TERMOFİLİK *Anoxybacillus pushchinoensis* G11'DEN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN KARAKTERİZASYONU

Berna GENÇ

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

2020

(Her hakkı saklıdır)

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

TERMOFİLİK *Anoxybacillus pushchinoensis* G11'DEN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN KARAKTERİZASYONU

(Characterization of Exopolysaccharide Produced from Thermophilic *Anoxybacillus pushchinoensis* G11)

DOKTORA TEZİ

Berna GENÇ

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Şubat, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Berna GENÇ tarafından hazırlanan 'Termofilik *Anoxybacillus pushchinoensis* G11'den Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu' başlıklı çalışması 16/01/ 2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ *Ahi Evran Üniversitesi*
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN *Atatürk Üniversitesi*
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN *Atatürk Üniversitesi*
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ *Erzurum Teknik Üniversitesi*

Enstitü Yönetim Kurulunun 27.02.2020 tarih ve 09-78 sayılı kararı.

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

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.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "Termofilik *Anoxybacillus pushchinoensis* G11'den Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	**Tezin Benzerlik Oranı (%)**	**Maksimum Oran (%)**
Giriş	**9**	**30**
Kuramsal Temeller	**0**	**30**
Materyal ve Metot	**4**	**35**
Bulgular	**0**	**20**
Tartışma	**0**	**20**
Tezin Geneli	**9**	**25**

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

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

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Berna GENÇ	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
İmza:	İmza:

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

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

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

TEŞEKKÜR

Tez araştırma ve çalışmalarımda akademik destek ve yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve tez izleme komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a, manevi desteklerinden dolayı aileme, eşime ve kızıma sonsuz teşekkürler ederim.

Berna GENÇ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TERMOFİLİK *Anoxybacillus pushchinoensis* G11'DEN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN KARAKTERİZASYONU

Berna GENÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu çalışmada, mikrobiyal polisakkarit üreticisi bakterinin izolasyonu ve moleküler identifikasyonu ve elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS) biyolojik, kimyasal ve reolojik karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, kaplıcalardan toplanan örneklerden termofilik bakteriler izole edilip, en iyi EPS üreticisi olan izolat, moleküler (16S rRNA sekans analizi) ve konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış, antibiyotik dirençliliği ve endüstriyel enzim üretebilme yeteneği araştırılmıştır. İzolatın, EPS üretimi gerçekleştirilmiş, elde edilen EPS'nin kimyasal (çözünürlük, karbonhidrat ve protein içeriğin belirlenmesi, kompozisyon, molekül ağırlığı, fonksiyonel grup analizi, termal analizler, X ışını kırınım deseni ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleme), reolojik (sıcaklık, kayma hızı ve yoğunluğun etkisi) ve biyolojik özelliklerinin (antioksidan, antibiyofilm ve antitümör aktivite) karakterizasyonu yapılmıştır.

Bulgular: Termofilik kaynaklardan izole edilen bakteriyel izolatlar arasından en anlamlı ekzopolisakkarit üreticisi izolat *Anoxybacillus pushchinoensis* G11 olarak belirlenmiştir. Sulfamethoxazol dirençliliğine sahip *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin, %93 karbonhidrat (arabinoz, früktoz, glikoz ve galaktoz) ve %1,08 protein içerdiği belirlenmiştir. 24,2 dL/g iç viskozite ve 75,5 kDa molekül ağırlığına sahip EPS'nin, kimyasal bağ analizi neticesinde; 1217cm^{-1}'de sülfat esterinin varlığını gösteren bağ titreşimi elde edilmiştir. XRD ve SEM görüntülemesi ile yarı kristalin yapıda olduğu belirlenen EPS'nin, termal analizleri neticesinde 800°C'de ağırlığının %36'sını koruyabildiği, kristalinizasyon ve erime sıcaklıklarının ise 221°C ve 255°C olduğu tespit edilmiştir. Newtonian akış profili gösteren EPS'nin, viskozitesinin sıcaklık bağımlı olduğu ve antibiyofilm ve antitümör aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği heteropolisakkarit, farklı ve değişken koşullara uyum sağlayabilecek, özellikle akış ve sıcaklık uygulamalarının temel alındığı farklı endüstriyel proseslerde kararlılık gösteren bir polimer olacağı; gıda, medikal ve farmasötik alanlarda kullanılabilirliğinin yüksek olabileceği düşünülmektedir.

Şubat 2020, 117 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus pushchinoensis*, ekzopolisakkarit, antitümör, antibiyofilm, viskozite

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED FROM THERMOPHILIC *Anoxybacillus pushchinoensis* G11

Berna GENÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: In this study, isolation and molecular identification of the microbial polysaccharide producer bacteria and biological, chemical and rheological characterization of the exopolysaccharide (EPS) were aimed.

Method: Thermophilic bacteria were isolated from samples from hot springs and the significant EPS producer was identified by molecular (16S rRNA sequencing analysis) and conventional methods. The ability of the isolate, which was tested for antibiotic resistance, to produce industrial enzymes was investigated. EPS production has been carried out, the chemical (solubility, carbohydrate and protein content, composition, molecular weight, functional group analysis, thermal analysis, X-ray diffraction pattern and scanning electron microscopy), rheological (temperature, shear rate and density) and biological properties (antioxidant, antibiofilm and antitumor activity) of the EPS were performed.

Findings: Among the bacterial isolates isolated from thermophilic sources, the most significant exopolysaccharide producer isolate was determined as Anoxybacillus pushchinoensis G11. It is determined that the EPS produced by *A. pushchinoensis* G11 with sulfamethoxazole resistance contains 93% carbohydrates (arabinose, fructose, glucose and galactose) and 1.08% protein. As a result of chemical bond analysis of EPS with 24.2 dL / g internal viscosity and 75.5 kDa molecular weight; bond vibration at 1217cm^{-1} was obtained indicating the presence of sulphate ester. It was determined that EPS, which was semi-crystalline by XRD and SEM imaging, could maintain 36% of its weight at 800°C and crystallization and melting temperatures were 221°C and 255°C, in order. It has been observed that the viscosity of EPS showing Newtonian flow was temperature dependent and had antibiofilm and antitumor activities.

Results: The heteropolysaccharide by *A. pushchinoensis* G11 was a polymer that could adapt to different and variable conditions, especially in different industrial processes based on flow and temperature; it was considered to be highly feasible especially in food, medical and pharmaceutics.

February 2020, 117 pages

Keywords: *Anoxybacillus pushchinoensis*, exopolysaccharide, antitumor, antibiofilm, viscosity

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ xii
GİRİŞ 1
Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler ve Çeşitleri 1
Homopolisakkaritler 2
Levan. 2
Selüloz. 3
Pullulan. 3
Kurdlan. 4
Heteropolisakkaritler 6
Ksantan. 6
Gellan. 7
Aljinat. 8
Hiyalüronik asit. 9
Süksinoglikan. 10
EPS Üreten Mikroorganizmalar 10
EPS üreten ekstremofilik bakteriler. 11
Termofilik bakteriler. 12
EPS Üretimini Etkileyen Etmenler 14
EPS'nin Bileşenleri 15
Polisakkaritler. 15
Protein. 15
DNA ve hümik bileşenler. 16
EPS'lerin Biyosentezi, Hücre Dışı Salınımı ve Genetiği. 16
Öncül substrat sentezi. 17

Polimerizasyon ve sitoplazmik membran transferi. 17
Zar dışına salınım. 18
EPS Ekstraksiyon Metotları 18
EPS'lerin Fizyolojik Özellikleri 20
EPS'lerin Kullanım Alanları 20
Reolojik Kavramlar 22
KURAMSAL TEMELLER 24
MATERYAL ve METOT 28
Örnek Toplama ve Bakterilerin İzolasyonu 28
Ekzopolisakkarit (EPS) Üreten Bakterilerin Taranması 28
EPS üretimi. 28
Ekstraksiyon. 29
EPS Üreten İzolatın Fizyolojik Gereksinimlerin Belirlenmesi 29
EPS Üreten İzolatın Kültürel, Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 29
Gram boyama. 29
Endospor boyama. 30
Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi. 30
EPS Üreten İzolatın Moleküler Tanılaması 33
Genomik DNA izolasyonu. 33
16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesi. 33
16S rRNA PCR jel elektroforezi. 34
Kompotent hücrenin hazırlanması. 34
Ligasyon. 35
Transformasyon. 35
Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım. 35
Koloni PCR için hazırlık ve PCR reaksiyonu. 35
Plazmit izolasyonu ve yoğunluklarının belirlenmesi. 36
DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağacın oluşturulması. 37
EPS Karakterizasyonu 37
Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi. 37
Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi. 37
Protein içeriğinin belirlenmesi. 38
Moleküler kompozisyonun belirlenmesi. 38
Molekül ağırlığının belirlenmesi. 39

Fonksiyonel grup analizi. 39
Termogravimetrik analiz. 39
Diferansiyel taramalı kalorimetre analizi. 39
X-ışını kırınımı analizi. 40
Taramalı elektron mikroskopisi. 40
Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 40
Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi 40
Antimikrobiyal aktivite. 40
Antioksidan aktivite. 41
Antibiyofilm aktivite. 42
Antitümör aktivite. 43
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 44
Ekzopolisakkarit (EPS) Üreten İzolatın İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu 45
A. pushchinoensis G11'in Antibiyotik Duyarlılığı 50
A. pushchinoensis G11'in EPS Üretimi ve Karakterizasyonu 51
Çözünürlük. 51
Karbonhidrat ve protein miktarı. 52
Monomer kompozisyonu. 54
İç viskozite ve Molekül ağırlığı. 55
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR). 56
Termogravimetrik analiz (TGA). 58
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC). 60
X-ışını difraktometresi (XRD). 60
Taramalı elektron mikroskopi (SEM). 63
Reolojik Karakterizasyon 66
Biyolojik Aktivite 71
SONUÇ ve ÖNERİLER 75
KAYNAKLAR 78
EKLER 94
EK-1. Standart Grafikler 94
EK-2. HPLC kromatogramları 95
EK-3. Tez kapsamında kullanılan donanım ve kimyasal malzemeler 97
EK-4. Kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanışı 99
ÖZGEÇMİŞ 101

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *16S rRNA Gen Bölgesine Özgü PCR İçin Gerekli Reaktiflerin Yoğunluk ve Miktarları* 33
Tablo 2. *16S rRNA Gen Bölgesine Özgü PCR İçin Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayıları* 34
Tablo 3. *Koloni PCR İçin Gerekli Reaktiflerin Yoğunluk ve Miktarları* 36
Tablo 4. *Koloni PCR İçin Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayıları* 36
Tablo 5. *Türkiye'nin Farklı Sıcak Su Kaynaklarından Alınan Termofilik Bakterilerin Ürettikleri EPS Miktarları ve Mikrobiyal Büyüme Değerleri* 45
Tablo 6. *A. pushchinoensis G11'in Eztaxon Veri Tabanına Göre Yakın Akraba Türleri* 46
Tablo 7. *A. pushchinoensis G11'in Fizyolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Gereksinimleri* 46
Tablo 8. *A. pushchinoensis G11'in Farklı Antibiyotikler Varlığında İnhibisyon Değerleri* 50
Tablo 9. *A. pushchinoensis G11'in Ürettiği EPS'nin Moleküler Kompozisyonu* 54
Tablo 10. *A. pushchinoensis G11'in Ürettiği EPS'nin Standart Suşlara Karşı Antibiyofilm Aktiviteleri* 72
Tablo 11. *HPLC Analizi Yapılan Standart Şekerlerin Pikleri ve Alıkonma Süreleri* 95
Tablo 12. *A. pushchinoensis G11'den Elde Edilen EPS Örneğinin Şeker Kompozisyonu, Alıkonma Süreleri ve Pik Alanları* 96
Tablo 13. *Tez Kapsamında Kullanılan Donanım ve Kimyasal Maddeler* 97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Levan polisakkaritinin kimyasal yapısı 2
Şekil 2. Bakteriyel selülozun kimyasal yapısı 3
Şekil 3. Maltotrioz tekrar birimleri içeren pullulan polisakkaritinin kimyasal yapısı 4
Şekil 4. Kurdlan biyosentezinin metabolik yolağı 5
Şekil 5. Glikoz-ramnoz ve glukuronik asit tekrar birimine sahip gellan polisakkaritinin kimyasal yapısı 7
Şekil 6. Mannuronik asit (M) ve glukuronik asit (G) bloklarından oluşan aljinaton kimyasal yapısı 8
Şekil 7. Glukuronik asit ve N-asetil glukozaminden oluşan disakkarit tekrar birimlerine sahip hiyalüronik asidin kimyasal yapısı..... 9
Şekil 8. Bakterilerde EPS üretim yolakları 18
Şekil 9. Sıvıların akış özelliklerine göre sınıflandırılması..... 23
Şekil 10. 16S rRNA gen sekans verilerine göre *A. pushchinoensis* G11'in filogenetik ağacı. . 46
Şekil 11. A. pushchinoensis G11'in (a) Gram boyama (Gram pozitif) ve (b) katalaz (negatif) testi sonuçları..... 47
Şekil 12. A. pushchinoensis G11'den üretim besiyerinde elde edilen ve dondurularak kurutulmuş EPS..... 48
Şekil 13. A. pushchinoensis G11'in antibiyotik disk difüzyon sonuçları (soldan sağa doğru; kontrol, Kanamycin, Sulfamethoxazol). 50
Şekil 14. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS örneğinin spektrum grafiği. 53
Şekil 15. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin FT-IR diyagramı. 57
Şekil 16. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin termogravimetrik analiz diyagramı. 59
Şekil 17. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin diferansiyel kalorimetre diyagramı. 60
Şekil 18. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin X-ışını kırınım deseni. 62
Şekil 19. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin amorf bölgesine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (a; 20.000X büyütme gücü, b; 50.000X büyütme gücü).... 64
Şekil 20. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin kristal bölgesine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (a; 6.500X büyütme gücü, b; 10.000X büyütme gücü)..... 65
Şekil 21. A. pushchinoensis G11'in EPS ürettiği, farklı sıcaklıklardaki ham ekstraktın farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim. 67
Şekil 22. A. pushchinoensis G11'in EPS ürettiği, farklı sıcaklıklardaki etanolle yoğunlaştırılmış ekstraktın farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim. 68

Şekil 23. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim (kontrol olarak saf su ve %0,2'lik CMC kullanılmıştır). 69
Şekil 24. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin sabit kayma hızında (50 s^{-1}) sıcaklık taraması (kontrol olarak saf su kullanılmıştır). 70
Şekil 25. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (soldaki; E. coli O157:H7 35150, sağdaki; S. typhimurium ATCC 23566) 71
Şekil 26. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin DPPH antioksidan tayin yöntemi sonuçları [1 pozitif kontrol; , 2; kör (Mowsumi et al. 2015)]. 72
Şekil 27. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin (a) A-549 (b) Caco-2 (c) HT-29 ve (d) SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki antitümör aktivitesi (0 mg/ml kontrol grubudur. Veriler ortalama ± standart sapma olarak hesaplanmıştır. $p<0.05$)..... 74
Şekil 28. Toplam karbonhidrat analizi için glikoz standart grafiği..... 94
Şekil 29. Toplam protein analizi için bovin serum albumin standart grafiği..... 94
Şekil 30. Standart şekerlerin HPLC kromatogramı. 95

