LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE EKSTRASELÜLER POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Yaprak İlayda KARADAYİ

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2020
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE EKSTRASELÜLER POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Yaprak İlayda KARADAYİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2020

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE EKSTRASELÜLER POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Yaprak İlayda KARADAYİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 08/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / ~~oy çokluğu~~ (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Mesut TAŞKIN	İmza	:
Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 16.01.2020 tarih ve .03..../..55..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
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.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN BAKTERİLERLE EKSTRASELÜLER POLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Yaprak İlayda KARADAYİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

EPS'ler hücreyi olumsuz dış etkilerden korumak, antibakteriyel, ağır metaller ve toksik bileşikler gibi tehlikeli çevresel faktörlere karşı savunmada kullanılmaktadır. Farklı fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri sayesinde gıda, ilaç, kozmetik, petrol ve tekstil gibi birçok alanda kullanıldığı için büyük önem arz etmektedir. Bu doğrultuda EPS üretimi için ucuz substrat olarak nitelendirilen şeker fabrikası yan ürünü olan melas kullanılmıştır. Mikrobiyal EPS üretimi için Erzurum bölgesinde ki (Ilıca, Pasinler, Köprüköy) termal kaplıcalarından alınan su örneklerinden, toplam 28 termofilik bakterinin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu bakterilerin herbirinin EPS üretim kapasitesi araştırılmıştır. En yüksek EPS üretimi YK-25 izolatı ile 3,2 g/l şeklinde belirlenmiştir. Bu izolatın tanısı için, 16S rRNA dizi analizi yapılmış ve %99 oranında *Anoxybacillus gonensis* suşuna benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra *A. gonensis* YK-25 bakterisi EPS üretim verimini artırabilmek için kültür parametrelerinin (pH, sıcaklık, pepton, inkübasyon süresi ve melas konsantrasyonu) optimizasyonu yapılmıştır. Beklenen optimal değerler pH 7, sıcaklık 55°C, melas konsantrasyonu 100 ml/l, pepton konsantrasyonu 6 g/l, inkübasyon süresi ise 96 saat olarak bulunmuştur. Bu optimal değerlerle gerçekleştirilen deneyler sonucunda; 3,2 g/l EPS miktarı 4,4 g/l'ye yükselmiştir. Bu EPS'nin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve moleküler ağırlığı 102 kDa olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca EPS'nin konsantrasyonuna bağlı olarak, SHSY-5Y, Caco-2, HT-29, A-549 ve DU-145 kanser hücre hatlarında antikarsinojen etki gösterdiği tespit edilmiştir.

2020, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Thermophilic bacteria, isolation, identification, Anoxybacillus gonensis, molasses, exopolysaccharide

ABSTRACT

Master Thesis

EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE PRODUCTION WITH LOCALLY ISOLATED BACTERIA

Yaprak İlayda KARADAYİ

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Molecular Biology and Genetic
Microbiology Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Exopolysaccharides (EPS) are used to protect the cell from negative external influences and to defend against dangerous environmental factors such as antibacterial, heavy metals and toxic compounds. Due to its different physical, chemical and rheological properties, it is of great importance since it will be used in many fields such as food, medicine, cosmetics, petroleum and textiles. Accordingly, molasses, a by-product of sugar factory, which is considered as a cheap substrate, was utilised for EPS production. A total of 28 thermophilic bacteria were isolated from water samples obtained from thermal springs situated in Erzurum province (Ilıca, Pasinler, Köprüköy) for microbial EPS production and EPS production capacity of these isolates was investigated. The highest EPS production was determined as 3.2 g / l with YK-25 isolate. For the identification of this isolate, 16S rRNA sequence analysis was performed and it was designated that the isolate was similar to *Anoxybacillus gonensis* with rate of 99%. Then, the culture parameters (pH, temperature, peptone, incubation time and molasses concentration) were optimized in order to increase EPS production yield of *A. gonensis* YK-25 bacteria. The expected optimal values were noted as pH 7, temperature 55°C, molasses concentration 100 mL/L, peptone concentration 6 g/L and incubation time 96 h. After consequence of experiments performed with these optimal values, 3.2 g/L EPS was increased to 4.4 g/L. Characterization studies of this EPS have been carried out and molecular weight was observed as 102 kDa. In addition, depending on the concentration of EPS, SHSY-5Y, Caco-2, HT-29, A-549 and DU-145 were found to show anticarcinogenic effects in cancer cell lines.

2020, 70 pages

Keywords: Thermal spring, isolation, *Anoxybacillus gonensis* YK25, exopolysaccharide, thermophilic bacteria, molasses

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü, Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren desteğini her zaman hissettiğim, bana inanan, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan, her türlü laboratuvar imkânını sağlayan Bölüm Başkanımız ve hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, tezimin deneysel aşamalarında büyük bir özveriyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla benimle ilgilenen çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her türlü sevinç ve üzüntümü paylaştığım, gerek laboratuvar çalışmalarımda gerekse tez yazım aşamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli dostlarım Behiye TAŞER, Esra PALABIYIK, Meryem DOYMUŞ, Handan UĞUZ, Tuğba ORAK, Şeyda ALBAYRAK ve Arş. Gör. Elanur TUYSUZ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, her aşamada yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI ve Sayın Arş.Gör. Mehmet Akif ÖMEREOĞLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca maddi, manevi hiçbir fedakarlık ve destekten kaçınmayan, duaları her zaman benimle olan babam Adem KARADAYİ ve annem Kezban KARADAYİ'ya, abim Ufuk Sefa KARADAYİ, kardeşlerim Muhammet Halil KARADAYİ ve Atabey KARADAYİ'ya teşekkürü borç bilirim.

Yaprak İlayda KARADAYİ
Ocak, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Karbonhidratlar 1
1.1.1. Monosakkaritler 1
1.1.2. Disakkaritler 1
1.1.3. Polisakkarit 2
1.2. Ekzopolisakkaritler ve Özellikleri 2
1.2.1. Ekzopolisakkaritlerin fizyolojik özellikleri 4
1.2.2. Ekzopolisakkaritlerin teknolojik özellikleri 5
1.2.3 Ekzopolisakkaritlerin reolojik özellikleri 6
1.3. EPS'nin Biyokimyası 7
1.4. EPS Üretimi 8
1.5. EPS'nin Kullanım Alanları 11
1.5.1. Gıda alanında uygulamaları 11
1.5.2. Eczacılıkta ve tıpta ekstraselüler polisakkaritler 13
1.5.3. Biyoteknolojide EPS uygulamaları 16
1.6. EPS Üreten Mikroorganizmalar 17
1.6.1. *Bacillus* cinsi bakteriler 19
1.6.1.a. *Anoxybacillus gonensis* 20
1.6.1.b. *Anoxybacillus* için büyüme ortamı 21
2. KAYNAK ÖZETLERİ 23
3. MATERYAL ve YÖNTEM 28
3.1. Materyal 28
3.1.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar 28

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar 29
3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması 30
3.2. Yöntemler 32
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu 32
3.2.2. İzolatların EPS üretim kapasitelerinin karşılaştırılması 32
3.2.3. Seçilen izolatın konvensiyonel yöntemlerle karakterizasyonu 33
3.2.4. Seçilen izolatın moleküler yöntemlerle karakterizasyonu 33
3.2.4.a. Bakteriden genomik DNA izolasyonu 33
3.2.4.b. 16S rRNA PCR analizi 34
3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi 35
3.2.4.d. Klonlama 35
3.2.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretiminin optimizasyonu 40
3.2.5.a. EPS üretiminde optimal pH değerinin belirlenmesi 40
3.2.5.b. EPS üretiminde optimal sıcaklık değerinin belirlenmesi 41
3.2.5.c. EPS üretiminde optimal melas konsantrasyonunun belirlenmesi 41
3.2.5.d. EPS üretiminde optimal pepton konsantrasyonunun belirlenmesi 42
3.2.6. Üretilen EPS'nin karakterizasyonu 42
3.2.6.a. Şeker kompozisyonunun belirlenmesi 43
3.2.6.b. Molekül ağırlığının belirlenmesi 43
3.2.7. Üretilen EPS'nin biyolojik aktivitesi 43
3.2.7.a. EPS'nin antibakteriyel aktivitesi 43
3.2.7.b. EPS'nin antikanser aktivitesi 44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 45
4.1. Bakterilerin İzolasyonu 45
4.3. İzolatın Konvensiyonel Test Sonuçları 46
4.4. Optimizasyon Denemeleri 46
4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi 47
4.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi 48
4.4.3. Optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi 49
4.4.4. Optimum pepton konsantrasyonunun belirlenmesi 50
4.4.4. Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi 51
4.5. Üretilen EPS'nin Karakterizasyonu 52

4.5.1. EPS'nin şeker kompozisyonunun belirlenmesi 52
4.5.2. EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi 52
4.6. Üretilen EPS'nin Biyolojik Aktivitesi 53
4.6.1. EPS'nin antibakteriyal aktivitesi 53
4.6.2. EPS'nin antikanser aktivitesi 53
5. TARTIŞMA SONUÇ 56
KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikrolitre
CPS	Kapsüler polisakkarit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EPS	Ekzopolisakkarit
g	Gram
H_2SO_4	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
LAB	Laktik asit bakterisi
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molarite
ml	Mililitre
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SMC	Düz kas hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Levan ve dextran'ın homopolisakkarit yapısı 3
Şekil 1.2. Xsantan'ın heteropolissakkarit yapısı 4
Şekil 1.3. Biyopolimerik sulu çözeltilerin reolojik özelliklerini etkileyen faktörler 6
Şekil 1.4. Şeker fermantasyonunda rol oynayan yolların glikoliz yoluyla şematik gösterimi 8
Şekil 1.5. Ekzopolisakkaritlerin genel kullanım alanları 13
Şekil 4.1. *Anoxybacillus gonensis* YK25'in filogenetik ağacı 46
Şekil 4.2. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine başlangıç pH'sının etkisi 47
Şekil 4.3. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine sıcaklığın etkisi 48
Şekil 4.4. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi 49
Şekil 4.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi 50
Şekil 4.6. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi 51
Şekil 4.7. EPS'nin şeker kromotogramı 52
Şekil 4.8. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, A-549 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu 53
Şekil 4.9. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, Caco-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu 54
Şekil 4.10. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, HT-29 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu 54
Şekil 4.11. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, DU-145 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu 55
Şekil 4.12. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, SHSY-5Y hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu 55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ana ekzopolisakkaritlerin endüstriyel üretimi....10
Çizelge 1.2. EPS için gıda uygulamaları....12
Çizelge 1.3. *Bacillus* cinsinin taksonomisi....19
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar....28
Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler....29
Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı....34
Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR programı....35
Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan kimyasallar....36
Çizelge 3.6. Koloni PCR'da kullanılan bileşenler ve miktarları....38
Çizelge 3.7. Koloni PCR programı....38
Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının EPS üretme yeteneklerinin araştırılması....45
Çizelge 4.2. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine başlangıç pH'sının etkisi....47
Çizelge 4.3. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine sıcaklığın etkisi....48
Çizelge 4.4. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi....49
Çizelge 4.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi....50
Çizelge 4.6. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi....51
Çizelge 4.7. EPS'de belirlenen şekerler ve miktarları....52

1. GİRİŞ

1.1. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, birden fazla hidroksil (-OH) grubu içeren alkollerin aldehit ya da keton türevleri veya bu türevlerin hidrolizi ile oluşan yapılardır. Bu moleküller, günümüzde yaşayan tüm canlılarda mevcuttur ve genellikle üç büyük sınıfa ayrılarak incelenirler: (Carl 2005).

1) Monosakkaritler 2) Disakkaritler 3) Polisakkaritler

1.1.1. Monosakkaritler

Aldehit ya da keton yapısında olan monosakkaritler, bir veya daha fazla hidroksil grubu içren karbonhidratlardır. Reaktif gruplarına göre; aldozlar (aldehit grubu içerenler), ketozlar (keton grubu içerenler) olarak sınıflandırılırken; karbon zincirinin uzunluğuna göre; triozlar, tetrozlar, pentozlar, heksozlar ve heptozlar olarak sınıflandırılırlar. Doğada ve organizmada en yaygın bulunan monosakkaritler; trioz, pentoz ve heksozlardır. Heksozlardan en fazla bulunanları ise glukoz, fruktoz, galaktoz ve mannozdur (Carl 2005).

1.1.2. Disakkaritler

Disakkaritler, iki monosakkaritin bir su kaybederek glikozidik bağla kovalent olarak bağlanması sonucu oluşmuş bileşiklerdir. En yaygın bulunan disakkaritler; maltoz, sükroz ve laktoz'dur (Carl 2005).

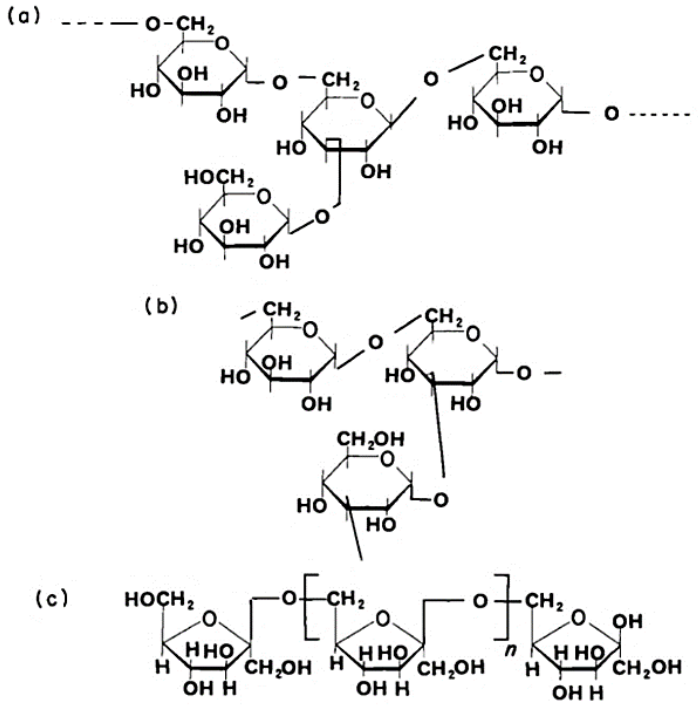
1.1.3. Polisakkarit

Pek çok sayıda monosakkarit veya monosakkarit türevi molekülün art arda glikozid bağ ile bağlanması sonucu oluşan yapılar polisakkarit olarak adlandırılır. Polisakkaritler; zincirleri boyunca tekrarlayan monosakkarit ünitelerinin benzerliği, bu üniteleri bağlayan bağların tipi ve dallanma derecesi bakımından birbirlerinden farklıdır (Montgomery *et al.* 2000).

1.2. Ekzopolisakkaritler ve Özellikleri

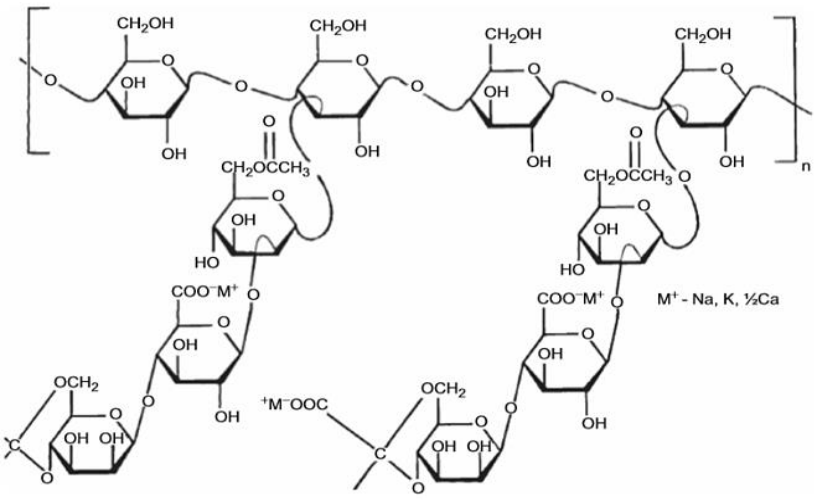
Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS), monosakkaritlerin glikozidik bağı ile bağlanmasıyla oluşan düz veya dallanmış yapıya sahip biyopolimerlerdir. EPS türleri genellikle heksoz ve pentoz yapılarından oluşmaktadır (Bhaskar and Bhosle 2005). Yüksek moleküler ağırlığına sahip EPS'ler; DNA, protein, lipid, humik asit, nükleik asit, fosfolipid ve diğer polimerik bileşiklerden meydana gelen yapılardır (Singh *et al.* 2011). Mikrobiyal EPS'ler doğada iyonik veya iyonik olmayan formda bulunup, suda çözünebilirler. Molekül büyüklükleri genel olarak 10 kDA ile 200 kDa arasında değişmekle birlikte 1000 kDa'a kadar da çıkabilmektedir (Singh *et al.* 2011).

EPS'ler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır, Homopolisakkaritler, üç veya daha fazla aynı monosakkaritten oluşurken, heteropolisakkaritler farklı monosakkaritlerin birleşmesiyle meydana gelmektedir (Minervini *et al.* 2010). Levan ve Dekstran gibi homopolisakkaritler tek tip monosakkaritten oluşmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Levan ve dextran'ın homopolisakkarit yapısı

Jellan ve Ksantan gibi heteropolisakkaritler ise birkaç çeşit monosakkaritten meydana gelmektedir (Şekil 1.2) Heteropolisakkaritler, çoğunlukla hücre içinde sentezlenmekte ve bakteriyel EPS grubunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Donot *et al.* 2012). Kültür ortamında, mikroorganizmanın çevresini saran EPS, polimerik yapıdadır ve saflaştırılmasında peptid, karbonhidrat, protein gibi yapılar güçlük çıkarmaktadır (Cerning 1995).



Şekil 1.2. Xsantan'ın heteropolissakkarit yapısı

EPS'lerin görevi hücreyi olumsuz dış etkilerden korumaktadır. EPS protein ve fosfat gibi makromoleküllerin depolanmasının, genetik bilginin korunması, enerji üretimi enerji indirgenmesi, antibakteriyel ve ağır metaller gibi tehlikeli çevresel faktörlere karşı savunma gibi önemli rolleri bulunmaktadır (Donot *et al.* 2012).

EPS'ler mikroorganizmayı kurumaya, fagositoza, faj saldırılarına, antibiyotiklere, toksik bileşiklere ve ozmotik strese karşı korumaktadırAyrıca hücrenin katı yüzeylere tutunmasını sağlayarak biyofilm oluşumunda etkilidir (Singh *et al.* 2006).

EPS'ler sahip oldukları farklı fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri sayesinde gıda, ilaç, kozmetik, petrol, tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu durum mikrobiyal kaynaklı EPS'lere olan ilginin giderek artmasına, onların daha değerli hale gelmesine olanak sağlamaktadır (Onbaşılı 2006).

1.2.1. Ekzopolisakkaritlerin fizyolojik özellikleri

EPS'ler bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterol düşürücü, antiülser, antitümör, antimutajenik gibi olumlu özelliklere sahiptir (De Vuyst and Degeest 1999; Tsuda *et al.* 2008). Serbest radikallerin organizmaya verdiği hasarı önlemek amacıyla sentetik ve

doğal antioksidanlar kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların karsinogenez ve karaciğer hasarına neden olduğu bilindiğinden insan sağlığını serbest radikallerden koruyan doğal ve toksik olmayan antioksidanların üretimi ortaya çıkarmıştır (Liu *et al.* 2009; Mahapatra and Banerjee 2013). Bu nedenden dolayı antioksidan ve serbest radikal bağlayıcı özelliğe sahip olan EPS'nin kullanımı artmıştır. EPS'ler bitkisel yağların oksidasyonunu serbest radikalleri bağlayarak gerçekleştirirler. (Kishk and Al-Sayed 2007).

EPS'ler sindirim sisteminde bulunan bakteriler tarafından parçalanamadıkları için prebiyotik özellik göstermektedirler. bifidobakteri üyelerinin ürettiği EPS'nin, bağırsakta bulunan mikroorganizmalar arasında etkileşimi modifiye ettiği ise yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Salazar *et al.* 2008).

