarittir. Renksiz, tatsız ve kokusuz özellikler göstermektedir. Üretimi ilk olarak 1966 yılında yapılan bir çalışmada *Alcaligenes faecalis* ile gerçekleştirilmiştir (Harada *et al.* 1966). Kimyasal olarak dalsız yapıya sahiptir ve bu sayede diğer polisakkaritlere göre hem nispeten daha iyi çözünürlüğe sahiptir hem de kimyasal modifikasyonu daha mümkündür (Zhang & Edgar, 2014). Kurdlan, biyolojik olarak parçalanabilmekte ve toksik özellik göstermemektedir. Bu avantajlı yönleri sayesinde çeşitli alanlarda aplikasyonları bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde koyulaştırıcı, jelleştirici ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal ve ilaç

endüstrisinde ise ilaçların kapsüllenmesinde tercih edilmektedir. Ayrıca antitümör, antienfektif, antienflamatuar ve antikoagülan aktiviteler olmak üzere doğal bağışıklık savunmasını güçlendiren veya eski haline getiren biyolojik özelliklere sahiptir (Aquinas *et al.* 2022).

Ksantan

Ksantan glukoz, glukronik asit ve mannoz gibi farklı monosakkarit türlerinin oluşturduğu bir heteropolisakkarittir. Ksantan'ın ilk keşfi 1950'li yıllarda *Xanthomonas campestris* isimli mikroorganizma tarafından üretilmesiyle olmuştur. Keşfinden sonraki süreçte de 1964 yılından itibaren endüstriyel ölçekte üretimi sağlanmıştır. Karbon kaynağı olarak peynir altı suyu, şeker kamışı melası ve sakkaroz; azot kaynağı olarak ise maya özütü, soya, amonyum ve nitrat gibi bileşenler ile ucuz bir şekilde üretimi sağlanmaktadır (Riseh *et al.* 2022).

Bu ekzopolisakkaritin başlıca avantajları biyobozunur özellik gösterip çevre dostu olması, nispeten düşük konsantrasyonlarda yüksek viskozite göstermesi ve gıdalarda kullanılabilecek kadar güvenilir seviyede toksik olmamasıdır (Kreyenschulte *et al.* 2014). Ayrıca geniş pH aralığında, yüksek sıcaklıklarda ve yüksek tuz oranında stabilitesini koruduğu için uygulanabilirlik açısından avantaj sağlamaktadır (Rosalam & England, 2006).

Ksantan, üstün reolojik özelliklerinden dolayı gıdalar, içecekler, tuvalet malzemeleri, yağ geri kazanımı, kozmetikler, su bazlı boyalar, tarım ilaçları, petrol endüstrisi, sulu sistemlerde reolojik kontrol ajanı, emülsiyonlar ve süspansiyonlar için stabilizatör gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rosalam & England, 2006).

Gellan

Gellan, *Pseudomonas elodea* tarafından üretilen bir heteropolisakkarit çeşitidir. İlk keşfi *Pseudomonas elodea* bakterisinde olmasının yanı sıra sonradan yapılan çalışmalarda *Sphingomonas paucimobilis*'in çeşitli suşlarının da gellan üretim yeteneğine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Nampoothiri *et al.* 2003; Bajaj *et al.* 2006). Kirli beyaz bir renge sahip olan bu ekzopolisakkarit suda çözünür özellik göstermektedir (Prajapati *et al.* 2013). Ayrıca iyi reolojik özelliklere ve ticari potansiyele sahip bir bakteriyel polisakkarittir.

Uygulama alanlarında diğer jelleştirici maddelerle kıyaslandığında iyi bir alternatiftir. Bunun sebebi ise az miktarlarda dahi etkili olması ve ısıya duyarlı olmayan berrak bir jel oluşturmasıdır. Gıda endüstrisinde şekerlemeler, meyve ve sebze ürünleri, soslar ve sürülebilir ürünler, içecekler ve paketlenmiş gıdalar dahil olmak üzere işlenmiş gıdaları stabilize etmek, bağlamak veya tekstüre etmek gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisine ek

olarak spesifik jelleşme özelliği sayesinde tıp ve tarım alanlarında da tercih edilmektedir (Riseh *et al.* 2022).

Aljinat

Aljinat, kahverengi alglerden ve çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen bir heteropolisakkarittir. Yapısal olarak glukuronik asit ve mannuronik asitten oluşmaktadır (Cheng *et al.* 2020). Aljinat üretiminde ana mikroorganizma grubu kahverengi algler olmasına rağmen *Azotobacter* ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler de aljinat üreticisi olarak bilinmektedir (Clementi, 1997; Müller *et al.* 2011).

Aljinat koyulaştırıcı, stabilizatör ve jelleştirici ajan olarak; gıda, tekstil, kağıt, kozmetik, farmasötik ve tıp endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kahverengi alglerden veya toprak bakterilerinden elde edilen aljinat, genellikle gıda endüstrisinde buğday unundan elde edilen hamurun iyileştirilmesi, içecek gibi karışımların süspansiyon halinde kalması ve köpük stabilizasyonu gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Lee *et al.* 2008). Kağıt ve tekstil endüstrilerinde kullanılan aljinat ise kumaş ve kağıtlara yapılan baskılarda mürekkebin iyileştirilmesi ve yapılan baskının yüzeyde kalıcılığının artması yönünde avantajlar sağlamaktadır (Müller *et al.* 2011). Ayrıca aljinatın en yaygın kullanım alanlarından birkaçı da mikrokapsül oluşturulması ve enzim immobilizasyon çalışmalarında yoğunlaştırıcı olarak işlev görmesidir (Taqieddin & Amiji, 2004).

Hiyalüronik asit

Hiyaluronan olarak da bilinen hiyalüronik asit, glukoronik asit ve asetil glukozaminden oluşan bir heteropolisakkarittir (Schmid *et al.* 2015). Omurgalı canlıların epitel, nöral ve bağ dokularının hücre dışı matrisinde yaygın olarak bulunmakta ve fizyolojik olarak ciddi bir öneme sahiptir (Sze *et al.* 2016). İlk ve ana kaynağı hayvan dokuları olmasına rağmen günümüzde mikrobiyal kaynaklardan rekombinant teknolojiler kullanılarak üretimi sağlanmaktadır (Moscovici, 2015). Hiyalüronik asit üretme yeteneğine sahip bakterilerin başında *Streptococcus* cinsi bakteriler gelmektedir. Bunlara ek olarak, *Bacillus, Agrobacterium, Lactococcus* cinsleri ve *Escherichia coli* ile yapılan çalışmalarla bu bakterilerden hiyalüronik asit üretimi ortaya konulmuştur (Widner *et al.* 2005; Mao & Chen, 2007).

Hiyalüronik asitin uygulama alanlarına bakıldığında tıp ve kozmetik endüstrilerinde yaygınlık göstermektedir. Tıp alanında ilk olarak 1950'li yılların sonlarında bir göz ameliyatı sırasında uygulanmıştır (Necas *et al.* 2008). Bu ekzopolisakkaritin biyouyumluluğu, yüksek su tutma kapasitesi ve mükemmel viskozitesi nedeniyle başlıca uygulamaları göz cerrahisi, ilaç

dağıtımı, doku mühendisliğinde kıkırdak üretimi, leke tedavisi, yara iyileşmesi ve osteoartrit tedavisi gibi rejeneratif terapilerdir (Barcelos *et al.* 2020).

Ekzopolisakkarit Üretimini Etkileyen Faktörler

Üretilen EPS'nin miktarı ve verimi mikroorganizmanın bulunduğu ortam koşullarıyla doğrudan ilişkilidir (Suresh Kumar *et al.* 2007). Bu bileşenler; başlıca sıcaklık, pH, büyüme döngüsü, çalkalama hızı, havalandırma, karbon ve nitrojen kaynaklarından oluşmaktadır. Mikroorganizmalar çoğunlukla karbon kaynağı olarak karbonhidrat şekerlerini, nitrojen kaynağı olarak ise, amonyum tuzları ve amino asitleri kullanmaktadır. Yapılan optimizasyon çalışmalarına bakıldığında, büyüme ortamında yüksek miktarda karbonhidrat varlığı ile üretilen EPS miktarı da artmıştır. Büyüme ortamında bulunan nitrojen kaynağının fazlalığı ise, karbonhidrat ile ters etki göstermiştir. Yani besiyerinde bulunan düşük miktarda nitrojen ile yüksek miktarlarda EPS üretimi sağlanırken, yüksek miktardaki nitrojen EPS'den ziyade hücre dışı protein üretimine katkı sağlar (Czaczyk & Myszka, 2007).

EPS üretimini etkileyen bir diğer faktör ise fermentasyon ortamının pH değeridir. EPS üretiminde farklı pH değerleri denenerek yapılan optimizasyon çalışmaları, mikroorganizmaların optimum pH değerinde en yüksek miktarda EPS ürettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca optimum pH değerinin dışındaki pH değerleri mikroorganizmaların sadece EPS üretim miktarlarını değil, aynı zamanda üretilen EPS'lerin hücre dışına salınmasına da engel oluşturmaktadır (Shu & Lung, 2004). Farklı bir çalışmada (Xiao *et al.* 2004) ise EPS üretiminin mikroorganizmanın gelişim gösterdiği optimum pH değerine yakın olmasına rağmen farklı pH değerinde maksimum miktarda olduğu ortaya konulmuştur.

Büyüme ortamının sıcaklığı, EPS üretimine pH değeri ile eşlenik bir etki göstermektedir. Her mikroorganizma için uygun görülen optimum sıcaklık koşullarında mikroorganizmalar maksimum seviyede EPS üretimi sağlamaktadır. Ekstrem soğuk veya sıcak ortamlar mikroorganizmaların büyümelerini olumsuz etkilediği gibi EPS üretimini de engellemektedir (Lin & Sung, 2006; Torres *et al.* 2012). Yapılan bir diğer çalışmada (Zhao & Li, 2022) ise, mikroorganizmaların sıcaklık stresi altında EPS üretimini artırdığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak sıcaklığın EPS üretimi üzerine olan etkisi, mikroorganizmalar arasında değişkenlik göstermektedir.

Büyüme döngüsünün mikroorganizmaların EPS üretim miktarına etkisi ise bakteri cinsine bağlı olarak kendini göstermektedir. Genellikle EPS üretimi mikroorganizmaların geç logaritmik-erken durağan fazları sırasında gerçekleşmektedir. Bu süre mikroorganizmalar arasında değişkenlik gösterir. Yapılan çalışmalara bakıldığında da, hücreler büyüme

döngüsünün erken dönemlerinde besin ortamından uzaklaştırıldıklarında EPS üretiminin inhibe olduğu gözlemlenmiştir (Sutherland, 2001; Czaczyk & Myszka, 2007; Chug *et al.* 2016).

Ekzopolisakkarit Üretiminde Biyosentetik Yol

Yapılarındaki büyük çeşitliliklere rağmen EPS'ler, mikroorganizmalar tarafından genel olarak dört yol üzerinden üretilebilir: (1) hücre dışı sentez yolu (örneğin sukraz), (2) ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıya bağımlı yol, (3) sentaz bağımlı yol ve (4) Wzx/Wzy'ye bağlı yol (Schmid *et al.* 2015). Mevcut tez çalışmamızda kullanılan bakterinin EPS biyosentez yolu, hücre dışı sentez yolu ile örtüşmektedir. Bu nedenle, yalnızca hücre dışı sentez yoluna vurgu yapılmaktadır (Zhou *et al.* 2019).

Hücre dışı sentez yolundaki ilk adım, nükleotid difosfatlar (NDP'ler) veya nükleotid monofosfatlar (NMP'ler) olarak adlandırılan polisakkarit biyosentez yollarının ortak öncülerinin sentezidir. Bu nükleotid şeker öncüleri, şekerin bir lipit taşıyıcıya veya bir karbonhidrata glikosiltransferaz katalizli transferi için aktifleştirilmiş donörler olarak görev yapmaktadır. İkinci adımda, oligosakkarit tekrar birimlerinin sentezi veya glikosiltransferazların ardışık veya ilerleyici aktivitesi ile polisakkaritin doğrudan sentezi gerçekleşmektedir. Üçüncü adım, polisakkaritin tekrar birimlerinden birleştirilmesinden oluşmaktadır. Dördüncü ve son adımda ise, EPS'nin hücre dışına salgılanması gerçekleşmektedir (Becker, 2015; Barcelos *et al.* 2020).

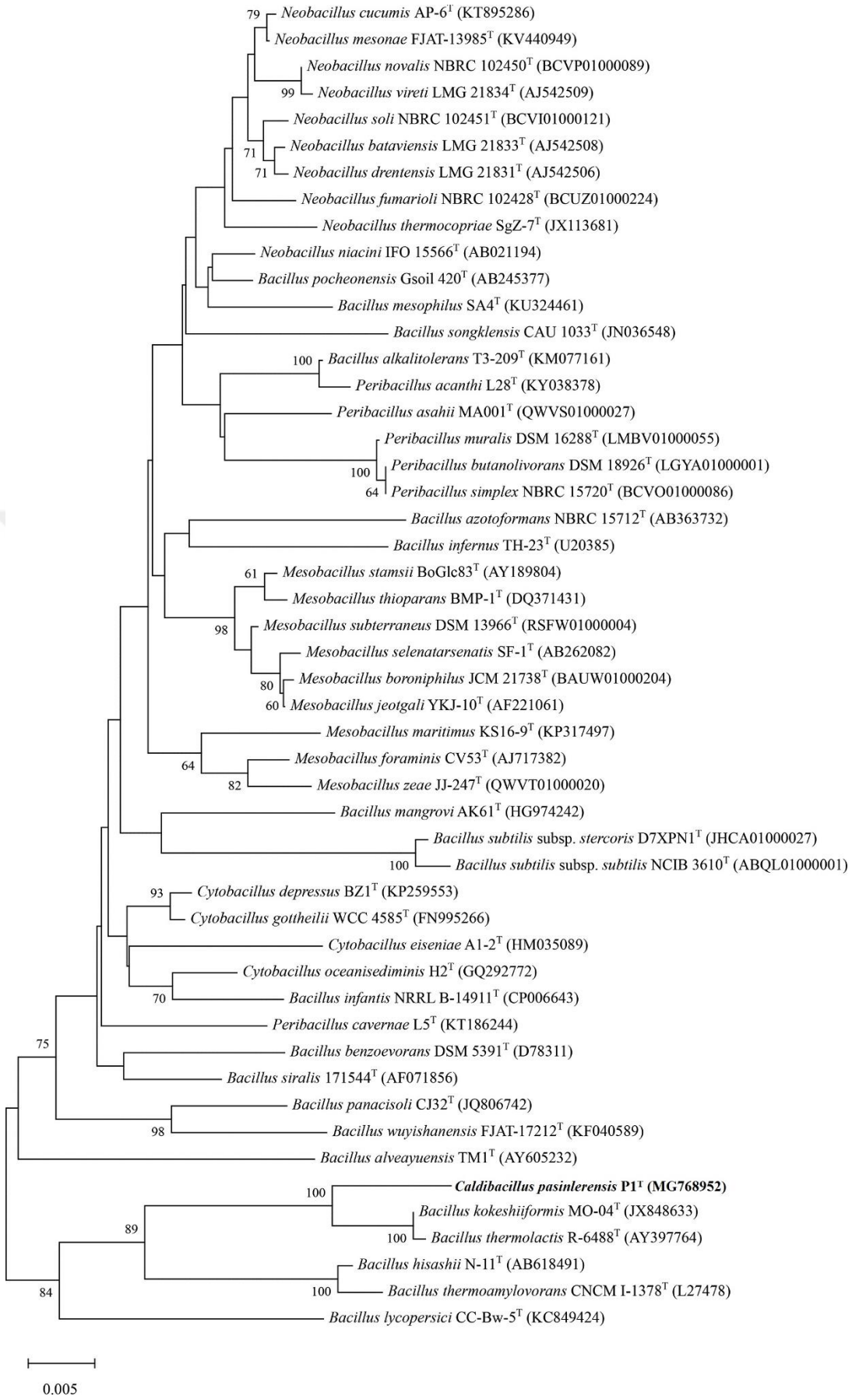
Ekzopolisakkarit Üretiminde Termofilik Bakteriler

Sıcaklık, ortam pH'sı, su ve oksijen varlığı mikroorganizmaların hayatta kalmasını ve üremesini etkileyen temel faktörlerdir. Bu faktörler arasında sıcaklık, en temel çevresel faktör olarak bilinmektedir. Mikroorganizmalar çok yüksek veya çok düşük sıcaklıklarda canlılıklarını devam ettiremeyebilirler. Mikroorganizmaların üremeleri ve canlılıklarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan sıcaklık aralıkları mikroorganizmalar arasında farklılık göstermektedir. Termofilik bakteriler, optimum üreme sıcaklıkları 45-80°C aralığında olan bakterilerdir. Sıcak su kaynaklarında, tamamen güneşe maruz kalan toprak yüzeylerinde, gübre yığınları ve silaj gibi ortamlarda bulunurlar (Dale *et al.* 2003).

Termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklara gösterdikleri dayanıklılık nedeniyle ürettikleri maddeler de bu açıdan öneme sahiptir. Mikroorganizmaların fizyolojileri ve bulundukları ortama adaptasyonları ile ürettikleri EPS arasında yakın bir ilişki vardır. Termofiller tarafından üretilen EPS'ler yüksek termal stabiliteye sahip olmakta ve zorlu çevresel koşullarda aktivitesini korumaktadır (Wang, *et al.* 2019; Banerjee *et al.* 2022). Bu özellikleri sebebiyle de gıdadan biyoteknolojiye çeşitli uygulamalarda tercih edilmektedir (Wang, *et al.* 2019).

Caldibacillus pasinlerensis'in Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneği

Eski adı *Bacillus pasinlerensis* olup *Caldibacillus pasinlerensis* olarak değiştirilen bakteri, 2020 yılında Erzurum'un Pasinler ilçesindeki kaplıcadan alınan su örneklerinden izole edilmiştir. Yapılan fenotipik ve filogenetik araştırmalar sonucunda da izolatın *Bacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu ortaya konulmuştur. *C. pasinlerensis,* gram pozitif, oksidaz ve katalaz pozitif, aerobik, hareketli, çubuk şeklinde, 0,4–0,6×2,0–5,0 µm boyutunda ve endospor oluşturan termofilik bir bakteridir. Optimum büyüme koşulları ise %2 NaCl varlığında, pH 7 ve 55 °C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Ayrıca keşfinin gerçekleştirildiği çalışmada mikroorganizmanın hangi karbon kaynaklarını besin olarak kullanabildiği de sunulmuştur (Baltaci *et al.* 2020).



Şekil 5. 16S rRNA gen dizilerine göre daha önce *Bacillus* cinsinde sınıflandırılan bakterilerin filogenetik ağaç görüntüsü (Baltaci *et al.* 2020)

Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları ve Yapılan Çalışmalar

Ekzopolisakkaritler yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumluluk gibi özelliklere sahip olduklarından gıdadan tıbba çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Freitas *et al.* 2014). Gıda endüstrisinde kullanım alanlarına bakıldığında EPS'ler stabilizatör, emülgatör, viskozlaştırıcı, jelleştirici ve su bağlayıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda kullanılan EPS'ler çoğunlukla bitkisel kaynaklı olmasına rağmen reolojik özelliklerinin getirdiği avantajlardan dolayı mikrobiyal kaynaklı EPS'ler de tercih edilebilmektedir. Örneğin laktik asit bakteri tarafından üretilen dekstran, şekerlemelerde nem tutucu, viskoziteyi iyileştirici ve şekerlerin kristalleşmesini engelleme amacıyla kullanılabilmektedir. Sakız ve jöle gibi ürünlerde jelleştirici ajan işlevi görmektedir. Ayrıca dondurmalarda kristalleşmeyi engellemekte ve pudinglerde istenilen kıvamın tutmasını sağlamaktadır. EPS'lerin gıda endüstrisinde bir diğer uygulaması ise gıdaların bozulmalara karşı korunmasını sağlamaktır. Birçok gıda maddesinde depolama sırasında bozulmalar meydana gelebilmektedir. Eğer bu bozulmalar farkedilmez ve gıdaların tüketimi gerçekleştirilirse gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonlarının olması kaçınılmazdır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve özellikle antimikrobiyal ve antioksidan etkiye sahip olan EPS'ler sayesinde gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte ve bozulmaları kısmi olarak engellenebilmektedir (Gerbersdorf *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2013; Banerjee *et al.* 2022).

Tıp, farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda ise EPS'ler, ilaç kapsülleme, kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği ve farmasötik maddelerin hedefe gönderilmesi gibi amaçlarla kullanılabilmektedir. Özellikle antikanser, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar özelliğe sahip biyolojik olarak aktif EPS'lerin tedavi amaçlı kullanımları mümkün olmaktadır. Bunlara ek olarak, "akıllı ilaç dağıtımı" veya "akıllı terapötik" adı da verilen EPS'lerin mikro ve nano taşıyıcılarla birlikte tasarlanarak hedefe yönelik uygulamaları mevcuttur (Simpson & Morris, 2014; Asgher *et al.* 2021; Xie *et al.* 2021).

Mikrobiyal polisakkaritler üretimleri açısından sağladığı avantajlardan dolayı mikroorganizmalardan elde edilen EPS'ler endüstriyel açıdan oldukça öneme sahiptir. Çeşitli mikrobiyal kaynaktan izole edilen, özellikle termofilik bakterilerden EPS üretimi ve karakterizasyonu üzerinde yapılan değerli çalışmalardan bazıları şu şekildedir:

Yasar Yildiz *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada Türkiye ve Bulgaristan'da bulunan kaplıcalardan su örneği almış ve karbon kaynağı olarak maltoz içeren besiyeri ortamına ekim yapmıştır. Gelişim gösteren bakteriler arasından en iyi EPS üreticisi olarak *Brevibacillus thermoruber* 423 suşu seçilmiştir. En yüksek üretimin sağlanması için besiyeri optimizasyonları

yapılmıştır. EPS'nin izolasyonu ve saflaştırılmasından sonra reolojik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Radchenkova *et al.* (2015), Bulgaristan'da bir kaplıcadan izole edilen *Aeribacillus pallidus* 418 suşundan EPS üretimi ve saflaştırma işlemlerini yapmıştır. Üretimi gerçekleştirilen bu EPS'nin miktarının kesikli ve sürekli kültürde optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen EPS ile de kozmetik bir krem üretilip fiziksel karakterizasyonu yapılarak EPS'nin bu krem üzerinde fiziko-kimyasal açıdan olumlu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sardari *et al.* (2017), bir deniz kaplıcası bakterisi olan *Rhodothermus marinus*'un *DSM* 4252 ^{T} ve MAT 493 suşlarını kullanarak EPS üretimi gerçekleştirmiştir. İki suşun büyümesi ve ürettiği EPS değerlendirilerek daha çok avantaj sağlayan ve belirgin şekilde agregat oluşturan suş MAT 493 seçilmiştir. Karbon kaynağı olarak farklı şekerler kullanılarak üretilen EPS miktarı gözlemlenmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan EPS'nin monomer kompozisyonu ve fonksiyonel grup analizi gerçekleştirilmiştir.

Vazquez-Rodriguez *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, Meksika'dan izole edilen ve doğal bir maya suşu olan *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L tarafından üretilen ekzopolisakkaritin patojen bakteriler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için de *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L ile *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerle birlikte kültürlenerek ekzopolisakkarit üretiminin miktarı ve patojen mikroorganizmalara etkisi gözlemlenmiştir. Sonuç olarak da *Escherichia coli* ile birlikte kültürlenen *Rhodotorula mucilaginosa*'nın, rakip bir bakterinin varlığında savunma mekanizması olarak EPS üretimini tetiklediği ortaya konulmuştur.

Wang *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, termal sulardan izole edilen birkaç *Geobacillus* türü çalışılmıştır. *Geobacillus* sp. WSUCF1 suşundan 10 farklı şeker ortamında EPS üretilmiş ve miktar olarak karşılaştırmaları yapılmıştır. Üretilen EPS'nin biyosentezi, düzenlemesi ve hücre dışına salınımı detaylı bir şekilde verilmiş ve bu süreçten sorumlu genler belirlenmeye çalışılmıştır.

Ayyash *et al.* (2020), fermente deve sütünden probiyotik bir bakteri olan *Lactococcus garvieae* C47 suşunu izole etmiştir. Bu bakteriden EPS üretilmiş ve bu EPS'nin fiziksel, kimyasal, biyolojik ve reolojik özelliklerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak bir laktik asit bakterisinden üretilen EPS'nin antioksidan, antidiyabetik, antitümör ve antipatojenik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir.

Dhagat & Jujjavarapu (2021), *Brevibacillus borstelensis* tarafından üretilen EPS miktarının maksimize edilmesi amaçlamıştır. Bu doğrultuda, simüle edilmiş tavlama ve yapay sinir ağı gibi iki farklı istatistiksel program aracıyla ortam ve proses optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Araçlar arasında karşılaştırma yapılarak en iyi yöntem belirlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan optimizasyon aracıyla düşük maliyetle EPS üretiminde maksimum verim elde edilmiştir.

Banerjee *et al.* (2022), Şili'de keşfedilmemiş asidik bir kaplıcadan su örnekleri toplayarak nutrient agar (NA) besiyerine pH 5.8 olacak şekilde inoküle etmiştir. Optimum büyüme sıcaklığı 55 °C olan ve *Bacillus haynesii* olarak tanılanan izolattan EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. EPS'nin iyileştirilmesi için gerekli optimizasyon çalışmaları yapılmış olup ardından fizikokimyasal ve işlevsel karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Kavitake *et al.* (2022), *Weissella confusa* KR780676 tarafından galaktan ekzopolisakkaritini üretmiş ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde oluşturulan oksidatif strese etkisi olup olmadığı gözlemlemiştir. Sonuç olarak, kullanılan EPS maya hücreleri üzerinde oluşturulan oksidatif stresi nötralize ederek hücrelerin hayatta kalma oranlarını artırmıştır. Galaktan'ın gıda, ilaç gibi çeşitli endüstrilerde antioksidan olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar

Tablo 2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Markaları

No	Cihaz	Marka
1	Otoklav	Hmc Hiramaya
2	Dondurucu (-86°C)	Glacier Ultralow Freezer
3	Buzdolabı (+4/-20 °C)	Vestel
4	Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
5	Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
6	Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
7	İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
8	Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
9	Hassas Terazi	Ohaus Pioneer
10	pH metre	Mettler Toledo FiveEasy Plus
11	Saf Su Cihazı	Mp Minipure
12	Çeker Ocak	Fume Hood mikrotest
13	Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
14	Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
15	Vortex	Fisons WhirliMixer
16	Etüv	Redline by-BINDER
17	Su Banyosu	Memmert

Çalışmada kullanılan çözeltiler

1X Bradford çözeltisi: 0,02 g Coomasie Brillant Blue G-250, 10 mL %95'lik EtOH ve 20 mL %85'lik fosforik asit karıştırıldı ve son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon kullanılmadan önce filtre kağıdından geçirildi.

2M Sülfürik asit çözeltisi: %95'lik sıvı formdaki sülfürik asitten 5,61 mL alındı ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

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

0,1 mM DPPH-EtOH çözeltisi: 4 mg DPPH 10 mL %95'lik EtOH içerisinde çözdürüldü.

Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tablo 3. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları

Kimyasal	Üretici Firma
Tryptone Soya Agar	Oxoid
Tryptone Soya Broth	Oxoid
Yeast Extract Granulated	Merck
Coomasie Brillant Blue G-250	Merck
Etanol	İso-Lab Chemicals
Metanol	İso-Lab Chemicals
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
Aseton	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik Asit	Sigma-Aldrich
DPPH	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
D(+)-Sükroz	Fluka BioChemika
D(+)-Glukoz	Fluka BioChemika
Sülfürik Asit	Fluka BioChemika
Kloroform	Carlo Erba Reagents

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

Stok Besiyeri: 30 g TSB besiyeri, 1000 mL distile su ve 250 mL gliserol manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek stok tüplerine paylaştırıldı ve 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı ve steril petrilere döküldü.

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g besiyeri 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

TSB+Maya Ekstraktı: 30 g TSB ve 3 g maya ekstraktı 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

TSB+Sükroz: 30 g TSB ve 20 g sükroz 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

TSB+Glukoz: 30 g TSB ve 20 g glukoz 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

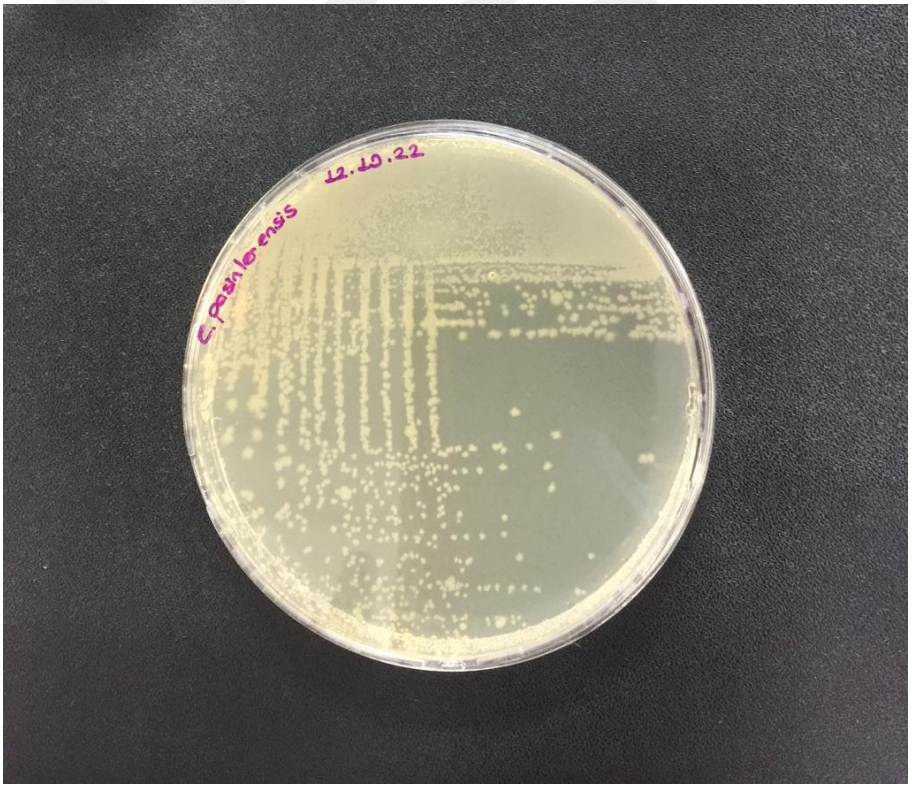
TSB+Maya Ekstraktı+Glukoz: 30 g TSB, 3 g maya ekstraktı ve 20 g glukoz 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz: 30 g TSB, 3 g maya ekstraktı ve 20 g sükroz 1000 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile otoklavlandı.