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ATP **:** AdenozinTriFosfat

CER **:** Katyonik değişim reçinesi

CMC **:** Karboksimetilselüloz

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

EDTA **:** 2,2',2",2"'-(Ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraasetik asit

EPS **:** Ekzopolisakarit

FT-IR **:** Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

GA **:** Gum arabik

GDP **:** Guanozin difosfat

KOH **:** Potasyum hidroksit

NaOH **:** Sodyum hidroksit

PCR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TAE **:** Tris-Asetat EDTA

TCA **:** Trikloroasetik asit

TE **:** Tris-EDTA

UDPG **:** Üridin difosfat glikoz

GİRİŞ

Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler ve Çeşitleri

Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal polisakkaritler, suda çözünebilen veya çözünemeyen, iyonik veya iyonik olmayan karbonhidrat temelli biyopolimerlerdir (Suresh Kumar *et al.* 2007; Dahech *et al.* 2013).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS); monosakkarit kompozisyonu, elektrik yükü, üniteler arası bağlar, tekrarlanan yan zincirler, zincir uzunluğu ve zincir dallanmasının sıklığına bağlı olarak önemli yapısal farklılıklar göstermektedirler. Farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı; petrol, gıda, tekstil, deterjan, kozmetik, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde jelleştirme, kıvam artırıcı, biyofilm oluşturma, anti-tümör, anti-viral ve anti-inflamatuar etkeni olarak kullanılmaktadırlar (Freitas *et al.* 2011; Liu *et al.* 2017). Enerji kaynağı olarak kullanılamayan EPS'ler ayrıca bulundukları ortamda azalan su aktivitesine, faj ataklarına, fagositoza, toksik bileşiklere, antibiyotiklere, ozmotik basınca karşı koruma ve hücrelerin tanınması, hücrenin yüzeye tutunması ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulması gibi birçok önemli role sahiptir (Liu *et al.* 2017).

Ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalar, hücre çevresindeki ozmotik dengeyi korumak için polisakkarit yapı üretirler. Bu polisakkarit yani EPS, hücre içi dengenin korunmasını ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamak içi kolonizasyonu arttırma görevi görür. (Insulkar *et al.* 2018).

Mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sırasında üretilen yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritler (Mohamed *et al.* 2018; Yang *et al.* 2018), genel olarak endopolisakkaritler (hücre içi), hücre yüzeyine tutunmuş halde kapsüler polisakkaritler ve çoğu mikroorganizma tarafından hücre dışı ortama doğal olarak yayılan ekzopolisakkaritler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Gruyer *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007).

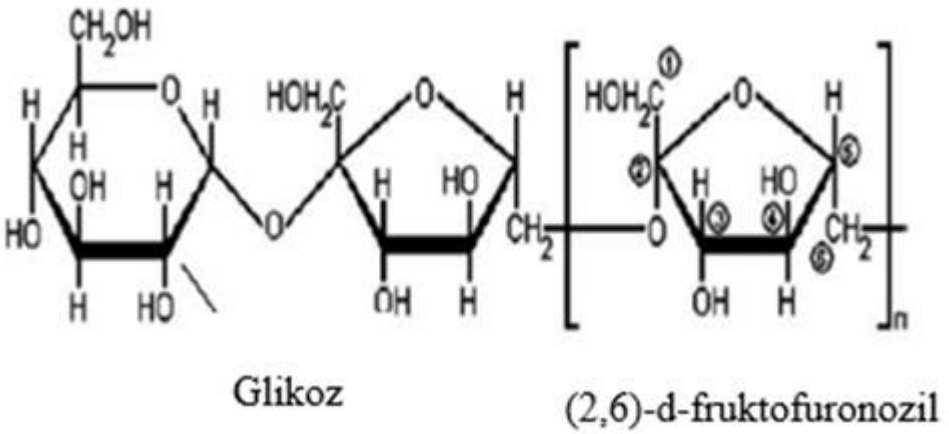
Şeker kompozisyonlarına göre ise homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak iki gruba ayrılırlar. Homopolisakkaritler tek çeşit monomerden oluşurken; heteropolisakkaritler, D-glikoz, D-galaktoz, L-früktoz, L-ramnoz, D-glukuronik asit ve D-mannuronik asit gibi farklı monosakkaritlerin tekrarlayan birimlerinden oluşmaktadır (Donot *et al.* 2012; Du *et al.* 2018).

Homopolisakkaritler

Ekstraselüler homopolisakkarit sentezi, spesifik bir enzim tarafından gerçekleştirilir ve sentez, hücre dışında veya hücre duvarı içinde oluşabilir (Donot *et al.* 2012). Homopolisakkarit yapıdaki mikrobiyal ekzopolisakkaritlerden bazıları şunlardır:

Levan

Polifruktosit ailesinden olan levan (2,6)-d-fruktofuronozil birimlerinden oluşmaktadır ve bitkiler aleminde oldukça yaygındır. Levan, *Zymomonas mobilis* (Calazans *et al.* 1997; Bekers *et al.* 2005), *P. syringae pv. phaseolicola* (Kasapis *et al.* 1994) veya *B. subtilis* (Chidambaram *et al.* 2019) gibi bakterilerden sükrozun parçalanmasıyla elde edilebilmektedir. β-(2-6) bağlarıyla bir araya gelen d-fruktofuranozil kalıntılarından oluşan levan, hücre dışında sentezlenir (Şekil 1) .



Şekil 1. Levan polisakkaritinin kimyasal yapısı (Moosavi-Nasab *et al.* 2010)

Levan biyosentezi, sükroz özgüllüğü olan levansükraz (sukroz 6-fruktoziltransferaz, β-(2-6)–fruktoziltransferaz, β-(2-6)-fruktan: d-glukoz 1-fruktosiltranseraz veya EC 2.4.1.10) adı verilen hücre dışı bir enzime bağlıdır ve bu enzim levan üretiminde kilit noktadır. *Bacillus* sp. dahil olmak üzere çok sayıda gram-pozitif bakteri ve *Z. mobilis* de dahil olmak üzere gram-negatif bakteri levansükraz üretmektedir ve levansükraz sentezi için en uygun sıcaklık bakterinin türüne bağlıdır (Meng and Fütterer 2003; Bekers *et al.* 2005).

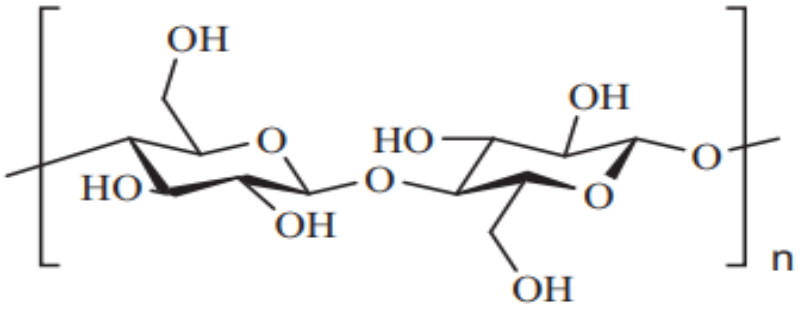
Sükrozun früktoz kısmını önceden mevcut alıcı moleküllere aktaran levansükraz hücre dışı bir enzimdir (Srikanth *et al.* 2015). Hücre dışına atılmadan önce periplazmada birikmekte ve nihai konformasyonunu burada almaktadır. Donot *et al.* (2012); levansükrazın hücre dışı ortamda asidik pH değerlerinde üretildiğini, glikoz varlığında ve 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda inhibe olabildiğini bildirmişlerdir.

Levanın yapısı ve moleküler ağırlığı, bağ yapısı, şeker bileşenleri ve viskoziteye etkisi gibi fiziksel özellikleri kapsamlı olarak çalışılmaktadır. Çünkü bu değişkenler önemli bir tümör inhibitörü olan fruktooligosakkaritlerin üretiminde rol oynayan levan polisakkaritinin reolojik özelliklerini ve kalitesini bütünüyle etkilemektedir (Dahech *et al.* 2013; Srikanth *et al.* 2015).

Selüloz

Selüloz dünyadaki en bol polimerdir ve doğal olarak gelişen biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlar sonucu bitkiler ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler. Bitki hücre duvarının anabileşeni olan bitkisel selüloz, lignin, pektin ve hemiselülozlar gibi çeşitli safsızlıklarla beraber bulunmaktadır. Bu nedenle, elde edilen selülozun kullanılabilmesi için saflaştırılması gerekmektedir. Ek olarak, bazı algler ve bazı bakteri türleri (*Acetobacter, Rhizobium, Agrobacterium, Aerobacter, Achromobacter, Gluconacetobacter, Sarcina, Azotobacter, Salmonella, Escherichia* ve *Sarcina*) normal metabolik süreçlerinin bir parçası olarak selüloz üretir.

Bakteriyel selüloz (BC), selülozun neredeyse en saf formunu temsil etmektedir ve yapısal, fizikokimyasal ve mekanik özellikleri bakımından bitki selülozundan oldukça avantajlı özelliklere sahiptir. Aerobik olarak çalkalamalı inkübatörlerde veya statik olarak kültür ortamının yüzeyinde bir tabaka halinde üretilebilen bakteriyel selüloz (Islam *et al.* 2017); β-1,4-glikosidik bağlantıya sahip β-D-glukopiranoz birimlerinden oluşan, çözünürlüğü oldukça düşük ve elastik olmayan bir karbonhidrat homopolimeridir (Şekil 2).

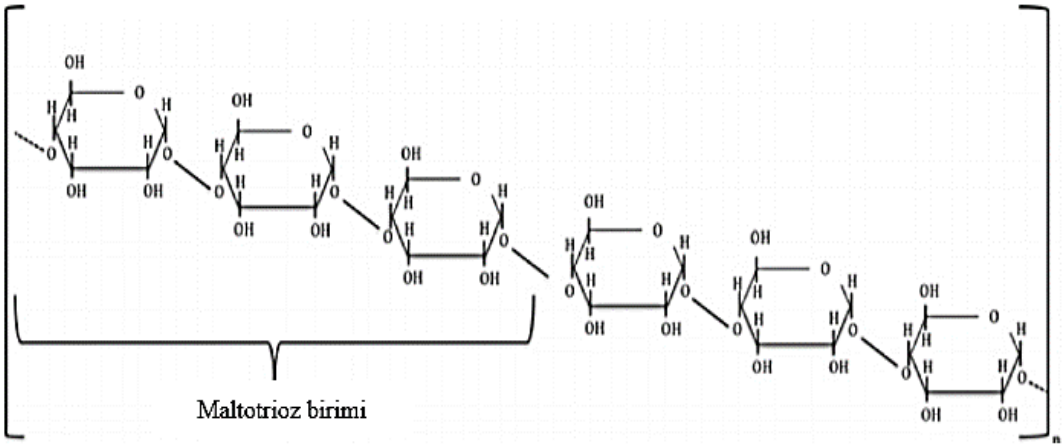


Şekil 2. Bakteriyel selülozun kimyasal yapısı (Farjadian et al. 2018).

Pullulan

Pullulan, glikozdan oluşan doğrusal bir homopolisakarittir. Çoğu çalışmada, α-(1-4)-Glu-α-(1-4)-Glu-α-(1-6) sıralı birimlerinden oluşan bir polimer iken (Şekil 3) bazen de α-(1-4)-Glu-α-(1-4)-Glu-α-(1-6)-Glu-α-(1-6) sıralı birimlerinden oluştuğu bildirilmektedir (Gänzle and Follador 2012; Zhu *et al.* 2014).

Levandan farklı olarak pullulan, sitozolde sentezlenir ve daha sonra hücre dışı ortama salgılanır. Pullulanın biyosentez yolakları açıkça anlaşılmamasına rağmen, pullulan oluşturmak için öncüllerin sentezlenmesinin takip edildiği bir biyosentez yolu modeli önerilmiştir.

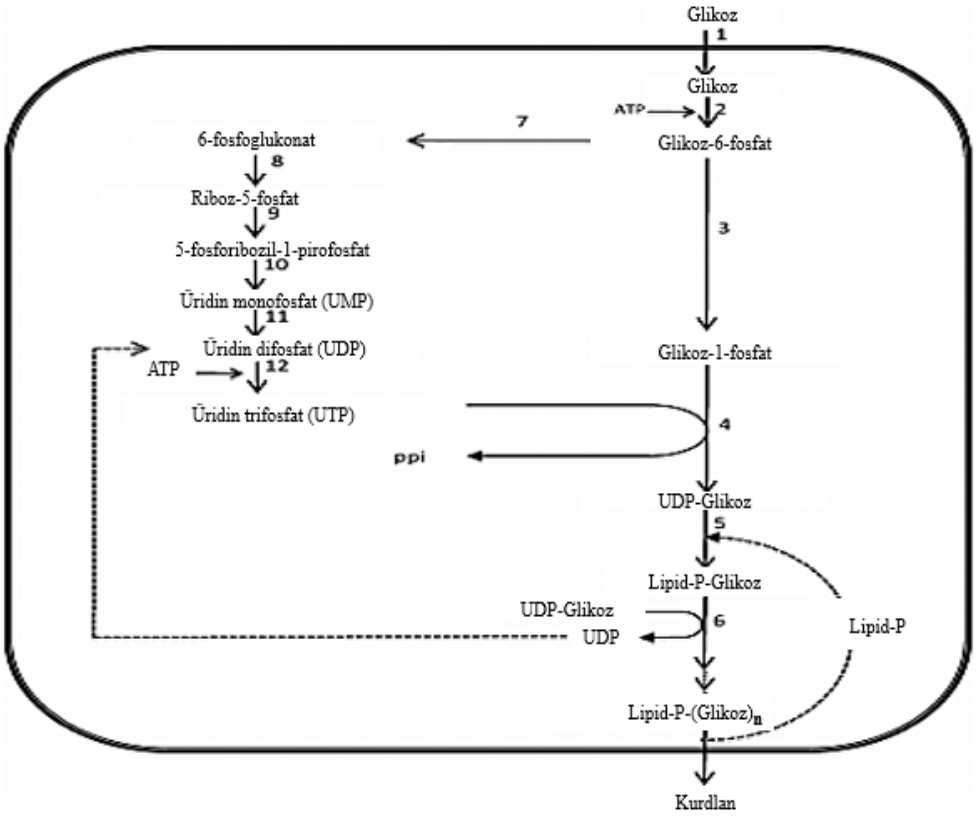


Şekil 3. Maltotrioz tekrar birimleri içeren pullulan polisakkaritinin kimyasal yapısı (Donot et al. 2012).