1.2.2. Ekzopolisakkaritlerin teknolojik özellikleri

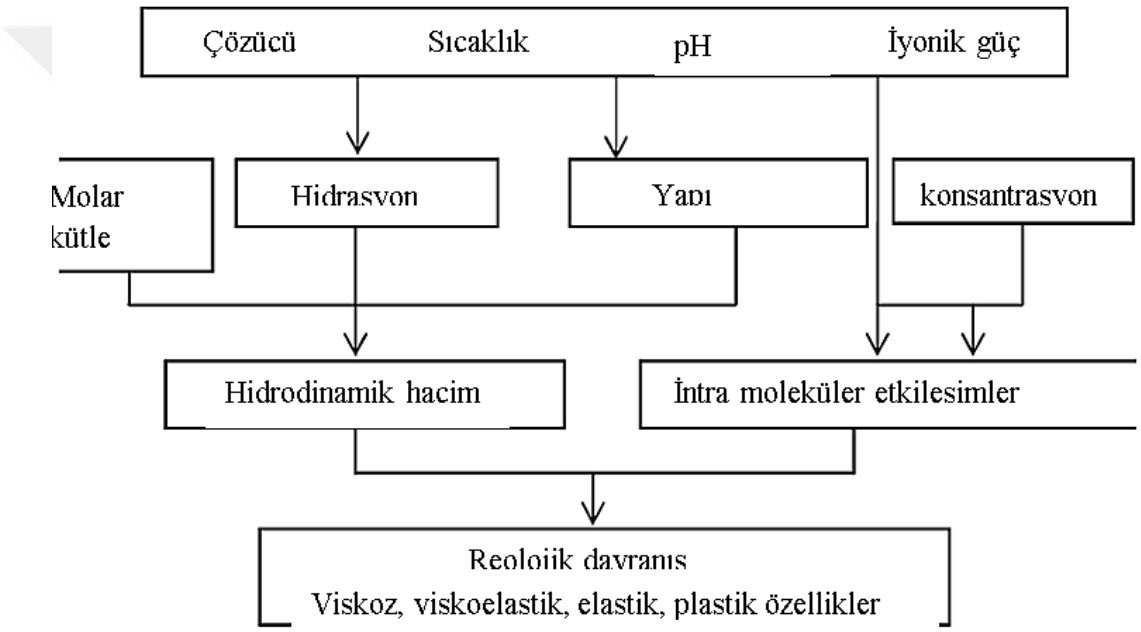
Mikrobiyal EPS'ler ve türevleri sentetik polimerlere göre farklı fizyolojik aktiviteye sahip olduklarından dolayı gıda, ilaç ve diğer endüstriler dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (Kumar *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2009).

EPS'lerin viskoziteyi artırıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, emülsiye ve stabilize edici özellikleri bulunduğu için EPS üreten laktik asit bakterisi (LAB) gıda sanayisinde kullanılmaktadır. LAB tarafından üretilen ve GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer alan EPS'ler başta süt endüstrisinde olmak üzere, çiğ gıdaların sebze ve et gibi ürünlerin fermantasyonunda endüstriyel olarak kullanılmaktadırlar (Welman and Maddox 2003).

EPS'lerin gıdalarda katkı maddesinin kullanımını azaltmak, yoğurdun yapısını düzenlemek, aromasını geliştirmek, viskozitesini artırmak, lezzetin daha iyi algılanır olmasını sağlamak ve ağızdaki hissin iyileştirmek gibi rolleri bulunmaktadır (Patel and Prajapat 2013).

1.2.3 Ekzopolisakkaritlerin reolojik özellikleri

EPS'lerin bileşimi ve yapısı, farklı özelliklere bağlı olarak büyük çeşitlilik gözlenmektedir (Levander *et al.* 2002). Polisakkarit çözeltileri biyoproses, biyopolimer kalitesi, mikroyapı ve dokusal analiz hakkında bilgi sunmaktadır. Ayrıca fiziksel ve kimyasal faktörlerin bu moleküllerin reolojik özellikler üzerindeki etkisi oldukça önemlidir,



Şekil 1.3. Biyopolimerik sulu çözeltilerin reolojik özelliklerini etkileyen faktörler (Mironescu 2003)

Moleküllerin boyutu, çeşitli kayma hareketlerinde reolojik davranışı etkiler. Bakteriyel polisakkaritler, immün yanıtlar oluşturan hücreleri çevresel streslerden korumak ve ayrıca çeşitli ekolojik nişlerin kolonizasyonunu arttırmak için önerilmektedir. Bakteriyel polisakkaritler, ayrıca sahip oldukları bu reolojik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda oldukça önemli yerdedir (Sutherland 1990).

EPS'in reolojik analizi için iki ölçüm sistemi önerilir: paralel plaka ve koni plaka geometrileri. Bu geometrileri kullanarak, kararlı hal ve dinamik ölçümler yapılabilir;

Birinci analizler polisakkaritlerin akış davranışı hakkında bilgi verirken, ikincisi viskoelastik davranışı karakterize etmektedir (Mironescu 2003).

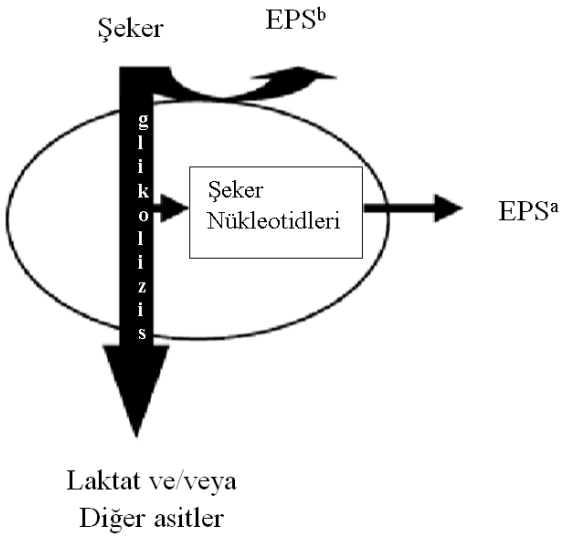
1.3. EPS'nin Biyokimyası

Mikrobiyal polisakkaritler, hücre duvarlarının bir bileşeni olan O-antijenleri olarak adlandırılan hücre yüzeyi ile kovalent olarak bağlanmış lipopolisakkaritlerin (LPS) bir parçasıdır ayrıca bunlar ekzopolisakkaritler (EPS) halinde salgılanan kapsüler polisakkaritler (CPS) olarak bulunabilmektedirler. CPS ve LPS gibi hücre ile ilişkili polisakkaritler önemli bir tıbbi öneme sahiptir. (Boels *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2003).

Polisakkarit üreten gen kümeleri Gram (-) bakterilerde incelendiğinde gen kümelerinin genel organizasyonu korunmuş görünmektedir. Polimerizasyonda yer alan her kümenin başında varsayılan bir düzenleyici bölge bulunmaktadır. Bu O-antijen sentezinde yer alan genler, homolojileri benzer biyosentetik yolaklara işaret etmektedir (Stingele *et al.* 1999).

Şeker birimleri farklı oranlarda ağırlıklı olarak glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluşmaktadır. Büyüme sırasında çevrelerine salgılanmakta ve mikrobiyal hücrenin yüzeyine kalıcı olarak bağlı kalmazlar. Bu, onları hücre yüzeyine kalıcı bir şekilde bağlı kalan yapısal olarak benzer kapsüler polisakkaritlerden ayırmaktadır (Welman and Maddox 2003).

EPS sınıfları biyokimyasal olarak farklı sınıflara ayrılmaktadır. Birinci sınıf, dekstran, levan ve mutan gibi hücre dışı olarak üretilen homopolisakkaritleri içerir. Bu noktada, polimerizasyon reaksiyonu, bir monosakkaritten disakkaritte doğru ilerleyen hücre dışı glikosiltransferazlar yoluyla gerçekleşmektedir (Şekil 1.4). Diğer kategoriler, hücre içi şeker nükleotit öncüllerinden sentezlenen düzenli olmayan tekrarlayan birimler içeren homo ve hetero-polisakkaritler içermektedir (Boels *et al.* 2001).



Şekil 1.4. Şeker fermantasyonunda rol oynayan yolların glikoliz yoluyla şematik gösterimi (laktat ve/veya diğer asitlerin ve ekzopolisakkaritlerin (EPS) hücre içi şekerden biyosentezi) (Boels *et al*. 2001)

1.4. EPS Üretimi

EPS üretimi bakteriyel üreme ile ilişkili olup optimum şartlar altında bu üretim yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bakteriyel gelişim ve EPS üretimi; besiyerine konulan karbonhidrat, azot kaynağı, vitamin, tuz gibi maddeler ile inkübasyon sıcaklığı, süresi, oksijen seviyesi, pH gibi etmenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (De Vuyst and Degeest 1999). Bakteriyel EPS üretimi genellikle aerobik koşullar altında gerçekleşmektedir. Ksantam gum gibi EPS'ler için maksimum havalandırma gerekirken, bakteriyel aljinat için mikroaerofilik koşullar yeterlidir (Rehm 2009).

Ekzopolisakkarit salgılanması 'Quorum sensing' olarak adlandırılan, bakteri yoğunluğuna bağlı olarak spesifik feromonların salgılanması ile başlamaktadır. Salgılanan feromonlar antibiyotik üretimi, biyofilm oluşumu, sporulasyon gibi biyokimyasal olayları başlatmaktadır (Donlan 2002).

Polisakkaritler, bakteri suşlarını farklı evrelerine göre değişken koşullarda sentezlenmektedir. EPS'nin sentezi hücre membranında veya hücre dışında

gerçekleşmektedir (Donlan 2002). Bakteriyel EPS nin sentezi ise hücre içinde gerçekleşmekte ve hücre dışına makro molekül olarak salgılanmaktadır. Salgılanan enzimler hücre dışında subsratı polimere dönüştürmektedir. Bunun dışında levan ve dekstran gibi istisna durumlar da mevcuttur. EPS sentezi ve polimerizasyonu hücre dışında meydana gelir (Freitas *et al.* 2011).

EPS'lerin oluşumunda (Sutherland 1977);

- UDP-glukoz-dehidrogenaz
- glukozil-transferaz
- galaktozil – transferaz 1 ve 2
- polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır (Sutherland 1990).

Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenmekte ve hücre dışına çıkarıldığında hücrenin etrafını sarmaktadırlar. İşlemler sırasında birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır ve bu enzimlerin bir kısmı lipopolisakkaritlerin sentezinde görev almaktadır. Nötral homopolisakkaritlerin sentezleri birbirinden farklıdır (nötral levan ve dekstran homopolisakkaritlerinde olduğu gibi). Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sükroz varlığında sırasıyla, levansukraz ve dekstransukraz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedir (Sutherland 1990).

EPS sentezi intraselüler bir süreçtir (Kumar *et al.* 2007). Çoğunlukla kromozomlara lokalize olmuş genler tarafından düzenlenmektedir fakat bazı türlerde megaplazmid ve kromozom olarak iki farklı yolla kontrol edilmektedir (Mishra and Jha 2013). Üretilen polimere göre de 12-17 kb büyüklüğünde gen sekansına gereksinim duyulur (Freitas *et al.* 2011).

EPS üretiminde fermantasyon sıvısının reolojisi önemlidir. Viskozitenin artışı ortamın homojenitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu durum ise karıştırmayı, havalandırmayı ve bioreaktör olan şartların kontrolünü zorlaştırmaktadır (Freitas *et al.* 2011).

Çizelge 1.1. Ana ekzopolisakkaritlerin endüstriyel üretimi (Mironescu 2003)

Ekzopolisakkarit	Kültür sistemi	Kültür durumu	Kültür ortamı
Alginat	Sürekli	30°C pH 7,2; Oksijen varlığında ve çalkalamalı	karbon kaynağı sükroz(20g/l), yüksek üretim hızı fosfor sınırlaması veya düşük Oranda dilüsyon
Dextran	Kesikli	25°C oksijensiz ortam	karbon kaynağı sükroz
Xanthan	Kesikli	28°C, pH 7,0; havalandırma ve çalkalamalı	karbon kaynağı glukoz
Xanthan	Sürekli	28°C, pH 7,0; havalandırma ve çalkalamalı	dilüsyon oranı kontrollü nitrojen, sülfür potasyum sınırlı

Metabolik mühendisliği EPS üretiminde umut verici alanlardan biridir ve bu nedenle üretim bu yolla gerçekleşmektedir. Üretim, enzim genlerinin geliştirilmesi ve gen ekspresyonunu düzenleyen genlerin değiştirilmesi ile gerçekleşmektedir. Biyosentetik süreç üç farklı seviyede kontrol edilmektedir. Bunlar şeker nükleotid öncülerinin sentezi, tekrarlayan birimlerin birleştirilmesini polimerizasyon ve dışa salım biyosentetik süreçleri içermektedir (Freitas *et al.* 2011).

EPS'ler agar plaklarında veya sıvı kültürde üretilebilmektedir (Yang *et al.* 2001) Çoğu mikrobiyal polisakkaritin üretimi, karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz veya sükroz içeren ortam kullanılarak karıştırılmalı tank fermentörlerinde gerçekleştirilir. Sentez, genellikle yüksek C:N oranlarına sahip ortamda gerçekleştirilmektedir. Fermantasyon sıvısının yüksek viskozitesi nedeniyle, önemli miktarda enerji girişi ile birlikte etkili karıştırma ve havalandırma gerekmektedir (Sutherland 2002).

1.5. EPS'nin Kullanım Alanları

Polisakkaritlerin endüstriyel kullanımları, yakın zamana kadar bitkilerden (nişasta, selüloz, pektinler, galaktomananlar, zamklar) veya alglerden (karragenan, aljinatlar, agar) ekstrakte edilmiş materyaller ile gerçekleşmekteydi. Ancak son 30 yılda, hücre dışı polisakaritlerin mikrobiyal üretimi için biyoteknoloji sistemler geliştirilmeye başlanmaktadır. Mikrobiyal kökenli polisakkaritler gıda endüstrisinde, biyoteknolojide, tıpta ve eczacılıkta büyük oranda kullanılmaktadır (Mironescu 2003; Sutherland 2002).

Birçok işlevselliğe sahip fiziko-kimyasal ve reolojik özellikleri nedeniyle, mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS) yeni biyomateryaller olarak işlev görmektedirler. EPS'nin endüstriyel alanda kullanıldığı sektör ise; tekstil, deterjanlar, yapıştırıcılar, mikrobik gelişmiş yağ geri kazanımı (MEOR), atık su arıtımı, tarama, demleme, kozmetik, farmakoloji ve gıda katkı maddeleri gibi uygulama alanlarıdır (Kumar *et al.* 2004).

Birçok bakteri virülans faktörleri, bakteri-bitki etkileşimlerindeki sinyal molekülleri veya koruyucu ajanlar gibi çeşitli fonksiyonlara sahip olabilecek polisakkaritler salgılamaktadır. Bu polimerlerin bazıları, gıda uygulamalarında viskozitör, stabilizatör, emülgatör veya jelleştirici özelliklere sahip ajanlar olarak kullanılmaktadırlar (Çizelge 1.2) (Kranenburg *et al.* 1997).

1.5.1. Gıda alanında uygulamaları

EPS'ler sahip oldukları farklı fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri sayesinde gıda, ilaç, kozmetik, petrol, tekstil gibi birçok alanda kullanım imkânına sahiptir. Bu durum mikrobiyal kaynaklı EPS'lere olan ilginin giderek artmasına, onların daha değerli hale gelmesine olanak sağlamıştır (Kranenburg *et al.* 1997).

Çizelge 1.2. EPS için gıda uygulamaları (Kranenburg *et al.* 1997)

Polimer	Bakteriyel Kaynak	Kullanımı	in-situ EPS
Xanthan	*X. campestris*	Viskozitör, Stabilizatör, Emülgatör	-
Acetan	*A. xylinum*	Viskozitör ve Jelleştirici madde	-
Gellan	*Sphingomonas*	Jelleştirici ajan, Stabilizatör, Süspansiyon ajanı	-
EPS	*S. thermophilus* *L. Lactis*	Viskozitör ve Hidrasyon ajanı	-

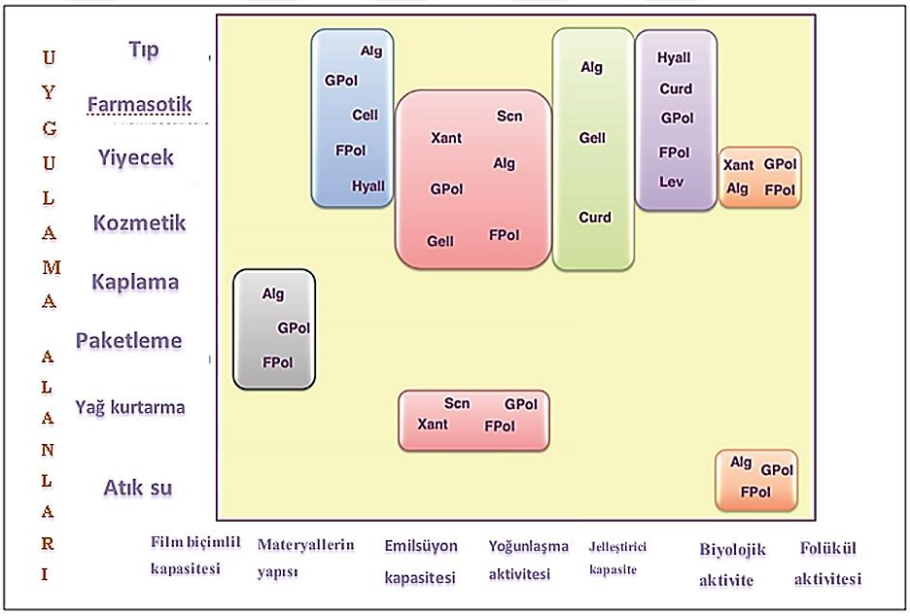
LAB kökenli olan EPS kaynağı gıda sanayisinde kullanılmaktadır. LAB tarafından üretilen ve GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer alan EPS'ler başta süt endüstrisinde olmak üzere, çiğ gıdaların; sebze ve et gibi ürünlerin fermantasyonunda endüstriyel ölçekte uygulanmaktadır (Welman and Maddox 2003).Duyusal özelliklerini değiştiren fiziksel, kimyasal ve enzimatik faktörlere ek olarak, gıdalardaki mikrobiyolojik değişiklikler, gıda zehirlenmesi de dahil olmak üzere çok çeşitli bozulma reaksiyonları meydana gelmektedir. (Gould 1991). Bu nedenle, gıdalardaki bozulma mikroorganizmaların büyümesini engellemek çok önemlidir. Doğal ve minimal işlenmiş gıdalara olan yoğun talep nedeniyle, LAB tarafından güvenli ve doğal bir gıda muhafaza yöntemi olarak üretilen antimikrobiyal bileşiklerin kullanımına olan ilgi artmaktadır (Qiao 1996). Yoğurt üretiminde yapının düzenlenmesi viskozite ve su tutma kapasitesinin ilerletilmesi için çeşitli EPS üreten bakteri türleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Ruas-Madiedo *et al.* 2002a).

EPS'nin kullanımı Kuzey ve Doğu Avrupa ile Asya bölgesinde üretilen yoğurtlarda da görülmektedir. EPS sentezleyen suşlarla yoğurtların reolojik ve tekstürel özellikleri hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Kodali *et al.* 2009).

Çok az sayıda EPS ticari olarak temin edilebilmektedir. Ancak sayı ve uygulamaları giderek artmaktadır (Lee *et al.* 2005). Dekstran, ticarileştirilen ve gıda kullanımı için onay

alan ilk mikrobiyal polisakkarit olmasına rağmen, bunun gibi birkaç polimeri çeşitli ticari amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır (Sutherland 2002).

Ksantan (*Xanthomonas campestis* pv. Campestris'den EPS) gibi mikrobiyal polisakkaritlerin bazıları modern biyoteknolojik sistemlerle üretilip ve geniş bir teknolojik satış sahasına sahiptir (Şekil 1.5). Pullulan gibi diğer polisakkaritler potansiyel olarak faydalı olup endüstriyel alanlarda büyük ilgi görmektedir. Mikrobiyal EPS'ler, eşsiz ve üstün fiziksel özelliklerinden dolayı geleneksel bitki polisakkaritlerinin oluşumunda umut vaadedicidir (Lee *et al.* 2005).