Metot

***Caldibacillus pasinlerensis* için önkültür hazırlanması**

İlk olarak %20 gliserol içeren TSB stok besiyerinden alınan *C. pasinlerensis*'in TSA besiyerine ekimi yapılarak 55°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve hücrelerin canlandırılması gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda, saf koloniden alınarak ön kültür hazırlamak için 250 mL'lik erlenler içerinsindeki steril 100 mL TSB besiyerine inoküle edilmiş ve 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.



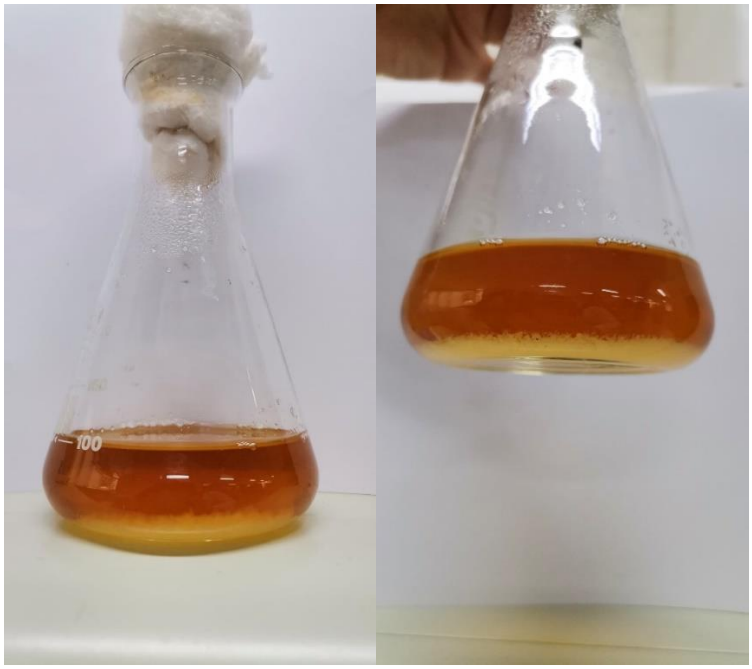
Şekil 6. TSA besiyeri ortamında geliştirilen *Caldibacillus pasinlerensis*



Şekil 7. TSB ve TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz sıvı besiyeri ortamlarında geliştirilen *Caldibacillus pasinlerensis*

***Caldibacillus pasinlerensis* ile ekzopolisakkarit üretimi**

Ön kültürün 1 mL'si 250 mL'lik erlenler içerisindeki 100 mL TSB besiyerine inoküle edilmiş, 48 saat boyunca 55°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürler santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmış ve supernatant EPS kaynağı olarak kullanılmıştır. TCA uygulaması, etanol çöktürmesi, santrifüj ve liyofilizasyon işlemlerinin ardından supernatanttaki EPS miktarları belirlenmiştir.



Şekil 8. TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz besiyeri ortamına TCA muamelesi sonucu çöktürülen proteinler

Ekzopolisakkarit Üretiminin Optimizasyonu

EPS üretiminde optimal besiyerinin belirlenmesi

Stoktan alınarak katı besiyerinde canlandırılan hücreler TSB ön kültürüne alınmıştır. İnkübasyon sonunda 1 mL ön kültür TSB, TSB+Maya Ekstraktı, TSB+Sükroz ve TSB+ Maya Ekstraktı+Sükroz içeren fermentasyon ortamlarına (besiyerlerinin pH'sı 7.0'a ayarlanmıştır) inoküle edilmiştir. 48 saat inkübasyon sonunda sırasıyla hücre uzaklaştırması, protein uzaklaştırması ve etil alkolde EPS çöktürme yapılarak üretilen EPS'ler miktar tayini için liyofilize edilmiştir. Üretilen EPS'lerin miktar tayini yapıldıktan sonra, en yüksek seviyede EPS üretiminin gerçekleştiği fermentasyon ortamı belirlenmiştir.

EPS üretiminde optimal sıcaklığın belirlenmesi

EPS üretiminde uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla stok besiyerinden alınan hücreler TSA besiyerinde canlandırılmıştır. Canlandırılan hücreler TSB ön kültürüne alınarak 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ön kültürün 1 mL'si optimal olarak belirlenen besiyeri (100 mL, pH 7) içeren erlenlere inoküle edilmiş ve erlenler sırasıyla 40, 45, 50, 55, 60 ve 65°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörlerde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sırasıyla hücre uzaklaştırması, protein çöktürmesi ve etil alkolde EPS çöktürmesi yapılarak EPS'ler miktar tayini için liyofilize edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda üretilen EPS miktarları kaydedilerek elde edilen verilere göre en yüksek EPS üretimine sahip sıcaklık değeri sonraki optimizasyon basamaklarında kullanılmıştır.

EPS üretiminde optimal pH değerinin belirlenmesi

EPS üretiminde uygun pH değerinin belirlenmesi amacıyla hücreler stoktan alınarak TSA besiyerinde canlandırılmış, ardından TSB ön kültürüne alınmıştır. Ardından 1 mL ön kültür sırasıyla 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerlerine sahip 100 mL optimal besiyeri içeren fermentasyona ortamına inoküle edilerek 48 saat boyunca optimum sıcaklık değerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sırasıyla hücre uzaklaştırması, protein çöktürmesi ve etil alkolde EPS çöktürmesi yapılarak EPS'ler miktar tayini için kurutulmuştur. Farklı pH değerlerinde üretilen EPS miktarları kaydedilerek elde edilen verilere göre en yüksek EPS üretimine sahip pH değeri sonraki optimizasyon basamaklarında kullanılmıştır.

EPS üretiminde optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi

EPS üretiminde uygun fermantasyon süresinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınarak katı besiyerinde canlandırılan hücreler TSB ön kültürüne alınmıştır. İnkübasyon sonunda 1 mL ön kültür 100 mL optimal besiyeri (optimal pH'da) içeren fermentasyona ortamına inoküle

edilerek sırasıyla 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca belirlenen optimal sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda sırasıyla hücre uzaklaştırması, protein çöktürmesi ve etil alkolde EPS çöktürmesi yapılarak EPS'ler miktar tayini için kurutulmuştur. Farklı fermantasyon süreleri sonucunda üretilen EPS miktarları kaydelilerek elde edilen verilere göre en yüksek EPS üretimi gerçekleştirilen fermantasyon süresi sonraki basamaklarda kullanılmıştır.

EPS'nin Total Üretimi ve Saflaştırılması

Bu aşamada belirlenen optimal koşullar altında toplam 1 litre besiyeri hacminde EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen inkübasyon süresinin sonunda kültür 6000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Alınan supernatant üzerine %4 oranında TCA eklenmiş, iyice çözdürülerek +4°C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 7000-8000 rpm'de 10-15 dk santrifüj edilerek proteinler uzaklaştırılmıştır. Alınan supernatant üzerine hacimce iki katı olacak şekilde saf etanol eklenerek +4°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 7000-8500 rpm'de 10-15 dk santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen final materyali liyofilize edilerek karakterizasyon çalışmaları için hazır hale getirilmiştir (Genc *et al*. 2021).



Şekil 9. Hücre ve proteinlerin uzaklaştırılması sonucu besiyeri ortamı ve EPS çöktürmesi için alkol eklenen besiyeri ortamı

Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu

Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi

Üretim sonucu elde edilen EPS örneğinin; distile su, etanol, metanol, izopropanol, aseton, DMSO, formaldehit, hekzan ve kloroform gibi çözücülerde çözünürlüğü araştırılmıştır. Bu amaçla, her bir çözücü için liyofilize EPS örneği (5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda), ependorf tüplere aktarılmış ve seçilmiş çözücüler ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler vortekslenerek çözünürlük veya çökelti oluşumu gözlemlenmiştir. Çözünmemiş EPS'yi çöktürmek için 12.000 rpm'de 25°C'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatanttan 0,5 mL alınıp şeker içeriğinin analizi için kullanılmıştır. EPS içeriklerinin çoğunu karbonhidratlar oluşturduğu için mevcut EPS'nin çözünürlüğünün belirlenmesinde çözücüye geçen karbonhidratların total miktarı göz önüne alınmıştır. Bu amaçla da alınan süpernatantın total şeker analizinin belirlenmesinde fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda çözünürlük oranları yüzde (%) olarak belirlenmiştir. (Asgher *et al.* 2020)

Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

Liyofilize edilen EPS örneğinin total karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol-sülfürik asit yöntemi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, distile su içerisinde çözünmüş 1 mg/mL konsantrasyona sahip EPS örneğinden 100 µL alınıp cam tüpe aktarılmıştır. Üzerine 1 mL %6'lık fenol ve 5 mL konsantre sülfürik asit eklenerek oda sıcaklığında 15 dk süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler soğutularak spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda köre (EPS içermeyen çözücü distile su ile hazırlanmıştır) karşı ölçüm alınarak absorbans değerleri kaydedilmiştir. Standart grafiği oluşturmak için konsantrasyonları 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0.6 mg/mL ve 0,8 mg/mL olacak şekilde glukoz örnekleri hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklere 1 mL %6'lık fenol ve 5 mL saf sülfürik asit eklenerek tüm basamaklar glukoz standartları için de gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ile standart grafik oluşturulmuş ve EPS'nin spektrofotometrik ölçümü yapılarak bu grafiğe göre toplam karbonhidrat içeriği hesaplanmıştır (Karadayi *et al.* 2021).

Protein içeriğinin belirlenmesi

Warburg-Christian yöntemi

Karbonhidratların, nükleik asitlerin ve proteinlerin varlığını belirlemek için liyofilize formdaki 5 mg EPS örneği 1 mL distile su içinde vortekslenerek homojenize edildi. Daha sonra bu karışımın 230, 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değerleri kaydedildi. Alınan absorbans değerlerine göre toplam protein miktarı %'lik olarak hesaplanmıştır (Stoscheck, 1990; Barton, 2005).

Bradford yöntemi

Liyofilize edilen EPS örneğinin toplam protein miktarını belirlemek için bradford yöntemi ile analiz gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemde, öncelikle 0,02 g Coomasie Brillant Blue G-250, 10 mL %95'lik EtOH, 20 mL %85'lik fosforik asit karıştırılmış ve son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirilerek 1X'lik bradford çözeltisi kullanıma hazır hale gelmiştir. Ardından distile su içerisinde çözünmüş 1 mg/mL konsantrasyona sahip EPS örneğinden 100 µL alınıp cam tüpe aktarılarak üzerine 900 µL bradford çözeltisi eklenmiştir. Örnek spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda köre (EPS içermeyen çözücü distile su ile hazırlanmıştır) karşı ölçüm alınarak absorbans değeri belirlenmiştir. Standart grafiği oluşturmak için konsantrasyonları 0,8 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL olacak şekilde BSA örnekleri hazırlanmıştır. Her bir örnekten 100 µL alınıp üzerine 900 µL bradford çözeltisi eklenerek tüm basamaklar BSA standartları için de gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuş ve EPS'nin ölçüm sonucuna göre içerdiği toplam protein miktarı belirlenmiştir (Kacı, 2018).

Monomer kompozisyonunun belirlenmesi

Monomer kompozisyonun belirlenebilmesindeki öncelik, polimer yapıda bulunan glikozidik bağların kırılması ve monosakkarit yapının elde edilmesidir. Bunun için liyofilize haldeki 200 mg EPS örneği, 2M 5 mL sülfürik asit ile 100°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 5M NaOH ile nötralize edilmiştir. Nötralizasyon sonrası safsızlıkların giderilmesi için 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek supernatant alınmıştır. Alınan supernatant 0,45 µm çaptaki membran filtreden geçirilmiş ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonuna yerleştirilmiştir. Monosakkaritlerin analizi, 40°C'de bir Inertsil NH2 kolonu (5 um, 250 mm x 4.6 mm) ve RID detektör sistemi ile donatılmış bir Prominence LC-20A HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak belirlenen Asetonitril:su (4:1) karışımı 1 mL/dk akış hızında kolona verilmiştir. Monomer standartları olarak, mannoz, glikoz, sükroz, fruktoz, ramnoz, maltoz, laktoz, arabinoz, galaktoz, glukuronik asit ve ksiloz kullanılmıştır. HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından gerçekleştirilmiştir (Genc *et al.* 2021).

Fonksiyonel grup analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile ekzopolisakkarit örneğinin fonksiyonel grupları ve yapısal karakterizasyonu hakkında bilgi edinmeye çalışılmıştır. Bu

amaçla, liyofilize haldeki EPS örneği (5 mg) analiz edilmek üzere Doğu Anadolu Araştırma Merkezi (DAYTAM)'ne hizmet alımı sağlanarak gönderilmiştir.

Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite

Öncelikle patojen tür olan *Candida albicans* (ATCC 10231), *Bacillus cereus* (ATCC 33019), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) ve *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) TSA besiyeri ortamına inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda McFarland 0,5 oranına göre steril fizyolojik su bulunan tüplere patojen mikroorganizmaların inokülasyonu gerçekleştirilerek her birinden 100 µL alınarak TSA besiyeri ortamına drigalski spatülü ile yayma ekimi yapılmıştır. Liyofilize edilen EPS örnekleri distile su içerisinde son yoğunlukları 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış ve boş antimikrobiyal disklere 20 µL emdirilerek petrilere yerleştirilmiştir. 37 °C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda zon çapları ölçülmüştür (Tuysuz, 2020).