Bu model, glikolipid ara maddesi LPh-Glu'nun etkisine dayanmaktadır. Pullulan molekülünün öncülleri 3 ana aşamada oluşturulur. İlk aşama, ATP tarafından katalize edilen üridin-difosfat-glikoz (UDPG) vasıtasıyla LPh-Glu oluşmaktadır. İkinci aşama, bir izomaltoz molekülü yani LPh-Glu-(1-6)-Glu oluşturmak için UDPG ek bir d-glikoz transfer etmektedir. Son aşamada, izomaltoz, izopanozil (LPh-Glu-(1-6)-Glu-(1-4) -Glu) molekülünü üretmek için ilk aşamadaki glikolipid öncüsü ile etkileşime girmektedir. İzopanozil molekülleri daha sonra bir pullulan zincirinde polimerize edilir (Shingel 2004).

Kurdlan

Kurdlan, dallanmayan ve çözünmeyen doğrusal bir homopolisakarittir. 400-500 glikoz biriminden β-(1–3)-glikozidik bağlarıyla oluşturulur (Şekil 4) ve esas olarak belirli *Agrobacetrium* cinsine ait türler tarafından sentezlenmektedir (Shih *et al.* 2009).



Şekil 4. Kurdlan biyosentezinin metabolik yolağı (Donot et al. 2012)
1: Glikoz alımı için glukoz bağlayıcı protein, 2:hekzokinaz, 3: fosfoglukomutaz, 4:UDP-glukoz fosforilaz, 5:UDP-galaktoz-4-epimeraz, 6:β-(1-4) -galaktosiltranferaz, 7:glukoz-6-fosfat deshidrogenaz, 8:6-fosfosglukonat deshidrogenaz, 9:riboz fosfat difosfokinaz, 10: orotat fosforibosiltranferaz ve orotidin-5-fosfat dekarboksilaz, 11:uridylate kinaz, 12: UDP kinaz.

Kurdlan sentezindeki ilk aşamada, glikoz, fosfoenolpiruvatglikoz fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) ve/veya permeaz proteinleri gibi aktif taşıyıcılar vasıtasıyla hücreye girmektedir. Substrat hücreye girdiğinde, glikoz-6-fosfat haline fosforile edilir. Fosfoglukomutaz enzimi ile glikoz-6-fosfatı glikoz-1-fosfata dönüştürülür (Şekil 4). Bir sonraki adım, kurdlanın ana öncüsü olan UDPG sentezidir. UDPG, glukoz-1-fosfat ve üridintrifosfattan (UTP) UDPG pirofosforilazın katalizi ile oluşmaktadır. Kurdlan-sentaz enzimi, UDPD'den bir glikoz molekülünü yeni polimer zincirine transfer ederek bir UDP (ürinidindifosfat) molekülü üretmek için polimerizasyonu katalize etmektedir. Sitozolde UDP kinaz, UDP'yi UTP'ye dönüştürmek için glikoliz veya trikarbolik asit (TCA) döngüsünden gelen ATP'yi kullanmaktadır (Donot *et al.* 2012).

Başlıca karbon, azot ve fosfat gibi besinlerin yoğunluğu, kültür ortamının pH'sı ve havalandırılması kurdlan üretimini etkileyen ana faktörlerdir (McIntosh *et al.* 2005; Jin *et al.* 2008; Shih *et al.* 2009). Bunlar içerisinden glikoz, kurdlan üretmek için kullanılan temel endüstriyel karbon kaynağıdır (McIntosh *et al.* 2005). Ayrıca, diğer karbon kaynakları üzerinde yapılan testler, sükroz ve melasın da kurdlan üretimi için uygun olduğunu göstermiştir (Donot *et al.* 2012).

Heteropolisakkaritler

Heteropolisakkaritler hücreye çeşitli işlevlerde yardımcı olurken, rekabet gibi biyotik strese ve sıcaklık, ışık yoğunluğu veya pH gibi abiyotik streslere karşı koruma sağlamaktadırlar.

Heteropolisakkaritlerin biyosentez yolakları, homopolisakkaritlerinkinden daha karmaşıktır. Heteropolisakkaritlerin sentezi üç aşamaya ayrılır: birincisi, substratın (karbon kaynağı) asimilasyonu ve nükleotid türevlerine dönüştürülmesi; ikincisi, pentasakkarit alt birimlerinin muhtemelen undekaprenil fosfat veya izoprenoid fosfata bağlı bir lipit taşıyıcıya birleştirilmesiyle polisakaritlerin hücre içi sentezi ve üçüncüsü de tekrarlayan pentasakkarit birimlerinin polimerizasyonu ve hücre dışı ortama salgılanmasıdır (Whitfield and Valvano 1993).

Asidofilik veya termofilik türler ve Archaea'larda, heteropolisakkaritler ekstrem koşullara adaptasyona yardımcı olur. Endüstriyel olarak dğerli fizikokimyasal özelliklere sahip mikrobiyal heteropolisakkarit çeşitliliğine rağmen, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanım için yalnızca ksantan (30.000 ton / yıl) ve gellan ticarileştirilmiştir (Donot *et al.* 2012). Heteropolisakkarit yapıdaki mikrobiyal ekzopolisakkaritlerden bazıları şunlardır:

Ksantan

En çok çalışılan heteropolisakkaritlerden biri olan ksantan, *Xanthomonas campestris* tarafından üretilir. Ksantan, 2-8 monomerlik tekrarlayan birimler olarak, iki d-glikozdan, iki d-mannozdan ve bir d-glukuronik asitten oluşur ve genellikle bakteri cinsine ve türüne göre değişen, 500-2000 kDa arasında değişen çok yüksek bir moleküler ağırlığa sahiptir (Rosalam and England 2006).

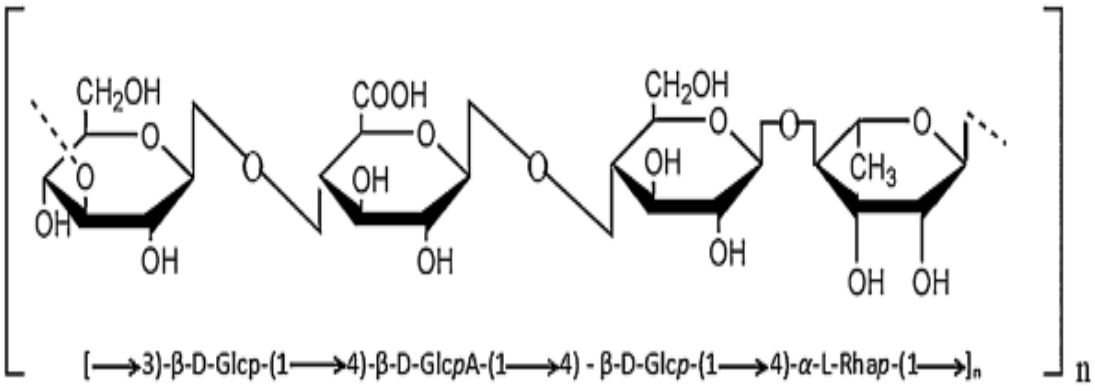
Ksantan sentezi, tekrarlayan pentasakkarit birimlerinin oluşturulması ile başlar. Bu birimler daha sonra polimerize edilir. Yinelenen ksantan birimleri, asetil-CoA ve fosfoenolpiruvatın aracılığıyla oluşturulur. Pentasakkarit bileşiminin ilk adımı, bir UDPG molekülünden glikozil-1-fosfatın bir lipit taşıyıcısının poliizoprenol fosfatına aktarılmasıdır. Lipit bağlı pentasakkarit birimini oluşturmak için, bu transferi d -mannoz, GDP-mannozdan d-glukuronik asit ve UDP-glukuronik asit şeker kalıntılarının sıralı transferi takip etmektedir. Asetil grupları, iç mannoz kalıntısına bağlanmakta ve pirüvat, terminal mannoza eklenmektedir. Asetil grupları, ksantanın yapısal özelliklerine katkıda bulunmaktadır ve sentezlenen ksantan, daha sonra hücre dışı ortama yayılmaktadır. Bu adımların her biri, glikoz ve mannoz gibi substratların yanı sıra, ksantan sentezine özgü polimeraz ve transferaz gibi enzimlerin varlığını gerektirmektedir (Rosalam and England 2006; Donot *et al.* 2012).

Ksantan üretim miktarını karbon kaynağı, fosfat yoğunluğu ve pH önemli derecede etkilemektedir (Donot *et al.* 2012). Garcıa-Ochoa *et al.* (2000)'e göre ksantan üretimi için en sık kullanılan karbon kaynakları; glutamat formunda nitrat ilavesiyle, glikoz ve sükrozdur. Kalogiannis *et al.* (2003), *X. campestris*'in melas ortamında geliştirildiği zaman 53 g/L yoğunluğunda ksantan üretebildiğini belirtmişlerdir ancak glikoz içeren ortamda büyüdüğünde ise 40 g/L ksantan üretebilmiştir. Donot *et al.* (2012); ksantan üretiminin pH 6-8 arasındaki nötral pH'da yüksek olduğunu ve en uygun sıcaklık değerinin 30 ve 33°C aralığında olduğunu bildirmişlerdir.

Gellan

Gellan, *Pseudomonas elodea* bakterisi tarafından üretilen hücre dışı bir polisakkarittir. Suda çözünebilen gellan oldukça viskoz bir çözelti oluşturmaktadır ve etanolde çözünememektedir. Gellan polisakkariti, β-d-glukoz (d-Glc), L-ramnoz (L-Rha) ve d-glukuronik asit (d-GlcA) içeren tekrarlayan birimlerden oluşmaktadır (Şekil 5) ve birleşimi yaklaşık olarak %60 glikoz, %20 ramnoz ve %20 glukuronik asitten oluşmaktadır (Prajapati *et al.* 2013)

Gellan üretimi için kullanılan besiyeri; bol miktarda karbon kaynağı, sınırlı azot kaynağı ve inorganik tuzlardan oluşmaktadır. Bazen vitamin sağlayan karmaşık ortam bileşenleri de hücre büyümesini ve üretimini artırabilmektedir. Azot kaynağının sınırlı olduğu koşulda, ortamda nükleotid fosfat şekerlerinin varlığı ve miktarının fazlalığı gellan sentezinin metabolik yolağında tetrasakkarit yapının oluşumun teşvik etmekte ve dolayısıyla ürün verimi arttırmaktadır. Bu tetrasakarit sentezi için gereken şeker nükleotidlerinin sırasıyla UDP-glikoz, TDP - ramnoz ve UDP - glukuronik olduğu varsayılmaktadır (Giavasis *et al.* 2000; Pollock 2005).

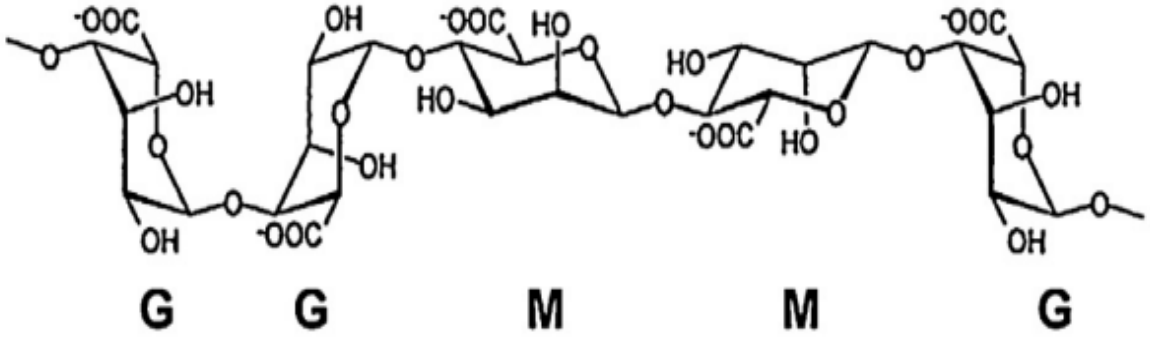


Şekil 5. Glikoz-ramnoz ve glukuronik asit tekrar birimine sahip gellan polisakkaritinin kimyasal yapısı (Prajapati et al. 2013)

Özellikle ilaç salınım sistemlerinin gelişmesi ile birlikte, varolan birçok mikrobiyal polimer içerisinden en çok tercih edilenin gellan olduğu görülmektedir. Katyonların varlığında şeffaf bir jl oluşturabilen gellan, farklı tuzların farklı oranlarda ilavesiyle oldukça değişik ve yeni jel dokuları oluşturduğundan, sıcaklığa ve asidik koşullara direnç gösterdiğinden dolayı mevcut jelleştirici ajanlarda karşılaşılan birçok soruna bir çözüm sunabilmekte ve böylelikle yaygın olarak kullanılabilmektedir (Prajapati *et al.* 2013).

Aljinat

Aljinat, aljinik asit tuzları için kullanılan terimdir, ancak aynı zamanda tüm aljinik asit ve aljinik asit türevlerini de belirtir. Aljinatlar, aljinik asidin iki değerlikli tuzları formunda bulunan ve hücreler arası jel matrisi oluşturan kahverengi mikro algler (*Phaeophyceae*) hücre duvarlarının yapısal bileşenleridir. Aljinatlar, 1-4 glikosidik bağlanan α-d-mannuronik asit (M) ve a-l-glukuronik asit (G) birimlerinden oluşan (Şekil 6) doğrusal polisakkaritlerdir (Tavassoli-Kafrani *et al.* 2016).



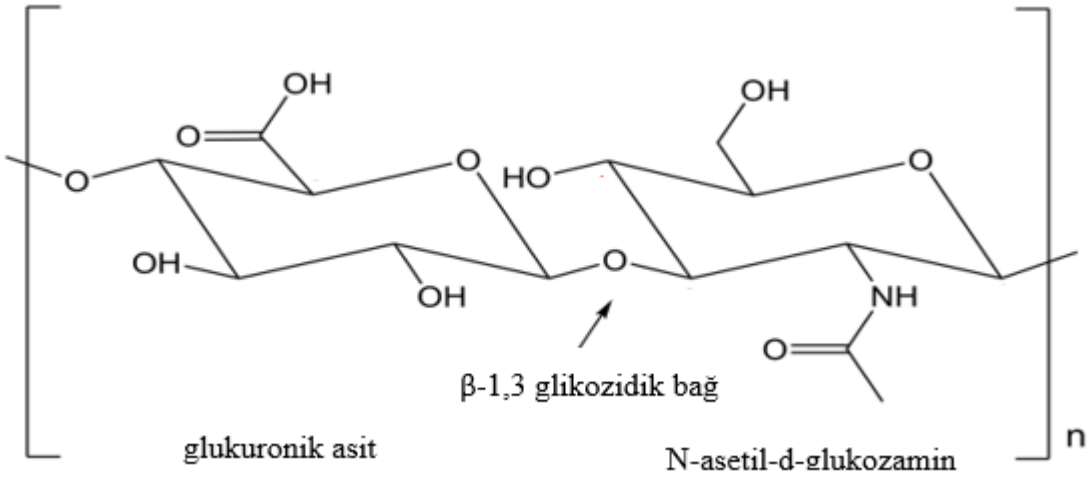
Şekil 6. Mannuronik asit (M) ve glukuronik asit (G) bloklarından oluşan aljinaton kimyasal yapısı (Tavassoli-Kafrani et al. 2016).