Şekil 1.5. Ekzopolisakkaritlerin genel kullanım alanları (Hamed and Belhadri 2009)

1.5.2. Eczacılıkta ve tıpta ekstraselüler polisakkaritler

Polisakkaritler, eczacılık ve tıp alanındaki farklı uygulamaların temelini oluşturan çok çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip yapısal olarak çeşitli bir biyolojik makromolekül sınıfı oluşturmaktadır. Doğada bol miktarda ve birçok bitki kaynağında bulunan bu grubun (polisakkarit hidrokolloidler) maddelerin ticari önemi vardır. Polisakkarit hidrokolloidlerin fonksiyonel olan özellikleri arasında; dengeleyici (süspansiyon

maddesi), koyulaştırıcı (film oluşturucu madde), pıhtılaştırıcı (su tutma maddesi) ve kolloid (yağlama maddesi veya sürtünme azaltıcı) yapıdadır (Franz 1989).

Çeşitli polisakkarit hidrokolloidlerin farmasötik amaçlar için önemi uzun bir geçmişe dayanmakta ve son yıllarda da önemi artmaktadır. Geçmişte ilaç olarak kullanım, yara tedavisi, kanser tedavisi, bakteriyel ve viral hastalıkların teşhisi, önlenmesi tedavisi gibi pek çok alanda kullanılmıştır. Bazı polisakkaritler zamanla kimyasal değişikliklere uğradıkları biyolojik ve terapötik aktivite kaybına neden olabilmektedir (Franz 1989).

Yine bazı polisakkaritler, uygun bir proteine bağlandıklarında aşıların ayrılmaz bileşenlerini oluşturdukları için *Streptococcus pneumoniae* ve *Klebsiella* spp.'ye karşı multivalent polisakkarit aşılar formülüze edilebilirler. Bazı mikrobiyal polisakkaritlerin tümörün baskılanmasında ve immün yanıtın uyarılmasındaki rolü incelendiğinde birkaç mantar türünden elde edilen 'Scleroglucan' veya şizofillan adlı bir homopolimer ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu moleküller sıralı, üçlü sarmal formda uygulandığında bazı kanserlere karşı çok etkili olduğu görülmektedir. β bağlantılı glukanlar bu nedenle Mevcut araştırmaların konusu olmuş ve Japonya'da klinik olarak test edilmiştir. Sonucunda ise bazı tümör türlerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (Sutherland 2002).

Polisakkaritler ayrıca insanlarda antitümör, antiviral ve antienflamatuar ajanlar gibi çeşitli fizyolojik aktivitelere sahip olmakla birlikte interferon, trombosit agregasyon inhibisyonu koloni uyarıcı faktör sentezi için de indükleyici olarak işlev görebilmektedir. Bu anlamda immün uyarıcı polisakkaritler tümör tedavisi için oldukça yeni ve çekici bir alandır (Kumar *et al.* 2004).

Bu doğrultuda toksik, immünojenik, mutajenik ve kanserojen olmayan doğası nedeniyle, hedeflenen ilaç ve gen iletimi, doku mühendisliği dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar için pullulanın kullanma çabası artmaktadır. Bu ekzopolimer hakkındaki erken gözlem, 1938'de Bauer tarafından yapılmıştır. 1959'da ise Bender ve arkadaşları tarafından pullulan olarak adlandırılmıştır. Pullulan ve türevleri ayrıca protez yapıştırıcısı olarak kullanılmıştır (Rekha and Sharma 2007; Singh *et al.* 2008).

Doku mühendisliği, hücreleri barındırabilen ve büyümelerini düzenleyen üç boyutlu doku rejenerasyonuna yol açan iskele veya yapay hücre dışı matris gerektirmektedir. Araştırmacılar karboksimetil pullulan heparin ile birleştirmiş ve doku mühendisliği uygulamalarına yönelik özelliklerini araştırmışlardır. Heparin konjuge pullulan, in vitro düz kas hücrelerinin (SMC'ler) çoğalmasını inhibe ettiği ve bu yapının vasküler endotelyal hücrelerin proliferasyonunu ve SMC'lerin proliferasyonunu inhibe etmek için kullanılabilir forma getirildiği belirtilmiştir (Rekha and Sharma 2007).

Gen tedavisi, pullulan uygulamasının araştırıldığı başka bir alandır. Gen terapisinin, çeşitli kalıtsal bozukluklar ve kanser için bir tedavi olduğu düşünülmektedir. Gen terapisi için virüs kullanılmıştır fakat virüslerin immünojenik ve tehlikeli olabileceği bilinmektedir (Mata *et al.* 2006).

Böylece viral olmayan vektörler geliştirme girişimleri başlatılmış olup ve bu amaçla doğal polimerlerin katyonik türevleri incelenmiştir. Bu nedenle, pullulan biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan bir gen dağıtım uygulaması için araştırılmaktadır (Mata *et al.* 2006).

EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Nicolaus *et al.* 1993). Bu yüzden, laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılmasına yönelik talep artmaktadır. Bir bakterinin probiyotik olması, asit ve safraya tolerans göstermesi, patojenik kardiyojenik bakterilere karşı antimikrobiyal bileşikler üretmesi, insan bağırsak mukozasını yapışma ve kolonize etme yeteneğine sahip olması anlamına gelmektedir (Maija 1995). Antimikrobiyal bileşik üretimi, normal gastrointestinal mikrofloraya karşı rekabetin artırılmasına, bağırsak mukozasında probiyotiklerin kolonizasyonuna fayda sağlamaktadır (Salminen *et al.* 1991a). Kapsüler polisakkaritin, bakterilerin biyolojik yüzeylere yapışmasını arttırdığı ve çeşitli ekolojik nişlerin kolonizasyonunu kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Costerton *et al.* 1987).

1.5.3. Biyoteknolojide EPS uygulamaları

Fiziksel yapısal çeşitliliği ve reolojik özellikleri nedeniyle gıda, ilaç, biyomedikal, biyolojik ıslah ve biyo dallanma alanlarında kullanılan mikroorganizmaların EPS ile büyük ilgisi bulunmaktadır (Fialho *et al.* 2008; Rehm 2009). Zamanla ilerleyen biyoteknoloji alanı, madencilik ve metalurji endüstrileri tarafından üretilen çevresel atıkların iyileştirilmesinde mikroorganizmaların uygulandığı bir alandır (Gadd 2004; Rawlings and Johnson 2007). Bu alanda çevre kirletici maddeleri elemine etmek ve bu endüstrilerden çevreye giren toksik atık miktarını azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Singh *et al.* 2006; Liu *et al.* 2008).

Son on yılda yapılan çalışmalarda, mikropların iyileştirme tekniklerinde kullanımı, geleneksel olan kimyasal ve fiziksel arıtma yöntemlerinde kullanımmına her geçen gün arttırmıştır (Singh *et al.* 2006; Liu *et al.* 2008; Pal and Paul 2008). Biyoremediasyon, biyolojik işlemlerin kullanılmasıyla kirletici veya kontamine edici maddelerin giderilmesi, zayıflatılması veya dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır (Lynch and Moffat 2005). Biyoremediasyon teknolojilerinin uygulamaları genel olarak ağır metaller, BTEX hidrokarbonları, petrol, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, mikroaromatikler, poliklorlu bifeniller, klorlu fenoller ve alifatikler gibi kirletici maddeleri hedef almaktadır (Lynch and Moffat 2005; Singh *et al.* 2006).

Biyofilm aracılı biyoremediasyonun, bir biyofilm içinde büyüyen hücrelerin farklı ortamlara ve sonraki hayatta kalma şanslarına daha fazla sahip olmaları nedeniyle, planktonik bakterilerin biyoremediasyonda daha etkili ve daha güvenli bir alternatif olduğu bulunmuştur (Donlan 2002; Singh *et al.* 2006). Biyofilmler, hücrelerin mineralizasyon süreçlerini iyileştirmelerine izin vererek optimal pH koşullarını, lokalize çözünen konsantrasyonlarını ve redoks potansiyelini korumaktadır (Singh *et al.* 2006). Biyofilm reaktörleri hidrokarbonları, ağır metalleri ve endüstriyel ve belediye atık suyu gibi büyük hacimlerde seyreltilmiş sulu çözeltileri işlemden geçirmek için kullanılmaktadır. EPS'nin ağır metallerin çevreden uzaklaştırılmasındaki önemli rolü, flokülasyona katılımları ve metal iyonlarını çözeltilerden bağlama kabiliyetlerinden

kaynaklanmaktadır (Pal and Paul 2008). Metalle kirlenmiş sularda yaygın olarak bulunan bakteri grubun birçok organik kirleticinin anaerobik bozunmasında ve ağır metallerin atık sudan çökeltilmesinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Singh and Cameotra 2004).

Biyofilmler, mikropların mineraller üzerinde kolonileşmesinde, bağlanmalarına aracılık ederek kritik bir rol oynamaktadır. Metal sülfitlerin çözünmesinin EPS tabakasında gerçekleştiği düşünülmektedir ve bunun gerçekleştiği metafon iki varsayıma dayandırılmaktadır (Singh and Cameotra 2004).

İlk olarak, EPS kompleksli demir iyonlarının bir elektron ilerleme etkisiyle azaldığı varsayılmaktadır. İkincisi, demir iyon glukuronik asit kompleksleri stabil değildir ve bu nedenle demir iyonlarının EPS alanına taşınmasına izin vermektedir. Bu iyonlar dış zara doğru yayılırlarsa, hücrelerin enzimatik sistemi tarafından yeniden oksitlenirler ve bu nedenle oksidasyon/redüksiyon döngüsüne tekrar girebilmektedirler. Ek olarak, Sand ve Gehrke, EPS katmanı içindeki ferrik iyonların varlığı ile bakteriyel metabolizmanın derecesi arasında bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Elde ettiği sonuçlar, ekzopolimerleri içinde daha fazla miktarda demir ve glukuronik asit bulunduran hücrelerin, bu bileşenlerin düşük miktarlarına sahip olanlara kıyasla daha yüksek oksidasyon aktivitesi gösterdiğini ortaya koymaktadır (Nagaoka *et al.* 1994).

1.6. EPS Üreten Mikroorganizmalar

Son yıllarda farklı mikrobiyal EPS'lerin araştırması büyük önem arz etmektedir, mikroorganizmaların çoğunun değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit ürettikleri keşfedilmiştir. Bulunan bu EPS'lerin özellikleri araştırılmış ve çıkan sonuçlara göre mikrobiyal EPS'lerin karbon kaynakları için yarışan metabolit oldukları belirlenmiştir (Yılmaz 2006). EPS'yi üreten mikroorganizmalar planktonik ve tek hücreli olarak tanımlanmakta ve karakterize edilmektedir (Costerton *et al.* 1987; Donlan 2002). Farklı çalışmalarda yapılan planktonik mikrobiyal büyümenin doğada nadiren var olduğu sonucuna varılmaktadır. Diş yüzeylerindeki mikrobiyal agregaların Antonie van

Leeuwenhoek tarafından araştırılması ile mikrobiyal biyofilmlerin tespitine yol açtığı belirlenmiştir (Costerton *et al.* 1987; Socransky *et al.* 1998; Donlan 2002).

EPS üreten mikroorganizmalar kompleks besiyerinden yada sentetik besiyerlerinden izole edilebilmektedir. Bu organizmalar koloniler halinde mukoid veya sulu yüzey üretebildiklerinden makroskopik olarak belirlenebilirler. Bazı polisakkaritler suda çözünür boya ile muamele edilince stabil yapı oluştururlar ve bu da EPS tarama aracı olarak kullanılabilmektedir (Kumar *et al.* 2007).

EPS üreten birçok farklı tür belirlenmiştir. Bunlar Arkeler, bakteriler, funguslar, alglerdir. Bu türler mezofilik, termofilik ve halofilik gruplardan izole edilmiştir. Mezofilik cinsler arasında *Bacillus* spp., *Lactobacillus bulgaricus, helveticus, brevi, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus* spp. türleri iyi derecede EPS üretirler (Singha 2012). *Xanthomonas campestris, Sphingomonas paucimobilis, Pseudomonas* spp., *Acetobacter chorococcum, Acetobacter xylinium, Streptococcus equii* gibi türlerin yanı sıra diğer birçok bitki patojeni türün EPS ürettiği bildirilmiştir (Yılmaz 2006).

Diğer potansiyel EPS üreticileri arasında *Acetobacter* spp., *Aureobasidium* spp. *Sinorhizobium* spp. ve *Escherichia* spp. türleri sayılabilir. Termofilik mikroorganizma türleri arke ve bakteri filumlarında bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli çevrelerden izole edilen termofilik türler EPS üretme yeteneğine sahiptirler. Termofilik arke türleri arasında *Thermococcus* ve *Sulfolobus* EPS üretir.

Archaeoglobus fulgidus ve *Thermococcus litoralis'*in biyofilm yapısında önemli miktarda EPS üretticisi olarak bilinmektedir (Singha 2012).

Mikrobiyal EPS'ler, yosun ve bitki kaynaklı üretilen EPS'lere göre daha üst özelliklere sahiptir. Arke ve bakterilerin termofilik cinsleri sıcak bölgeler ve kaplıcaların yüzeyi gibi termal ekosistemlerden izole edildiği için bu bölgeler mikrobiyal EPS üreticileri için önemli kaynaklardır (Nicolaus *et al.* 1993).

Çoğu EPS biyosentezi bakteriyel hücre duvarı polimerleri, peptidoglukan ve lipopolisakkarit sentezine benzemektedir (Kumar *et al.* 2007). Birçok bakteri, maya, küf ve arke türlerinin mikrobiyal ekzopolisakkarit üretme yeteneğinde oldukları bilinmektedir fakat bu türler arasında bakteriler miktar ve çeşit açısından diğer türler arasında en iyi üreticiler olarak seçilmiştir. olduğu belirlenmiştir (Singha 2012). EPS üreten başlıca mikroorganizmalar *Bacillus spp., Lactobacillus bulgaricus, helveticus, brevis, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides,* ve *Streptococcus spp., Xanthomonas campestris, Sphingomonas paucimobilis, Pseudomonas* spp., *Acetobacter chorococcum, Acetobacter xylinium, Streptococcus equii* olarak sayılabilir (Yılmaz 2006; Singha 2012).

1.6.1. *Bacillus* cinsi bakteriler

Bacillus cinsi *Firmicutes* filumu *Bacillaceae* familyasına aittir. Taksondaki türlerin çoğu aerobik veya fakültatif anaerobik özelliğindeki bakteridir. Bazı türleri zorunlu anaerob olup, Gram pozitif bakterilerden oluşmaktadır ve bu grupların büyük çoğunluğu çubuk şekilli kemoorganotroflardır. 142 adet *Bacillus* cinsi bakteri 1835 yılında Christian Gottfried Ehrenberg tarafından 16S rRNA sekans analizine göre adlandırılmıştır (Vos *et al.* 2009). Taksonomik çalışmalarla DNA baz içeriğine bakıldığında G+C oranının yaklaşık olarak %32-69 aralığında değişebildiği görülmüştür. Bacillus cinsinin taksonomisi Çizelge 1.3'de verilmiştir (Vos *et al.* 2009). Bacillus cinsi bakteriler Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz pozitif veya negatif, endospor oluşturan çubuk şekilli, hareketli bakterilerdir. Hücreleri 1,2-1,5 µm çapında olup uzunluğu ise 5 µm'dir (Yılmaz 2006).

Çizelge 1.3. *Bacillus* cinsinin taksonomisi (Vos *et al.* 2009)

Domain	**Bakteri**
Alem	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Aile	Bacillaceae
Cins	*Bacillus*

Çoğunluğu mezofilik özellikte olup gelişim için optimum 30-45°C sıcaklığa ihtiyaç duyarlar. Ayrıca bazı termofilik cinsleri 65°C gibi yüksek sıcaklıklara gereksinim duymakta ve 0°C'de gelişme gösteren psikrofil türleri de bulunmaktadır (Todar 2015). Bu bakteriler normal şartlarda pH 6-8 aralığında gelişim göstermesine rağmen pH 4,5'e kadar gelişimlerini sürdürebildikleri görülmüştür (Yılmaz 2006). Hücre duvarları ise 20-50 nm arasında değişen kalınlığa sahiptir. Bacillus türlerinin hücre duvarı çapraz bağlı peptidoglukanlardan oluşmaktadır. Yüzey yapısında kapsül, flagella, fimbria gibi yapılar da bulunmaktadır (Sonenshein *et al.* 1993). Hücre duvarı bakteri ağırlığının %20-40'ını oluşturmaktadır. Hücre duvarında teikoik asit, polisakkarit ve birçok protein bulunmaktadır. Sitoplazma içi depo polisakkariti glikojen yapısındadır (Yılmaz 2006).

Bacillus cinsi bakteriler tüm aminoasitleri karbon, azot ve enerji kaynağı olarak metabolize edebilme yeteneğine sahiptir. Bu bakteriler aerobik ortam koşullarında karbon kaynağı olarak organik asitleri kullanırlar (Yılmaz 2006). Laboratuvar ortamında optimum koşullarda jenerasyon süresi yaklaşık olarak 25 dakika olarak belirtilmektedir (Todar 2015). Çoğu *Bacillus* türleri renk pigmenti oluşturmaz ancak bazı türler farklı besiyerlerinde farklı renk pigmentleri üretebilirler. Besiyerinde oluşan koloniler ise kreme yakın beyazdan sarıya doğru değişen bir renk oluşturmaktadır (Yılmaz 2006).

Bu bakteriler doğada topraktan ya da kontamine olmuş çevreden izole edilebilmektedir. Yaygın olarak su, gıda ve klinik örneklerde bulunmakla beraber (Vos *et al.* 2009) ekstrem koşullara sahip çeşitli ortamlardan izole edilebilirler (Yılmaz 2006). Kolay gelişmeleri ve nadiren patojenik özellik göstermeleri açısından önemli bir çok enzim üretiminde yer alırlar. Fermantasyon yoluyla enzim üretimi Bacillus cinsi ile oldukça kısa sürede yapılmakla beraber çok daha düşük maliyetli olan azot ve karbon kaynaklarıyla da yapılabilir (Vos *et al.* 2009).

1.6.1.a. *Anoxybacillus gonensis*

Bacillaceae, çoğu zaman endospor üreten, Gram-pozitif çubuk şeklinde olan bakteri ailesidir. UniProt Taksonomisine dayanan bu familya da, geçerli olarak tanımlanmış

türler, alt türler, uygun açıklamaları bekleyen suşlar ve doğrudan çevresel örneklerden tanımlanan suşlardan oluşan toplam 19.000'den fazla suş bulunmaktadır. Gen boyunca 16S rRNA dizilerinin benzerliği genellikle %80'den yüksektir. *Anoxybacillus* türleri bir araya toplanmış (%92-99 benzerlik) ve en yakın komşularının *Geobacillus, Saccharococcus* ve *Aeribacillus* olduğu saptanırken %90–95 *Caldalkalibacillus* ve *Calditerricola, Anoxybacillus* (%85-88) ile karşılaştırılmasıyla bu benzerlik daha düşük seviyede görülmektedir (Vos *et al.* 2009).

Bacillaceae cinsleri arasında *Bacillus* cinsi, toplam izolat sayısı, yapılan çalışmalar ve yayınlanmış raporlar bakımından en iyi çalışılan cins olduğu bildirilmektedir (de Boer *et al.* 1994).

2000 yılında, yeni *Anoxybacillus* anaerobik suşu K1T'yi hayvan gübresinden izole etmişlerdir. 16S rRNA, DNA-DNA hibridizasyon analizleri ve K1T suşunun fenotipik özellikleri temel alındığında, yeni bir *Bacillaceae* cinsi olan *Anoxybacillus* önerilmektedir (Pikuta *et al.* 2000).