Antioksidan Aktivite

DPPH serbest radikalini indirgeme etkisi

Liyofilize haldeki EPS örneğinden 1 mg/mL alınarak distile su içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 500 µL alınarak, 500 µL 0,1 mM DPPH-EtOH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta 30 dk inkübe edilmiş ve ardından 517 nm dalga boyunda köre (metanol) karşı ölçüm alınarak absorbans değeri belirlenmiştir. Standart grafiği oluşturmak için konsantrasyonları 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 1 mg/mL olan askorbik asit çözeltileri hazırlanmış ve aynı işlemler uygulanmıştır (Imran *et al.* 2016). DPPH radikalini giderme yeteneğinin hesaplamaları şu şekilde yapılmıştır:

$$\text{DPPH serbest radikal süpürme yeteneği } (\%) = (Akontrol - Aörnek) * 100 \,/\, Akontrol$$

Aörnek: örneğin absorbans değeri

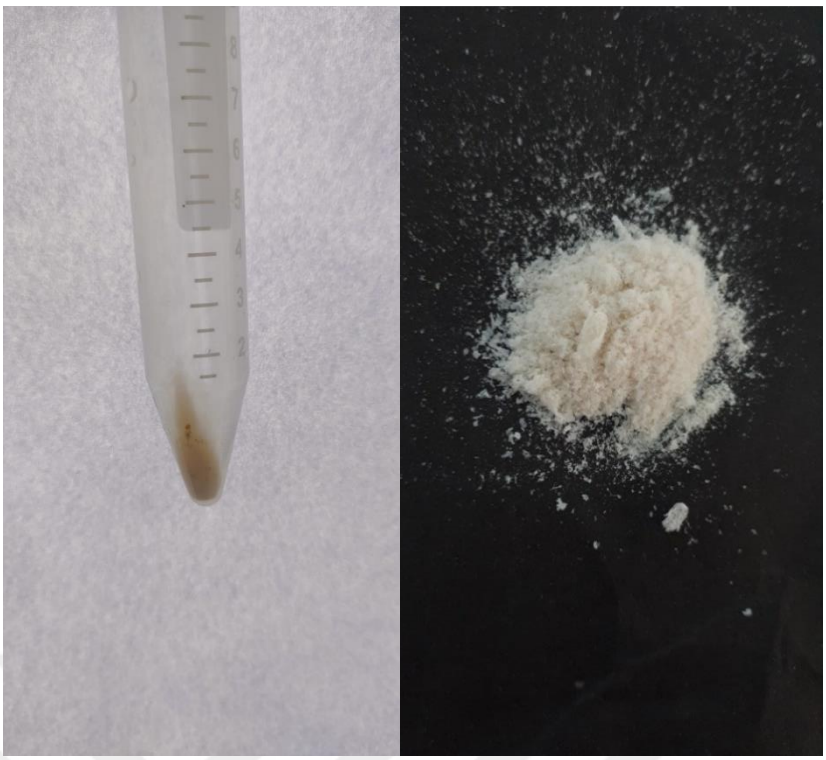
Akontrol: kontrolün absorbans değeri

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Caldibacillus pasinlerensis'in Ekzopolisakkarit Üretimi İçin En Uygun Besiyerinin Belirlenmesi

Mevcut çalışmada kullanılan bakteri türü (*C. pasinlerensis*) hali hazırda yeni keşfedilen ve üzerinde EPS üretimine dair herhangi bir çalışma yapılmamış bir mikroorganizmadır. Bu bakteri türünün tanılanması, karakterizasyonu ve büyüme şartları daha önceki çalışmada (Baltaci *et al.* 2020) ortaya çıkarılmış ve bakterinin Tryptone Soya Broth (TSB) besiyerinde en iyi gelişim gösterdiği ve optimum büyüme sıcaklığının 55°C olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden mevcut çalışmada bakteri kültürü TSB besiyerinde hazırlanmış ve 55°C'de inkübe edilmiştir. Bununla birlikte EPS üretimini artırmak için TSB besiyerini daha da zenginleştirme yoluna gidilmiştir.

Literatürde EPS üretimini karbon kaynaklarının, azot kaynaklarının ve vitaminlerin etkilediği bildirilmektedir (Czaczyk & Myszka, 2007; Yeesang *et al.* 2008; Jenny Angel *et al.* 2018; Dhagat & Jujjavarapu, 2021). Maya ekstraktının da organik azot, protein, yağ, vitaminler ve karbon kaynakları içerdiği bildirilmektedir (Demirgul *et al.* 2022). Bu bilgiler göz önüne alınarak TSB'ye maya ekstraktı ilave edilerek ikinci bir besiyeri hazırlanmıştır. Üçüncü besiyerinde sadece sükroz, dördüncü besiyerinde hem sükroz hem de maya ekstraktı, beşinci besiyerinde sadece glukoz ve altıncı besiyerinde ise hem glukoz hem de maya ekstraktı ilavesi gerçekleştirilmiştir. Kısacası üretim çalışmaları için altı farklı besiyeri (TSB, TSB+Maya Ekstraktı, TSB+Sükroz, TSB+Glukoz, TSB+Maya Ekstraktı+Glukoz ve TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz) dizayn edilmiştir. Bu besiyerlerinde bakteri kültürü hazırlandıktan sonra belirtilen inkübasyon süresinin sonunda bütün kültürler santrifüj edilmiş, TCA çöktürmesi uygulanmış ve etil alkol muamelesi ile EPS çöktürmesi yapılmıştır. Bu şekilde saflaştırılan EPS son olarak liyofilize edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Alkol muamelesi sonucu çöktürülen EPS ve liyofilize haldeki EPS

Baltaci *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, bu bakterinin hem glukoz hem de sükrozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği gösterilmiştir. Mevcut çalışmada da bakterinin glukoz ve sükroz üzerinde gelişebildiği ve bununla birlikte sükroz ile hazırlanan besiyerlerindeki EPS verimlerinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Tablo 4'te verilen sonuçlar bakterinin sadece TSB içeren besiyerinde bile hem gelişme hem de EPS üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte maya ekstraktı, glukoz ya da sükroz ilavesinin gerek hücre büyümesini gerekse EPS üretimini artırdığı belirlenmiştir. Ancak maya ekstraktından ziyade sükroz ya da glukoz ilavesinin EPS üretimini daha fazla artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum daha önceki çalışmalarda da (Xiao *et al.* 2004; Banerjee *et al.* 2022) belirtildiği gibi yüksek karbon/azot oranının EPS üretimini artırdığı gerçeğiyle uyuşmaktadır. Test edilen altı farklı besiyeri arasında maksimum EPS üretimi (0,49 g/L) hem sükroz hem de maya ektraktı içeren besiyerinde başarılmıştır.

Tablo 4. Farklı Besiyeri Ortamlarında Üretilen EPS'nin Miktar Tayini

Besiyeri Ortamı	**Üretilen Miktar (g/L)**	**Biyokütle (g/L)**
TSB	0,12	0,127
TSB+Maya Ekstraktı	0,14	0,213
TSB+Sükroz	0,39	0,229
TSB+Glukoz	0,37	0,232
TSB+Maya Ekstraktı+Glukoz	0,45	0,325
TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz	0,49	0,328

EPS üretiminin en yüksek seviyede gerçekleştirildiği fermantasyon ortamı TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz besiyeri olarak belirlendiği için çalışmanın takip eden aşamaları bu besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, besiyeri ortamına bazı karbon, azot ve mineral kaynaklarının özellikle de karbon kaynağı ilavesinin mikroorganizmada EPS üretimini artırabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Optimum sıcaklık değerinin değerlendirilmesi

Ekzopolisakkarit üretim miktarını etkileyen parametrelerden biri sıcaklık değeridir. Ortam sıcaklığının EPS üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı optimizasyon çalışmaları literatürde bulunmaktadır (Xiao *et al.* 2004; Mahdi *et al.* 2019). Bu çalışmalarda termofilik mikroorganizmalar ile EPS üretimi için yüksek sıcaklıkların daha iyi sonuçlar verdiği açıklanmıştır (Wang *et al.* 2021). Yapılan tez çalışmasında EPS üretimini artırmak için 6 farklı sıcaklıkta deneyler gerçekleştirilmiştir. Tablo 5'te verilen sonuçlarda da görülebileceği gibi EPS ve hücre biyokütlesi sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermiştir. Hücre biyokütlesi maksimum değere 55°C'de ulaşmıştır. Bu sonuç da önceki çalışma ile uyumluluk göstermektedir (Baltaci *et al.* 2020). Hücre biyomkütlesinin aksine maksimum EPS üretimi 60°C'de gerçekleşmiştir. Bu sonuç da yine EPS sentezi ve hücre büyümesi için optimum sıcaklığın farklı olabileceğini gösteren önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Peiris *et al.* 1998; Mahdi *et al.* 2019) Bu yüzden çalışmanın takip eden aşamalarında EPS üretimi 60°C'lik sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. Farklı Ortam Sıcaklıklarında Üretilen EPS'nin Miktar Tayini

Ortam Sıcaklığı (°C)	Üretilen Miktar (g/L)	Biyokütle (g/L)
40	0,15	0,109
45	0,31	0,203
50	0,41	0,286
55	0,48	0,328
60	0,54	0,310
65	0,47	0,245

Optimum pH değerinin değerlendirilmesi

Hem hücrelerin canlılığını korumasında hem de EPS üretiminde etkili olan bir diğer çevresel koşul pH değeridir. Mikroorganizmalar belirli pH aralıklarında canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda besiyeri ortamının pH değerinin EPS üretimini etkileyen bir faktör olduğu ortaya konulmuştur (Xiao *et al.* 2004; Mahapatra & Banerjee, 2013). Bu çalışmada *C. pasinlerensis*'in üretimini gerçekleştirdiği EPS'nin miktarı üzerinde pH

değerinin etkisi araştırılmıştır. Araştırmalar sonucu 5 farklı pH değerine sahip fermantasyon ortamı ile üretilen EPS'nin miktarları Tablo 6'da gösterilmiştir. Sonuçlarda da görülebileceği gibi hücre biyokütlesi maksimum değere pH 7'de ulaşmıştır. EPS miktarı için ise maksimum değer pH 8'de elde edilmiştir. Bu sonuç da yine sıcaklıkta olduğu gibi hücre büyümesi ve EPS sentezi için en uygun pH'nın farklılık gösterebilecek olduğunu ortaya koyan önceki çalışmaların sonuçlarına benzerlik göstermektedir (Xiao *et al.* 2004). Bu yüzden çalışmanın sonraki aşamaları için optimum pH değeri 8 olarak belirlenmiştir.

Tablo 6. Farklı pH Değerlerinde Üretilen EPS'nin Miktar Tayini

Ortam pH'sı	Üretilen Miktar (g/L)	Biyokütle (g/L)
5	0,26	0,01
6	0,21	0,02
7	0,53	0,328
8	0,59	0,4
9	0,57	0,516

Optimum fermantasyon süresinin belirlenmesi

Literatürde polisakkaritler dahil enzim, organik asit, pigment, tek hücre proteini, etil alkol gibi mikrobiyal ürünlerin sentezini inkübasyon süresinin etkilediği; çok kısa ve çok uzun inkübasyon sürelerinin ürün verimini azaltabileceği ve bu yüzden de en uygun sürenin belirlenmesinin çok önemli bir kriter olduğu belirtilmektedir (Kanari *et al.* 2002; Chug *et al.* 2016; Jenny Angel *et al.* 2018). Bu bilginin ışığında mevcut çalışmada, EPS ve hücre büyümesi üzerine 24-96 saatleri arasında inkübasyon süresinin etkisi test edilmiştir. Tablo 7'de görülebileceği gibi hücre büyümesi ilk 24 saatte daha hızlı olup, bununla birlikte 72. saate kadar devam etmiştir. 72 ve 96. saatler arasında ise hücre biyokütlesinde herhangi bir artış tespit edilmemiştir. EPS konsantrasyonu ise maksimum seviyeye 48. saatte ulaşmış, 48 ve 72. saatler arasında herhangi bir değişiklik olmamıştır. 72. saatten sonra ise EPS konsantrasyonunda bir miktar azalma tespit edilmiştir. Bu azalma daha önceki çalışmalarda uzun inkübasyon sürelerinin EPS miktarını azaltabileceği gerçeği ile uyumludur (Kanari *et al.* 2002; Mahapatra & Banerjee, 2013). EPS'deki azalma ortamdaki karbon kaynağının tükenmesine ve buna bağlı olarak mikroorganizmanın kendi ürettiği EPS'ye yönelmesine bağlanabilir.

Mevcut çalışmada fermantasyon süresinin EPS üzerine olan etkisini belirlemek için 4 farklı süre belirlenmiş olup bu süreler sonunda EPS'lerin miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 7'de gösterildiği gibidir:

Tablo 7. Farklı Fermantasyon Sürelerinde Üretilen EPS'nin Miktar Tayini

Fermantasyon Süresi	Üretilen Miktar (g/L)	Biyokütle (g/L)
24 saat	0,59	0,328
48 saat	0,71	0,578
72 saat	0,64	0,742
96 saat	0,51	0,738

EPS'nin Total Üretimi

Yukarıda da bahsedilen optimizasyon çalışmalarından görülebileceği gibi EPS üretimi için en uygun kültür parametreleri; besiyeri kompleksi TSB+maya ekstraktı+sükroz, inkübasyon sıcaklığı 60°C, başlangıç pH'sı 8 ve inkübasyon süresi ise 48 saat olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu optimal parametrelerde toplam 3 litre besiyerinde (250 mL'lik erlenmayerler içerisinde, her erlende 100 mL besiyeri olacak şekilde) EPS'nin üretimi gerçekleştirilmiştir. Yöntemler kısmında belirtildiği gibi hücre çöktürmesi, TCA muamelesi, etil alkol çöktürmesi ve santrifüj işlemleri ardından üretilen EPS saflaştırılmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen EPS aşağıda belirtilen karakterizasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur.

Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Farklı solventler içerisinde çözünürlüğünün değerlendirilmesi

Bir ekzopolisakkaritin solventlerdeki çözünürlüğü, temel olarak moleküler yapıya, moleküler ağırlığa ve biyolojik kökene bağlıdır (Asgher *et al.* 2020). Yani, EPS'nin içeriğinde bulunan hidrofilik ve hidrofobik gruplarla yakından ilişkilidir. Hidrofilik grup bakımından zengin olan EPS'ler polar solventlerde çözünürken, hidrofobik grup bakımından zengin olan EPS'ler apolar solventlerde çözünmektedir (Patil & Shirsath, 2015). *C. pasinlerenesis* tarafından üretilen EPS'nin distile su, etanol, metanol, izopropanol, aseton, DMSO, formaldehit, hekzan ve kloroform gibi polar ve apolar solventler içerisinde çözünürlükleri belirlenmiştir. Çözünürlük dereceleri Tablo 8'te gösterilmektedir.

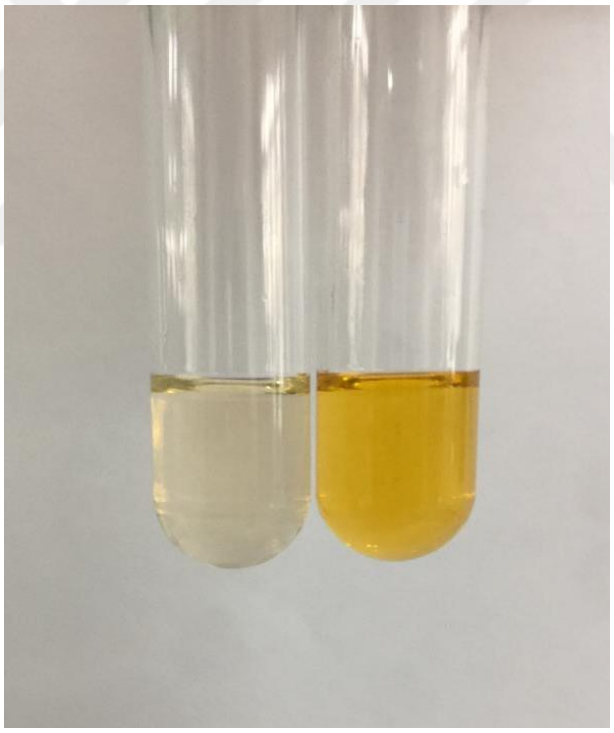
Tablo 8. Üretimi Gerçekleştirilen EPS'nin Çözünürlüğü

Çözücü Solvent	Çözünürlük Derecesi
Distile Su	++++
Metanol	+++
İzopropanol	++
Aseton	++
DMSO	+
Etanol	+
Formaldehit	-
Hekzan	-
Kloroform	-

Kullanılan solventler içerisinde en iyi çözücünün distile su olduğu belirlenmiş olup, EPS'nin formaldehit, kloroform ve hekzan içerisinde çözünmeden pelet halinde kaldığı gözlemlenmiştir. Bu ürünün düşük konsantrasyonda (5 mg/mL) suda çözünürlüğü yüksek olup, daha yüksek konsantrasyonda (10 mg/mL) azalmıştır. Distile suda 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında EPS çözünürlüğü değerleri sırasıyla %98 ve %96'dır.