Aljinat omurgası, mannuronik asit (M-blokları) veya glukuronik asit (G-blokları) bloklarından ve alternatif bölgelerden (örn., MG, MMG, GGM) oluşmaktadır. M-blokları, $^{4}C_{1}$ konformasyonuna sahip β-1,4 bağlantılarıyla zincire esneklik kazandırırken; G-blokları, $^{1}C_{4}$ konformasyonuna sahip α-1,4 bağlantılarıyla bağlanan guluronat kalıntılarından dolayı zincirin sert yapılarını oluşturmaktadırlar. Farklı kaynaklardan ekstrakte edilen aljinatlar, her bloğun uzunluğu ile birlikte farklı M ve G içeriklerine sahiptir, bu da malzemenin özelliklerini etkiler. Örneğin, alg aljinatları genellikle yüksek bir G bloğu içeriği gösterirken, *P. aeruginosa* tarafından üretilen aljinat G bloklarına sahip değildir (Pina *et al.* 2015; Hernández-González *et al.* 2019).

Hiyalüronik asit

Hiyoluronik asit (HA), d-glukuronik asit ve N-asetil-d-glukozamin birimlerinden oluşan bir heteropolisakkarittir (Şekil 7). İlk olarak 1934 yılında sığır gözlerinden keşfedilen ve lineer bir yapıda olan hiyoluronik asidin molekül ağırlığı oldukça fazla odeğişkenlik gösterebilmektedir. Hayvansal dokularda hücre dışı matrisin ana bileşeni olan hiyalüronik asit, sağlıklı organlarda ifade edilirken, ilginç bir şekilde, karmaşık biyolojik aktiviteler gösteren tümör mikroçevresinde de aşırı ekspresyonu gözlemlenebilmektedir. Farklılaşma proteini olan CD44'ün ana reseptörü olarak kabul edilir ve CD44-HA etkileşimi birçok sinyal yolunda aktive edilerek; iltihaplanma, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim, rejenerasyon ve onarım, morfogenez ve kanser gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır (Stern and Jedrzejas 2006; Gallo *et al.* 2019; Luo *et al.* 2019).

Tıbbi ve kozmetik pazarında büyük ilgi gören hiyalüronik asidin, son yıllarda hayvan türlerinden ekstraksiyonu yerine, mikrobiyal fermentasyondan yoluyla üretimleri dikkat çekmektedir. Hiyaluronik asit fermentasyonları çoğunlukla *Streptococci* spp. tarafından kapsüler polisakkarit üretimi şeklinde gerçekleşmektedir (Huang *et al.* 2008).



Şekil 7. Glukuronik asit ve N-asetil glukozaminden oluşan disakkarit tekrar birimlerine sahip hiyalüronik asidin kimyasal yapısı (Gallo et al. 2019)

Hiyalüronik asitte hidroksil grupları, karboksil grupları ve asetamido grupları dahil olmak üzere birçok hidrofilik grup bulunmaktadır. Bu gruplar hücre içinde hidrojen bağları oluşturabilir ve moleküle hidrofiliklik ve iyi çözünürlük sağlamaktadır. Hiyaluronik asitteki eksenel hidrojen atomları (C-H) hidrofobik etki alanı oluşturmakta, bu da hiyalüronik aside nanoparçacıkların veya misellerin bağlanabilmesi için avantaj olan amfifilik özellik kazandırmaktadır. Hiyaluronik asitteki karboksil grupları 3-4 civarında bir pKa göstermekte ve fizyolojik durumda ayrışabilmektedir. Bu nedenle hiyalüronik asit, negatif yüklü

polisakkaritlerden biridir ve bu sayede, ilaç yükleme veya nanopartikül üretmek için kullanılabilmektedir (Luo *et al.* 2019).

Süksinoglikan

Hücre dışı bir polisakkarit olan süksinoglikan, *Sinorhizobium, Agrobacterium* ve diğer toprak bakterileri tarafından üretilmektedir Nispeten yüksek molekül ağırlıklı süksinoglikan molekülleri viskoz çözeltiler oluşturmaktadırlar ki bu, süksinoglikanları gıda endüstrisi için çekici bir kalınlaştırıcı ajan yapmaktadır (Simsek *et al.* 2009).

Süksinoglikan, bir galaktoz (Gal) ve yedi glikoz (Glc) tortusundan oluşan tekrarlayan oktasakkarit alt birimlerine sahip bir ekzopolisakkarittir. Alt birimlerdeki asetil, süksinil ve piruvil modifikasyonları 1: 1: 1 oranında oluşmaktadır (Freitas et al. 2011). S. Meliloti'nin iki farklı boyutta süksinoglikan üretebildiği rapor edilmiştir. Bunlar yüksek moleküler ağırlıklı (HMW;> 100,000 Da) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW; <5000 Da) olarak gruplanmıştır. spesifik boyut aralığı yani HMW / LMW oranı ve karbonhidrat olmayan bileşenlerin eklenme derecesi, bakteri kaynağına bağlı olarak değişebilmektedir (Glenn et al. 2007).

EPS Üreten Mikroorganizmalar

Mantar, mikro alg, arkea ve ekstremofilik bakterilerden birçok farklı tür, EPS üreticisi olarak bildirilmiştir (Donot *et al.* 2012; Singha 2012).

Pek çok mantarın gelişimi boyunca EPS üretebildiği ve bu üreticilerin *Botrytis* (Simionato *et al.* 2017), *Aspergillus* (Chen *et al.* 2011; Lee *et al.* 2016), *Coriolus (Trametes)* (Tavares *et al.* 2005), *Aureobasidium* (Catley and McDowell 1982; Gaur *et al.* 2010), *Botryosphaeria* (Selbmann *et al.* 2002), *Shiraia* (Yang and He 2008), *Acremonium* (Stasinopoulos and Seviour 1990), *Fusarium* (Mahapatra and Banerjee 2013; Prathyusha *et al.* 2018) ve *Sclerotium* (Farina *et al.* 1998; Selbmann *et al.* 2002) cinslerine ait olduğu bildirilmiştir.

Mikro algler ve Siyanobakteriler, güneş enerjisi, su ve CO_2 kullanarak biyokütle üretebilen tek hücreli fotoototrofik mikroorganizmalardır. Enzim, lipit, pigment gibi oldukça değerli ve çeşitli biyomoleküller üretebilen mikro algler ve siyanobakteriler aynı zamanda yüksek miktarda EPS üretimleri ile dikkat çekmektedir (Gaignard *et al.* 2019). *Duneliella* (Mishra and Jha 2009; Goo *et al.* 2013), *Microcoleus* (Ge *et al.* 2014; Lan *et al.* 2017), *Nostoc* (Parikh and Madamwar 2006; Ge *et al.* 2014), *Flintiella* (Gaignard *et al.* 2018) ve *Rhodella* (Chen *et al.* 2010; Villay *et al.* 2013) cinsleri EPS üretebilen mikro alg ve siyanobakterilerden bazılarıdır.

Mikrobiyal EPS üreticisi olarak Archaea domainine ait çoğunlukla termofilik ve halofilik cinsler dikkat çekmektedir. Bu gruba; *Haloterrigena* (Squillaci *et al.* 2016), *Sulfolobus* (Nicolaus *et al.* 1993), *Haloferax* (Antón *et al.* 1988; Parolis *et al.* 1996), *Thermococcus* (Rinker and Kelly 1996), *Halobacterium* (Severina *et al.* 1989) ve *Haloarcula* (Nicolaus *et al.* 1999; Lu *et al.* 2017) cinsleri örnek verilebilir.

Çok çeşitli mikrobiyal kaynaktan üretilebilmesine karşın, miktar ve çeşit bakımından en dikkat çeken EPS üreticilerinin, bakteriler oldukları bildirilmiştir. Han *et al.* (2015), endüstriyel biyopolimerler olarak daha avantajlı olmalarından dolayı, farklı bakteri türlerinden elde edilen EPS'lere yüksek talep olduğunu bildirmiştir.

EPS üreten ekstremofilik bakteriler

Kardinal yaşam sıcaklıkları göz önüne alındığında mikroorganizmalar psikrofilik, mezofilik ve termofilik olarak gruplandırılmaktadır ve büyüme sıcaklıklarına bağlı olarak mikrobiyal kaynakların ürettikleri EPS'ler çeşitlilik göstermektedir (Nicolaus *et al.* 2002; Li *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2009).

Düşük sıcaklık şartlarında gelişen bakterilerle yapılan çalışmalar, tüm hücrelerin kriyoprotektan (soğuğa karşı koruyan) görevi üstlendiği düşünülen EPS'ler ile çevrelendiğini göstermektedir . Psikrofilik (ya da soğuk adaptif, ılımlı psikrofilik) bakteriler içerisinde; *Pseudoalteromonas* (Li *et al.* 2008; Roca *et al.* 2016), *Winogradskyella* ve *Shewanella* (Caruso *et al.* 2018), *Colwellia* (Casillo *et al.* 2017; Caruso *et al.* 2018), ve *Pseudomonas* (Carrión *et al.* 2015) gibi cinslerin üyeleri önemli EPS üreticileri olarak bildirilmiştir.

Mezofilik EPS üreticileri olarak; *Pseudomanas* (Kasapis *et al.* 1994; Haggag 2007; Freitas *et al.* 2009; Jennings *et al.* 2015), *Lactobacillus* (Cerning *et al.* 1994; Ai *et al.* 2008; Yuksekdag and Aslim 2008; Miao *et al.* 2014), *Azotobacter* (Khanafari and Sepahei 2007), *Acetobacter* (Son *et al.* 2002) *Agrobacterium* (Triveni *et al.* 2001; Jin *et al.* 2008; Shih *et al.* 2009; Wu *et al.* 2016), *Clavibacter* (Bermpohl *et al.* 1996), *Erwinia* (Peng *et al.* 2019), *Pantoea* (Koutsoudis *et al.* 2006), *Ralstonia* (Araud-Razou *et al.* 1998), *Sphingomonas* (Zhou *et al.* 2012), *Streptococcus* (Degeest and de Vuyst 1999; Broadbent *et al.* 2003; Vaningelgem *et al.* 2004; Rangaswamy and Jain 2008; Tiwari and Misra 2008; Pedraza *et al.* 2017), *Rhizobium* (Reinhold *et al.* 1994; Tavernier *et al.* 1997), *E.coli* (Chen *et al.* 2004; Lee and Chen 2004; Ryu and Beuchat 2005), *Xanthomonas* (Kalogiannis *et al.* 2003; Rosalam and England 2006), *Leuconostoc* (Vijayendra *et al.* 2008; Siddiqui *et al.* 2014; Yang *et al.* 2015; Du *et al.* 2018; Yang *et al.* 2018) ve *Bacillus* (Lee *et al.* 1997; Ahmad and Muhammadi 2007; Chowdhury *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011; Dogan *et al.* 2015; Han *et al.* 2015; Patil and Shirsath 2015; Yu *et*

al. 2016; Malick *et al.* 2017; Rani *et al.* 2017; Angel *et al.* 2018; Banerjee *et al.* 2018; Berekaa and Ezzeldin 2018; Insulkar *et al.* 2018; Mohamed *et al.* 2018; Hu *et al.* 2019; Song *et al.* 2019), cinslerine ait türler dikkat çekmektedir.

Termofilik bakteriler

Mikroorganizmalar yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için çeşitli stres faktörlerine uyum sağlarlar. Birçok kimyasal ve fiziksel faktör, organizmaların gelişimini ve canlılığını kontrol eder. Canlıların hayati faaliyetlerini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biri de sıcaklıktır. Sıcaklık, birçok mikroorganizmada makro moleküllerin bozulmasına neden olur. Bu nedenle organizmaların (makro ve mikro) çok önemli bir kısmı suyun kaynama sıcaklığının altındaki sıcaklık koşullarında yaşayabilirler. Ancak yapılan çalışmalar, suyun kaynama derecesi üzerindeki sıcaklık değerlerinde mikrobiyal yaşamın olduğunu göstermektedir (Madigan and Martinko 2012).

Diğer organizmaların gelişemediği veya çok az geliştiği şartlarda yaşayabildiklerinden dolayı, ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmaların çevresel etmenler ile ilişkilerinin araştırılması önemlidir (Goyal *et al.* 2005). Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar; yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz yoğunluğu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır (Guagliardi *et al.* 1996). Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar, metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmek zorundadır. Bu adaptasyonu ise, elektrostatik disülfit köprüsü ve hidrofobik etkileşimler ile geliştirmektedirler (Haki and Rakshit 2003).

Yaşayabildikleri yüksek sıcaklık değerleri göz önüne alındığında, termofilik mikroorganizmaların hücresel bileşenleri (hücre membranı, enzim, protein, polisakkarit, nükleik asit vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır ve bu dayanıklılık termofilik mikroorganizmaların birçok alanda kullanımını arttırmaktadır. Bu artışın genel sebepleri şöyle sıralanabilir:

- Termofilik mikroorganizmaların hücre membranı, doymuş yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince sıkı ve sert tutar,
- Termofilik mikroorganizmalar ile biyokimyasal ve ekstraselüler metabolitleri; sıcaklık, asidik ve alkali denatürantlar, proteoliz gibi fizikokimyasal parametrelerdeki ani ve yüksek değişimlere karşı kararlılık gösterirler,
- Yüksek sıcaklıklarda polimerik substratların çözünürlükleri artar ve istenmeyen etkilere yol açan kontaminasyon riski azalır. Böylelikle mezofilik mikrobiyal

büyümeden kaynaklanan çevresel kirlenme en aza indirebilir, işletme bakım maliyeti azaltılabilir ve verim artırılabilir,

- Termofilik mikroorganizmalar, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardan çok daha yüksek sıcaklıklarda katalize edebilen enzimleri üretebilirler. Örneğin, termofilik mikroorganizmalar, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan, geri dönüşümü sağlayan bir DNA-Giraz enzimi ihtiva eder. Böylece DNA'nın erime noktası mikroorganizmanın en yüksek büyüme sıcaklığına yükseltilir (Aguilar 1996; Kristjansson and Asgeirsson 2002; Gugliandolo *et al.* 2003; Haki and Rakshit 2003).

Tüm bu sebeplerden ötürü, termofilik mikroorganizmalar ve metabolitleri; fermentasyon endüstrisinde, rekombinant DNA teknolojisinde, asetik asit ve sirke üretiminde, metal filizlerinden ve atık maddelerden metallerin geri dönüşümünde ve atıkların arıtımında, gıda sanayisinde, farmakolojide, deterjan, şeker, deri, tekstil ve kâğıt endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Tabata *et al.* 1993; Aguilar 1996; Blanc *et al.* 1999; Tomita *et al.* 1999; Wery *et al.* 2002; Gugliandolo *et al.* 2003).