Anoxybacillus adı bakterinin anaerobik özelliğinden dolayı kaynaklanmaktadır. Anoksik veya anoksi, çözünmüş oksijenin oluşturduğu dolayısıyla oksijensiz olarak hayatta kalabilen mikroorganizmaların olduğu anlamına gelmektedir. *A.pushchinensis* K1T *B.flavothermus* birlikte filogenetik olarak kümelenir ve Bacillus'tan farklı olduğu gösterilmiştir. *B. flavothermus, Anoxybacillus flavothermus* (flavithermus) olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Pikuta *et al.* 2009).

1.6.1.b. *Anoxybacillus* için büyüme ortamı

Anoxybacillus cinsleri sıcak su kaynaklarında baskın olarak bulunmaktadır. *Anoxybacillus*'un yaşadığı ortamlarda maya ekstraktının önemli bir organik azot kaynağı olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni ise; maya ekstraktının, diğer protein hidrolizatlarından daha fazla büyüme faktörü olması, serbest amino asit ve kısa peptit içermesidir (Narayan *et al.* 2008).

Termofilik mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklara dayanabilme kabiliyetlerinden dolayı biyoremediasyon işlemlerinde çok fazla kullanılmaktadır. Atık sularda termofilik *Anoxybacillus*'un kullanılması, mezofilik bakterilere göre bir avantaja sahiptir, çünkü boya ile kirlenmiş atık suyun sıcaklığı genellikle 40°C ila 60°C arasında olmaktadır (Burnett *et al.* 2006).

Bu özelliğinden dolayı *A. gonensis*, ağır metalleri sulu çözeltilerden uzaklaştırmada biyosorpsiyon sistemi geliştirmek için bir model olarak kullanılmıştır (Burnett *et al.* 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Fiziko-kimyasal ve reolojik özellikleri nedeniyle son zamanlarda ilgiyi kendi üzerinde toplayan ve biyomateryal olarak kullanılan EPS (Ekzopolisakkarit)'ler hakkında yapılmış çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Bramhachari and Dubey (2006) yaptıkları çalışmada ise *Vibrio harveyi* VB23 suşu ile büyüme ve EPS üretimi, NaCl (%1-5) ve glukoz (%0-2) içeren ortamda incelenmiştir. Kesikli kültürlerde EPS üretim oranı, durağan büyüme aşamasına kıyasla, büyümenin son log evresinde yüksek olarak gözlenmiştir. Eksopolimer, soğuk etanol çökeltme-diyaliz prosedürü kullanılarak kültür süpernatantından geri kazanılmıştır. EPS'nin gaz kromotografisi ile gerçekleştirilen analiz sonucu ile galaktoz ve glukoz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *V. harveyi* VB23 tarafından üretilen EPS'nin iyi emülsiyon aktivitesine sahip bir heteropolisakkarit olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Nampoothiri *et al.* (2008) çalışmada, laktik asit bakterilerini; fermente edilmiş sebzelerden, ekşi hamurdan, süt ürünlerinden, koyunlardan ve insan dışkısından izole etmiştir. Yoğurttan (MC-1) ve peynir altı suyundan (W3) elde ettiği izolatlardan, EPS üretimini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra bu iki izolatın EPS verimini karşılaştırdıklarında; 8,79 ± 0,05 g/l değeri ile maksimum EPS üretiminin W3 izolatında olduğunu tespit etmişlerdir.

Ahi (2011) yaptığı çalışmada, *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait bazı suşları kullanarak, bakterilerin hücre gelişimleri, laktik asit miktarları ve son pH değerlerini tespit etmiştir. Suşların EPS üretimleri 46,42 mg/l ile 208,88 mg/l arasında bulunmuştur. En yüksek (208,88 mg/l) EPS üretimi *Enterococcus fecalis* RT8 suşunda tespit edilirken, en düşük (46,42 mg/l) EPS miktarı ise, *Enterococcus fecalis* NCDO 581 kültüründe belirlenmiştir. Suşların hücre gelişimlerinin kültürlerin EPS üretimini etkilemediğini gözlemlemişlerdir.

Xu *et al.* (2011) *Bifidoba cterium*'un ana ekzopolisakkarit fraksiyonunun (EPSa), kimyasal karakterizasyonunu ve in vitro antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. EPSa'nın moleküler ağırlığı jel afinite kromatografisi (GPC) ile 2.31×10^4 olarak belirlenmiştir. Elde edilen EPS'nin karakterizasyonu yapıldığında; D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, L-arabinoz, D-fruktoz, ve L-ramnozdan oluşan heteropolisakkarit bir yapı tespit edilmiştir.

Yilmaz *et al.* (2012) yaptıkları bu çalışmada, farklı melas ve fruktoz konsantrasyonlarının *Bacillus* sphaericus 7055 suşu tarafından EPS üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu suş ile gerçekleştirilen maksimum EPS üretimi %2,5 fruktoz ve %2,5 melas konsantrasyon değerlerinde belirlenmiştir.

Radchenkova *et al.* (2013), Bulgaristan'da bulunan hidrotermal kaynaklardan EPS üretme potansiyeli olan mikroorganizmalar (*Aeribacillus pallidus, Geobacillus toebii, Brevibacillus thermoruber ve Anoxybacillus kestanbolensis*) izole etmiştir ve en yüksek miktarda EPS üretme potansiyeli bulunan bakteri *A. pallidus* olarak belirlenmiştir. Maltoz ve NH_4CI'ün EPS üretimi için sırasıyla en iyi karbon ve azot kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırma işlemleri sonucunda, EPS1 ve EPS2 olarak iki farklı polisakkarit elde edilmiştir. EPS1 (%69,3) ve EPS2 (%33,9)'deki başlıca şekerin, mannoz olduğu ve her ikisinin de düşük miktarlarda glukoz, galaktozamin, glukozamin, galaktoz ve riboz içerdiği belirlenmiştir.

Zhao *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada Çin'de sıcak su kaynaklarından izole edilen termofilik *Anoxybacillus* spR4-33 suşunun ürettiği ekzopolisakkarit üzerinde ağır metallerin yapısal karakteristikleri ve biyosorpsiyon davranışlarını incelemiştir. Üretilen EPS'nin gaz kromotografisi, nükleer manyetik rezonans ve asit hidrolizi sonucu D-mannoz ve D-glukoz'dan oluşan heteropolisakkarit yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Sorpsiyon deneyleri pH 6,0'da, EPS başına sırasıyla; 1,9783 MgZn (II) ve 1,4095 mg Cd (II)'nin adsorbe edildiğini doğrulamıştır.

Yue *et al.* (2015), *Desulfovibrio desulfuricans*'ın ağır metallerin EPS bileşenleri ve adsorpsiyon kabiliyetleri üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopi analiz sonuçları, ağır metallerin, EPS'nin fonksiyonel gruplarının şekillerini etkilemediğini göstermiştir. Ayrıca EPS'nin, ağır metal için spesifik bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu ve Zn^{+2} dozlu sistemden ekstrakte edilen EPS'nin tüm ağır metaller için daha yüksek bir bağlanma afinitesi sergilediğini tespit etmişlerdir.

Shahnavaz *et al.* (2015) aktif çamurdaki yüksek verimde (EPS) üreten bakterileri tanımlamış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. İzole edilen 74 bakteriden 20 tanesinin EPS ürettiği belirlenmiştir. Bu bakteriler Bonjnourd atık su arıtma tesisinden elde edilmiştir. EPS ekstraksiyonu, glukoz bakımından zenginleştirilmiş besiyerinden sonra etanol ile muamele edilerek elde edilmiştir. En yüksek EPS üretimine sahip bakterilerin moleküler tanımlanması, 16S rRNA gen amplifikasyonu kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, bu bakterilerin *Bacillus, Pseudomonas ve Klebsiella* cinsine ait olduğunu göstermiştir. EPS üretimi, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsi için farklı koşullarda (karbon ve azot kaynakları, farklı glikoz ve maya ekstraktı ve sıcaklık seviyeleri) çalışılmıştır.

Dertli *et al.* (2016) çalışmasında, Doğu Karadeniz bölgesinden elde edilen hamur mayalarından, toplam 11 farklı türe (*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paraplantarum, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus rossiae, Lactobacillus sanfranciscensis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus paralimentarius, Weissella paramesenteroides, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc pseudomesenteroides and Weissella cibaria*) ait 47 laktik asit bakterilerisinin (LAB) izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Daha sonra, İzolatların ekzopolisakkarit (EPS) üretim özellikleri belirlenmiş ve EPS veriminin yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile, LAB türlerinin biyolojik çeşitliliği doğrulanmış ve EPS üretim potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Vidhyalakshmi *et al.* (2016), hindistan cevizi tabakasından ekzopolisakarit üretme kabiliyetine sahip bakteri izole etmiş ve 16S rDNA analizi ile bu organizmanın *Bacillus circulans* olduğunu tespit etmişlerdir. EPS üretimi için kültürün gelişim aşamaları

gözlemlenmiş ve 96 saatin sonunda, EPS üretiminin maksimum 0,065 mg/ml'ye ulaştığı, uzun süreli inkübasyona bırakıldıklarında ise, EPS miktarının azaldığını belirlemişlerdir. HPLC analizi ile şeker kompozisyonunun; glukoz, mannoz ve fruktoz, NMR analizi sonucunda ise; glukoz, mannoz ve galaktoz şekerlerinden oluştuğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, *Bacillus circulans*'tan elde edilen EPS'nin, kayda değer bir antibakteriyel veya antifungal aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Abid *et al.* (2018), ekzopolisakarit üreten laktik asit bakterini (LAB), sığır ve hindi eti sosislerinden, hurma sapı ve inek sütünden izole etmiş ve bu bakterileri (*Leuconostoc citreum, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus pentosaceus* ve *Leuconostoc pseudomesenteroides*) tanılamışlardır. Ayrıca izole edilen suşların, insan gastrointestinal (GI) kanal koşullarına (düşük pH, lizozim, safra tuzları, pepsin ve pankreatin) dayanma kabiliyeti sergilediklerini gözlemlemişlerdir. Daha sonra, EPS üretme potansiyellerine HPLC-SEC kullanılarak baktıklarında, EPS'nin molekül ağırlığının 106 Da'dan daha yüksek olduğunu, üretilen EPS'nin de dextran ve levan karışımı olduğunu tespit etmişlerdir.

Liu *et al.* (2018), ekzopolisakkarit üretme potansiyelleri olan ikiyüz tane laktik asit bakterisini ekşi mayadan (Ya'an) izole etmişler. Bütün izolatların EPS üretiminde rol alan genleri içerdiği ve bu izolatlar tarafından üretilen EPS veriminin; 2,3 ve 229,5 mg/g olduğunu tespit etmişlerdir.

Moshabaki Isfahani *et al.* (2018), çok yüksek miktarda tuz içeren toprak örneklerinden bakteri izolasyonunu gerçekleştirmiş ve EPS üretme potansiyellerini araştırmışlardır. Yapılan testler sonucunda, 6 izolatın EPS üretme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA gen sekans analizi sonucunda; bu izolatların *Bacillus aerius* ATHM35, *Arthrobacter luteolus* ATHM 36 ve *Halomonas eurihalina* ATHM 37 olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber en yüksek EPS üretimi (0,277 g/L) *H. eurihalina* suşunda gözlemlenmiştir.

Zhang *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, kriyoprotektif ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) salgılayabilen *Flavobacterium* ve *Thermomonas* gibi bazı psikrotolerant mikroorganizmalar, düşük sıcaklıklarda zenginleştirilmiştir. Ayrıca, EPS bileşimi ve karakterizasyonuna göre; bol miktarda protein içeren hücre yüzeyine, bağlanan EPS'lerin salgılanması düşük sıcaklıklarda uyarılarak, sistem stabilitesi daha da artırılmıştır. Sonuç olarak, psikotolerant mikroorganizmaların uygun besiyeri ortamında zenginleştirilmesinin, EPS salgılanmasını arttırdığı ve düşük sıcaklıklarda nitrojen uzaklaştırılması açısından da oldukça faydalı olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan melas örneği Erzurum Ilıca Şeker Fabrikasından temin edilirken, ekzopolisakkarit üretimi için gerekli bakteriler ise Erzurum bölgesindeki termal kaplıcalardan (Ilıca, Pasinler, Köprüköy) toplanan su örneklerinden izole edildi.

3.1.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Çalışmada aşağıdaki cihaz ve aletlerden faydalanıldı.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Buzdolabı	Vestel
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
UV-Spektrofotometre	Beckman Coulter
Santrifüj	Hettich
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Vortex	Wisemix VM-10
pH metre	Mettler-Toledo
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Otomatik pipet	Eppendorf
İnkübatör	BINDER
Çalkalamalı İnkübatör	ZHWY 2102C
Otoklav	HMC Hirayama
Saf su cihazı	MP Minipure
Elektroforez tankı	Biorad-dikey
Güç Kaynağı	Bio Rad Power Power3000
Mikroskop	Leica
PCR Cihazı	Senso Quest

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler

Agaroz (DNase-RNase-Protease free)	Sigma
Ampisilin	Sigma
DNA Marker	Thermo
dNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil alkol	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
NB (Nutrient Broth)	LabM
NA (Nutrient Agar)	LabM
NaCl	Sigma
H_2SO_4	Sigma
ETDA	Sigma
DMSO	Sigma
Distile Su	Thermo
Gliserol	Sigma
IPTG	Sigma
İmmersiyon Yağı	Sigma
İzoprapanol	Sigma
Kristal violet	Sigma
Lügol	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum klorür (MgCI2)	İnvitrogen
Malaşit yeşili Sigma	Sigma
N,N,N‟,N‟-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum hidroksit(KOH) Sigma	Sigma
Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
Promega wizardR genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti) Promega	Sigma
RNaz A	İnvitrogen
Safranin	Sigma
Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Oksidaz kiti)	Biomerieux
5-Bhromo-4-Choloro-3-Indolyβ-D-Galactopyranoside (Xgal)	Sigma
6X Yükleme tamponu	Thermo

3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

Nutrient Broth (NB) Besiyeri: 13 g NB, 1 litre distile suda çözüldü ve otoklavda steril edildi.

Nutrient agar (NA) Besiyeri: 20 gram NA 1 litre distile suda çözüldü ve otoklavda steril edildi.

Luria Bertani (LB) Agar: Luria Bertani Agar besiyerinden 35 gr alınıp, 1L distile su içerisinde çözüldü ve otoklavlandı.

%0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi: 9 g sodyum klorür (NaCl), 1000 ml distile suda çözüldü otoklavda steril edildi.

50 mM, pH:8 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi: 1,46 g EDTA 90 ml distile suda çözüldü ve pH 8'e ayarlandıktan sonra, toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%70'lik Etanol: 70 ml EtOH, toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu: 20 ml 50X TAE (Sigma) tamponu üzerine 980 ml distile su eklendi.

%1'lik agaroz jel hazırlanışı: 0,9 g agaroz (Sigma) 90 ml 1X TAE'de çözüldü ve 2 µl Etidyum bromür (Sigma) eklendi.

2 M'lık H_2SO_4 çözeltisi: 1 litre saf su üzerine, %98'lik sülfürik asit çözeltisinden 108,7 ml eklendi.

DPPH solüsyonu: 0,004 gram DPPH, 100 ml etanolde çözüldü ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi

Lügol Solüsyonu: 1 gr iyot ve 2 gr KCl tartıldı ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Safranin Solüsyonu: 1 gr safranin %96'lık EtOH'da çözüldü, üzerine 100 ml safsu ilave edildi.

Kristal Violet Solüsyonu: 2 gr kristal violet, %96'lık EtOH'da çözüldü ve üzerine 80 ml saf su eklendi.

Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili, 100ml steril saf su içinde çözüldü.

KOH Solüsyonu: 3 gr KOH tartılıp, 100 ml saf suda içerisinde çözüldü ve otoklavlandı.

%70'lik EtOH: 70 mL EtOH, hacmi 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM EDTA Solüsyonu: 1,46 g EDTA tartılırarak, 100 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 8'e ayarlandı.

1X TAE Tamponu: 100 ml 10X TAE'den alınarak, hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

$CaCI_2$ Solüsyonu: 1,11 gr $CaCl_2$, 100ml (100 mM olacak şekilde) saf su içerisinde çözüldü ve ağzı pamukla kapatılarak, otoklavlandı. Daha sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4°C) saklandı.

Amfisilin Solüsyonu: 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek, steril edildi. Kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal Solüsyonu (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside): 40 mg/ml olacak şekilde çözelti hazırlandı ve ışık almaması için etrafı aliminyum folyö ile kaplanarak, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

IPTG Solüsyonu (Isopropyl-β-D-1 thiogalactopyranoside): 23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm çapındaki milipor filtreden geçirilerek, steril edildi. Daha sonra çözelti kullanılıncaya kadar, -20°C'de bekletildi.

3.2. Yöntemler

Çalışma boyunca kullanılan tüm cam malzeme, pipet ucu ve besiyerleri için otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu

Erzurum'da bulunan farklı termal tesislerden (Ilıca, Pasinler, Köprüköy) alınan su örnekleri steril koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve serum fizyolojik su ile bir seri dilüsyon hazırlandı. Daha sonra örnekler, yayma ekim tekniği ile Nutrient agar (NA) besiyerine aktarıldı ve petriler 55°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Petride gelişen kolonilerden saf olanları seçilerek, stoğa alındı ve kullanılıncaya kadar, -86°C'de muhafaza edildi (Albayrak 2018).

3.2.2. İzolatların EPS üretim kapasitelerinin karşılaştırılması

Saflaştırılan izolatlar bu aşamada EPS üretim yetenekleri açısından birbiriyle kıyaslanarak en iyi EPS üreticisi izolat belirlendi. Bu doğrultuda, izolatlar ilk önce nutrient agar'da aktifleştirilip ardından nutrient broth (NB) besiyerine inoküle edildi. 24-48 saat süre ile 50°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda erlenler inkübatörden çıkarılarak, OD 600 değerleri 1.0 absorbans verecek şekilde 55°C'de inkübe edildi. Daha sonra her bakteri izolatı için hazırlanan bu ön kültürlerin 1 ml'si melas ile hazırlanan

üretim besiyerine inoküle edildi. Üretim besiyeri; melas (20 ml/l), pepton (4 g/l)'dan oluşmakta olup ve pH 7.0'dir. Üretim çalışmaları bu besiyerinin 100 ml'sini içeren 250 ml'lik erlenler içerisinde gerçekleştirildi. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, kültürdeki EPS analizleri yapıldı ve en fazla EPS üreten izolat belirlendi. Bir sonraki adımda, bu izolatın konvensiyonel ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3. Seçilen izolatın konvensiyonel yöntemlerle karakterizasyonu

Test izolatının morfolojik (Koloni, Hücre morfolojisi, Gram özelliği, Endospor ve Hareket testi) Fizyolojik (izolatların gelişebildiği tuz, sıcaklık ve pH aralıkların belirlenmesi) ve Biyokimyasal (katalaz ve oksidaz testi) özellikleri, Albayrak (2018) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirildi.

3.2.4. Seçilen izolatın moleküler yöntemlerle karakterizasyonu

3.2.4.a. Bakteriden genomik DNA izolasyonu

Nutrient Broth besiyerinde ön kültürü yapılan YK25 kodlu bakteriden 2 ml alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst fazı dökülerek, altta kalan pellet üzerine 480 µl 50 mM EDTA (pH=8) eklenip, pipetaj yapıldı. Ardından bu karışımın üzerine 120 µl 10 mg/ml lizozim eklenerek karışması sağlandı ve 30°C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Karışım 2 dk süreyle 13000 rpm'de santrifüjlenip, süpernatant atıldı. Tüplerin üzerine 600 µl Nükleer Lizis Solüsyonu eklenerek, pipetajlandı. Karışım 80°C'de 5 dk süre ile inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Karışımın üzerine 3 µl RNase A eklenerek alt üst edildi ve 37°C'de 30 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı. Karışımın tekrar oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve karışımın üzerine Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklenerek, 20 saniye süre ile vortexlendi. Ardından 5 dk buzda bekletildi. Örneklere 30 saniye süre ile 13000 rpm'de çöktürme işlemi uygulandı. Bir sonraki adımda süpernatant 600 µl izoproponal bulunan yeni eppendorf tüplerine aktarılarak ve tüplerde pellet oluşuncaya kadar çalkalandı. Daha sonra 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip ve

süpernatant dikkatlice döküldü. Eppendorflara %70'lik etil alkol (EtOH)'den 600 µl eklenip yavaşça alt üst edilerek 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi. Tüplerdeki üst faz dökülerek etanol tamamen uzaklaşıncaya kadar 37°C'de 15-20 dk boyunca inkübe edildi. Tüplerin üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu ilave edildi ve 1 saat süre ile 65°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda içlerinde genomik DNA bulunan eppendorf tüpler, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.4.b. 16S rRNA PCR analizi

Evrensel olarak korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi, özellikle bakteri taksonomisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla bakteriden genomik DNA izolasyonu aşamasından sonra, 16S rRNA gen bölgesi evrensel primerler kullanılarak amplifiye edildi.