Karbonhidrat içeriğinin değerlendirilmesi

Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan fenol-sülfürik asit yönteminde ortamda karbonhidrat varlığında fenol ve sülfürik asit muamelesi sonucu sarı-kahverengi renk görülmesi beklenmektedir. Bu sarı rengin koyuluğu ile üretilen EPS'nin içeriğinde bulunan karbonhidrat miktarı doğru orantı göstermektedir. Şekil 11'de görüldüğü gibi EPS örneği üzerinde yapılan denemede oldukça belirgin bir şekilde renk değişimi gözlemlenmiştir. Soldaki tüp kör (blank) olarak kullanılan EPS içermeyen çözücünün, sağdaki tüp ise distile su ile çözünmüş EPS'nin fenol-sülfürik asit ile muamele edilmiş halidir.



Şekil 11. *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin fenol-sülfürik asit muamelesi sonucu gözlemlenen renk değişimi

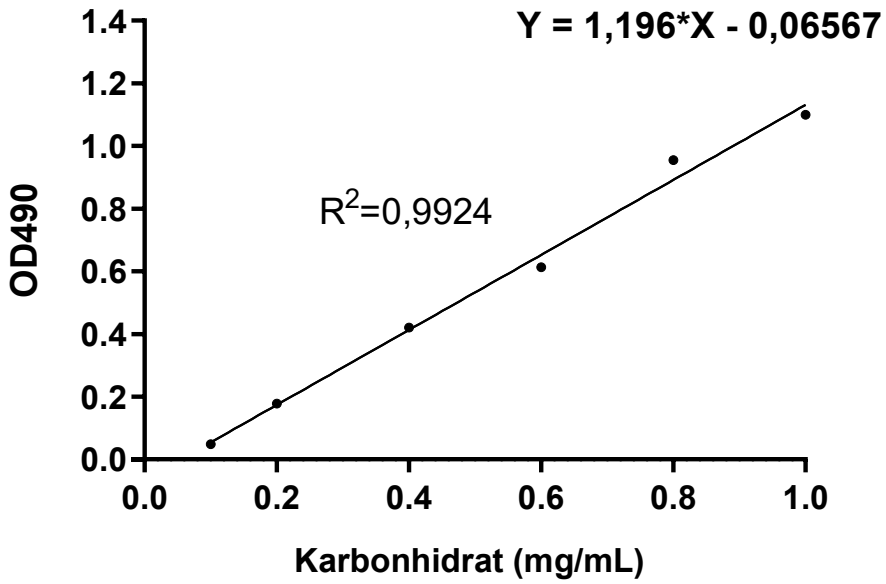
Renk değişiminin yanı sıra miktar olarak sayısal bir veri elde edilmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda glukoz şekeri standart olarak kullanılarak, fenol-sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Her bir örnek 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve standart grafik oluşturulmuştur. Renk değişiminin gözlemlendiği EPS örneğinin de spektrofotometrik olarak

ölçümü sağlanmış olup, absorbans değeri 1,09 olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik sonuçlar Tablo 9'da gösterilmektedir:

Tablo 9. Fenol-Sülfürik Asit Yöntemi Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

Glukoz Miktarı	Absorbans Değeri
0,1 mg/mL	0,048
0,2 mg/mL	0,178
0,4 mg/mL	0,421
0.6 mg/mL	0,613
0,8 mg/mL	0,955
1,0 mg/mL	1,100

Standart grafik referans alınarak EPS'nin içeriğinde ne kadar karbonhidrat olduğu elde edilmiştir. Standart grafik Şekil 12'de gösterilmektedir:



Şekil 12. Karbonhidrat tayininde kullanılan fenol-sülfürik asit yöntemi glukoz standart grafiği

Oluşturulan standart grafik formülünden y yerine EPS örneğinin spektral sonucu yazılarak elde edilen x değeri, EPS'nin içeriğinde ne kadar karbonhidrat olduğunu vermektedir.

Yani, $1{,}09 = 1{,}196 * \mathrm{x} + 0{,}06567$ denkleminden $x = 0{,}856$ bulunmuştur. Bu da elde edilen liyofilize haldeki 1 mg EPS içerisinde 0,856 mg karbonhidrat varlığı demektir.

Protein İçeriğinin Değerlendirilmesi

Warburg-Christian yöntemi

Polisakkaritler 230 nm'de maksimum absorbans verirken, nükleik asitler ve proteinler için maksimum absorbansın alındığı dalga boyları sırasıyla 260 nm ve 280 nm'dir (Zimmer &

Roalson, 2005). Uygulaması yapılan bu yöntemde 1 mL distile su içinde çözünen EPS'nin 230, 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Kaydedilen absorbans değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir:

Tablo 10. Toplam Protein Miktarı İçin Alınan Spektrofotometrik Sonuçları

230 nm	260 nm	280 nm
2,826	2,842	2,780

Elde edilen absorbans değerlerine göre 230 nm'de 2,826'lık önemli bir absorbans olduğunu ortaya çıkardı, bu da EPS'nin yüksek miktarda polisakkarit içerdiğini göstermektedir. Bu sonuç fenol-sülfürik asit yöntemiyle de doğrulanarak 1 mg EPS'nin yaklaşık 0,856 mg karbonhidrat (%85,6) içerdiği belirlenmiştir.

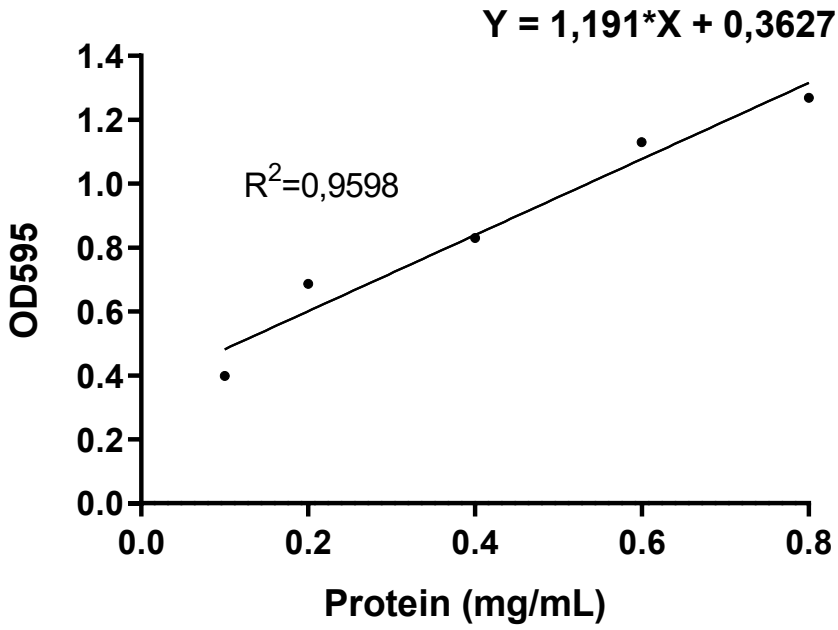
EPS içerisinde bulunan total protein miktarı $(\%) = 1{,}55 * \mathrm{A280} - 0{,}76 * \mathrm{A260}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, 1 mg liyofilize EPS örneğinin %2,14 miktarda protein içerdiği belirlenmiş olup, bu da 0,021 mg'a denk gelmektedir.

Bradford yöntemi

Protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bradford yönteminde ise ortamda protein varlığında mavi renk oluşumu beklenmektedir. Yapılan çalışmada standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA örnekleri, Bradford çözeltisi ile muamele edilmiş ve 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek, standart grafik (Şekil 13) oluşturulmuştur. Spektrofotometrik sonuçlar Tablo 11'de gösterilmiştir:

Tablo 11. Bradford Yöntemi Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

BSA Miktarı (mg/mL)	Absorbans Değeri
0,8	1,269
0,6	1,13
0,4	0,83
0,2	0,687
0,1	0,398



Şekil 13. Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan BSA standart grafiği

EPS örneğinin Bradford çözeltisi ile muamelesi sonucu 595 nm'deki absorbans değeri 0,156 olarak belirlenmiştir. Oluşturulan standart grafiğinden elde edilen formülde y yerine EPS örneğinin ölçülen absorbans değeri yazılarak x bulunmuştur.

Yani, $0{,}401 = 1{,}191 * x + 0{,}3627$ denkleminden $x = 0{,}032$ bulunmuştur. Bu da elde edilen liyofilize haldeki 10 mg EPS içeriğinde 0,032 g olmak üzere göz ardı edilecek kadar düşük miktarda protein varlığı demektir.

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında EPS'nin karbonhidrat içeriğinin %85 civarında olduğu anlaşılmaktadır. Bu değer de daha önceki çalışmalarda karakterize edilen EPS örneklerinin karbonhidrat içeriklerine benzemektedir (Seo *et al.* 2015; Subudhi *et al.* 2016; Arun *et al.* 2017; Sivasankar *et al.* 2018; Genc *et al.* 2021; Karadayi *et al.* 2021; Dhanya *et al.* 2022).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile monomer kompozisyonunun değerlendirilmesi

Literatürde, mikrobiyal polisakkaritlerin monomer tipine göre ikiye ayrıldığı belirtilmektedir. Tek tipte monomerlerden oluşanlara homopolisakakrit, birden çok tip monomerden oluşanlara heteropolisakkarit adı verilmektedir. Mikrobiyal EPS'lerin monomer kompozisyonlarının belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmakta olup, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bu yöntemler içerisinde önemli bir yere sahiptir (Ozturk *et al.* 2010; Rühmann *et al.* 2015). *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin monomer karakterizasyonunda da kromatografik bir yöntem olan HPLC kullanılmıştır. Bu amaçla,

öncelikle mevcut EPS'nin sülfürik asit ile hidrolizi sağlanıp ardından sodyum hidroksit ile nötralizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra monomerlerine ayrılan EPS ve 11 adet standart şeker örneği (ramnoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, mannoz, glukoz, galaktoz, sükroz, maltoz, glukronik asit ve laktoz) HPLC kolonundan geçirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 12'de gösterilmektedir:

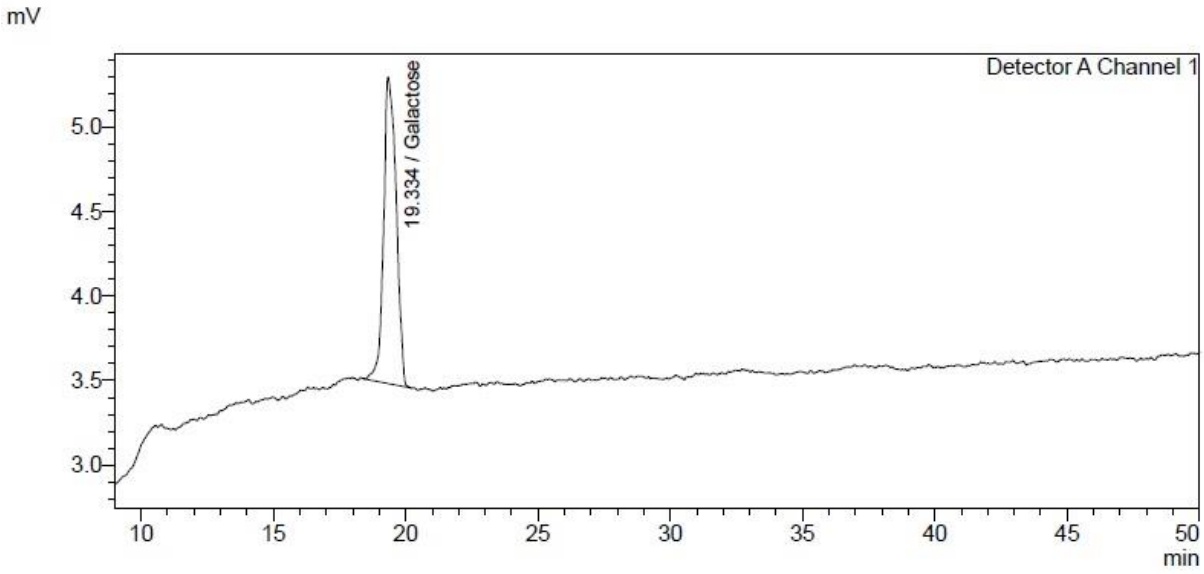
Tablo 12. *C. pasinlerensis*'in Ürettiği EPS'nin Monomer Kompozisyonu

Kompozisyon	**Alıkonma Süresi (dakika)**
Galaktoz	19.334

Literatürde üretilen EPS'lerin homopolisakkarit ve heteropolisakkarit yapıda olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada (Zhao *et al*., 2014), *Anoxybacillus* sp. R4-33 kaynaklı EPS'nin heteropolisakkarit özellik gösterip, glukoz ve mannoz'dan meydana geldiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada (Karadayi *et al*., 2021) ise, *Anoxybacillus gonensis* YK25' bakterisinin ürettiği EPS'nin ksiloz, glukoz, galaktoz ve sükroz monomerlerinden meydana gelen bir heteropolisakkarit olduğu rapor edilmiştir Literatürde, bakterilerin homopolisakkarit yapıda EPS ürettiği de belirtilmiştir. Örneğin, Ozturk & Aslim (2010) yaptıkları çalışmada *Synechocystis* cinsine ait üç farklı mikroorganizma tarafından üretilen EPS'lerin homopolisakkarit ve heteropolisakkarit yapıda olduğu HPLC analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Yilmaz *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada ise, *Bacillus sphaericus* 7055 suşu tarafından üretilen EPS'nin yüksek oranda galaktoz içerdiği kanıtlanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada (Yilmaz *et al.* 2022) ise, *Weissella cibaria* tarafından üretilen EPS'nin HPLC analizi sonucunda glukoz içeren bir homopolisakkarit olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak, *Limosilactobacillus reuteri* (Fraunhofer *et al*., 2018)'nin glukozdan oluşan glukan isimli, *Lactobacillus rhamnosus* (Polak-Berecka *et al*., 2014) ve *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 (Ni et al., 2018)'nin ise fruktoz monomerlerinden oluşan inulin isimli homopolisakkarit yapıdaki EPS ürettiği belirtilmiştir.