Termofilik bakteriler tabii olarak, denizel ve karasal kaplıcalar ile derin deniz termal delikleri, tropik topraklar, gübre yığınları, dışkılar ve çöpler gibi yerlerde bulunurlar (Aragno 1992; Guagliardi *et al.* 1996). Yüksek sıcaklık, yüksek basınç, toksik ve yüksek inorganik veya metal ihtiva eden bu ortamlarda, polisakkarit üretebilen termofilik bakterilerin var olduğu bildirilmiştir (Manca *et al.* 1996; Nicolaus *et al.* 2002; Moriello *et al.* 2003; Nicolaus *et al.* 2004). Çünkü termofilik bakteriler için yüksek sıcaklık, çoğu biyokimyasal reaksiyonun oranını arttırır ve belirli bir zaman diliminde mikrobiyal polisakkaritin üretimini iyileştirebilir. Bu nedenle, termofilik bakteriler, ticari değere sahiptir ve birçok endüstri sektörünün ilgisini çekmektedir (Kambourova *et al.* 2009; Radchenkova *et al.* 2013; Yildiz *et al.* 2014).

Yüksek sıcaklık değerlerine adapte olabilmek için polisakkarit üretim yeteneği geliştiren termofilik bakteriler arasında ilk tanımlanan Doğu Pasifik'te 2600 m derinlikte hidrotermal yarıktan izole edilen *Alteromonas* sp. 1644 [1995'den bu yana *Pseudoalteromonas* sp. olarak yeniden sınıflandırılmaktadır (Gauthier *et al.* 1995)]'dir. Polisakkarit üreten diğer termofilik bakteriler olarak; *Bacillus thermoantarcticus* (Manca *et al.* 1996), *B. licheniformis* (Schaffer *et al.* 2001; Maugeri *et al.* 2002a; Nicolaus *et al.* 2002; Liu *et al.* 2010), *Geobacillus thermodenitrificans* (Arena *et al.* 2009), *G. tepidamans* (Kambourova *et al.* 2009), *Thermotoga maritima* (Rinker and Kelly 2000), *Rhodothermus marinus* (Sardari *et al.* 2017), *Aeribacillus pallidus* (Radchenkova *et al.* 2013; Taslimi *et al.* 2013) ve *Halomonas nitroreducens* (Poli *et al.* 2013) gibi türler sayılabilmektedir.

Bakteriyel EPS üreticileri içerisinde, endüstriyel uygulamalara elverişli olan *Bacillius* cinsine ait türler oldukça dikkat çekmektedir. Bu cinse ait patojen olmayan bazı suşlar uzun yıllar boyunca üretim amaçlı olarak güvenli bir şekilde kullanılmıştır. Dahası, geniş bir yelpazede biyolojik aktivite ve teknolojik özelliklere sahip, oldukça viskoz ve üstün pseudoplastik özelliklere sahip EPS üretebildikleri de rapor edilmiştir (Radchenkova *et al.* 2013; Wang *et al.* 2019b).

EPS Üretimini Etkileyen Etmenler

Mikrobiyal polisakkarit üretimi yaygın olarak sıvı kültürde gerçekleştirilmekte olup, besiyerine karbonhidrat ve azot kaynağı, vitamin ve tuz gibi mineral maddelerin ilavesinden, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, oksijen seviyesi, pH gibi değişkenlerden de etkilendiği bildirilmiştir (Alves *et al.* 2009; Liang and Wang 2015).

Büyüme ortamının belirlenmesinde temel değişken karbon ve enerji kaynağıdır. Glikoz, maltoz, laktoz ve sükroz gibi kaynaklar, mikrobiyal polisakkarit üretimi için sıklıkla kullanılan karbon kaynaklarıdır. Karbon kaynağının EPS verimini etkilemekte ve molekül büyüklüğü karbon kaynağına göre değişebilmektedir (Nicolaus *et al.* 2010; Rafigh *et al.* 2014).

EPS üretiminde bir diğer önemli bileşen ise azot kaynağıdır. Azot kaynağı olarak geniş oranda pepton, maya özütü, potasyum nitrat, asparjin, glutamik asit, amonyum sülfat, sodyum nitrat ve üre gibi bileşenler kullanılmaktadır (Suresh Kumar *et al.* 2007). Çoğunlukla EPS üretiminin sınırlı seviyedeki azot yoğunluğunda daha yüksek olduğu bildirilmiş ve optimum gelişim için önerilen karbon:azot oranı ise 20:1 olarak belirlenmiştir (Ye *et al.* 2011b).

EPS'nin içeriği üzerine değişen azot ve fosfor oranının etkisi de önemlidir. Aktif çamur besiyerinin büyüme ortamı olarak kullanıldığı bir üretimde elde edilen EPS'nin karbonhidrat içeriği %16-94 arasında değişmiştir ve karbonhidrat içeriği üzerinde fosforun azottan daha etkili olduğu vurgulanmıştır (Hoa *et al.* 2004).

Karbon ve azot kaynakları kadar mikrobiyal üretici de üretilen polisakkaritin kompozisyonun belirlenmesinde önemlidir. Bazı istisnai durumlar olmakla birlikte genel olarak EPS üretimi bakteriyel üreme ile yakından ilgilidir ve optimum mikrobiyal büyüme koşullarında EPS üretim miktarı yüksek seviyeye ulaşmaktadır (Kwon *et al.* 2002). Mikrobiyal genetiğe ve metabolik yolaklara bağlı olarak aynı mikroorganizma farklı karbon veya azot kaynağı ile beslendiği zaman farklı yoğunluk ve kompozisyonda EPS üretebildiği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yuksekdag and Aslim (2008)'e göre glikoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında 175 mg/L EPS üreten laktik asit bakterisinden, früktoz kullanıldığında sadece 69 mg/L üretilebildiği bildirilmiştir. Ye *et al.* (2011a)'e göre; aktif çamur içerisinde

asetat karbon kaynağı olarak kullanıldığında üretilen EPS'nin polisakkarit içeriği, glikoz ya da nişasta karbon kaynağı olarak kullanıldığında elde edilen polisakkarit içeriğinden daha düşük olduğu bildirilmiş ve sebebi farklı metabolik yolaklarla açıklanmıştır. Çünkü sodyum asetatın, sitrik asit çemberine direkt olarak girebildiği ancak glikoz ve nişastanın önce pirüvata parçalandığı ve okside olarak asetil-CoA oluşturduktan sonra sitrik asit döngüsüne girdiği bildirilmiştir.

Oksijen varlığı veya seviyesi bir diğer etken olarak belirlenmiştir. Çünkü bakteriyel EPS üretimi genellikle aerobik koşullar altında gerçekleşmektedir. Örneğin ksantam gum için maksimum havalandırma gerekirken, bakteriyel aljinat için mikroaerofilik koşullar gerektiği bildirilmiştir (Kumar and Mody 2009).

EPS'nin Bileşenleri

Polisakkaritler

Karbonhidratlar, protein ve nükleik asitlerle beraber üç önemli biyolojik makromolekülden biridir ve bakteriyel ya da viral enfeksiyon, inflamasyon ve immün sistem gibi birçok özel biyokimyasal reaksiyonda rol oynar. Biyolojik fonksiyonları ise büyük oranda polimerleşme derecesi, bağlanma şekli ve zincirin dallanma biçimine bağlıdır (Dwek 1996; Dahech *et al.* 2013).

Mikrobiyal EPS'lerin büyük kısmı karbonhidrat (polisakkarit) içermektedir ve homopolisakkarit ya da heteropolisakkarit yapıda olabilirler. EPS'nin karbonhidrat içeriği üretim ve ekstraksiyon aşamasındaki çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir, ancak ana etkenler üretici mikroorganizma, karbon kaynağı, nutrientler (azot ve fosfor) ve ekstraksiyon metodudur (Donot *et al.* 2012).

Protein

Mikrobiyal hücrelerin ürettiği polimerik bileşenlerin kimyasal yapısı organizmanın büyüdüğü çevresel koşullara bağlıdır. Polisakkaritlerden sonra EPS'lerin en çok araştırılan bileşeni; proteinlerdir (Nouha *et al.* 2018). Mikrobiyal EPS'lerin protein içeriğini etkileyen faktörler ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ton-That *et al.* (2004); proteinin EPS matrisinin ana bileşeni olduğunu ve protein varlığının mikrobiyal büyüme için kullanılan substrat tipinden etkilenmediğini belirtmişlerdir. Ayrıca mikroorganizmaların farklı tipte karbon kaynakları (glikoz, sodyum asetat) ile desteklendiğinde tutarlı bir protein içeriğine sahip olabileceği bildirilmiştir. Hoa *et al.* (2004), azotun protein içeriği üzerine etkisini araştırmıştır. EPS'nin protein içeriğinin, azot (NH_4Cl) kısıtlamasından etkilenebileceğini ve kısıtlı azot

bulunması durumunda üretilen EPS'nin protein içeriğinde bir artışın gözlendiğini bildirmişlerdir.

DNA ve hümik bileşenler

Biyofilmler, polimerik bileşiklerin karışımından oluşan bir matris içine alınmış bakteri agregasyonu olarak tanımlanır. Pek çok mikroorganizma fonksiyonel bir konsorsiyum oluşturmakta ve biofilm olarak isimlendirilen EPS'ler sentezlemektedirler (Nouha *et al.* 2018). Nükleik asitler ve hümik bileşenlere ise biyofilm yapısında sıklıkla karşılaşılmaktadır.

DNA veya nükleik asit, hücre parçalanmasına bağlı olarak salgılanan ve EPS matrisine adsorbe olabilen hücre içi bir bileşendir. Hücre dışı DNA (eDNA), üretilen biyofilmlerin ilk oluşumu için gereklidir. eDNA, mikroorganizma ve abiyotik yüzey arasındaki hidrofobik etkileşimleri düzenleyerek bakterinin abiyotik yüzeye yapışmasına yardımcı olur (Conover *et al.* 2011). Benzer şekilde, biyofilm, stres koşullarında veya hücre parçalanmasından dolayı spesifik olarak DNA salgılayan diğer birçok bakteri tarafından da oluşturulur (Seper *et al.* 2011; Chiang *et al.* 2013; Jennings *et al.* 2015). Hümik maddeler ise organik artıkların hidrolizi sonrası oluşan ve EPS matrisine karboksilik veya fenolik gruplar ile adsorbe olabilen bileşenler olup; nükleik asitlerin ve hümik maddelerin, EPS'lerin reolojik özelliklerini ve stabilitesini etkilediği bilinmektedir (Nouha *et al.* 2018).

EPS'lerin Biyosentezi, Hücre Dışı Salınımı ve Genetiği

Mikrobiyal EPS sentezi, spesifik enzimler (polimerizasyon ve öncü sentez enzimleri) ile gerçekleştirilir ve sentez hücre dışında veya hücre duvarında gerçekleştirilir (Nouha *et al.* 2018).

Mikrobiyal EPS üretimi için üç farklı biyosentez yolağı bulunmaktadır. Bazı homopolisakkaritlerin (glukan ya da fruktan gibi) sentezi sükraz enziminin etkisi ile gerçekleştirilmektedir. Buradaki glukansükrazlar ve fruktansükrazlar sükrozu parçalayan glikozid hidrolazlar olup, polimer zincirin oluşmasını sağlayan transglikozilasyonu kataliz etmektedirler (Kumar and Mody 2009). Heteropolisakkaritler ve bazı homopolisakkaritler için olan diğer iki biyosentez yolağı oldukça karmaşıktır ve glikoz, fruktoz, mannoz veya ksiloz gibi şeker monomerlerinin alımını gerektirmektedir. Bu şeker monomerleri daha sonra sitoplazmik zarda bulunan bir izoprenoid lipit-fosfat üzerine bağlanan nükleozit difosfat şekerlerine (NDP-şekerleri) dönüştürülür. Bu aşamada, tekrarlayan monosakkarit üniteleri, sırasıyla şeker nükleotidlerinden glikoziltransferazlar ile transfer edilmekte, bir açil grubunun eklenmesiyle modifiye edilmekte ve daha sonra polimerize olmaktadırlar. Son olarak, polisakkarit hücre zarından hücre dışı ortama salgılanmaktadır (Yildiz *et al.* 2015).

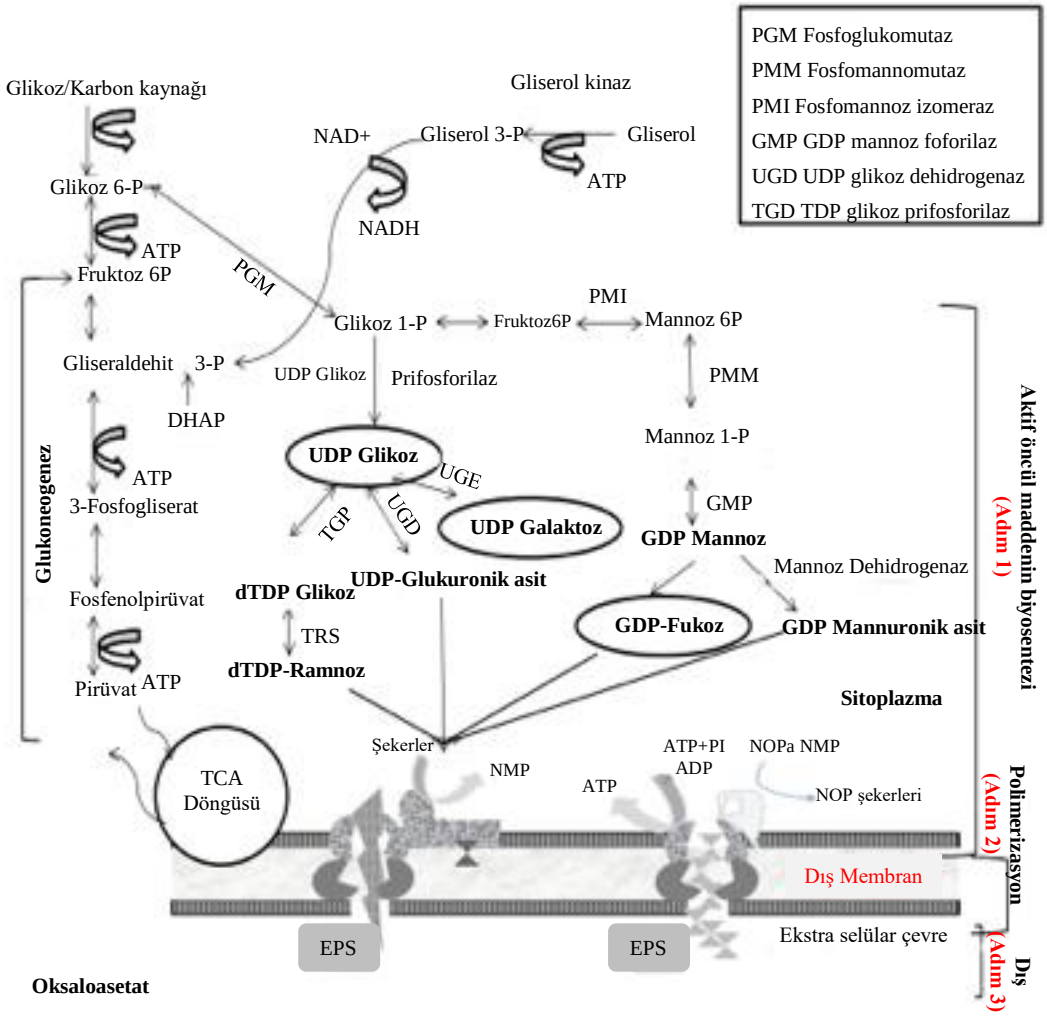
Genel hatlarıyla EPS biyosentezi; ilk aşamada öncül substrat sentezi, ikinci aşamada polimerizasyon ve sitoplazmik membran transferi ve son olarak zar dışına salınım şeklinde üç ana aşamada gerçekleştirilmektedir. Bu üç adım aynı zamanda kullanılan karbon kaynağına ve mikroorganizma türüne göre değişiklik göstermektedir.