Verilen reaktif miktarları dikkate alınarak, PCR reaksiyon karışımı hazırlandı ve Çizelge 3.3'de verilen PCR protokolüne göre 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi (Adıgüzel 2006).

Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı

Reaktif	**Miktar (µl)**
PCR Buffer (Sigma)	3
dNTP	0,6
$MgCl_2$	1,8
Primer 1	3
Primer 2	3
Taq DNA Pol.	0,3
DMSO	1,2
ddH_2O	12,1
Kalıp DNA	5

Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	-

3.2.4.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %1'lik agaroz hazırlanıp, mikrodalgada 2-3 dk kaynatıldı ve homojen hale getirildi. Daha sonra jel soğuduktan sonra, üzerine etidyum bromür eklendi ve tarakların yerleştirildiği elektroforez tankına dökülerek donması sağlandı. Elektroforez tankı uygun seviyeye kadar 1X TAE ile dolduruldu. Jelin ilk kuyusuna (100-10000 baz çifti) DNA markırı (New England Bio Labs, N0550S) diğer kuyuya ise her bir örnek için 1 µl 6X yükleme tamponu ve 4 µl 16S rRNA PCR ürünü içeren karışım yüklendi. 90 voltta 120 dakika boyunca jelde yürütüldü ve süre sonunda Quantum Vilber Lournat cihazında görüntülendi.

3.2.4.d. Klonlama

1. Kompetent hücrenin hazırlanması

Escherichia coli JM101 suşu stok kültürden çizgi ekim yöntemiyle canlandırılarak, gelişen kültürden tek bir koloni alındı ve LB besiyerine aktarıldı. 37°C'de 1 gece çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Gelişen kültürden 300 µl alınarak 2700 µl steril saf su ile seyretildi ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

Hazırlanan kültürden alınması gereken miktar;

$$\frac{(30\ x\ 0{,}1)}{(Absorbans\ Değeri\ x\ 10)}$$

formülü ile hesaplandı. Bu eşitlikte, 30 hazırlanacak miktar (ml), 0,1 sabit değer, 10 ise seyreltme faktörüne karşılık gelmektedir.

30 ml LB broth besiyerine, yukarıdaki hesaba göre çıkan değer kadar kültür eklendi. optik yoğunluk (600 nm'de) değerleri 0,4-0,5'e gelinceye kadar kültür 37°C'de inkübe edilmiştir. Yeterli doygunluğa ulaşan kültür, 4400 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü, Hücre pelleti üzerine, buzdolabında bekletilen soğuk 100 mM $CaCl_2$ çözeltisinden 10 ml eklenerek 30-45 dakika buzda bekletildi. Bekleme süresinden sonra, 4400 rpm'de (4°C) 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Ardından pellet üzerine, soğuk 100 mM $CaCl_2$'den 2 ml eklendi, bir gece buzdolabında bekletildi (Arslan 2017).

2. Ligasyon İşlemi

0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilen ligasyon karışımı (Çizelge 3.5) 16°C'de 13-15 saat süre ile inkübe edildi ve tekrar kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi (Arslan 2017).

Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Miktar (µl)
2X Ligasyon buffer	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA ligaz	1

3. Transformasyon işlemi

Eppendorf tüplerine buzdolabında bekletilen kompetent hücrelerden 200 µl kadar eklendi ve üzerlerine 2,5 µl ligasyon ürünü aktarılarak, 30 dk boyunca buzda bekletildi. Buzdan alınan örnekler, önceden 42°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 2 dk ısı şokuna maruz

bırakıldı. Tüplerin üzerine 200 µl LB besiyeri eklenerek 37°C'de 1 saat 40 dakika bekletildi. Bu esnada amfisilinli katı besiyeri buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve ardından X-Gal ve IPTG'den 40'ar µl petrilere yayıldı. Daha sonra petrilerin tam ortasına, inkübasyondan çıkartılan ligasyon ürünü ve kompetent hücre karışımından 150 µl bırakıldı ve karışım petride iyice yayıldı. Ardından örnekler 37°C'de yaklaşık 14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı (Arslan 2017).

4. Kolonilerin seçimi ve sıvı kültüre aktarma

14 saat süre ile inkübasyona bırakılan petriler, +4°C'de bir gece bekletildi. Petrilerde mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlendikten sonra beyaz koloniler steril bir pipet ucu ile alınıp içerisinde 3 ml amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere aktarıldı. Daha sonra 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı (Baltacı 2015).

5. Koloni PCR için Hazırlık ve PCR Reaksiyon Şartları

Uygun inkübasyon şartlarında Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde geliştirilen kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan tüplere aktarıldı. Bir sonraki işlemde ısı şokuna maruz bırakmak amacıyla öncelikle 10 dk su banyosunda kaynatıldı ve ardından 2 dakika boyunca buzda bekletildi. Tüplerdeki karışım 12000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak PCR basamağına geçildi. PCR işlemi için Çizelge 3.6'da verilen bileşenler ve miktarlara göre PCR karışımı hazırlandı ve tüpler PCR cihazına yerleştirilerek Çizelge 3.7'de verilen programa göre koloni PCR yapıldı (Baltacı 2015).

Çizelge 3.6. Koloni PCR'da kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
Tampon (MgCl2'li)	3
dNTP mix	0,6
MgCl2 (25 mM)	1,8
dH2O	16,1
DMSO	1,2
T7 Primer	2
SP6 Primer	2
Taq DNA Polimeraz	0,3
Süpernatant	3

(**T7 Primer:** 5'-AATACGACTCACTATAG–3'
SP6 Primer: 5'– ATTTAGGTGACACTATAG–3')

Çizelge 3.7. Koloni PCR programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

PCR işleminin ardından %1'lik agaroz jel hazırlanarak; markır, pozitif kontrol, istenen genin bulunmadığı negatif kontrol ve PCR ürünleri jele yüklendi. Ardından 90 voltta 1 saat yürütüldü. İşlemin sonunda jel görüntüleme sisteminde bantlar incelendi ve istenen aralıkta bant veren koloniler belirlenerek plazmit izolasyonu işlemi için amfisilinli LB broth sıvı besiyerine aktarıldı (Baltacı 2015).

6. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Promega (A1330) izolasyon kiti kullanıldı. Protokole göre;

Amfisilinli LB broth sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilen kültürlerden 4 ml alınarak, 11000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine Cell Resuspension Solüsyonundan 250 µl eklenerek homojenize edildi. Tüplerin üzerine 250 µl Cell Lysis Solution eklenerek alt üst edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 10 µl Alkaline Protease Solüsyonu karışıma eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma 350 µl Nötralizasyon çözeltisinden ilave edildi ve 13000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatanttan yaklaşık 650-750 µl alınarak içerisinde kolon bulunan eppendorf tüpüne aktarıldı ve 13000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüjlendi. Ardından kolonun üzerine 750 µl Wash Solution eklenip tekrar 1 dk 13000 rpm'de santrifüjlendi. Kolonun üzerine 250 µl Wash Solution ilave edilip tekrar 2 dk 13000 rpm'de santrifüjlendi ve tüplerde alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Tekrar 1 dk 13000 rpm'de oda ısısında santrifüjlendikten sonra kolon yeni bir tüp içerisine aktarılarak üzerine 100 µl Nuclease-Free Water eklendi ve 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Son aşamada kolon çıkarılıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler ölçüm yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi (Arslan 2017).

7. Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsa da, istenilen bölgenin klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla, örnek EcoRI ile kesime tabi tutuldu (Albayrak 2018).

8. Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

998 µl saf su ve 2 µl plazmit karışımının 260 nm'deki optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü. A_{260} × 50 (sabit katsayı) × 500 (dilüsyon oranı) formülüne göre plazmit konsantrasyonu, 100-200 ng olacak şekilde ayarlandı. Uygun konsantrasyona sahip tüplerden 30-50 µl alınarak sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir (Albayrak 2018).

9. DNA dizi analizine göre sonuçların değerlendirilmesi

Sekansa gönderilenörneğe ait sonuçlar firmanın sayfasından indirilerek FASTA formatına çevrildi ve BioEdit programı ile analiz edildi ve. Sekans dizisi içerisindeki primerler ve vektöre ait kısımlar çıkarıldı. Daha sonra diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi. Ardından NCBI'ın BLAST ve EzTaxon veritabanı yardımıyla izolatımızın mevcut bakteri türleri ile olan benzerlik oranlarına göre tür tespiti yapıldı (Albayrak 2018).

3.2.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretiminin optimizasyonu

Bu bakteriden EPS üretimi için pH, sıcaklık, melas ve pepton konsantrasyonu ile optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu doğrultuda, farklı pH (5-9), sıcaklık (45-65°C), inkübasyon süresi (24-120 saat) melas (60-110 ml/l), pepton (0-10 g/l) konsantrasyonlarında çalışma gerçekleştirildi.

3.2.5.a. EPS üretiminde optimal pH değerinin belirlenmesi

Anoxybacillus gonensis YK25 bakterisinin ön kültürünü elde etmek amacıyla NA (Nutrient Agar) katı besiyerine ekili olan bakteri NB (Nutrient Broth)'a aktarıldı ve 50°C'de 1 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometrede OD ölçülerek uygun mikrobiyal gelişimin sağlandığı belirlendikten sonra ön kültürden 1 ml, 40 ml/l melas konsantrasyonu ve 2 g/l pepton konsantrasyonu içeren ve sırasıyla 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerlerine ayarlanan 100 ml'lik steril besiyerlerine aşılandı. Ardından, tüm erlenler 50°C'de 2 gün boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından erlenler falcon tüplerine aktarılarak 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjün ardından kültür sıvısında bulunan hedef ekzopolisakkaritin eldesi için süpernatant başka bir erlene alındı ve üzerine hacimce 1:2 oranında etanol eklenip +4°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra, +4°C'den alınan örnekler falcon tüplere aktarılıp, tekrar 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant atılarak tüpün dibindeki pellet 80°C'de 1 gün boyunca kurutuldu. Ardından her birinin ağırlıkları tartıldı

ve en yüksek üretim miktarının kurutuldu. Ardından her bir tüp tartılarak ağırlıkları belirlendi ve en yüksek üretim miktarının gerçekleştiği pH değeri 7 olarak tespit edildi.

3.2.5.b. EPS üretiminde optimal sıcaklık değerinin belirlenmesi

Optimal sıcaklık basamağına başlamadan önce Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinin ön kültürü hazırlanıp, uygun optik yoğunluğa ulaşması sağlandı. 40 ml/l melas ve 2 g/l pepton konsantrasyonu içeren 5 adet 100 ml'lik besiyeri hazırlandı ve hepsinin pH'sı 7'ye ayarlandı. Ardından her birine bakterinin ön kültüründen 1 ml ekildi ve sırasıyla 40, 45, 50, 55 ve 60°C'ye ayarlanan çalkalamalı inkübatörde 2 gün inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerleri falcon tüplere alınıp 6500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar erlenlere alınıp üzerine hacimce 1:2 oranında etanol eklendi ve +4°C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra örnekler yeniden falcon tüplere alınıp 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant tekrar atıldı. Dipteki pellet 80°C'de 1 gün boyunca kurutuldu. Her bir tüpteki pelletin ağırlığı tartılıp kaydedildi ve elde edilen verilere göre en yüksek EPS miktarına sahip sıcaklık değeri bir sonraki optimizasyon basamaklarında kullanıldı.

3.2.5.c. EPS üretiminde optimal melas konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimal melas konsantrasyonu için öncelikle bakterimizin ön kültürü hazırlanıp uygun optik yoğunluğa ulaşıncaya kadar inkübe edildi. Ardından, 4 g/l pepton ve sırasıyla 40, 80, 120, 160, 200 ve 240 ml/l melas ihtiva eden 6 adet 100 ml'lik besiyeri hazırlandı ve hepsinin pH'sı belirlenen optimal değere ayarlanıp, bütün erlenlere bakterinin ön kültüründen 1 ml aşılandı. Ardından optimal sıcaklıkta 2 gün çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyerleri falcon tüplere alınıp 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatantlar ayrı bir erlene alındı ve üzerine hacimce 1:2 oranında etanol eklendi. Bir gece +4°C'de bekletildikten sonra tekrar falcon tüplere alınıp santrifüjlenir. Üst faz atılıp tüpün altındaki pellet etüvde 80°C'de 1 gün boyunca kurutuldu. Her bir melas konsantrasyonunda elde edilen pellet ağırlığı tartılıp, üretilen EPS miktarı olarak

kaydedildi. En yüksek EPS üretiminin elde edildiği melas konsantrasyonu optimal değer olarak belirlendi ve bir sonraki optimizasyon basamağında dikkate alındı.

3.2.5.d. EPS üretiminde optimal pepton konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimal pepton konsantrasyonunun belirlenebilmesi için öncelikle *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinin ön kültürü hazırlanıp inkübasyona bırakıldı ve uygun optik yoğunluğa ulaşması sağlandı. Optimal melas konsantrasyonu içeren ve sırasıyla 0, 4, 8, 12 ve 16 g/l'lik peptonun eklendiği 5 adet 100 ml'lik besiyeri hazırlandı ve hepsinin pH'sı optimal değere ayarlandı. Ardından her birine bakterinin ön kültüründen 1 ml inoküle edildi ve belirlenen optimal sıcaklık değerine ayarlanan çalkalayıcıda, 2 gün inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerleri falcon tüplere alınıp, 6500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar erlenlere alınıp üzerine hacimce 1:2 oranında etanol eklendi ve +4°C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra yine falcon tüplere alınıp 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve süpernatant atılarak dipteki pellet 80°C'de 1 gün boyunca kurumaya bırakıldı. Her bir tüpteki pelletin ağırlığı tartılıp kaydedildi ve elde edilen verilere göre en yüksek EPS miktarına sahip pepton konsantrasyonu belirlenerek optimizasyon çalışması tamamlanmıştır.

Elde edilen optimal değerler üzerinden 1 litrelik büyük ölçekli EPS üretimi önceki aşamalarda anlatıldığı şekilde 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi. En son falcon tüpte toplanan pellet iki kez saf etanol ile yıkanarak santrifüjlendi (6500 rpm'de 10 dk). Bu evrelerden sonra tüpteki pelletin yani ekzopolisakkaritin, karakterizasyonu ve biyolojik aktiviteleri araştırıldı.

3.2.6. Üretilen EPS'nin karakterizasyonu

Üretilen EPS'nin moleküler ağırlığı, viskozite değerleri üzerinden hesaplanırken şeker kompozisyonu ise, HPLC analizi ile belirlendi.

3.2.6.a. Şeker kompozisyonunun belirlenmesi

Şeker kompozisyonu belirlenmeden önce EPS sülfürik asitte (H_2SO_4) hidroliz edildi. Bu amaçla, 5 mg EPS 2 M sülfürik asit çözeltisinin içerisinde çözüldü ve NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak HPLC analizine gönderildi. HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından gerçekleştirildi.

3.2.6.b. Molekül ağırlığının belirlenmesi

Ekzopolisakkarit örneğinin molekül ağırlığı; Anton-Paar MCR102 reometrede, iç viskozite değerleri ile korelasyon sağlanarak belirlendi. Bunun için farklı yoğunluklarda hazırlanan EPS örneklerinin değişen kayma hızına karşılık, viskozite ölçümleri yapıldı ve oluşturulan empirik denemelerde, Herschel-Bulkley akış modeli yardımıyla moleküler ağırlık belirlendi.

3.2.7. Üretilen EPS'nin biyolojik aktivitesi

3.2.7.a. EPS'nin antibakteriyel aktivitesi

Elde edilen EPS'nin gram-pozitif (*Staphlococcus aureus*) ve gram-negatif (*Escherichia coli*) bakteriler üzerinden antibakteriyal aktivitesi test edildi. Stoktan alınan patojen bakterileri aktifleştirmek için Nutrient Agar (NA) besiyerine ekim yapıldı. 24 saat 30°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Aktifleşen bakteriler yeniden NA besiyerine ekildi ve petri 4'e bölündü. Pozitif kontrol olarak petriye Gr (+) bakteri için gentamisin, Gr (-) bakteri için ampisilin antibiyotiği diski yerleştirildi. Negatif kontrolde ise; her iki petriye boş disk yerleştirilip 20 µl saf su aktarıldı. Polisakkarit örneğinden 0,05 gr tartıldı ve 500 µl saf suda çözünmesi sağlandı. 100 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan polisakkarit çözeltisinden, 20 µl disklere aktarıldı. Petriler 30°C'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından disk etrafında zon oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

3.2.7.b. EPS'nin antikanser aktivitesi

Üretilen EPS'nin; insan nöroblastom kanser hücreleri (SHSY-5Y), kolon kanseri (HT-29 ve Caco-2), prostat kanseri (DU-145) ve akciğer kanseri (A-549) üzerine antikanser etkileri araştırıldı. Hücre hatları, %10 fetal bovin serumu ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren RPMI 1640 hücre besiyerinde, %5 CO_2 içeren etüvde 37°C'de çoğaltıldı.

EPS'nin; SHSY-5Y, HT-29, Caco-2, A549 ve DU-145 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, WST-1 hücre canlılık kiti (BosterBio, USA) ile analiz edildi. Hücreler çoğaltıldıktan sonra, 96-kuyucuklu plakalara herbir kuyucukta en az 5000 hücre olacak şekilde hücreler eklenmiştir. 24 saat sonra hücreler çoğalma aşamasında iken şeker ekstraktları, hücrelere değişen dozlarda hücre besiyeriyle eklenmiştir. Kontrol grubu hücrelerine, ekstraktsız hücre besiyeri eklenmiştir. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 3 µl WST-1 eklenerek, 2 saat sonra 450 nm'de (referans dalgaboyu 690 nm) ELİSA cihazında (SpectraMax Molecular Devices, USA) kolorimetrik olarak ölçüm alındı. 0 mg/ml kontrol grubudur (Veriler mean±standart deviasyon olarak hesaplanmıştır. $p<0.05$, * $p<0.05$ vs 0).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakterilerin İzolasyonu

Erzurum bölgesindeki farklı sıcak su kaynaklarından alınan örneklerden, bölüm 3.1'de anlatıldığı şekilde bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, toplam 28 bakteri saflaştırıldı ve çalışmanın bir sonraki aşamasında, bu izolatların EPS üretim kapasiteleri değerlendirildi.

4.2. İzolatların EPS Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Saflaştırılan tüm bakteriler içerisinde en yüksek EPS üretimine sahip olan izolatın seçimi için bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belli şartlar altındaki 60 g/l melas ve 4 g/L pepton ile hazırlanan kültür ortamında bakteriler geliştirildi. 72 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda kültürdeki EPS'ler kültür ortamından saflaştırıldı ve her bir bakterinin ürettiği EPS tartıldı. Deneyler sonucunda, 21 izolatın bazılarının hiçbirinin EPS üretmediği ya da EPS verimlerinin çok düşük olduğu belirlendi. Geriye kalan 7 izolatın ise santrifüj tüpünün altında da görülebilecek şekilde yüksek miktarda EPS ürettiği tespit edildi. 7 izolat arasında da maksimum EPS üretimi (3.2 g/L) YK-25 izolatı ile başarılmıştır. Bu izolatın 16S rRNA gen bölgesi referans alınarak moleküler düzeyde teşhisi yapılmıştır.