Sonuç olarak, *C. pasinlerensis* tarafından üretilen EPS'nin sadece galaktoz içeren bir homopolisakkarit olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen HPLC kromatogramı (Şekil 14) sonucunda EPS'de ramnoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, mannoz, glukoz, sükroz, maltoz, glukronik asit ve laktoz tespit edilmemiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bu türün EPS üretme yeteneği ve EPS'nin kimyasal yapısı hakkında herhangi bir bilgi literatürde yer almamıştır. Diğer taraftan, galaktozdan oluşan homopolisakkaritlerin varlığı sadece birkaç bakteri türünde (*Weissella confusa* ve *Bacillus sphaericus* 7055) gösterilmiştir (Yilmaz *et al*., 2012; Kavitake *et al*., 2016). Bu yüzden, *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin yapılan çalışmalar

ile uyumlu olduğu görülüp, bilimsel literatür açısından son derece önemli olduğu düşünülmektedir.



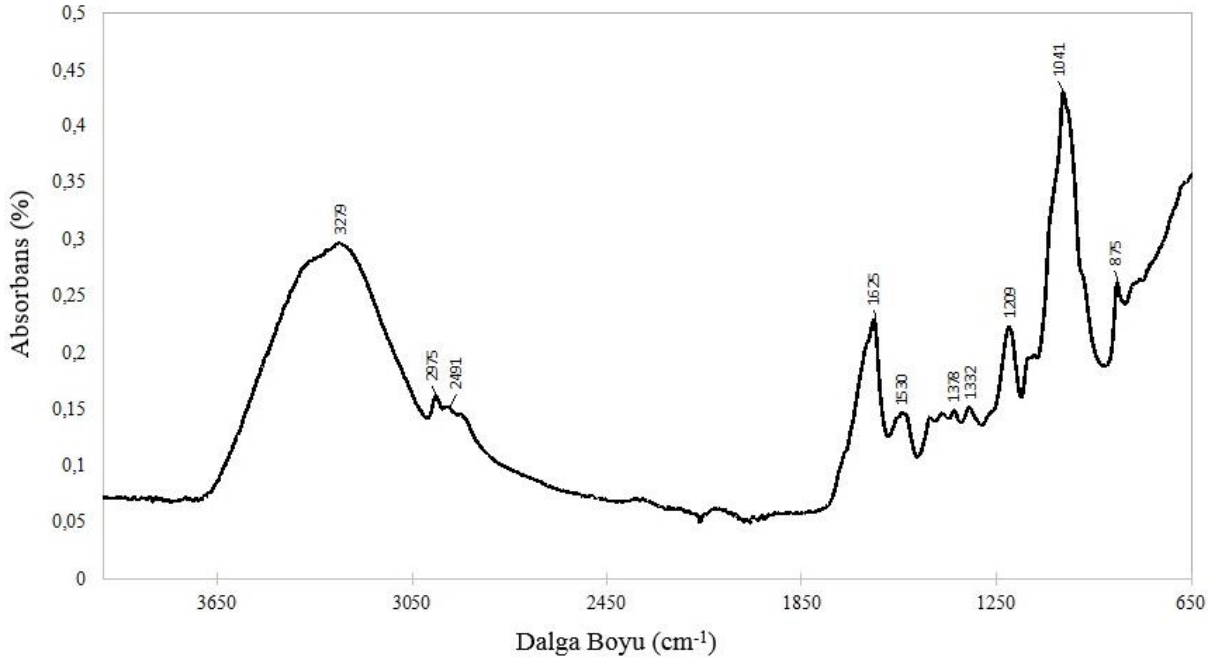
Şekil 14. *C. pasinlerensis* tarafından üretilen galaktozun monomer bileşimini gösteren HPLC kromatogramı

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

Polisakkaritlerdeki karakteristik organik grupların tanımlanmasında FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden, mevcut çalışmada EPS'nin gruplarının analizi için FT-IR kullanılmış ve belirlenen bantlar literatür verilerine göre değerlendirilmiştir. Şekil 10'dan görülebileceği gibi EPS için 3279, 2975, 2941, 1625, 1530, 1332, 1209, 1041 ve 875 cm^{-1} bölgesinde güçlü bantlar tespit edilmiştir.

EPS için 3279 cm^{-1}'de tespit edilen bant moleküller arası hidrojen bağlarının ve –OH gerilme titreşiminin (3600–3200 cm^{-1}) varlığı ile açıklanmıştır (Kavita *et al.* 2011; Kayar *et al.* 2022). Hidroksil gruplarının varlığı daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi (Castellane *et al.* 2015; Karadayi *et al.* 2021), EPS'nin sudaki çözünürlüğünün bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. EPS için 2975 ve 2941 cm^{-1}'de tespit edilen bantlarlar lipitler ve/veya karbonhidratlardaki fonksiyonel grupların C-H germe titreşimi (−CH3, >CH2 ve >CH−) ile açıklanmıştır. 1700–1770 cm^{-1} bölgesinde herhangi bir belirgin bant tespit edilmediğinden EPS'de glukuronik asit monomerinin olmadığı düşünülmüştür (Wang *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Hospodarova *et al.* 2018; Nandiyanto *et al.* 2019; Karadayi *et al.* 2021). Amid bantları (I, II ve III), bir numunede proteinlerin varlığını gösterir. Amid I'in ikincil proteine en duyarlı spektral bölge olduğu bilinmektedir. Proteinlerin FTIR spektrumlarında, amid I, 1600 ila 1700 cm^{-1} aralığında absorbans bantlarına sahiptir. Amid I bandı, C=O (yaklaşık %80) ve C-N gruplarının gerilme titreşimi ile ilişkilidir. Amid II bandı 1480-1575 cm^{-1} aralığında bulunur ve

N-H bükülme (%40-60) ve C-N germe titreşimi (%18-40) ile ilgilidir. Amid III bandı, 1200 ile 1350 cm^{-1} aralığında absorbans gösterir (Naumann *et al.* 1982; Kong & Yu, 2007; Hashim *et al.* 2010; Aboul-Enein *et al.* 2014; Dawood *et al.* 2020; Ji *et al.* 2020). Bu bilgilerin ışığında, EPS için 1625 cm^{-1}'de tespit edilen bandın amid I'e, 1530 cm^{-1}'de tespit edilen bandın amide II' ye ve 1209 ve 1332 cm^{-1}'de tespit edilen bantların ise amide III'e ait olduğu düşünülmüştür. Amid II esas olarak N-H bükülmeyi işaret ettiği ve Amid II bandının da Amid I'den daha zayıf olduğu tespit edildiği için EPS örneğinin protein içeriğinin düşük olduğu düşünülmüştür. EPS örneğine başlangıçta TCA ile protein giderme işlemi uygulandığı gerçeği göz önüne alındığında bu durum şaşırtıcı olmamalıdır. Diğer taraftan, TCA çöktürmesine rağmen EPS yapısında protein tespit edilmesi de bu proteinlerin serbest formdan ziyade EPS ile bağlı halde bulunması ile açıklanmıştır. FTIR spektrumunda 1200-800 cm^{-1}'e aralığı polisakkaritler için parmak izi bölgesi olarak bilinmektedir (Čopíková *et al.* 2006). EPS için bu aralıkta 1041 ve 875 cm^{-1}'de iki güçlü bant belirlenmiştir. Hatta, EPS'nin en güçlü bandının 1041 cm^{-1}'deki tespit edilmesi, EPS'nin yapısında yüksek oranda karbonhidrat mevcut olduğunun işareti olarak kabul edilmiştir. Anomerik bölgede (1200–1000 cm^{-1}) bölgede 1041 cm^{-1}'deki güçlü absorpsiyon, EPS'deki C–C ve C–O gerilme modlarına ve glikozidik bağların (C–O–C) titreşimine atfedilmiştir (Vijayabaskar *et al.* 2011; Sardari *et al.* 2017). Literatürde de belirtildiği gibi (Muhidinov *et al.* 2020), 875 cm^{-1}'de ki bant ise polisakkaritin β-konfigurasyonuna sahip olduğunu işaret etmektedir. Literatürde, RNA veya DNA'ya ait fosfat gruplarının 1230 and 980 cm^{-1}'de FTIR spektrumunda bant verdiği açıklanmaktadır. Mevcut çalışmada, ise EPS örneğinin bu iki bölgede bant oluşturmadığı ve bu yüzden de EPS örneğinde tespit edilebilir seviyede bir nükleik asitin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum ise, başlangıçta bakteri hücrelerin santrifüjle EPS'den uzaklaştırılmasıyla açıklanmıştır.



Şekil 15. Saflaştırılan EPS'nin FT-IR spektrumu

Biyolojik Aktivitenin Değerlendirilmesi

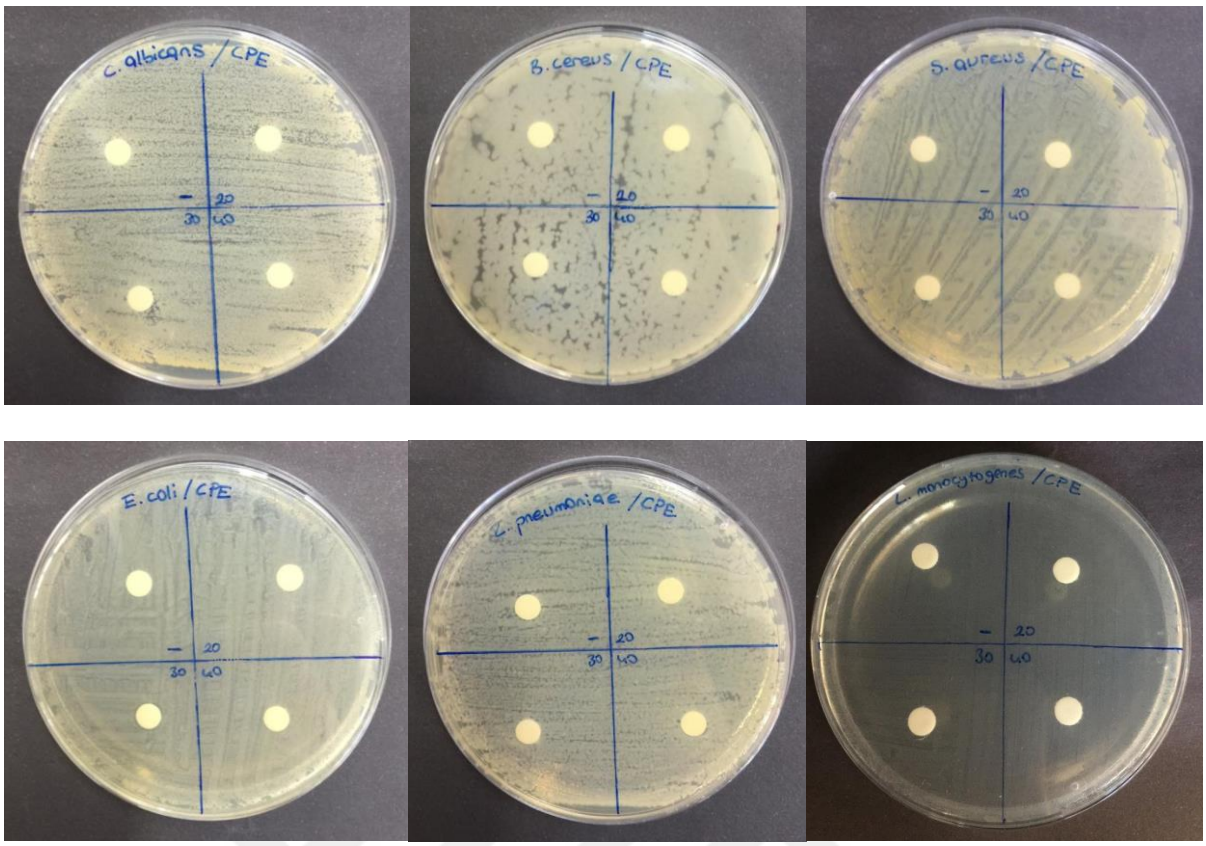
Antimikrobiyal aktivite

İlaç ve biyomedikal alanlarda uygulanan ekzopolisakkaritlerin oldukça önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Örneğin (X. Chen *et al.* 2016), yaptığı çalışmada *Schizophyllum commune* mantarından elde ettiği EPS'nin gümüş nanopartiküller ile immobilizasyonu sonucu oluşan kompleks bileşiğin *E. coli* ve *S. aureus* gibi bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviyeteye sahip olduğunu test etmiştir. (Vazquez-Rodriguez *et al.* 2018), *Rhodotorula mucilaginosa* mayasının *E. coli, S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi patojenlerle birlikte kültüre edilerek ekzopolisakkarit üretiminin arttığını ve bu bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bazı araştırmacılar da (Garza-Cervantes *et al.* 2019) *Rhodotorula mucilaginosa* bakterisinden üretilen EPS'nin yine *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* gibi çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini belirtmiştir. Tam tersine bazı çalışmalarda ise bakteri veya fungal kökenli EPS'lerin antimikrobiyal etkinlik göstermediği rapor edilmiştir.

Örneğin, Wu *et al.* (2010)'nun çalışmasında *Bifidobacterium longum*'un ürettiği EPS'nin *E. coli* BCRC10239, *S. typhimurium* BCRC10747 (ATCC14028), *P. aeruginosa* BCRC10261 (IFO3898), *Vibrio. parahaemolyticus* (ATCC17802), *S. aureus* BCRC10451 (ATCC6538P), *B. subtilis* BCRC10029 (ATCC21778) ve *B. cereus* (ATCC10361) gibi mikroorganizmalara karşı düşük konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite göstermez iken, yüksek konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite gösterip patojen mikroorganizmaların

büyümelerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada (Kanmani & Lim, 2013) ise bakteri kökenli EPS'nin *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumonia* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği varken, *L. monocytogenes* gibi başka bir mikroorganizmaya karşı düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkinlik göstermediği ve ayrıca mevcut EPS'nin *Aspergillus niger* ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Genc *et al.* (2021)'in çalışmasında ise, *Anoxybacillus pushchinoensis*'in *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *C. albicans* ATCC 10231'e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Kısacası yukarıdaki çalışmalardan da görülebileceği gibi mikrobiyal polisakkaritlerin antimikrobiyal etkinliği farklılık göstermektedir. Bu yüzden mevcut çalışmada *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Patojen test mikroorganizmaları olarak daha önceki çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *C. albicans* (ATCC 10231), *B. cereus* (ATCC 33019), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 43894), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) ve *L. monocytogenes* (ATCC 7644) gibi gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar kullanılarak disk difüzyon testi uygulanmıştır. Şekil 16'da da görülebileceği gibi EPS örnekleri test mikroorganizmalarının hiçbirine karşı gerek antibakteriyel gerek antifungal etki göstermemiştir.



Şekil 16. *C. pasinlerensis*'in ürettiği EPS'nin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Antioksidan aktivite

Önceki çalışmalarda mikrobiyal EPS'lerin antioksidan aktiviteleri de test edilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında (Sivasankar *et al.* 2018; Genc *et al.* 2021; Z. Liu *et al.* 2023) mikrobiyal EPS'lerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve olmadığı belirtilmiştir. Kısacası antimikrobiyal aktivitede olduğu gibi mikrobiyal EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin varlığı da farklılık gösterebilmektedir.