Öncül substrat sentezi

Bu adımlar, ara monosakkarit metabolitlerinin, substrat veya karbon kaynağına karşılık gelen nükleozit difosfat (örneğin Guanosin difosfat (GDP)-monosakkarit) gibi EPS öncülüne dönüştürülmesini içermektedir (Şekil 8). Aktif polimer öncülünün biyosentezi prosesinde, polimer üretimi ve özel polisakkaritlerin sentezi için polimer-spesifik enzimler kullanılmaktadır. Örneğin, üridin difosfat (UDP)-glikoz, *Acetobacter xylinum*'dan selüloz (üridin difosfat glikoz (UDPG) pirofosforilaz) ve *Aureobasidium pullulans*'dan pullulan (glikoziltransferaz) sentezinin öncüsü olarak bildirilmiştir (Nouha *et al.* 2018).

Polimerizasyon ve sitoplazmik membran transferi

Öncül monosakkarit-nükleotit kompleksinin oluşumu ile monosakkaritler bir izoprenoid lipid üzerine sıralı olarak eklenmekte ve eşzamanlı olarak açil grupları bağlanmaktadır. Spesifik monosakkarit transferaz enzimleri, monosakaritlerin ve açil gruplarının, sitoplazmik zarda bulunan izoprenoid lipit alıcılarına (baktoprenol, C55-izoprenoid lipit gibi) transferini kolaylaştırmaktadırlar. Daha sonra asetil, piruvil ve diğer açil bağlı oligosakkarit tekrarlayan üniteler polimerize edilmektedir ve tekrarlayan birimlerin polimerizasyonundan sonra mikrobiyal polisakkarit (EPS), sitoplazmik, periplazmik ve dış zar proteinlerini içeren bir kompleks oluşumunun koordinasyonu ile sitoplazmik membrandan dışarı salgılanmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Bakterilerde EPS üretim yolakları (Nouha et al. 2018)

Zar dışına salınım

EPS biyosentezinin son aşaması, polisakkaritin sitoplazmik zardan salgılanmasıdır (Şekil 8). Periplazmadan, dış membran boyunca geçiş ve sonunda hücre dışı ortama salınımını içermektedir. Polisakkaritler, sitoplazmik membranın iç tarafında polimerize edilmekte ve daha sonra bir lipit taşıyıcısının aracılığıyla, doğrudan dışarıya aktarılmaktadır. Bu taşıyıcılar, uzun zincirli fosfat esterleri ve izoprenoid alkollerdir. Salınımdan sonra, EPS'ye özgü enzimin müdahalesi ile polimer serbest bırakılmaktadır.

EPS Ekstraksiyon Metotları

Üretilen EPS'yi kültür ortamından ve mikrobiyal tortulardan uzaklaştırmak için bir takım yöntemler geliştirilmiş olup, proseste genellikle kimyasal ve fiziksel yöntemler ile bunların kombinasyonları uygulanmaktadır. Comte *et al.* (2006); ekstraksiyon ürünlerinin, kimyasal ekstraksiyon sırasında reaktifler ve/veya proteinlerden dolayı kirlenebileceğini bildirmişlerdir. Fiziksel ekstraksiyon sırasında, farklı seviyelerde hücre parçalanmaları da

gözlenebilir. Bu durumda protein ve nükleik asit içeriğinin EPS ya da mikrobiyal ölüm kaynaklı olduğu anlaşılamamaktadır. Dolayısıyla bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları, elde edilen EPS'nin miktarı ve kalitesine göre kıyaslanabilir.

Farklı kimyasal yöntemler (katyon değişim reçinesi/CER, formaldehit/sodyum hidroksit, etilendiamintetraasetikasit/EDTA, gluteraldehit, alkali ekstraksiyonu gibi) arasındaki karşılaştırmalar farklı yazarlar tarafından gerçekleştirilmiştir. Domínguez *et al.* (2010); reçine ile elde edilen EPS miktarının (158 ±3 mg/g toplam EPS), formaldehit/sodyum hidroksit (150±3 mg g toplam EPS) ile elde edilen miktar ile neredeyse aynı olduğunu göstermişlerdir. Becerra *et al.* (2010); alkali ekstraksiyonunu CER ekstraksiyon yöntemi ile karşılaştırmışlar ve alkalin ekstraksiyonu ile üç kat daha fazla organik madde (proteinler, karbonhidratlar vb.) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çünkü CER yönteminde reçinenin çıkarılması kolaydır ve EPS, kimyasal reaktifler tarafından kirletilmemektedir. Ayrıca katyon değişimine dayanan yöntemlerin, magnezyum ve kalsiyum bağlı EPS'ler için oldukça seçici olduğu gösterilmiştir (Donot *et al.* 2012).

Kimyasal yöntemler arasından alkali ekstraksiyonun, %75'e kadar organik materyal elde edilmesine olanak sağladığı ancak aynı zamanda polimer bileşiminde ciddi bir bozulmaya neden olabildiği bildirilmiştir. EDTA ise, oldukça etkili ekstraksiyon kapasitesine rağmen hafif hücre parçalanmasına neden olabilmektedir. Formaldehit/sodyum hidroksit yönteminde ise, formaldehit dozu, EPS'nin karakteristiklerini değiştirir ve monomer kompozisyonu belirlenirken önemli etkileşimlere neden olur (Sheng *et al.* 2005).

Fiziksel ekstraksiyon yöntemleri (ultrasonik, santrifüj, mikrodalga işlemi veya ısıtma) EPS'yi hücrelerden ayıran yöntemlerdir ve genellikle, fiziksel işlemlerin verimliliği, kimyasal ekstraksiyon yöntemlerinden daha düşüktür. Comte *et al.* (2006); farklı ekstraksiyon metotlarını ve bir kontrol metodunu (sadece santrifügasyon ile çöktürme) birbirleriyle kıyaslamışlar ve kimyasal yöntemle elde edilen verimin (96–318 mg kuru EPS/gram çamur) oldukça fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Domínguez *et al.* (2010); ayrıca CER yönteminin ısıl işlemden 1.1-6 kat daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Mikrobiyal EPS'lerin niteliksel ve niceliksel olarak elde edilebilmesi için basit ve tek bir yöntem yoktur. Elde edilecek EPS'nin özellikleri dikkate alınarak her durum için bir ekstraksiyon tekniği seçilmeli ve optimize edilmelidir. Bazı ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması ve metotların nitelik veya nicelik olarak nihai amacına göre seçilmesi gerekmektedir Ayrıca tüm EPS fraksiyonlarının geri kazanımı için kombine ve tekrarlanan ekstraksiyonlar kullanılabilmektedir.

EPS’lerin Fizyolojik Özellikleri

Son yıllarda yeni mikrobiyal EPS’lerin araştırılmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda EPS ürettikleri bildirilmiştir. Sıcaklık, basınç, ışık yoğunluğu ve derin ya da katı kültür büyüme ortamı gibi seçici çevresel faktörlere bağlı olarak üretilen EPS’lerin fizyolojik rolünün ise üretici mikroorganizmanın biyotopuna bağlı olduğu rapor edilmiştir (Donot *et al.* 2012).

Mikroorganizmalar sıklıkla yüksek hücre yoğunluğuna sahip bir biyofilm (EPS) oluşturabilirler. Temel olarak polisakkaritten oluşan glikokaliks ise bu biyofilm oluşumu için gereklidir ve polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler biyofilmin stabilitesini etkileyebilmektedir. Çünkü biyofilm yapıdaki polisakkaritler, mikroorganizmaların büyümesi için gerekli substrata yapışmasını sağlamaktadır ve biyofilm oluşumu bakterilerin çevrenin fizikokimyasal koşullarına adaptasyonunda önemli bir yer tutmaktadır (Sutherland 2001). Yapışkan ve koruyucu fonksiyonlarından ayrı olarak, biyofilm oluşumu farklı mikrobiyal türlerin birleşmesini teşvik etmektedir. Biyofilm ile ilişkilendirildiğinde, bir türün metabolik ürünleri, başka bir türün metabolik işlemleri için substratlar olarak işlev görebilmektedir (Dunne 2002).

EPS'ler enerji rezervi olarak işlev görmemektedirler ve mikroorganizmalar tarafından katabolize edilememektedirler. Dolayısıyla, mikrobiyal EPS’lerin en büyük fizyolojik rolü, hücresini ortamından korumaktır. (Cerning *et al.* 1994). Kendisini yüksek su içeriğine sahip bir hücre dışı polisakkarit tabakası ile çevreleyen mikroorganizma, kurumaya ve protozoanlar tarafından eleminasyona karşı direnç sağlamaktadır. Ayrıca, dış polisakkarit katmanının anyonik doğası, gerekli mineralleri ve besin maddelerini yakalamaya, metalleri ve iyonları bağlamaya yardımcı olabilmektedir (Ozturk *et al.* 2009). Polisakkarit zarf ayrıca bazı moleküllerin hücre dışı ve hücre içi ortamlar arasındaki difüzyonunu da düzenleyebilmektedir ve bu düzenlenmiş difüzyon ile bazı bakteriler sürfaktanlara ve antibiyotiklere karşı direnç oluşturabilmektedirler (O'Toole *et al.* 2000).

EPS’lerin Kullanım Alanları

Mikrobiyal EPS’ler işlevsellikleri ile farklı fiziksel, kimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket etmekte ve genellikle güvenli olarak kabul edilmektedirler. Keçiboynuzu ve arabik zamkı gibi bitki zamklarına kıyasla suda daha yüksek çözünürlük gösterirler ve geniş sıcaklık, pH ve iyonik güç aralığı gibi farklı koşullar altında sabit ve stabil özelliklere sahip olmaktadırlar. Böylece, çeşitli endüstriyel çalışmalarda uygulanabilir hale gelmektedirler ve bu alanlar gıda sanayisi, ilaç ve medikal sanayisi ve atık

su arıtım prosesleri olabilmektedir (Freitas *et al.* 2009; Chowdhury *et al.* 2011; Han *et al.* 2015; Song *et al.* 2019). Tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri, atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri ve akarsu işleme sürecinde oldukça geniş kullanım alanına sahiptirler (Becker *et al.* 1998). Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS'ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler (Wolfaardt *et al.* 1994; Krylova *et al.* 2000).

Gıda sanayisinde; katkı maddesi, kıvam arttırıcı, kalınlaşma, dengeleyici ve emülsifiye edici ajan olarak kullanılabilen ksantan gam, gellan gam, aljinat, glukan, süksinoglukan, hiyalüronik asit ve levan gibi polisakkaritler üzerinde yoğun çalışmalar yapılan ve ticari olarak kullanılan bakteriyel EPS'lerdir (Becker *et al.* 1998). Avrupa Birliği (AB) ülkelerinin çoğunda stabilizatör kullanımının yasak olmasından dolayı kıvam artırıcı kültür kullanımı oldukça yaygındır. Laktik asit bakterilerini içeren starter kültürler AB ülkeleri ve ABD'de ticari kültür olarak süt endüstrisinde kıvam artırma amacıyla satılmaktadır. Farklı laktik asit bakterilerinden üretilen EPS'ler; kimyasal kompozisyon, elektriksel yük, üç boyutlu yapı ve proteinlerle etkileşim yapabilme yetenekleri gibi birçok özellik bakımından değişkenlik göstermektedir (Duboc and Mollet 2001). Sardari *et al.* (2017); düşük yağ ve şeker içeriğine sahip, inorganik gıda katkı maddesi içermeyen gıdalara olan tüketici taleplerinin artması ile üreticilerin EPS içeriği yüksek gıdalar üretmeye sebep olduğunu bildirmektedirler.

Mikrobiyal EPS'ler, ilaç ve medikal sanayisinde; immünomodülatör, immünostimülatör, anti-tümör, anti-viral, anti-enflamatuar ve antioksidan ajan ve ilaç kaplama materyali gibi pek çok fizyolojik aktiviteye katkıda bulunurlar (Lee *et al.* 1997). Yapılan bazı araştırmalar ise mikrobiyal EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediğini, kolesterolü düşürdüğünü ve anti-ülser aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Tavernier *et al.* 1997). Mikrobiyal polisakkaritlerin biyolojik aktiviteleri; molekül ağırlığı, polimerizasyon derecesi, monosakkarit kompozisyonu ve glikozidik bağlanma özelliklerine göre belirlenmektedir. Ye *et al.* (2018); yüksek molekül ağırlıklı EPS'lerin gıda sanayisinde stabilizatör ve emülsifiye edici ajan olarak, tekstür ve viskoziteyi arttırmak için kullanılırken, 40.000-70.000 Da gibi düşük molekül ağırlıklı olanların ise en çok tıpta ve medikal alanda kullanıldığını rapor etmişlerdir. Örneğin; α-(1,2)-, α-(1,3)- ve/veya α-(1,4)-dallanmaya sahip α-(1,6)-bağlı glukan moleküllerinden oluşan dekstran polisakkariti yüksek prebiyotik aktiviteye sahiptir. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi hayvan beslenmesinde ve hipokalsemi tedavisinde, ağ yapılı sefadeks dekstranlar ise, biyolojik materyallerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında kullanılmaktadır (Calazans *et al.* 1997; Ye *et al.* 2018).

Çamur çökeltme işlemi genellikle sentetik polimerler eklenerek gerçekleşirilir ancak bu polimerler pahalıdır ve sonraki aşamalarda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Sentetik çöktürücülerin kullanımını sınırlandırmak için yeni alternatif uygulamalar, çevre dostu biyolojik koagülantların kullanımıdır. EPS'lerin temel görevi, biyokütle ve askıda katı madde arasında London kuvveti, elektrostatik kuvvet ve hidrojen bağları gibi kompleks etkileşimleri sağlayarak adhezyon ve kohezyonlar oluşturmak ve bu sayede biyokütle ve askıda katı maddelerin agregasyonunu arttırmaktır. EPS'lerin bu özellikleri ise onların atıksu arıtımında çamur flokülasyonu, çökeltme, susuzlaştırma, metal bağlanması ve toksik organik bileşiklerin uzaklaştırılması gibi çevresel uygulamalar için biyoflokülant ajan olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Nouha *et al.* 2018).