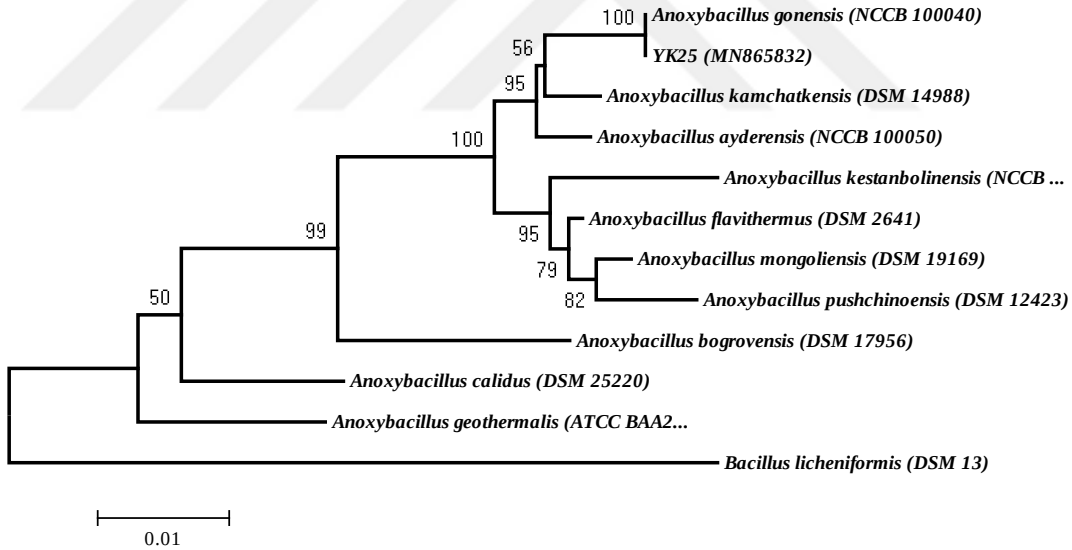
Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının EPS üretme yeteneklerinin araştırılması

İzolat kodu	Hücre biyoması (g/L)	EPS (g/L)
YK-6	1,4	1,5
YK-9	2,7	1,5
YK-14	1,7	2,9
YK-15	1,6	1,8
YK-22	1,9	2,6
YK-23	2,7	2,3
YK-25	2,4	3,2

(Kültür koşulları: 8.0 pH, 60 mL/L melas, 4 g/L pepton, 55 °C sıcaklık ve 72 saat inkübasyon süresi)

4.3. İzolatın Konvensiyonel Test Sonuçları

Yapılan analizler sonucunda test suşunun; çubuk hücre, dairesel koloni morfolojisine sahip, oksidaz, katalaz, gram ve endospor pozitif, hareketli, %2-8 tuz konsantrasyonunda, pH 6-8'de ve 50-65°C'de üreyebildiği, optimum gelişme sıcaklığının ise 55°C olduğu tespit edildi. 16S rRNA bölgesinin sekans analizi Macrogen (Hollanda) firmasına yaptırıldı. Analiz sonucunda elde edilen 1430 bazlık bölge Eztaxon ve NCBI'daki verilerle mukayese edilerek, izolatın %99 oranında *Anoxybacillus gonensis*'e benzerlik gösterdiği tespit edildi. Daha sonra bu dizinin Gen bankasına girilerek, numara alındı (MN865832). Çalışmanın bir sonraki basamağında, *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden daha yüksek EPS üretimi elde edebilmek için, kültür parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirildi.



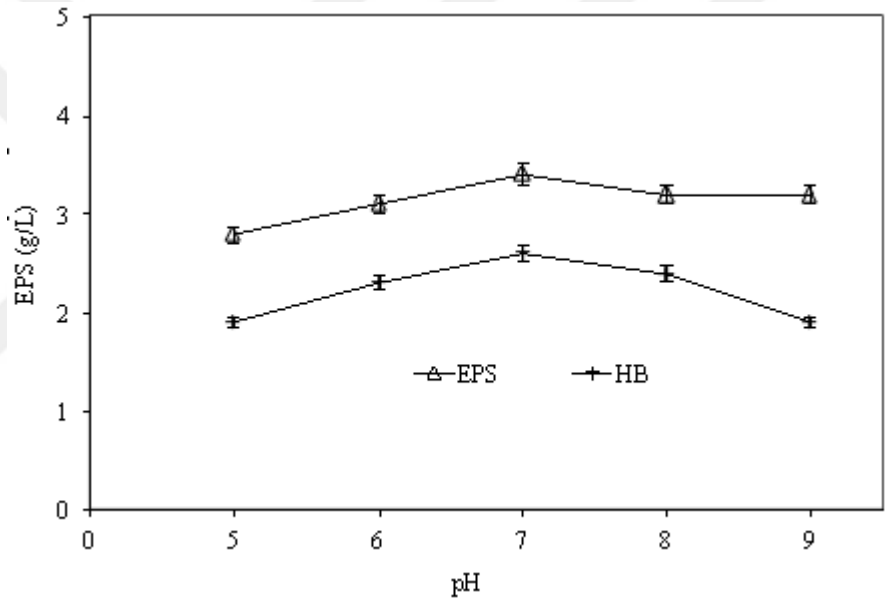
Şekil 4.1. *Anoxybacillus gonensis* YK25'in filogenetik ağacı

4.4. Optimizasyon Denemeleri

Mikrobiyal EPS üretiminde, en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan bakterimizin üretim verimini daha da arttırabilmek adına pH, sıcaklık, melas ve pepton konsantrasyonu gibi kültür parametrelerinin optimizasyonu yapıldı.

4.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimal pH değerinin belirlenebilmesi için EPS üretimi gerçekleştirildi. Farklı pH aralıklarında (5-9) üretilen EPS'ler, besiyerinden geri alınıp tartıldı (Çizelge 4,1). Elde edilen veriler, bakterinin geniş bir pH aralığında büyüyebildiğini ve EPS üretebildiğini ortaya çıkardı. Bununla birlikte, maksimum EPS üretimi (3,4 g/L) ve hücre büyüme (2,6 g/L) performansına pH 7'de ulaşıldı. Bu yüzden bir sonraki parametrenin optimizasyonu için kültür ortamının pH'sı 7'ye ayarlandı.



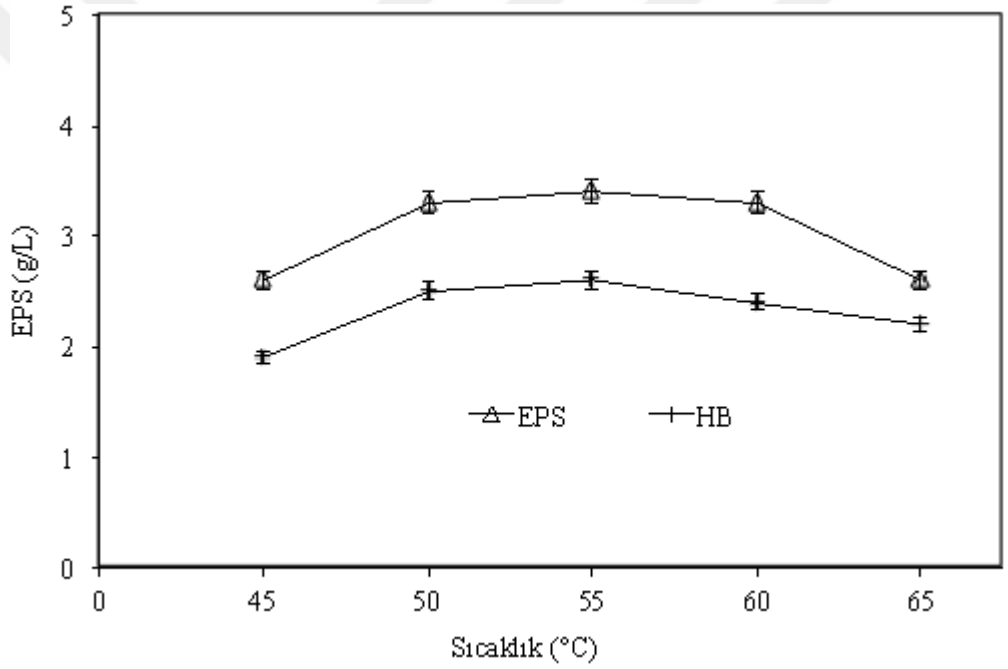
Şekil 4.2. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine başlangıç pH'sının etkisi **(**Kültür koşulları: 60 mL/L melas, 4 g/L pepton, 55°C sıcaklık ve 72 saat inkübasyon süresi)

Çizelge 4.2. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine başlangıç pH'sının etkisi

Başlangıç pH	Hücre biyoması (g/L)	EPS (g/L)
5	1,9	2,8
6	2,3	3,1
7	2,6	3,4
8	2,4	3,2
9	1,9	3,2

4.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

aOptimum sıcaklığı belirlemek için pH'sı 7 olan besiyeri hazırlanarak, sıcaklık denemeleri 45-65°C arasında gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.3'de görülebileceği gibi bakteri test edilen sıcaklıkların hepsinde gelişme ve EPS üretme kapasitesi göstermiş bununla birlikte hem maksimum hücre biyoması (2,6 g/L) hem de maksimum EPS konsantrasyonu (3,4 g/L) 55°C'lik sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Bu yüzden, takip eden deneyler 55°C'de dizayn edilmiştir.



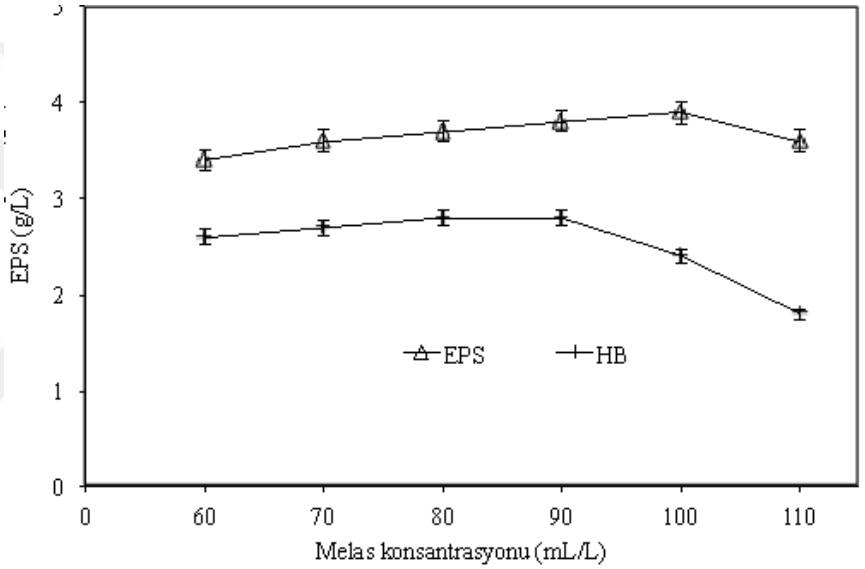
Şekil 4.3. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine sıcaklığın etkisi (Kültür koşulları: 7,0 pH, 60 mL/L melas, 4 g/L pepton ve 72 saat inkübasyon süresi)

Çizelge 4.3. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hücre biyoması	EPS
45	1,9	2,6
50	2,5	3,3
55	2,6	3,4
60	2,4	3,3
65	2,2	2,6

4.4.3. Optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi optimal pH ve sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen deneyler maksimum hücre biyoması 80 mL/L gerçekleşmiştir. maksimum EPS konsantrasyonuna ise 100 ml/L melas konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Daha yüksek melas konsantrasyonlarının ise, hem hücre büyümesini hem de EPS sentezini azalttığı gözlemlenmiştir.



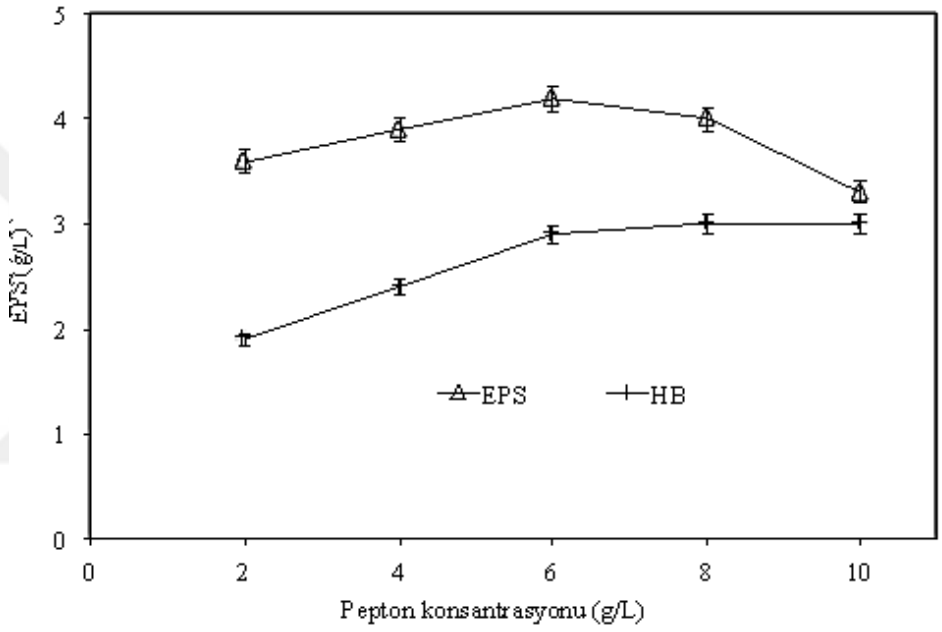
Şekil 4.4. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi (Kültür koşulları: 7,0 pH, 4 g/L pepton, 150 rpm çalaklama hızı, 55°C sıcaklık ve 72 saat inkübasyon süresi)

Çizelge 4.4. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi

Melas konsantrasyonu (ml/L)	**Hücre biyoması**	**EPS**
60	2,6	3,4
70	2,7	3,6
80	2,8	3,7
90	2,8	3,8
100	2,4	3,9
110	1,8	3,6

4.4.4. Optimum pepton konsantrasyonunun belirlenmesi

Deneyler optimal pH, sıcaklık ve pH'da gerçekleştirildiğinde maksimum hücre biyomasına (3,0 g/L) 8 g/L'lik trypton pepton konsantrasyonunda, maksimum EPS konsantrasyonuna (4,2 g/L) 6 g/L pepton konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Pepton ilavesi yapılmayan besiyerlerinde ise hücre büyümesi ve EPS üretimi başarılmamıştır.



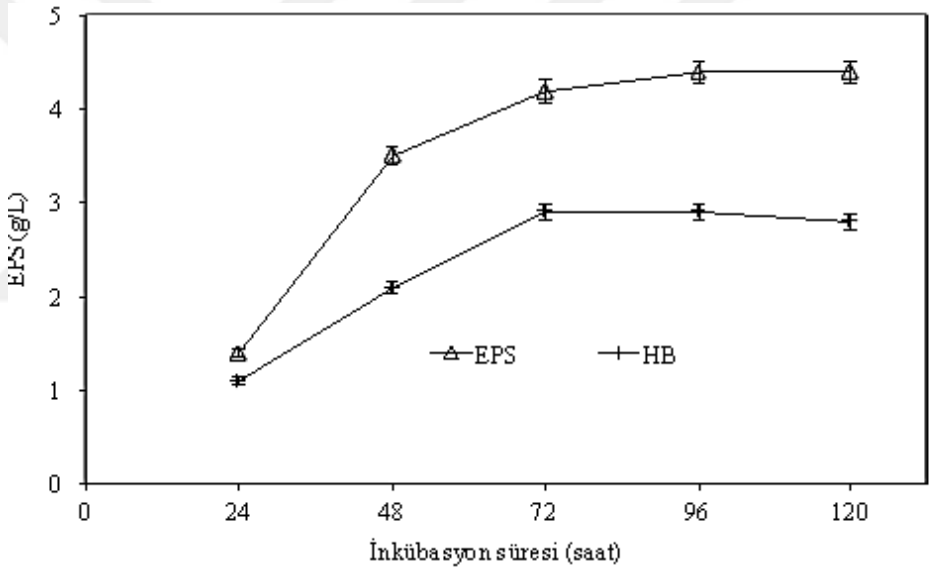
Şekil 4.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi (Kültür koşulları: 7,0 pH, 100 mL/L melas, 150 rpm çalkalama hızı, 55°C sıcaklık ve 72 saat inkübasyon süresi)

Çizelge 4.5. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi

Pepton konsantrasyonu (g/L)	Hücre biyoması	EPS
0	-	-
2	1,9	3,6
4	2,4	3,9
6	2,9	4,2
8	3,0	4,0
10	3,0	3,3

4.4.5. Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Deneyler optimum pH, sıcaklık, melas ve pepton konsantrasyonunda gerçekleştirildiğinde maksimum hücre konsantrasyonuna (2,9 g/L) 72 saatte ulaşıldığı (bununla birlikte en fazla hücre büyümesi ilk 48 saat içerisinde gözlemlendi) 72-96 saatleri arasında ise; hücre biyomasında herhangi bir artışın olmadığı tespit edildi. 96. saatten sonra hücre biyomasında azalma meydana gelmiştir. EPS konsantrasyonu ise 96. saatte maksimuma ulaşıldığı ve 96-120 saatler arasında ise EPS üretiminde herhangi bir artışın olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.6. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi **(**Kültür koşulları: 7,0 pH, 100 mL/L melas, 150 rpm çalkalama hızı, 6 g/L pepton, 55°C sıcaklık ve 72 saat inkübasyon süresi)

Çizelge 4.6. *Anoxybacillus gonensis* YK25 ile EPS üretimi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon süresi	Hücre biyoması	EPS
24	1,1	1,4
48	2,1	3,5
72	2,9	4,2
96	2,9	4,4
120	2,8	4,4

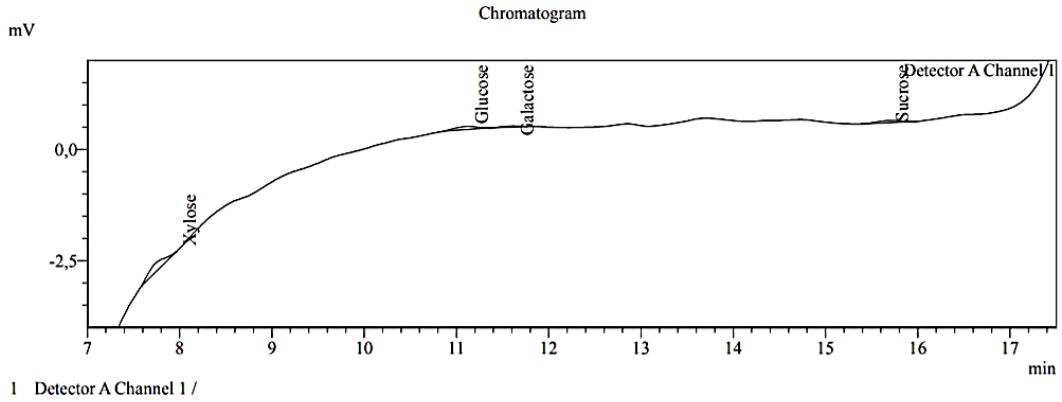
4.5. Üretilen EPS'nin Karakterizasyonu

4.5.1. EPS'nin şeker kompozisyonunun belirlenmesi

Sıcaklığı 40°C ve Inertsil NH_2, 5µm, 250mm x 4,6mm kolonunda yapılan HPLC analizinde az miktarlarda da olsa Ksiloz (Xylose), Glukoz, Galaktoz ve Sükroz şekerlerinin varlığı tespit edilmiştir. Hesaplanan değerler ve kromotogram Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. EPS'de belirlenen şekerler ve miktarları

Şeker	Miktar (µg)
Ksiloz (Xylose)	3,76
Glukoz	1,05
Galaktoz	0,36
Sükroz	1,19



Şekil 4.7. EPS'nin şeker kromotogramı

4.5.2. EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi

Bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı gibi viskozite değerleri üzerinden molekül ağırlığı araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre üretilen EPS'nin molekül ağırlığı 102 kDa olarak hesaplanmıştır.