Mevcut çalışmada da EPS'nin 1 mg/mL konsantrasyonu test edilmiştir. Standart olarak da askorbik asitin dört farklı konsantrasyonu (0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL) kullanılmıştır. Bu yöntemde 517 nm'de alınan yüksek absorbans, düşük antioksidan aktiviteyi gösterirken; daha düşük absorbanslar ise daha yüksek aktivite değerlerini göstermektedir. Askorbik asitin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan standart ve EPS örneğinin DPPH çözeltisiyle muameleleri sonucu renk değişimi gözlemlenmiştir. Tablo 13'de görülebileceği gibi test edilen bütün konsantrasyonlarda hem askorbik asit hem de EPS antioksidan aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte askorbik asitin antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Yapılan araştırmalar kapsamında antioksidan aktivitesinin galaktoz içeren EPS'lerde olduğu görülmüştür (Andrew & Jayaraman, 2020). Mevcut çalışmada araştırılan

örneğin antioksidan aktivitesinin yapısında bulunan galaktozdan kaynaklı olabileceği tahmin edilmiştir.

Tablo 13. 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				% 12,7

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, 2020 yılında Erzurum'un Pasinler ilçesinde bulunan bir termal kaynaktan izole edilen *Caldibacillus pasinlerensis*'in ekzopolisakkarit üretme yeteneği belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak ticari besiyeri Tryptone Soya Broth (TSB) kullanılarak EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra üretim miktarının artırılması amaçlanarak, besiyeri optimizasyonu yapılmıştır. Kullanılan karbon kaynağı, ortam sıcaklığı, pH değeri ve fermantasyon süresi optimize edilmiştir. Karbon kaynağının optimizasyonunda TSB besiyerine maya ekstraktı, glukoz ve sükroz eklemeleri yapılıp EPS üretimi sağlanmıştır. Besiyeri ortamının bu optimizasyonu sonucunda üretilen EPS miktarında artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan izolatın EPS üretimi, besiyeri ortamında bulunan karbon kaynağıyla doğrusal olarak artış göstermiştir. Ardından sıcalık, pH değeri ve fermantasyon süresi optimizasyonu yapılarak EPS üretimi için en uygun şartlar belirlenmiştir. Optimizasyonlar sonucu üretimi gerçekleştirilen EPS'nin geniş pH aralığına ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı bir polisakkarit olduğu ortaya konulmuştur.

Kullanılan besiyerleri arasında TSB+Maya Ekstraktı+Sükroz seçilerek pH 8 değerinde 60 °C'de 48 saat süre ile üretim sağlanıp, sonraki aşamalarda bu besiyerinde üretilen ekzopolisakkaritler liyofilize hale getirilerek karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında alınan sonuçlara göre *C. pasinlerensis*'in ürettiği ekzopolisakkaritin distile su, etanol, metanol, izopropanol, DMSO ve aseton gibi solventlerde çözünebildiği ve bu solventler arasında en iyi çözücünün distile su olduğu gözlemlenmiştir. Kullanılan bir diğer solvent olan formaldehit, kloroform ve hekzanda ise EPS'nin çözünmeyip pelet halinde kaldığı görülmüştür. İlaçların çoğunun suda çözünürlüğü zayıf olduğundan, sıvı farmasötik formülasyonlar için su iyi bir solvent seçimi olarak görülmektedir. Suda çözünürlüğü az olan ilaçların çözünürlüğünün iyileştirilmesinde kullanılan yöntemler (birlikte çözücülük, misel çözündürme, kimyasal modifikasyon ve katı dispersiyon) olmadan uygulama sağlanabilecektir. Böylece EPS'nin suda çözünürlüğünün yüksek olması, toksik çözücülere ihtiyaç duyulmaması nedeniyle önemli bir avantajdır.

Toplam karbonhidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan fenol-sülfürik asit yönteminde EPS'nin kaydadeğer oranda karbonhidrat içerdiği hem spektral olarak hem de renk değişimiyle görsel olarak kanıtlanmıştır.

Toplam protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bradford ve Warburg-Christian yöntemlerinde ise; Bradford yönteminde spektrofotometrik ölçüm yapılmış olup oluşturulan standart grafikte hesaplama yapılmıştır ve protein içeriğinin %0,32 olduğu ortaya konulmuştur. Yine spektral ölçüme dayanan Warburg-Christian yönteminde ise EPS'nin %2,14 oranında protein içerdiği belirlenmiştir.

Bu analizlere ek olarak monomer kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılan HPLC analizinde ise *C. pasinlerensis* tarafından üretilen EPS'nin galaktoz içeren bir homopolisakkarit olduğu gözlemlenmiştir. EPS'nin içeriğinde; %85 karbonhidrat ve %2,14 protein olduğu belirlenmiştir. İçeriğin belirlenmesinde kullanılan fenol-sülfürik asit, Bradford, Warburg-Christian ve HPLC analiz yöntemlerinden birbirleriyle örtüşen sonuçlar elde edilmiştir.

Biyolojik aktivitenin belirlenmesinde ise disk difüzyon ve DPPH testi uygulanmıştır. Disk difüzyon testi ile EPS örneğinin *C. albicans* (ATCC 10231), *B. cereus* (ATCC 33019), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 43894), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) ve *L. monocytogenes* (ATCC 7644) gibi patojen mikroorganizmaların gelişimlerine olan etkisi belirlenmiştir. Bu gözlemler sonucu üretimi gerçekleştirilen EPS örneğinin herhangi bir antipatojenik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Biyolojik aktivitenin belirlendiği bir diğer test olan DPPH testi aracılığıyla 1 mg/mL EPS örneğinin %12,7 oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu raporlanmıştır.

Sonuç olarak; *C. pasinlerensis* tarafından üretilen EPS'nin sıcaklık başta olmak üzere değişken koşullara uyum sağlayabilecek ve kararlılığını koruyabileceği öngörülmektedir. En iyi çözücüsünün distile su olmasının avantajları göz önüne alındığında gıda, biyomedikal ve ilaç uygulamalarında kullanılabilecektir. Ayrıca, ekzopolisakkaritlerin biyouyumluluk, biyobozunurluk, toksik olmama, yüksek vizkozite, su bağlama ve stabilizasyonu sağlama gibi çarpıcı özelliklerinden dolayı ticari olarak popüler ekzopolisakkaritlere bir alternatif olabilmektedir. Bu alternatifi güçlendirmek için farklı besiyerleri ve ortam koşulları gibi çeşitli optimizasyonlar sağlanarak EPS üretiminde artış gerçekleştirilebilir. Ek olarak, EPS üreten çoğu bakteri patojen özellik göstermektedir. Bu mikroorganizmaların aksine *C. pasinlerensis*, patojenitesi bulunmayan bir bakteridir. Bu özelliği de üretilen EPS'nin uygulama alanlarındaki sınırı ortadan kaldırmaktadır.

KAYNAKLAR

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.

Ali, I., Suhail, Mohd., & Aboul-Enein, H. Y. (2018). Chiral analysis of macromolecules. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *41*(11), 749–760. https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1514509

Andrew, M., & Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, *487*, 107881.

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

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., Urooj, Y., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020). Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: Optimization and structural/functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 984–992. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.094

Asgher, M., Qamar, S. A., & Iqbal, H. M. N. (2021). Microbial exopolysaccharide-based nano-carriers with unique multi-functionalities for biomedical sectors. *Biologia*, *76*(2), 673–685. https://doi.org/10.2478/s11756-020-00588-7

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

Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli exopolysaccharides*. *Biotechnology Advances*, *29*(1), 54–66. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011

Bajaj, I. B., Saudagar, P. S., Singhal, R. S., & Pandey, A. (2006). Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *102*(3), 150–156. https://doi.org/10.1263/jbb.102.150

Baltaci, M. O., Ay, H., Akbulut, S., Adiguzel, G., Albayrak, S., Omeroglu, M. A., Ozkan, H., Taskin, M., & Adiguzel, A. (2020). *Bacillus pasinlerensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(6), 3865–3871. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004246

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

Banik, R., Santhiagu, A., & Upadhyay, S. (2007). Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. *Bioresource Technology*, *98*(4), 792–797. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.012

Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., & Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(9), 1475–1495. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1575791

Barton, L. (2005). *Structural and functional relationships in prokaryotes*. Springer Science & Business Media.

Becker, A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00687

Berlemont, R., Delsaute, M., Pipers, D., D'Amico, S., Feller, G., Galleni, M., & Power, P. (2009). Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *The ISME Journal*, *3*(9), 1070–1081. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.48

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

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.

Cervino, G., Fiorillo, L., Herford, A., Laino, L., Troiano, G., Amoroso, G., Crimi, S., Matarese, M., D'Amico, C., Nastro Siniscalchi, E., & Cicciù, M. (2018). Alginate Materials and Dental Impression Technique: A Current State of the Art and Application to Dental Practice. *Marine Drugs*, *17*(1), 18. https://doi.org/10.3390/md17010018

Chakraborty, I., Sen, I. K., Mondal, S., Rout, D., Bhanja, S. K., Maity, G. N., & Maity, P. (2019). Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *22*, 101425. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101425

Chanda, S., & Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, *3*(13), 981–996.

Chen, S., Cheng, R., Xu, X., Kong, C., Wang, L., Fu, R., Li, J., Wang, S., & Zhang, J. (2022). The structure and flocculation characteristics of a novel exopolysaccharide from a *Paenibacillus* isolate. *Carbohydrate Polymers*, *291*, 119561.

Chen, X., Yan, J.-K., & Wu, J.-Y. (2016). Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal exopolysaccharide in water. *Food Hydrocolloids*, *53*, 69–74. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.032

Cheng, D., Jiang, C., Xu, J., Liu, Z., & Mao, X. (2020). Characteristics and applications of alginate lyases: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 1304–1320. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.199

Cheng, F., Luozhong, S., Guo, Z., Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2017). Enhanced Biosynthesis of Hyaluronic Acid Using Engineered *Corynebacterium glutamicum* Via Metabolic Pathway Regulation. *Biotechnology Journal*, *12*(10), 1700191. https://doi.org/10.1002/biot.201700191

Cheng, K. C., Demirci, A., & Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(1), 29–44. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y

Chug, R., Gour, V. S., Mathur, S., & Kothari, S. L. (2016). Optimization of Extracellular Polymeric Substances production using Azotobacter beijreinckii and *Bacillus subtilis* and its application in chromium (VI) removal. *Bioresource Technology*, *214*, 604–608. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.010

Clementi, F. (1997). Alginate Production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, *17*(4), 327–361. https://doi.org/10.3109/07388559709146618

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.

Cummings, J. H., & Stephen, A. M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, *61*(S1), S5–S18. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602936

Czaczyk, K., & Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, *16*(6).

Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2011). Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(5), 942–947. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.08.011

Dale, T., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi (10th ed.). Prentice-Hall.

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.

Demirgul, F., Simsek, O., & Sagdic, O. (2022). Amino acid, mineral, vitamin B contents and bioactivities of extracts of yeasts isolated from sourdough. *Food Bioscience*, *50*, 102040. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102040

Denman, L. J., & Morris, G. A. (2015). An experimental design approach to the chemical characterisation of pectin polysaccharides extracted from *Cucumis melo Inodorus*. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 364–369. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.081

Dhagat, S., & Jujjavarapu, S. E. (2021). Simulated annealing and artificial neural network as optimization tools to enhance yields of bioemulsifier and exopolysaccharides by thermophilic *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(4), 105499. https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105499

Dhanya, B. E., Prabhu, A., & Rekha, P. D. (2022). Extraction and characterization of an exopolysaccharide from a marine bacterium. *International Microbiology*, *25*(2), 285–295. https://doi.org/10.1007/s10123-021-00216-7

Dixon, H. B. F., Vliegenthart, J. F. G., Cornish-Bowden, A., Cornish-Bowden, A., Chester, M. A., Barrett, A. J., Rigg, J. C., Bull, J. R., Cammack, R., Coucouvanis, D., Horton, D., Kaplan, M. A. C., Karlson, P., Li, C., Moss, G. P., Reedijk, J., Tipton, K. F., Velick, S., Venetianer, P., … Webb, E. C. (n.d.). *ALAN D. McNAUGHT The Royal Society of Chemistry,Thomas Graham House, SciencePark,Milton Road, CambridgeCB4 4WF, UK*. 90.

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

Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *209*, 130–144. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.020

Esawy, M. A., Abdel-Fattah, A. M., Ali, M. M., Helmy, W. A., Salama, B. M., Taie, H. A. A., Hashem, A. M., & Awad, G. E. A. (2013). Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies. *Carbohydrate Polymers*, *96*(1), 332–341. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.089

Franken, J., Brandt, B. A., Tai, S. L., & Bauer, F. F. (2013). Biosynthesis of levan, a bacterial extracellular polysaccharide, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, *8*(10), e77499. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077499

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. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 874–881.

Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, *29*(8), 388–398. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008

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

Garza-Cervantes, J., Escarcega-Gonzalez, C., Castro, E., Mendiola-Garza, G., Marichal-Cancino, B., Lopez-Vazquez, M., & Morones-Ramirez, J. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity of biopolymer-Ni, Zn nanoparticle biocomposites synthesized using R. mucilaginosa UANL-001L exopolysaccharide as a capping agent. *Internatıonal Journal Of Nanomedıcıne*, *14*, 2557–2571. https://doi.org/10.2147/IJN.S196470

Gaur, R., Singh, R., Tiwari, S., Yadav, S. K., & Daramwal, N. S. (2010). Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for a novel pullulan-producing fungus, Eurotium chevalieri: Optimization of pullulan production parameters for E. chevalieri. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(3), 1035–1043. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04731.x

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

Gerbersdorf, S. U., Westrich, B., & Paterson, D. M. (2009). Microbial extracellular polymeric substances (EPS) in fresh water sediments. *Microbial Ecology*, *58*(2), 334–349. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9498-8

Göksungur, Y., Uzunoğulları, P., & Dağbağlı, S. (2011). Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *83*(3), 1330–1337. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.047

Gunduz, G., Erbas Kiziltas, E., Kiziltas, A., Gencer, A., Aydemir, D., & Asik, N. (2019). Production of bacterial cellulose fibers in the presence of effective microorganism. *Journal of Natural Fibers*, *16*(4), 567–575. https://doi.org/10.1080/15440478.2018.1428847

Harada, T., Fujimori, K., Hirose, S., & Masada, M. (1966). Growth and *β* -Glucan 10C3K production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes* in defined medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, *30*(8), 764–769. https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858682

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.

He, P., Zhang, A., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Sun, P. (2016). Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus sclerotia*. *Carbohydrate Polymers*, *152*, 222–230. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.010

Hoa, P., Nair, L., & Visvanathan, C. (2004). The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water SA*, *29*(4), 437–442. https://doi.org/10.4314/wsa.v29i4.5050

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.