Reolojik Kavramlar

Reoloji; katı, sıvı veya gazların baskı/gerilim altında uğradıkları deformasyon olarak tanımlanmaktadır ve endüstride rutin analizlerden karmaşık araştırmalara kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır (Batchelor 2000).

Gıdaların ve içerisindeki katkı maddelerinin reolojik özellikleri gıdanın hammadde oranlarının hazırlanmasında ve üretimin tüm aşamalarında önemlidir. Çünkü üretim, depolama ve paketleme sırasında, ürünler mekanik ya da sıcaklık stresine maruz kalıp deformasyona uğrayabilirler. Gıda endüstrisinde boru hatları, pompa, ekstrüder, karıştırıcı, kaplama makinası, ısı değiştirici ve homojenizatör gibi ekipmanların ve bu ekipmanların içinde bulunduğu proseslerin tasarımı açısından önemli olan reolojik özellikler kil, beton, asfalt, plastik, boya, mürekkep, deterjan ve yağ gibi endüstri malzemelerinin üretim kontrolü açısından da vazgeçilmez bir parametredir (Schramm 1994).

Kayma gerilimi birim alana uygulanan kuvvet olarak tanımlanmaktadır ve genellikle 'pascal (Pa)' olarak ifade edilmektedir;

$$\tau = \frac{\mathrm{F(kuvvet)}}{\mathrm{A(alan)}} = \frac{Newton}{m^2} = Pa \tag{1.9}$$

Kayma geriliminin uygulanmasının düzlemler arasında yer değiştirmeye neden olmasıyla kayma hızı;

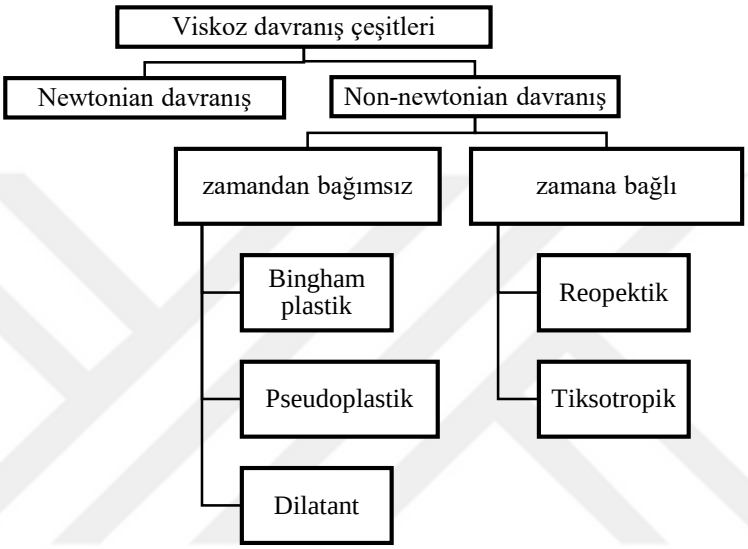
$$\gamma = \frac{dv}{dx} = \frac{{}^{m}/_{s}}{m} = {}^{1}/_{s} \tag{1.10}$$

olarak tanımlanır. Viskozite ise; kayma gerilime karşı gösterilen dirençtir. Birimi Pa.s olarak gösterilmektedir.

$$\mu = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{N}{m^2}.s = Pa.s \tag{1.11}$$

Viskoz maddeler mekanik etki veya strese maruz kaldıklarında akışa geçerler, bunun tersine katılar akış özelliği göstermezler, katı maddeler deforme olurlar ve bu deformasyona 'strain/gerinim' denir. Lastik gibi bazı katılar deformasyona uğradıktan sonra geri salınım hareketi ile eski haline geri dönerler ve bu durum elastiklik olarak bilinir (Tunç 2012).

Newtonian akış: Kayma hızı ve kayma geriliminin doğrusal bir şekilde artmasına karşılık viskozitenin aynı koşullar altında daima sabit olduğu akış tipidir. Düşük molekül ağırlığına sahip bileşenler içeren ya da çözünmüş polimer maddeler, su, bal ve süt gibi içecekler Newtonian tipi davranış gösterirler (Şekil 9).



Şekil 9. Sıvıların akış özelliklerine göre sınıflandırılması (Schramm 1994; Chhabra 2010)

Newtonian olmayan (non-newtonian) akış: Kayma hızı ve kayma geriliminin aynı oranda artmadığı ve dolayısıyla viskozitenin kayma hızına bağlı olarak değiştiği akışkan tipidir. Bu akışkanlar Newton'un viskozite yasasına uymamaktadırlar. Sabit bir viskozite değeri olmadığı için belli bir kayma hızında tespit edilen görünür viskozitelerinden (apparent viscosity) bahsedilmektedir. Genellikle emülsüyon, süspansiyon veya yüksek molekül ağırlıklı maddelerin çözeltileri Newtonian olmayan akış göstermektedirler. Zamandan bağımsız Newtonian akış göstermeyen sistemler ise plastik akış, pseudoplastik akış ve dilatant akış olarak üç gruba ayrılmaktadırlar. Plastik davranış; akışa başlaması için belli bir kayma gerilimine ihtiyaç duyan sistemler, Pseudoplastik davranış; kayma hızının artması ile viskozitenin azaldığı sistemler, Dilatant davranış ise; kayma hızının artması ile viskozitenin arttığı sistemlerdir (Şekil 9).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin türe özgü önemli biyolojik, fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri olabileceği hipotezinden yola çıkarak, bu çalışmada, değerli mikrobiyal polisakkarit üreticisi bakterinin izolasyonu, moleküler identifikasyonu ve elde edilen EPS'nin biyolojik, kimyasal ve reolojik karakterizasyonu amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Termofilik mikroorganizmalar ekstrem koşullara adapte olmuş, sıcaklık stabiliteleri yüksek canlılar olup, bu organizmalardan elde edilen EPS'ler, endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Farklı mikrobiyal kaynaklardan özellikle de termofilik bakterilerden EPS üretimi ve karakterizasyonu konularında yapılan önemli çalışmalardan bazıları şunlardır:

Stredansky *et al.* (1999); katı kültür fermentasyonu (SSF) ile bakteriyel EPS üretimini gerçekleştirmişler ve derin kültür fermentasyonu (SmF) ile kıyaslandığında laboratuvar ölçeğinde 2-5 kat daha fazla polimer üretebilmişlerdir. Ayrıca, *Xanthomonas campestris*'in 38,8 g/L ksantan, *Rhizobium hedysari'*nin 21,8 g/L süksinoglukan ve *Agrobacterium tumefaciens* PT45'in ise 20,3 g/L süksinoglukan üretebildiğini rapor etmişlerdir.

Moriello *et al.* (2003); sıcak su kaynağından izole ettikleri EPS üreten suşu *Geobacillus* sp. olarak tanımlamışlar ve optimum büyüme değerlerini 60°C ve pH 7 olarak bildirmişlerdir. En yüksek EPS verimini, sükroz ya da trehalozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumda 0,09 g/L olarak elde etmişler ve %75 polisakkarit ve %2,6 protein içerdiğini bildirmişlerdir. Nükleer manyetik rezonans sonuçlarına göre, pentasakkarit tekrar birimlerinden oluşan 100 kDa molekül ağırlığına sahip heteropolisakkaritin; galaktoz, mannoz, glukoz ve arabinozdan oluştuğunu belirlemişlerdir.

Gugliandolo *et al.* (2003); sıcak su kaynaklarından izole ettikleri termofilik ve halotolerant *Bacillus aeolius* sp. nov'un sükroz ile indüklenmiş büyüme ortamında 0,7 g/L EPS üretebildiğini bildirmişlerdir.

Kambourova *et al.* (2009); sıcak su kaynağından izole ettikleri *Geobacillus tepidamans* V264 suşunun EPS üretimi için ve en uygun karbon kaynağının maltoz olduğunu ve bakterinin; durağan fazın başlarında 0,1 g/L EPS üretebildiğini belirlemişlerdir. Yüksek molekül ağırlığına (1000 kDa) sahip olan bu heteropolisakkaritin yüksek oranda polisakkarit (%98; glikoz, galaktoz, fukoz ve fruktoz) ile düşük oranda protein (%1,8) ve nükleik asit (%0,9) içerdiğini bildirmişlerdir.

Arena *et al.* (2009); termofilik *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72 suşunun ürettiği 400 kDa molekül ağırlıklı EPS'nin; mannoz ve glikozdan oluştuğunu ve antiviral aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Radchenkova *et al.* (2011); Bulgaristan'ın Rupi termofilik havzasından izole edilen suşu, en iyi polisakkarit üreticisi olarak belirlemişler ve B*revibacillus thermoruber* 438 olarak tanımlamışlardır. Test edilen karbon ve azot kaynakları arasından en uygun karbon kaynağını, %1,8 maltoz ve en uygun azot kaynağını %0,1 amonyum dihidrojen fosfat olarak belirlemişlerdir. En yüksek polimer yoğunluğunun ise; pH 8 ve 55°C'de yapılan mikrobiyal üretimle 0,0781 g/L olarak elde edildiğini bildirmişlerdir.

Spanò *et al.* (2013); termofilik *Bacillus licheniformis* T14'ün EPS üretimi için en uygun ortamın karbon kaynağı olarak %5 sükroz içeren kültür olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen heteropolisakkarit, trisakkarit birimleri halinde; früktoz, fukoz, glikoz, galaktozamin ve mannozdan oluşmaktadır. 1000 kDa molekül ağırlığına sahip bu EPS'nin, mitozda telofaz oluşumunu engelleyen Avarol etken maddesinin etkinliğini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Dahech *et al.* (2013); Tunus'da sıcak su kaynaklarından izole ettikleri bakterileri levan üretimleri açısından taramışlar ve en yüksek verime sahip bakteriyi *Bacillus licheniformis* olarak tanımlamışlardır. Ayrıca üretilen EPS'nin (2,6)-β–d-fruktofuranozil birimlerinden oluşan lineer yapıda levan olduğunu tespit etmişlerdir.

Radchenkova *et al.* (2014); Bulgaristan kaplıcasından elde ettikleri EPS üreticisi bakteriyi *Aeribacillus pallidus* 418 olarak tanımlamışlardır. Havalandırma ve karıştırma hızı üzerinden optimize ettikleri polisakkarit üretiminin maksimum verimini 0,17 g/L olarak bildirmişlerdir. Ayrıca elde edilen EPS'nin emülsifiye edici özelliğinin olduğunu da rapor etmişlerdir.

Zhao *et al.* (2014); Çin'deki bir kaplıcadan radyasyona dirençli termofilik *Anoxybacillus* sp. R4-33 suşunu izole etmişlerdir. Bu bakteri, 55°C de optimum büyüme göstermiş olup, ortalama EPS verimi 1,083 g/L olarak belirlenmiştir. Üretilen EPS'nin iki temel fraksiyondan oluştuğu, nükleik asit ve protein içermediğini bildirmişlerdir. Molekül ağırlığı 1 kDa'dan fazla olan EPS'nin nükleer manyetik rezonans analizine göre, mannan-glukan (1:0,45 oranında) benzeri yapıya sahip yeni bir biyopolimer olduğunu belirtmişlerdir.

Yildiz *et al.* (2015); Türkiye ve Bulgaristan kaplıcalarından izole ettikleri bakteriler arasından yüksek EPS üreten izolatı, %99 benzerlik oranıyla *Brevibacillus thermoruber* 423 olarak tanımlamışlar ve üretilen EPS'nin heteropolimer yapıda olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca büyüme ortamında farklı karbon kaynakları (maltoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, mannitol, gliserol ve glikoz) kullanıldığında, üretilen EPS yoğunluklarının (0,6; 0,4; 0,3; 0,5; 0,5; 0,2 ve 0,3 g/L) karbon kaynağına göre farklılık gösterebileceğini ortaya koymuşlardır.

Sardari *et al.* (2017); kırmızı-kahverengi, aerobik, gram negatif bir termofilik bakteri olan *Rhodothermus marinus*'u ilk olarak İzlanda sıcak su kaynaklarından izole etmişlerdir. Bu çalışmada, iki farklı *R. marinus* suşu kullanılmış ve büyüme karakteristiği bakımından incelendiğinde suşlardan birinin belirgin bir şekilde agregat oluşturabildiğini gözlemlemişlerdir. Ön denemelerde karbon kaynağı olarak monosakkarit yerine disakkarit kullanımının daha fazla EPS üretimi ile sonuçlandığını ve EPS üretiminin eksponansiyel fazla başlayıp durağan fazda devam ettiğini bildirmişlerdir. Üretilen EPS'ler saflaştırılmış, farklı karbon kaynaklarına karşılık farklı moleküler ağırlıkta EPS üretimi belirlenmiş ve molekül ağırlıklarının $1x10^5$-$3x10^5$ Da arasında değiştiği rapor edilmiştir. Kompozisyon analizine göre *R. marinus'*un ürettiği polisakkaritin heteropolisakkarit olduğu; glikoz, arabinoz, xylose ve mannozdan oluştuğu gösterilmiştir. Bakteriyel EPS'lerde arabinoz ve ksiloz'un sık karşılaşılan şekerler arasında olmaması bakımından bu dikkat çekici bir sonuçtur. Kimyasal bağ analizine göre, karbon kaynağından bağımsız olarak her iki suş için EPS'nin üronik asit ve karboksil grup içeren, karmaşık yapılı olan ve töropotik etkisi olduğu bilinen sülfatlanmış polisakkaritler olduğu tespit edilmiştir.

Rani *et al.* (2017); serbest gezen tavuktan izole ettikleri çubuk şekilli, katalaz pozitif ve aerobik *Bacillus tequilensis* FR9'un değişik formülasyonlardaki büyüme ortamlarında EPS üretimini incelemişler ve antioksidan aktiviteye sahip olan polimerin glukoz, galaktoz, mannoz, arabinoz ve ksilozdan oluşan heteropolisakkarit olduğunu bildirmişlerdir.