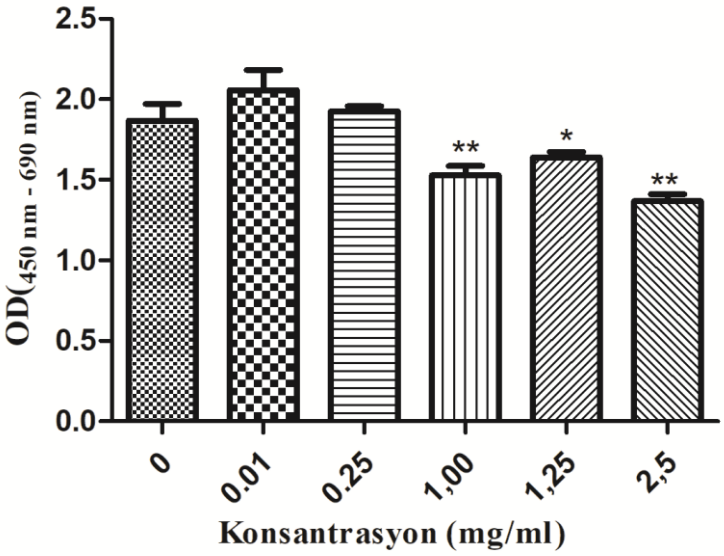
4.6. Üretilen EPS'nin Biyolojik Aktivitesi

4.6.1. EPS'nin antibakteriyal aktivitesi

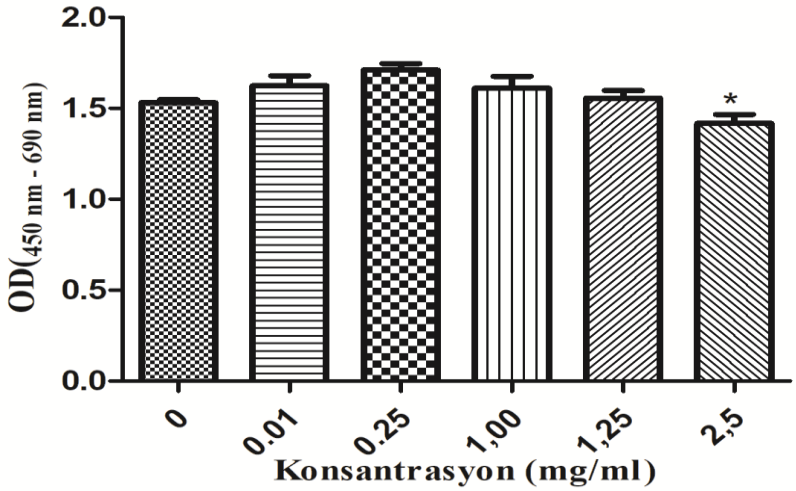
Patojenik test suşlarında yapılan analize göre EPS'nin araştırılan bakteriler üzerinde antibakteriyal etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

4.6.2. EPS'nin antikanser aktivitesi

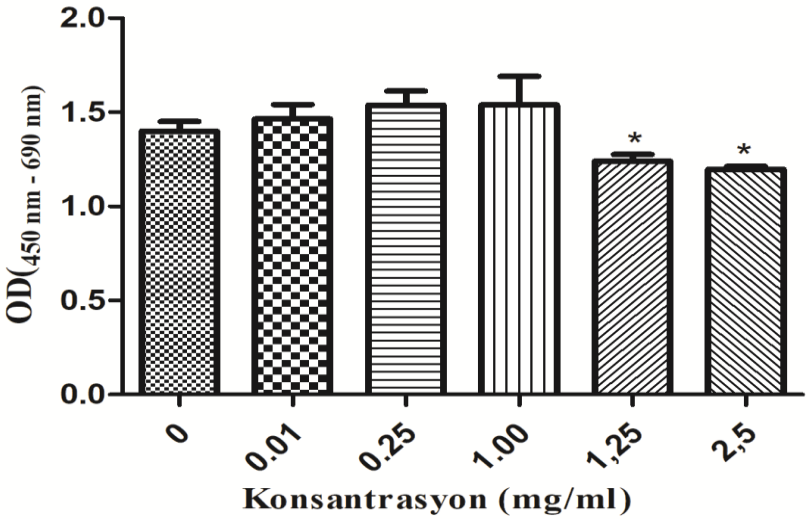
EPS'nin SHSY-5Y, HT-29, Caco-2, A-549 ve DU-145 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmış ve Şekil 4.8'de görüldüğü üzere EPS'nin 1-2,5 mg/ml konsantrasyonlarında A-549 hücre hattında, Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de de görüldüğü gibi 2,5 mg/ml'de Caco-2, HT-29, DU-145, SHSY-5Y kanser hücre hatlarında antikanser etkisi gözlenmiştir.



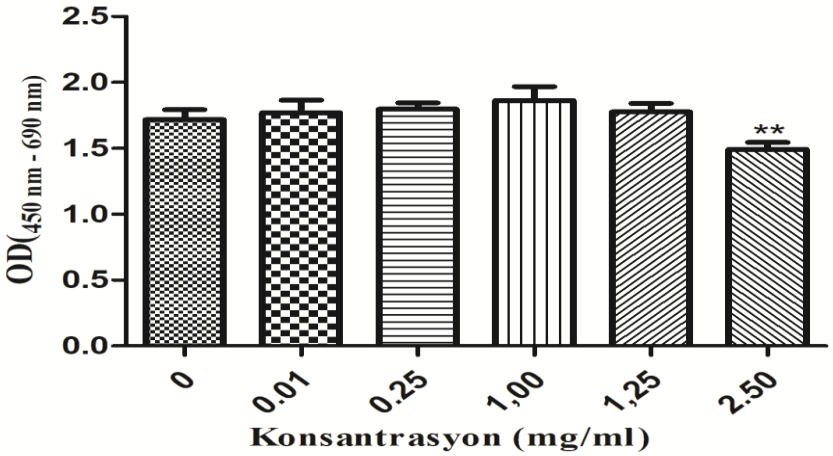
Şekil 4.8. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, A-549 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu



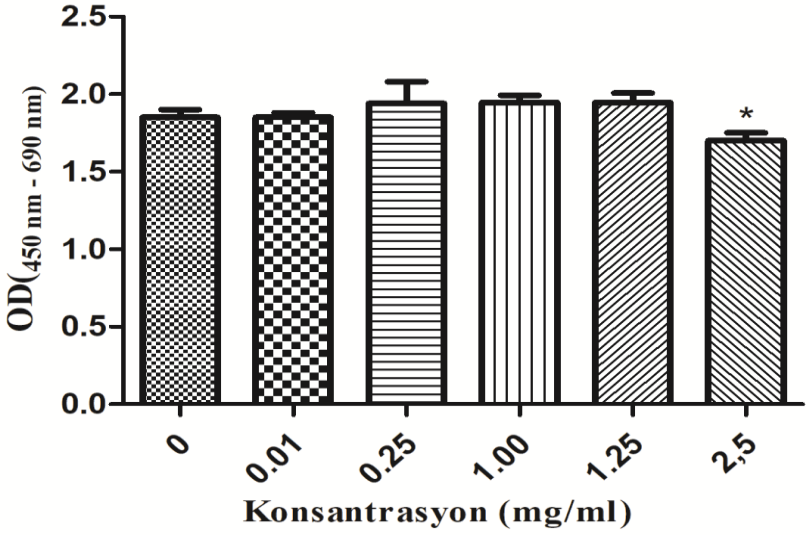
Şekil 4.9. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, Caco-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu



Şekil 4.10. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, HT-29 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu



Şekil 4.11. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, DU-145 hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu



Şekil 4.12. *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinden elde edilen EPS'nin, SHSY-5Y hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılık sonucu

5. TARTIŞMA SONUÇ

Kamış ve pancar şekeri fabrikalarında, sakkarozun kristal halde elde edilmesi ile gerçekleşen işlemlerin sonucunda geriye kalan ve koyu kahve renkli, yüksek viskoziteye sahip yapı, melas olarak tanımlanır (Türkşeker 2014). Dünyada üretilen melasın %75'i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*) elde edilirken, geriye kalan kısmın büyük bir çoğunluğu ise, şeker pancarından (*Beta vulgaris*) üretilmektedir. İşlenen pancardan yaklaşık %4 oranında melas üretimi gerçekleşir (Yılmaz 2006).

Şeker üretim prosesi sonucu açığa çıkan melastan kristal halde şeker eldesi çok düşük olduğundan, işletme için ekonomik açıdan değerli olmayan kalıntı madde olarak ifade edilmektedir (Türkşeker 2014). Melas geniş endüstriyel kullanım alanına sahiptir. Yakıt, kozmetik, gıda ve içecek üretiminde, lastik, baskı ve kimya endüstrisinde çeşitli amaçlar için kullanıldığı belirlenmiştir. Ayrıca tarımsal alanda da büyük oranda kullanılmaktadır (Yılmaz 2006).

Melas düşük maliyete sahip olduğu için etanol, bütanol, biyopolimer, biyohidrojen, enzim, pigment, aminoasit, polihidroksialkonatlar ve organik asit üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır (Hsu *et al.* 2014; Nakata *et al.* 2014; Shen *et al.* 2015). Şeker kamışı melası, yüksek şeker ve gelişim için gerekli metalleri içerdiğinden ksantan, pullulan, welan gibi mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin (EPS) üretilmesinde düşük maliyetli karbon kaynağı olarak tercih edilmektedir (Ahi 2011).

Bu bilgiler doğrultusunda, oldukça geniş uygulama alanına sahip doğal biyopolimerler olan EPS'nin üretimi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, bu üretimin gerçekleştirilebilmesi için kültür ortamına ucuz substrat kaynağı olarak şeker fabrikalarından elde edilen melas kullanılmıştır. Ayrıca EPS üretiminde standart bakteri suşları yerine kaplıca sularından lokal olarak izole edilen yeni suşlar tercih edilmiştir. Böylece, hem melas gibi ucuz substrat kullanımı hem de EPS üretiminde yeni bir mikrobiyal kaynak eldesi amaçlanmıştır.

Bakteri izolasyonu için Erzurum bölgesindeki termal kaplıcalardan (Ilıca, Pasinler, Köprüköy) su örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve toplam 28 bakteri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bakterilerin tamamının EPS üretim kapasitesi değerlendirilmiş ve en yüksek EPS üretimi 3,2 g/L ile YK25 izolatında gerçekleştirilmiştir. Ardından bu izolatın moleküler analizi yapılmış ve *Anoxybacillus gonensis* YK25 olarak Gen Bank'ta tanımlanmıştır.

Literatür bilgilerine göre bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, bakteri cinsleri içerisinden *Anoxybacillus, Geobacillus, Thermolongibacillus, Aeribacillus, Brevibacillus, Paenibacillus* ve *Bacillus*; arkeler de ise *Haloferax* ve *Thermococcus* cinsleri ekzopolisakkarit üretimi için kullanılmıştır *Anoxybacillus* sp. cinsleri ile ekzopolisakkarit üretimi gerçekleştirilmesine rağmen literatürde bu zamana kadar *Anoxybacillus gonensis* bakterisi ile gerçekleştirilmiş EPS üretimi mevcut değildir. Bu yüzden, yaptığımız tez çalışması literatürde bir ilki teşkil etmektedir (Finore *et al.* 2014; Cihan *et al.* 2017).

EPS üretiminde verimi artırmak için kültür parametrelerinin optimizasyonu önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalara göre pH, sıcaklık ve karbon kaynağı konsantrasyonu gibi parametrelerin EPS üretimi üzerinde etkili olduğu ortaya koyulmuştur (Kumar *et al.* 2007). Bu nedenle, çalışmanın ilerleyen aşamasında daha yüksek oranda mikrobiyal EPS eldesi için pH, sıcaklık, melas konsantrasyonu, pepton konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi kültür parametlerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

EPS üretim kapasitesini arttırabilmek için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda optimal pH değeri 7 olarak bulunmuştur ve bu pH değerinde elde edilen EPS üretim miktarı 3,4 g olarak belirlenmiştir. Literatür araştırılması yapıldığında, EPS üretim verimini arttımak için pH optimizasyonun gerçekleştirildiği bir çalışmada, 6 farklı pH değeri araştırılmış en yüksek EPS üretim verimi pH 7'de bulunmuştur (466,03 mg/L), en düşük üretim verimi ise pH 9'da (180,48 mg/L) gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmada, endofitik bir bakteri olan *B. licheniformis* ile gerçekleştirilen çalışmada 200 ml Nutrient

Broth besiyerine %3,5 NaCI (ağırlık/hacim) ve %0,02 glukoz ilave edilmiş ve besiyerinin pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. İnkübasyon sonrası 576 mg/L EPS elde edilmiştir (Singh *et al.* 2011). Bir diğer çalışmada, EPS üretimi için pH 7'de, *Bacillus* suşu ile EPS üretimi gerçekleştirilmiş ve suşun yüksek oranda EPS ürettiği gözlenmiştir (Lee *et al.* 1997). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda elde ettiğimiz optimal pH değerinin literatür ile örtüştüğü belirlenmiştir.

Çalışmamızın bir sonraki optimizasyon basamağında ise sıcaklığın üretim verimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve optimal sıcaklık değeri 55°C bulunmuştur ve bu sıcaklık değerinde EPS üretim miktarı 3,4 g olarak belirlenmiştir. Literatürde, termofilik mikroorganizmalarla gerçekleştirilen ekzopolisakkarit üretiminde optimal sıcaklık değeri 55°C bulunmuştur (Kumar *et al.* 2007). Bu verilere göre, elde ettiğimiz optimal sıcaklık değeri literatür ile paralellik göstermektedir.

Araştırılan bir diğer parametre ise melas konsantrasyonudur. Yapılan denemelere göre en yüksek EPS eldesi açısından optimal melas konsantrasyonu 100 ml/L olarak bulunmuş ve bu değerde üretilen EPS miktarı 3,9 g/L olarak belirlnemiştir. Bu sonuçta, melas konsantrasyonun EPS üretimini etkilediği gerçeğiyle uyumluluk göstermektedir (Moghannem *et al.* 2018; Gojgic-Cvijovic *et al.* 2019).

Literatürde besiyerine katılan peptonların ve onların konsantrasyonlarının mikrobiyal polisakkaritlerin üretimini etkiledeği belirtilmektedir (Ergene and Avcı 2017; Xu *et al.* 2019). Bu yüzden, mevcut çalışmada melas ortamına farklı konsantrasyonlarda trypton pepton eklenmiş ve EPS üretimini etkileyip etkilemediği analiz edilmiştir. Mevcut çalışmada da, pepton eklenmiş ortamda daha fazla EPS üretildiği ve EPS miktarının ortama eklenen pepton konsantrasyonundan etkilendiği ortaya çıkarılmıştır. Örneğin, mevcut çalışmada optimal pepton konsantrasyonu 6 g/L olarak belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalarda, inkübasyon süresininde EPS üretimini etkiledeği belirtilmektedir (Moghannem *et al.* 2018; Solmaz *et al.* 2018). Bu bilgi göz önüne alınarak, mevcut

çalışmada EPS üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkiside araştırılmış ve optimal inkübasyon süresi 96 saat olarak bulunmuştur.

Deneyler optimal parametreleride gerçekleştirildiğinde maksimum EPS üretimi 4,4 g/L' olarak bulunmuştur. Bu doğrultuda, 3,2 g/L'lik ilk EPS üretim verimimiz yapılan optimizasyon çalışmaları ile 4,4 g/L değerine kadar yükseltilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının ardından ürettiğimiz EPS'nin karakteristik özellikleri belirlenmiştir. İlk olarak EPS'nin molekül ağırlığı viskozimetrik yöntemle belirlenmiş ve 102 kDa olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda *Amphora sp.* p1 ve p2 suşlarının EPS üretim kapasiteleri incelenmiş ve toplam ağırlık 25 kDa olarak belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2008). Bir diğer çalışmada ise *Bifidobacterium animalis* mikroorganizması ile gerçekleştirilen en yüksek EPS üretim veriminde EPS'nin molekül ağırılığı 100 kDa olarak bulunmuştur (Leivers *et al.* 2011). Termofilik *Bacillus* suşlarından elde edilen EPS'ler için 380, 400, 600 ve 1000 kDa'lık molekül ağırlığı belirtilmiştir (Nicolaus *et al.* 2003). Başka bir termofil mikroorganizma *B. thermoantarcticus*'dan üretilen EPS'nin molekül ağırlığı 300 kDa bulunmuştur (Manca *et al.* 1996).

Anoxybacillus gonensis YK25 bakterisinden elde ettiğimiz EPS'nin şeker kompozisyonu HPLC analizi ile belirlenmiş ve Ksiloz (Xylose), Glukoz, Galaktoz ve Sükroz monosakkaritlerinden meydana gelen bir heteropolisakkarit olduğu belirlenmiştir. Zhao *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, üretilen EPS'nin moleküler analizi sonucunda *Anoxybacillus sp.* R4-33'un ürettiği EPS'nin glukoz ve mannoz'dan meydana geldiği belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada, *Bacillus* suşlarının EPS üretim yeteneği incelenmiş ve üretilen EPS'nin analazi yapıldığında galaktoz ve fruktozdan meydana geldiği saptanmıştır (Yilmaz *et al.* 2011).

Ürettiğimiz EPS'nin biyolojik özelliklerinin araştırılması için antibakteriyal ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. EPS'nin *Staphyloccocus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin gelişimi üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde petrilerde zon oluşumu gözlenmemiştir. Li *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, *Bifidobacterium bifidum*

WBIN03 ve *Lactobacillus plantarum* R315'den elde ettikleri EPS'lerin (300 µg/ml) *Cronobacter sakazakii, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphyloccocus aureus, Candida albicans, Bacillus cereus, Salmonella typhimurium* ve *Shigella sonnei* gibi patojen mikroorganizmalarına karşı agar difüzyon analizi ile antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, her iki EPS'nin de test mikroorganizmaları üzerinde değişen inhibisyon çaplarında zon oluşturduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada, Nehal *et al.* (2019) tarafından *Lactococcus lactis* (LT898177.1) suşu ile EPS elde edilmiş ve bu EPS'nin farklı konsantrasyonlarda (100, 200 ve 300 mg/mL) solüsyonları hazırlanarak *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Proteus mirabilis, Acinetobacter baumannii, Enterobacter cloacae* ve *Candida albicans* patojenlerinde antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre, üretilen EPS'nin test mikroorganizmaları üzerinde güçlü inhibisyon etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız test bakterilerine karşı diğer araştırmacıların ürettikleri EPS'lerin inhibisyon etkisi gözlenmesine rağmen *Anoxybacillus gonensis* YK25 bakterisinde elde ettiğimiz EPS'nin test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir.

EPS'nin antikanser aktivitesi; 0 ila 2,25 mg/ml EPS konsantrasyonları arasında SHSY-5Y, HT-29, Caco-2, A-549 ve DU-145 hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Bu kanserli hücre hatlarına, belirlenen EPS konsantrasyonları uygulanmış ve inhibitör etkinin ortaya koyulabilmesi için hücre canlılıkları ELİSA cihazından (450-690 nm) ölçülmüştür. A-549 (insan akciğer kanseri) hücreleri için tüm uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında en yüksek 2,5 mg/ml, ikinci olarak 1 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan EPS'nin sitotoksik etkisi diğer konsantrasyonlara göre daha fazladır. Benzer şekilde, Parthiban *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, *Bacillus thuringiensis*'den ürettikleri ekzopolimerin A-549 akciğer kanseri hücre hattındaki sitotoksititesi araştırılmış ve güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

EPS'mizin Caco-2 (insan kolon kanseri) hücre hatındaki sitotoksik etkisi incelendiğinde, tüm konsantrasyonlar arasında 2,5 mg/ml'nin daha yüksek inhibisyon etki gösterdiği

belirlenmiştir. Venkataraman *et al.* (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise Caco-2 kolerektal kanser hücre hattında probiyotik *Lactobacillus acidophilus*'dan üretilen EPS'nin sitotoksik etkisi araştırılmış ve en yüksek inhibisyon etki 5 mg/ml konsantrasyon değerinde bulunmuştur.