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

Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, *6*(25), 4497–4559. https://doi.org/10.1039/C5PY00263J

Izawa, N., Serata, M., Sone, T., Omasa, T., & Ohtake, H. (2011). Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *111*(6), 665–670. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.005

Jeffrey, G. A., & Huang, D. (1990). The hydrogen bonding in the crystal structure of raffinose pentahydrate. *Carbohydrate Research*, *206*(2), 173–182. https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80058-B

Jenny Angel, S., Vidyadharani, G., Santhosh, S., & Dhandapani, R. (2018). Optimization and characterisation of thermo stable exopolysaccharide produced from *Bacillus licheniformis* WSF-1 strain. *Journal of Polymers and the Environment*, *26*(9), 3824–3833. https://doi.org/10.1007/s10924-018-1261-0

Jeong, E., Shim, W. Y., & Kim, J. H. (2014). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *Journal of Biotechnology*, *185*, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018

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, Y., Zhu, J., Chen, X., Tang, D., Su, D., Yao, W., & Gao, X. (2013). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresource Technology*, *132*, 427–431. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150

Julianti, E., Rusmarilin, H., Ridwansyah, & Yusraini, E. (2017). Functional and rheological properties of composite flour from sweet potato, maize, soybean and xanthan gum. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *16*(2), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.05.005

Kacı, F. N. (2018). Çeşitli bakteri izolatlarının kültür filtratları ve proteinlerinin insan fibroblast hücrelerinde sitotoksik ve moleküler yanıtlarının değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kanagasabapathy, G., Malek, S. N. A., Kuppusamy, U. R., & Vikineswary, S. (2011). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts of Fresh Fruiting Bodies of Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2618–2626. https://doi.org/10.1021/jf104133g

Kanari, B., Banik, R. R., & Upadhyay, S. N. (2002). Effect of environmental factors and carbohydrate on gellan gum production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *102–103*(1–6), 129–140. https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:129

Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. *Process Biochemistry*, *48*(7), 1099–1106. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.011

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

Kargarzadeh, H., Mariano, M., Gopakumar, D., Ahmad, I., Thomas, S., Dufresne, A., Huang, J., & Lin, N. (2018). Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose*, *25*(4), 2151–2189. https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5

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. (2016). Characterization of a novel galactan produced by Weissella confusa KR780676 from an acidic fermented food. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 681–689.

Kavitake, D., Veerabhadrappa, B., Sudharshan, S. J., Kandasamy, S., Devi, P. B., Dyavaiah, M., & Shetty, P. H. (2022). Oxidative stress alleviating potential of galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676 in yeast model system. *Scientific Reports*, *12*(1), 1089. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05190-2

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.

Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(2), 199–230. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00208.x

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

Kreyenschulte, D., Krull, R., & Margaritis, A. (2014). Recent advances in microbial biopolymer production and purification. *Critical Reviews in Biotechnology*, *34*(1), 1–15. https://doi.org/10.3109/07388551.2012.743501

Kumar, V., Sharma, D. K., Bansal, V., Mehta, D., Sangwan, R. S., & Yadav, S. K. (2019). Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium. *Bioresource Technology*, *275*, 430–433. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.042

Lee, S., Bae, I. Y., Jung, J.-H., Jang, K.-I., Kim, Y. W., & Lee, H. G. (2008). Physicochemical, textural and noodle-making properties of wheat dough containing alginate. *Journal of Texture Studies*, *39*(4), 393–404. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2008.00149.x

Li, H., Ma, F., Hu, M., Ma, C. W., Xiao, L., Zhang, J., Xiang, Y., & Huang, Z. (2014). Polysaccharides from medicinal herbs as potential therapeutics for aging and age-related neurodegeneration. *Rejuvenation Research*, *17*(2), 201–204.

Li, J. E., Cui, S. W., Nie, S.-P., & Xie, M.-Y. (2014). Structure and biological activities of a pectic polysaccharide from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. *Carbohydrate Polymers*, *105*, 276–284. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.081

Liao, Y., Gao, M., Wang, Y., Liu, X., Zhong, C., & Jia, S. (2022). Structural characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharide from *Aureobasidium pullulans* CGMCC 23063. *Carbohydrate Polymers*, *288*, 119366. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119366

Lin, E.-S., & Sung, S.-C. (2006). Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible *Basidiomycete Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(2), 182–187. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.010

Liu, J., Luo, J., Ye, H., & Zeng, X. (2012). Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(3–4), 767–772. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.016

Liu, Z., Pei, F., Zhu, J., Xue, D., Liu, Y., Liu, D., & Li, H. (2023). Production, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharide from *Sporidiobolus pararoseus* PFY-Z1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(1), 10. https://doi.org/10.1007/s11274-022-03453-8

Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, *110*, 52–61. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012

Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers*, *97*(2), 627–634. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.039

Mahdi, A., Musa, M., Ahmad, S. A., & Khalil, K. A. (2019). Optimization of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* KAKii cultivation conditions for exopolysaccharide production by using response surface methodology. *Malaysian Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.21161/mjm.180217

Mandawe, J., Infanzon, B., Eisele, A., Zaun, H., Kuballa, J., Davari, M. D., Jakob, F., Elling, L., & Schwaneberg, U. (2018). Directed Evolution of Hyaluronic Acid Synthase from *Pasteurella multocida* towards High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid. *ChemBioChem*, *19*(13), 1414–1423. https://doi.org/10.1002/cbic.201800093

Mao, Z., & Chen, R. R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. Biotechnology progress, 23(5), 1038-1042. https://doi.org/10.1021/bp070113n

Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012

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.

Müller, J. M., Santos, R. L. dos, & Brigido, R. V. (2011). Produção de alginato por microrganismos. *Polímeros*, *21*(4), 305–310. https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000051

Nampoothiri, K. M., Singhania, R. R., Sabarinath, C., & Pandey, A. (2003). Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, *38*(11), 1513–1519. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00321-7

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

Ni, D., Zhu, Y., Xu, W., Bai, Y., Zhang, T., & Mu, W. (2018). Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1209–1218.

Ozturk, S., & Aslim, B. (2010). Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*, *17*(3), 595–602. https://doi.org/10.1007/s11356-009-0233-2

Ozturk, S., Aslim, B., & Suludere, Z. (2010). Cadmium(II) sequestration characteristics by two isolates of Synechocystis sp. In terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology*, *101*(24), 9742–9748. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.105

Patil, S., & Shirsath, L. (2015). Production of exopolysaccharide by an osmotolerant thermostable and metal resistant *Bacillus subtilis*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *4*, 965–971.

Peiris, P., Dlamini, A., & Bavor, H. (1998). Optimization of bioprocess conditions for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(6), 917–919.

Peterson, S. W., Manitchotpisit, P., & Leathers, T. D. (2013). *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(2), 790–795. https://doi.org/10.1099/ijs.0.047613-0

Polak-Berecka, M., Waśko, A., & Kubik-Komar, A. (2014). Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Polish Journal of Microbiology*, *63*(2), 253.

Prajapati, V. D., Jani, G. K., Zala, B. S., & Khutliwala, T. A. (2013). An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*, *93*(2), 670–678. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.030

Prakash, S., Rajeswari, K., Divya, P., Ferlin, M., Rajeshwari, C. T., & Vanavil, B. (2018). Optimization and production of curdlan gum using *Bacillus cereus* PR3 isolated from rhizosphere of leguminous plant. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *48*(5), 408–418. https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1451886

Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica*, *63*(2), 129–140. https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4

Radchenkova, N., Panchev, I., Vassilev, S., Kuncheva, M., Dobreva, S., & Kambourova, M. (2015). Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. *Journal of Applied Microbiology*, *119*(5), 1301–1309. https://doi.org/10.1111/jam.12944

Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *157*, 577–583. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084

Riseh, R. S., Tamanadar, E., Pour, M. M., & Thakur, V. K. (2022). Novel approaches for encapsulation of plant probiotic bacteria with sustainable polymer gums: application in the management of pests and diseases. *Advances in Polymer Technology*, *2022*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2022/4419409

Rosalam, S., & England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris*. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 197–207. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.019

Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2015). High throughput exopolysaccharide screening platform: From strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydrate Polymers*, *122*, 212–220. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.021

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

Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496

Seo, B.-J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y.-H. (2015). Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, *49*(4), 282–292. https://doi.org/10.5530/ijper.49.4.6

Shoda, M., & Sugano, Y. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *10*(1), 1–8.

Shu, C.-H., & Lung, M.-Y. (2004). Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*, *39*(8), 931–937. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00220-6

Simpson, R., & Morris, G. A. (2014). The anti-diabetic potential of polysaccharides extracted from members of the cucurbit family: A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *3*(2), 106–114. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.03.003

Singh, R. S., Kaur, N., & Kennedy, J. F. (2019). Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydrate Polymers*, *217*, 46–57. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.050

Sivasankar, P., Seedevi, P., Poongodi, S., Sivakumar, M., Murugan, T., Sivakumar, L., Sivakumar, K., & Balasubramanian, T. (2018). Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. *Carbohydrate Polymers*, *181*, 752–759. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.082

Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, *120*, 102–114. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003

Sriprablom, J., Luangpituksa, P., Wongkongkatep, J., Pongtharangkul, T., & Suphantharika, M. (2019). Influence of pH and ionic strength on the physical and rheological properties and stability of whey protein stabilized o/w emulsions containing xanthan gum. *Journal of Food Engineering*, *242*, 141–152. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.031

Stoscheck, C. M. (1990). [6] Quantitation of protein. In *Methods in enzymology* (Vol. 182, pp. 50–68). Elsevier.

Subudhi, S., Bisht, V., Batta, N., Pathak, M., Devi, A., & Lal, B. (2016). Purification and characterization of exopolysaccharide bioflocculant produced by heavy metal resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 441–451. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.066

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

Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, *11*(9), 663–674. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1

Sze, J. H., Brownlie, J. C., & Love, C. A. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: A mini review. *3 Biotech*, *6*(1), 67. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0379-9

Taqieddin, E., & Amiji, M. (2004). Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, *25*(10), 1937–1945. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.034

Thu, H.-E., Zulfakar, M. H., & Ng, S.-F. (2012). Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, *434*(1–2), 375–383. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.044

Torres, C. A. V., Antunes, S., Ricardo, A. R., Grandfils, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. A. M. (2012). Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. *Bioresource Technology*, *119*, 148–156. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.106

Tuysuz, E., 2020. *Bacillus licheniformis* EY2 ile koyun yününden hazırlanan protein hidrolizatının biyoteknolojik potansiyelinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Vazquez-Rodriguez, A., Vasto-Anzaldo, X. G., Barboza Perez, D., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., García-Rivas, G., Garza-Cervantes, J. A., Gómez-Lugo, J. J., Gomez-Loredo, A. E., Garza Gonzalez, M. T., Zarate, X., & Morones-Ramirez, J. R. (2018). Microbial competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of non-toxic exopolysaccharide with applications as a wide-spectrum antimicrobial. *Scientific Reports, 8*(1), 798. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17908-8

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.

Vijayendra, S. V. N., Bansal, D., Prasad, M. S., & Nand, K. (2001). Jaggery: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77. *Process Biochemistry, 37*(4), 359–364. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00214-X

Vijayendra, S. V. N., & Shamala, T. R. (2014). Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical Reviews in Biotechnology, 34*(4), 338–357. https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798254

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., & Sani, R. K. (2019). Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium—*Geobacillus* sp. WSUCF1. *Scientific Reports*, *9*(1), 1608. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36983-z

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*, *205*, 8–26. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.011

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2021). Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New Biotechnology*, *61*, 29–39. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.004

Wang, X.-Y.-Z., Dong, J.-J., Xu, G.-C., Han, R.-Z., & Ni, Y. (2016). Enhanced curdlan production with nitrogen feeding during polysaccharide synthesis by *Rhizobium radiobacter*. *Carbohydrate Polymers*, *150*, 385–391. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.036

Wani, S. M., Mir, S. A., Khanday, F. A., & Masoodi, F. A. (2021). Advances in pullulan production from agro-based wastes by *Aureobasidium pullulans* and its applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *74*, 102846. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102846

Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., DeAngelis, P. L., Weigel, P. H., & Brown, S. (2005). Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 3747–3752. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., & Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *185*, 317–335. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045

Wu, M.-H., Pan, T.-M., Wu, Y.-J., Chang, S.-J., Chang, M.-S., & Hu, C.-Y. (2010). Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(1), 104–110. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.003

Wu, X., Li, O., Chen, Y., Zhu, L., Qian, C., Teng, Y., & Tao, X. (2011). A carotenoid-free mutant strain of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 for the commercial production of gellan. *Carbohydrate Polymers*, *84*(3), 1201–1207. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.018

Xiao, J. H., Chen, D. X., Liu, J. W., Liu, Z. L., Wan, W. H., Fang, N., Xiao, Y., Qi, Y., & Liang, Z. Q. (2004). Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(5), 1105–1116. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02235.x

Xie, L., Shen, M., Wang, Z., & Xie, J. (2021). Structure, function and food applications of carboxymethylated polysaccharides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 539–557. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.016

Xu, W., Wang, X., Sandler, N., Willför, S., & Xu, C. (2018). Three-Dimensional Printing of Wood-Derived Biopolymers: A Review Focused on Biomedical Applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(5), 5663–5680. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03924

Yasar Yildiz, S., Anzelmo, G., Ozer, T., Radchenkova, N., Genc, S., Di Donato, P., Nicolaus, B., Toksoy Oner, E., & Kambourova, M. (2014). *Brevibacillus themoruber*: A promising microbial cell factory for exopolysaccharide production. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(2), 314–324. https://doi.org/10.1111/jam.12362

Yeesang, C., Chanthachum, S., & Cheirsilp, B. (2008). Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(7), 1195–1201. https://doi.org/10.1007/s11274-007-9592-3

Yilmaz, M., Celik, G. Y., Aslim, B., & Onbasili, D. (2012). Influence of carbon sources on the production and characterization of the exopolysaccharide (EPS) by *Bacillus sphaericus* 7055 Strain. *Journal of Polymers and the Environment*, *20*(1), 152–156. https://doi.org/10.1007/s10924-011-0358-5

Yilmaz, M. T., Ispirli, H., Taylan, O., Alamoudi, M., & Dertli, E. (2022). Bioactive and technological properties of an α-D-glucan synthesized by *Weissella cibaria* PDER21. *Carbohydrate Polymers*, *285*, 119227. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119227

Zhan, X.-B., Lin, C.-C., & Zhang, H.-T. (2012). Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(2), 525–531. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3740-2

Zhang, H.-T., Zhan, X.-B., Zheng, Z.-Y., Wu, J.-R., English, N., Yu, X.-B., & Lin, C.-C. (2012). Improved curdlan fermentation process based on optimization of dissolved oxygen combined with pH control and metabolic characterization of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(1), 367–379. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3448-3

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., & Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, *54*, 270–275. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037

Zhang, R., & Edgar, K. J. (2014). Properties, Chemistry, and Applications of the Bioactive Polysaccharide Curdlan. *Biomacromolecules*, *15*(4), 1079–1096. https://doi.org/10.1021/bm500038g

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

Zhao, S., Cao, F., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, F., & Liang, X. (2014). Structural characterization and biosorption of exopolysaccharides from *Anoxybacillus* sp. R4-33 isolated from radioactive radon hot spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(5), 2732–2746.

Zheng, Z. Y., Jiang, Y., Zhan, X. B., Ma, L. W., Wu, J. R., Zhang, L. M., & Lin, C. C. (2014). An increase of curdlan productivity by integration of carbon/nitrogen sources control and sequencing dual fed-batch fermentors operation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *50*(1), 35–42. https://doi.org/10.1134/S000368381401013X

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

Zimmer, E. A., & Roalson, E. (2005). *Molecular Evolution, Producing the Biochemical Data, Part B*. Elsevier.

Zou, Y.-F., Chen, X.-F., Malterud, K. E., Rise, F., Barsett, H., Inngjerdingen, K. T., Michaelsen, T. E., & Paulsen, B. S. (2014). Structural features and complement fixing activity of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. Var. Modesta L.T.Shen roots. *Carbohydrate Polymers*, *113*, 420–429. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.036

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Berrin ALGÜL
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek Lisans:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1.	