Bir sonraki basamakta, EPS'mizin HT-29 (insan kolon kanseri) hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmış ve sitotoksik aktiviteleri 2,5 ile 1,25 mg/ml konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Di *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'nin HT-29 kanser hücrelerinde antikanser aktivitesi araştırılmış ve sonuçlara göre EPS uygulamasının ardından HT-29 hücrelerinin G0/G1'de hücre döngüsünü durdurduğu ve Kaspaz-3 aktivitesini arttırarak apoptozu tetiklediği ortaya koyulmuştur. Bu doğrultuda, ilerleyen çalışmalarla insan kolon kanserinde terapötik madde olarak ekzopolisakkartlerin kullanımı umut vaad edebilir.

Bir diğer basamakta ise EPS'mizin DU-145 (insan prostat kanseri) ve SHSY-5Y (insan nöroblastom kanseri) hücre hatlarındaki inhibisyon etkisi incelenmiş ve tüm uygulanan konsantrasyonlar içerisinde 2,5 mg/ml konsantrasyondaki EPS'nin sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Literatürde bakteriyal ekzopolisakkaritlerin DU-145 ve SHSY-5Y hücre hatlarındaki antikanser aktivitelerine dair bir çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen bu hücrelerin sorumlu olduğu kanser tiplerinde (prostat kanseri ve nöroblastoma), EPS'lerin başka hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. El-Newary *et al.* (2017) çalışmalarında, *B. amyloliquefaciens* 3MS 2017 suşundan elde ettikleri EPS'nin insan prostat kanseri hücre hattındaki (PC3) antikanser etkisi hücre canlılığı analizi ile araştırılmış ve 100 µg/ml konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Lee *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmalarında, *Cordyceps takaomontana*'dan intraselüler ve ekstraselüler polisakkaritler elde edilmiştir. Üretilen polisakkaritlerin insan nöroblastoma hücrelerindeki inhibitör etkisinin belirlenmesi için SK-N-SH hücre hattına 0,5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda polisakkarit uygulanmış ve hücre canlılık analizi test edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre her iki polisakkaritinde kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre

ekzopolisakkaritlerin birçok kanser hücre hattında inhibisyon etki gösteriği *in vitro* çalışmalarla desteklenmekte ve önemli kanser terapötik özelliklerinin tanımlanmasıyla kanser tedavileri için gelecek çalışmalara ışık tutmaktadır.

Sonuç olarak son yıllarda çevre duyarlılığının artması, yenilenebilir kaynaklara olan ilgi ve biyoteknolojideki gelişmeler mikrobiyal ekzopolisakkaritlere olan ilgiyi arttırmıştır. EPS'lerin artan ticari öneminde gıda katkısı olmasından ham petrol arıtmada değerlendirilebilmesi gibi çeşitli alanlarda birçok uygulama olanağı bulması en önemli faktördür. Ancak üretim maliyetlerinin diğer polisakkaritlerden fazla olması üretim ve kullanım alanını kısıtlayan en önemli faktördür. Bu nedenle ucuz karbon kaynakları kullanılarak EPS üretimi konusundaki çalışmalar hız kazanmıştır. Melas içeriğindeki şeker ve diğer bileşenlerle karbon ve azot kaynağı olarak EPS üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip bir kaynaktır. Yaptığımız çalışmada melasın EPS üretimine katkı sağladığı belirlenmiştir. Ancak bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M.M., Attia, H. and Azabou, S., 2018. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. International journal of biological macromolecules, 108, 719-728.

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Ahi, S., 2011. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi ile Antibiyotik Direçliliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Albayrak, Ş., 2018. Türkiyenin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Baltacı, M.Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Bhaskar, P. and Bhosle, N.B., 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. Current Science, 45-53.

Boels, I.C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M. and De Vos, W.M., 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 11(9), 723-732.

Bramhachari, P.V. and Dubey, S., 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by Vibrio harveyi strain VB23. Letters in applied microbiology, 43(5), 571-577.

Burnett, P.-G.G., Daughney, C.J. and Peak, D., 2006. Cd adsorption onto Anoxybacillus flavithermus: Surface complexation modeling and spectroscopic investigations. Geochimica et Cosmochimica Acta, 70(21), 5253-5269.

Carl, A., 2005. Tietz klinik kimyada temel ilkeler. Beşinci baskıdan çeviri. Aslan D, çeviri editörü. PalmeYayıncılık, Ankara, 427-461.

Cerning, J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Le lait, 75(4-5), 463-472.

Cihan, A.C., Karaca, B., Ozel, B.P. and Kilic, T., 2017. Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to Bacillaceae family. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(6), 118.

Costerton, J.W., Cheng, K., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Reviews in Microbiology, 41(1), 435-464.

de Boer, A.S., Priest, F. and Diderichsen, B., 1994. On the industrial use of Bacillus licheniformis: a review. Applied microbiology and biotechnology, 40(5), 595-598.

De Vuyst, L. and Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews, 23(2), 153-177.

Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M.T. and Sağdıç, O., 2016. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. LWT-Food Science and Technology, 71, 116-124.

Di, W., Zhang, L., Yi, H., Han, X., Zhang, Y. and Xin, L., 2018. Exopolysaccharides produced by Lactobacillus strains suppress HT-29 cell growth via induction of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. Oncology letters, 16(3), 3577-3586.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases, 8(9), 881.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. and Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate polymers, 87(2), 951-962.

El-Newary, S.A., Ibrahim, A.Y., Asker, M.S., Mahmoud, M.G. and El Awady, M.E., 2017. Production, characterization and biological activities of acidic exopolysaccharide from marine Bacillus amyloliquefaciens 3MS 2017. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(7), 652-662.

Ergene, E. and Avcı, A., 2017. Effects of Cultural Conditions on Exopolysaccharide Production by Bacillus sp. ZBP4. Journal of Agricultural Sciences, 24(3), 386-393.

Fialho, A.M., Moreira, L.M., Granja, A.T., Popescu, A.O., Hoffmann, K. and Sá-Correia, I., 2008. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Applied microbiology and biotechnology, 79(6), 889.

Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B. and Poli, A., 2014. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. Marine drugs, 12(5), 3005-3024.

Franz, G., 1989. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. Planta medica, 55(06), 493-497.

Freitas, F., Alves, V.D. and Reis, M.A., 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in biotechnology, 29(8), 388-398.

Freitas, F., Alves, V.D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R. and Reis, M.A., 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a Pseudomonas strain grown on glycerol. Bioresource technology, 100(2), 859-865.

Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma, 122(2-4), 109-119.

Gojgic-Cvijovic, G., Jakovljevic, D., Loncarevic, B., Todorovic, N., Pergal, M.V., Ciric, J., Loos, K., Beskoski, V. and Vrvic, M., 2019. Production of levan by Bacillus licheniformis NS032 in sugar beet molasses-based medium. International journal of biological macromolecules, 121, 142-151.

Gould, G.W., 1991. Antimicrobial compound. Biotechnology and food ingredients, 461-482.

Hamed, S.B. and Belhadri, M., 2009. Rheological properties of biopolymers drilling fluids. Journal of Petroleum Science and Engineering, 67(3-4), 84-90.

Hsu, C.-W., Li, Y.-C., Chu, C.-Y., Liu, C.-M. and Wu, S.-Y., 2014. Feasibility evaluation of fermentative biomass-derived gas production from condensed molasses in a continuous two-stage system for commercialization. International Journal of Hydrogen Energy, 39(33), 19389-19393.

Isfahani, F.M., Tahmourespour, A., Hoodaji, M., Ataabadi, M. and Mohammadi, A., 2018. Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. Journal of Cleaner Production, 185, 922-928.

Kishk, Y.F. and Al-Sayed, H.M., 2007. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. LWT-Food Science and Technology, 40(2), 270-277.

Kodali, V.P., Das, S. and Sen, R., 2009. An exopolysaccharide from a probiotic: biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. Food research international, 42(5-6), 695-699.

Kranenburg, R.v., Marugg, J.D., Van Swam, I.I., Willem, N.J. and De Vos, W.M., 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in Lactococcus lactis. Molecular microbiology, 24(2), 387-397.

Kumar, A.S., Mody, K. and Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides–a perception. Journal of basic microbiology, 47(2), 103-117.

Kumar, C.G., Joo, H.-S., Choi, J.-W., Koo, Y.-M. and Chang, C.-S., 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic Bacillus sp. I-450. Enzyme and microbial technology, 34(7), 673-681.

Lee, I.Y., Seo, W.T., Kim, G.J., Kim, M.K., Ahn, S., Kwon, G.S. and Park, Y.H., 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by Bacillus polymyxa. Bioprocess Engineering, 16(2), 71-75.

Lee, S., Hwang, H. and Yun, J.W., 2010. Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus Cordyceps takaomontana and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells. Korean Journal of Chemical Engineering, 26, 1075-1083.

Lee, S.Y., Park, S.J., Park, J.P., Lee, Y. and Lee, S.H., 2005. Economic aspects of biopolymer production. Biopolymers Online: Biology• Chemistry• Biotechnology• Applications, 10.

Leivers, S., Hidalgo-Cantabrana, C., Robinson, G., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. and Laws, A.P., 2011. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by Bifidobacterium animalis subsp. lactis IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster. Carbohydrate Research, 346(17), 2710-2717.

Levander, F., Svensson, M. and Rådström, P., 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of Streptococcus thermophilus. Appl. Environ. Microbiol., 68(2), 784-790.

Li, S., Huang, R., Shah, N.P., Tao, X., Xiong, Y. and Wei, H., 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315. Journal of dairy science, 97(12), 7334-7343.

Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., Zhao, G., Xu, L., Shen, L. and Liu, Y., 2018. Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. LWT, 95, 17-22.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X., 2009. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. Carbohydrate polymers, 78(2), 275-281.

Liu, Y.-G., Zhou, M., Zeng, G.-M., Wang, X., Li, X., Fan, T. and Xu, W.-H., 2008. Bioleaching of heavy metals from mine tailings by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: effects of substrate concentration. Bioresource technology, 99(10), 4124-4129.

Lynch, M.J. and Moffat, J.A., 2005. Bioremediation–prospects for the future application of innovative applied biological research. Annals of Applied Biology, 146(2), 217-221.

Mahapatra, S. and Banerjee, D., 2013. Evaluation of in vitro antioxidant potency of exopolysaccharide from endophytic Fusarium solani SD5. International journal of biological macromolecules, 53, 62-66.

Maija, S., 1995. Development of Dietary Probiotics: Estimation of Optimal Lactobacillus GG Concentration. Doctoral Thesis, Turku. Turku Univeristy Library. ISBNM 952-90-6598-1 ….

Manca, M., Nocentini, A.M., Belis, C.A., Comoli, P. and Corbella, L., 1996. Invertebrate fossil remains as indicators of late Quaternary environmental changes in Latium crater lakes (L. Albano and L. Nemi). MEMORIE-ISTITUTO ITALIANO DI IDROBIOLOGIA, 55, 149-176.

Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C. and Quesada, E., 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria Halomonas ventosae and Halomonas anticariensis. Research in Microbiology, 157(9), 827-835.

Minervini, F., De Angelis, M., Surico, R., Di Cagno, R., Gänzle, M. and Gobbetti, M., 2010. Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by Lactobacillus curvatus DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. International journal of food microbiology, 141(1-2), 130-135.

Mironescu, M., 2003. Microbial polysaccharides production, characterisation and properties. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technol, 7(2).

Mishra, A. and Jha, B., 2013. Microbial exopolysaccharides. The prokaryotes: Applied bacteriology and biotechnology, 179-192.

Moghannem, S.A., Farag, M.M., Shehab, A.M. and Azab, M.S., 2018. Exopolysaccharide production from Bacillus velezensis KY471306 using statistical experimental design. brazilian journal of microbiology, 49(3), 452-462.

Montgomery, R., Conway, T., Spector, A. and Chappell, D., 2000. Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım. Palme Yayıcılık, 175-204, Ankara.

Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T. and Mori, Y., 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 17(8), 1012-1017.

Nakata, H., Tamura, M., Shintani, T. and Gomi, K., 2014. Evaluation of baker's yeast strains exhibiting significant growth on Japanese beet molasses and compound analysis of the molasses types. Journal of bioscience and bioengineering, 117(6), 715-719.

Nampoothiri, K., John, R.P., Bindhumol, I. and Aswathy, R., 2008. Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria.

Narayan, V.V., Hatha, M.A., Morgan, H.W. and Rao, D., 2008. Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu hot springs in Fiji. Microbes and environments, 1-14.

Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S. and Mohammed, S., 2019. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from Lactococcus lactis F-mou. Microbial pathogenesis, 132, 10-19.

Nicolaus, B., Manca, M.C., Romano, I. and Lama, L., 1993. Production of an exopolysaccharide from two thermophilic archaea belonging to the genus Sulfolobus. FEMS microbiology letters, 109(2-3), 203-206.

Nicolaus, B., Moriello, V., Maugeri, T., Gugliandolo, C. and Gambacorta, A., 2003. Bacilli from shallow Mediterranean marine vents producers of exopolysaccharides. Recent Res Dev Microbiol, 7, 197-208.

Onbaşılı, D., 2006. Çevredeki Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi. PhD Thesis.

Pal, A. and Paul, A., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. Indian journal of microbiology, 48(1), 49.

Parthiban, K., Vignesh, V. and Thirumurugan, R., 2014. Characterization and in vitro studies on anticancer activity of exopolymer of Bacillus thuringiensis S13. African Journal of Biotechnology, 13(21).

Patel, A. and Prajapat, J., 2013. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Advances in Dairy Research, 1-8.

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K., 2000. Anoxybacillus pushchinensis gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of Anoxybacillus flavitherms comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(6), 2109-2117.

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G., Laurinavichius, K. and Cleland, D., 2009. Genus IV. Anoxybacillus. Eds: B. W. Williams. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 134-141. New York.

Qiao, M., 1996. Lantibiotic nisin of Lactococcus lactis: biosynthesis, immunity and regulation. Ph.D. Thesis, Helsinki University, Helsinki.

Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., Kuncheva, M., Petrov, K. and Kambourova, M., 2013. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium Aeribacillus pallidus 418. Applied Biochemistry and Biotechnology, 171(1), 31-43.

Rawlings, D.E. and Johnson, D.B., 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. Microbiology, 153(2), 315-324.

Rehm, B.H., 2009. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. Horizon Scientific Press.

Rekha, M. and Sharma, C.P., 2007. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. Trends Biomater Artif Organs, 20(2), 116-121.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P., 2002a. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 12(2-3), 163-171.

Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P. and Clara, G., 2008. Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 74(15), 4737-4745.

Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. and Gorbach, S.L., 1991a. Lactic acid bacteria in health and disease. Eds: S. Salminen and A. Von Wright. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Marcel Dekker, 343-358. New York.

Shahnavaz, B., Karrabi, M., Maroof, S. and Mashreghi, M., 2015. Characterization and molecular identification of extracellular polymeric substance (EPS) producing bacteria from activated sludge. Journal of Cell and Molecular Research, 7(2), 86-93.

Shen, Q., Lin, H., Wang, Q., Fan, X., Yang, Y. and Zhao, Y., 2015. Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of Trichosporon fermentans in high-density molasses fermentation. Bioresource technology, 176, 249-256.

Singh, P. and Cameotra, S.S., 2004. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. Biochemical and biophysical research communications, 319(2), 291-297.

Singh, R., Paul, D. and Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. Trends in microbiology, 14(9), 389-397.

Singh, R.P., Shukla, M.K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. and Jha, B., 2011. Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria Bacillus licheniformis. Carbohydrate polymers, 84(3), 1019-1026.

Singh, R.S., Saini, G.K. and Kennedy, J.F., 2008. Pullulan: microbial sources, production and applications. Carbohydrate polymers, 73(4), 515-531.

Singha, T.K., 2012. Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. IOSR J Pharm, 2(2), 271-281.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M., Smith, C. and Kent Jr, R., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology, 25(2), 134-144.

Solmaz, K., Ozcan, Y., Mercan Dogan, N., Bozkaya, O. and Ide, S., 2018. Characterization and Production of Extracellular Polysaccharides (EPS) by Bacillus Pseudomycoides U10. Environments, 5(6), 63.

Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., 1993. Bacillus and Related Genera. Eds. Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria – systematics and ecology of Bacillus, American Society for Microbiology, 3-11. Washington.

Stingele, F., Newell, J.W. and Neeser, J.-R., 1999. Unraveling the function of glycosyltransferases in Streptococcus thermophilus Sfi6. Journal of bacteriology, 181(20), 6354-6360.

Sutherland, I., 1977. Microbial exopolysaccharide synthesis. American Chemical Society, 45, 40-57.

Sutherland, I., 2002. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. Microbiology today, 29, 70-71.

Sutherland, I.W., 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press.

Todar, K. 2015. Textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin, http://www.textbookofbacteriology.net/kt_contact.html (23.12.2019).

Tsuda, H., Hara, K. and Miyamoto, T., 2008. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum mutant strain 301102S. Journal of dairy science, 91(8), 2960-2966.

Türkşeker. 2014. Melas. Türkiye Şeker Fabrikaları Anonim Şirketi, http://www.turkseker.gov.tr/Urunler (23.12.2019).

Venkataraman, D., RamKumar Pandian, S., Sivasubramaniam, S., Hariharan, N. and Sundar, K., 2015. Optimization of Anticancer Exopolysaccharide Production From Probiotic Lactobacillus Acidophilus by Response Surface Methodology. Preparative biochemistry & biotechnology, 46.

Vidhyalakshmi, R., Valli, N.C., Kumar, G.N. and Sunkar, S., 2016. Bacillus circulans exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. International journal of biological macromolecules, 87, 405-414.

Vos, P., Rainey, F.A., Whitman, W.B., Krieg, N.R., Garrity, G.M., Schleifer, K.H., Jones, D. and Ludwig, W., 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume three the Firmicutes. Springer, New York.

Welman, A.D. and Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in biotechnology, 21(6), 269-274.

Xu, L., Wang, F., Zhang, Z. and Terry, N., 2019. Optimization of Polysaccharide Production from Cordyceps militaris by Solid-State Fermentation on Rice and Its Antioxidant Activities. Foods, 8(11), 590.

Xu, R., Shen, Q., Ding, X., Gao, W. and Li, P., 2011. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from Bifidobacterium animalis RH. European Food Research and Technology, 232(2), 231-240.

Yang, B.Y., Brand, J.M., Gray, J.S. and Montgomery, R., 2001. Extracellular polysaccharides of modified strains of Erwinia spp. Carbohydrate Research, 333(4), 295-302.

Yılmaz, M., 2006. Bazı Bacillus türlerinin ekzopolisakkarid (EPS) üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi, Niğde.

Yilmaz, M., Celik, G.Y., Aslim, B. and 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.

Yilmaz, M., Yuvali Celik, G., Aslim, B. and Onbasili, D., 2011. 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.

Yoshida, T., Ayabe, Y., Yasunaga, M., Usami, Y., Habe, H., Nojiri, H. and Omori, T., 2003. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph Methylobacillus sp. strain 12S. Microbiology, 149(2), 431-444.

Yue, Z.-B., Li, Q., Li, C.-c., Chen, T.-h. and Wang, J., 2015. Component analysis and heavy metal adsorption ability of extracellular polymeric substances (EPS) from sulfate reducing bacteria. Bioresource technology, 194, 399-402.

Zhang, J., Miao, Y., Zhang, Q., Sun, Y., Wu, L. and Peng, Y., 2019. Mechanism of stable sewage nitrogen removal in a partial nitrification-anammox biofilm system at low temperatures: Microbial community and EPS analysis. Bioresource technology, 122459.

Zhang, S., Xu, C. and Santschi, P.H., 2008. Chemical composition and 234Th (IV) binding of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the marine diatom Amphora sp. Marine Chemistry, 112(1-2), 81-92.

Zhao, S., Cao, F., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, F. and 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.

ÖZGEÇMİŞ

1995 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Erzurum'da tamamladı. 2013 yılında girdiği Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde 2017 yılında bölüm birinciliği ve fakülte üçüncülüğü ile mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.