Malick *et al.* (2017); mezofilik *Bacillus amyloliquefaciens* 23350 kodlu suş ile EPS üretiminin, bazal mineral ortamına maya özütü eklendiği koşulda 6,7 g/L; *B. licheniformis* 14580 kodlu suş ile üretim esnasında ise mineral ortama maya özütü ve süksinat eklendiğinde 48,57 g/L olarak gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *B. amyloliquefaciens* 23350'nın ürettiği, çoğunlukla glukandan oluşan EPS'nin moleküler ağırlığı 5 kDa civarında iken, *B. licheniformis* 14580'in ürettiği ve galaktoz, fruktoz ve glikozdan oluşan heteropolisakkaritin moleküler ağırlığının ise 5-30 kDa arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Angel *et al.* (2018); şeker üretim tesisinden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* WSF-1 suşunun EPS üretimini, karbon kaynağını değişken alarak standardize ettikleri çalışmada en yüksek EPS verimini (2,9 g/mL), %25'lik sükroz konsantrasyonunda elde etmişlerdir. Fruktoz ve glikoz monomerlerinden oluşan bu EPS; 219,4°C'ye kadar stabilitesini korumuş ve 150,6°C camsı geçiş sıcaklığına sahip olduğundan termostabil bir polimer olarak çeşitli endüstriyel uygulamalar için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Insulkar *et al.* (2018); *Bacillus licheniformis* PASS26'dan, 4,67 g/L verimle ürettikleri EPS'nin moleküler ağırlığını 56 kDa olarak belirlemişlerdir. Polimerin kompozisyonu

incelendiğinde; glikoz (%18,5), galaktoz (%9,8), früktoz (%16,2), mannoz (%27,3) ve galakturonik asitten (%28,2) oluştuğu gözlemlenmiştir. Yarı kristal yapıya sahip EPS'nin termal ve reolojik özelliklerine bakıldığında 30-350°C arasında ılımlı termal kararlılık gösterdiğini ve yarı-viskoz olduğunu bildirmişlerdir. Su ve yağ tutma kapasiteleri sırasıyla %98,8 ve %101,7 olarak belirlenmiş ve tüm gıda sınıfı yağlara ve hidrokarbonlara karşı oldukça yüksek stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca gıda ve ilaç sanayisindeki uygulamalar için önemli fonksiyonel ve biyolojik özelliklere sahip olduğu da belirlenmiştir.

Mohamed *et al.* (2018); Kızıl Deniz (Mısır) kenarında yetişen Mangrov ağaçlarının (*Avicennia marina*) rizosfer bölgesinden izole edilen sucul bakterilerin EPS üretimlerini, karsinom ve akciğer kanseri hücre hatlarına karşı anti-tümör ve bakteriler, maya ve funguslara karşı anti-mikrobiyal etkisini araştırmışlardır. 29 adet mezofilik bakteri izole edilmiş, bunlardan iki tanesinin EPS ürettiği belirlenmiştir. En yüksek EPS üreten (10,33 g/L) izolatın gram pozitif, çubuk şekilli, hareketli ve endospor pozitif olduğu, %99 oranında *Bacilllus altitudinis*'e benzediği tespit edilmiştir. *B. altitudinis* MSH2014'ün ürettiği EPS saflaştırılmış, molekül ağırlığı $4{,}23 \times 10^5$ Da olarak tespit edilmiştir. Monosakkarit analizine göre; mannuronik asit ve glikozdan oluştuğu, yapısında protein olmadığı ancak üronik asit ve sülfat bulunduğu belirlenmiştir.

Xu *et al.* (2019), dulavratotunu (*Arctium lappa L.*) karbon kaynağı olarak kullandıkları çalışmada *Bacillus subtilis*'in EPS üretimini tespit etmişlerdir. 1:0,1:17,2:0,7:1,1 oranında mannoz, ramnoz, glikoz, galaktoz ve arabinozdan oluşan bu EPS'nin, caspase-3'ün ekspresyonunu düzenleyebildiğini ve kanser ilacı olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

MATERYAL ve METOT

Örnek Toplama ve Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan termal su ve çamur örnekleri; Buharkent (Aydın), Kurşunlu (Manisa), Kızılcahamam (Ankara), Gönen (Balıkesir), Sarıkaya (Yozgat) ve Bozdağ (İzmir) kaplıcalarından steril numune kaplarına alınarak laboratuvara getirilmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Termofilik bakterilerin izolasyonu için, toplanan su ve çamur örneklerinden 5 mL alınarak, 250 mL'lik erlenlere konulmuş ve üzerlerine son hacim 100 mL olacak şekilde, steril Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri eklenmiştir. Her bir kaplıcadan alınan örnekler, 55°C'de 48 saat süre ile büyütülmüş ve gelişen bakteriler için %0,9 (w/v) fizyolojik su (NaCl) kullanılarak, bir seri dilüsyon (10^{-1}-10^{-7}) hazırlanmıştır. Dilüsyonu hazırlanan her bir kaplıca örneğinden 100 µL alınarak, Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine yayma ekim yöntemi ile inoküle edilmiş ve 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilerdeki koloniler incelenerek, farklı koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçilmiş ve TSA besiyerine aktarılmıştır. Üç faz çizgi ekim yöntemiyle saf kültürleri elde edilen her bir izolattan 2-3 öze dolusu alınarak, içerisinde 0,5 mL gliserol ve 0,5 mL TSB sıvı besiyeri bulunan kriyo tüplerde stok kültürleri hazırlanmış ve derin dondurucuda (-86°C) uzun süreli muhafaza edilmiştir.

Ekzopolisakkarit (EPS) Üreten Bakterilerin Taranması

EPS üretimi

En iyi EPS üreten izolatı belirlemek için, stok haldeki her bir izolat iki pasaj halinde TSA besiyerinde 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İkinci pasajın sonunda, katı besiyerinde büyüyen her bir izolattan, ön kültür hazırlamak için bir öze dolusu alınarak, 100 mL üretim besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere aktarılmış ve tüm izolatlar, 55°C'de 120 rpm'de inkübe edilmiştir. Üretim besiyeri litrede 50 gram sükroz ve 10 gram maya ekstraktı içerecek şekilde dizayn edilmiştir (pH 7,2). İnkübasyon boyunca hücre yoğunlukları, spekrofotometrede optik dansite takibi yapılarak belirlenmiş ve 600 nm dalga boyunda optik dansite değeri 0,5 McFarland ya da 10^{8}-10^{12} kob/mL değerine ulaşıncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir (Cockerill *et al.* 2012). Bu sürenin sonunda hazırlanan ön kültürlerden, 1 mL alınarak 250 mL'lik erlen içerisindeki 100 mL üretim besiyerine inoküle edilmiş ve 55°C 120

rpm'de 48 saat süre ile, EPS üretiminin gerçekleşmesi için inkübasyona bırakılmıştır (Dogan *et al.* 2015).

Ekstraksiyon

EPS üretimi sonrasında, her bir izolatın büyütüldüğü ortamdan hücre pelletini uzaklaştırmak için 4500 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve ham ekstrakt elde edilmiştir. Her bir izolat için elde edilen 'ham ekstrakt'lar üzerine, ortamdaki protein kirliliklerini uzaklaştırmak için son yoğunluğu %4 (w/v) olacak şekilde trikloroasetik asit (TCA) eklenerek +4°C'de 4 saat süre ile bekletilmiş (Rani *et al.* 2017) ve çöken proteinler 4500 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Her bir izolat için elde edilen ham ekstraktlar üzerine, iki katı hacimde soğuk (-20ºC) etanol eklenerek bir gece +4ºC'de bekletilmiş ve bu sayede EPS'nin çökmesi sağlanmıştır. Bu aşamada alkol eklendikten sonra ekstraktlar 'yoğunlaştırılmış ekstrakt' olarak tanımlanmıştır (Kurt and Kahyaoglu 2015; Li *et al.* 2017; Abid *et al.* 2018). Etanol muamelesi sonucu, alkol varlığına bağlı olarak çöken polisakkarit yapı önce 4500 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi ile çöktürülüp, hemen ardından liyofilizatörde vakum altında -70°C'de 12 saat süreyle dondurularak kurutulmuştur.

EPS Üreten İzolatın Fizyolojik Gereksinimlerin Belirlenmesi

İzolatın optimum gelişimi için gereksinim duyduğu parametreleri belirleme aşamasında, farklı sıcaklık (10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C), pH (pH 3, 5, 7, 9 ve 11) ve ve tuz yoğunlukları (%2, 4, 6, 8, 10 ve 12) denenerek inkübasyonlar gerçekleştirilmiş ve her parametre için izolatın gelişimi spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda (OD 600) yapılan ölçümler sonucunda tespit edilmiştir (Baltacı 2015).

EPS Üreten İzolatın Kültürel, Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Gram boyama

İzolatın hücre duvarı yapısını tespit etmek amacıyla iki farklı Gram reaksiyon testi uygulandı. Öncelikle, temiz bir lamın ortasına bir damla su konulmuştur. TSA besiyerinde 55°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılan genç kültürden öze ile alınan örnek su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyel film önce havada kurutulmuş, daha sonra lam iki üç kez alevden geçirilerek fiksasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan preparat önce kristal viyole boyası ile 1 dk muamele edilmiş ve süre sonunda fazla boya distile su ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra preparat lügol çözeltisi ile 1 dk muamele edilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. 10-15 sn etil alkol ile muamele edilen preparat, tekrar distile su ile yıkanmış ve son aşamada 30 sn kadar safranin ile muamele edilmiştir. Safranin boyası distile su ile

yıkanıp uzaklaştırıldıktan sonra kurumaya bırakılan preparat mikroskop altında 100X immersiyon objektifinde incelenmiştir. Mavi-mor renkte görülen bakteriler Gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Beveridge 2001).

Gram reaksiyonunda kullanılan ikinci bir yöntem potasyum hidroksit (KOH) testidir. Bu testte izolat %3 (w/v) KOH ile muamele edilmiştir. Gram (-) bakterilerde peptidoglikan yapı ince olduğundan, bu işlem esnasında sitoplazma dışarı çıkar ve mukoid bir yapı oluşurken, Gram (+) bakterilerde ise KOH hücre duvar yapısını bozamadığından, böyle bir durum gözlemlenmez. Bu amaçla izolattan bir öze dolusu alınarak, KOH solüsyonu ile 5-10 saniye süre ile muamele edilmiştir. Öze yukarı/aşağı doğru hareket ettirildiğinde, mukoid yapının oluşumu Gram (-) veya oluşmaması ise Gram (+) olarak değerlendirilmiştir (Powers 1995).

Endospor boyama

Konvansiyonel tanılamada kullanılan yöntemlerden biride endospor boyama testidir. Temiz bir lamın ortasına küçük bir su damlası konulmuş ve üzerine bir öze dolusu örnek bırakılarak yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyel film önce havada kurutulmuş, daha sonra lam iki üç kez alevden geçirilerek fiske edilmiştir. Preparat kaynar su banyosu düzeneği üzerine yerleştirilerek, 5 dk malaşit yeşili ile muamele edilmiş ve ardından su ile yıkanmıştır. Daha sonra 30 sn safranin ile muamele edilen ve su ile yıkanıp havada kurutulan preparat, mikroskop altında 100X immersiyon objektifinde incelenmiştir. Boyama neticesinde; endosporun yeşil, vejetatif hücrenin ise kırmızıya boyanması beklenmiştir (Prescott *et al.* 2002).

Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

Katalaz testi

Genellikle aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, elektron taşıma zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksiti parçalayarak, H_2O ve O_2 gazına dönüştürür. Açığa çıkan O_2 gazı da kabarcık oluşumuna sebep olur ve serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, katalaz enziminin varlığını gösterir. İzolatı katalaz enzimi açısından test etmek için, temiz bir lamın ortasına bir damla %3'lük (v/v) H_2O_2 konulmuş, üzerine bir öze dolusu örnek konarak iyice karıştırılmıştır. Hava kabarcıklarının oluşması katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Pikuta *et al.* 2000) .

Oksidaz testi

'Sitokrom c' proteini, mitokondride bulunan bir transmembran proteini olup, solunum olayında yani elektron transferinde görev almaktadır. Bu test ile bakterilerin 'sitokrom c' proteinini içerip içermedikleri tespit edilir. Analiz için, %1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorid içeren hazır kit kullanılmıştır. Bu amaçla kit bünyesinde bulunan disklere bir damla su damlatılmış ve üzerine bir öze dolusu örnek konularak renk değişimi gözlemlenmiştir. Mavi-mor renk oluşumu oksidaz pozitif, renk değişmemesi ise oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Tarrand and Gröschel 1982).

O_2 gereksinimi

Sodyum tiyoglikolat indirgeyici bir maddedir ve sodyum tiyoglikolat içeren besiyeri ise, mikroorganizmaların oksijen gereksinimleri ve anaerobik bakterilerin için ayırt edilebilmesi için kullanılabilen çok amaçlı bir besiyeridir. Ortamdaki sodyum tiyoglikolat, kültür ortamındaki oksijeni indirgeyerek tüketir ve zorunlu anaerobik bakterilerin büyümesini kolaylaştırır. Ortamdaki oksijenin kültür ortamına diffüzyonu, tüp boyunca farklı oksijen yoğunluklarının oluşmasına ve bu değişen yoğunluklarda O_2 gereksinimine göre farklı bakterilerin yaşamasına sebep olmaktadır. Bu amaçla, son yoğunluğu 29,5 g/L olacak şekilde sodyum tiyoglikolat içeren 100 mL TSB besiyeri 250 mL'lik erlenlere hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Test izolatından bir miktar alınarak, besiyerine transfer edilmiş ve 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Tüp boyunca mikrobiyal büyümenin yoğunlaştığı bölgeye göre; aerobik, fakültatif veya anaerobik şeklinde gruplandırma yapılmıştır (Cheesbrough 2006).

Enzim üretebilme potansiyelinin belirlenmesi

Selülaz

İzolatın selülaz enzimi üretebilme yeteneğini belirleyebilmek için, karboksimetilselüloz (CMC-10 g/L), pepton (5 g/L), maya ekstraktı (5 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2 g/L), NaCl (10 g/L) ve agar (15 g/L) içeren besiyeri hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Besiyeri donduktan sonra, TSA besiyerinde 55°C'de 48 saat süreyle üremeye bırakılan izolattan bir miktar alınarak selüloz besiyerinin tam ortasına ekim yapılmış ve 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petri, %0,1 (w/v)'lik Kongo kırmızısı ile 15 dk boyanmıştır. Boyanın fazlası dökülerek, 1M NaCl ile 20 dk muamele edilmiş, sarı renkli zon oluşumu selülaz pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Genc *et al.* 2015; Zamani *et al.* 2018).

Ksilinaz

İzolatın ksilinaz enzimi üretebilme yeteneğinin tespiti, selülaz enzimi için uygulanan prosedüre göre yapılmıştır. Sadece besiyeri içeriğinde CMC yerine ksilan kullanılmıştır (Sari *et al.* 2018; Zamani *et al.* 2018).

Lipaz

İzolatın lipaz enzimi üretebilme yeteneğini test etmek için, %1 (v/v)'lik gliserol tributirat içeren tributirin agar besiyeri [et pepton (2,5 g/L), kazein pepton (2,5 g/L), maya ekstraktı (3 g/L) ve agar (12 g/L)] hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Besiyeri donduktan sonra test izolatından bir öze alınarak, katı besiyeri üzerine inoküle edilmiş ve 55°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, büyüyen koloni etrafında şeffaf zon oluşumu lipaz pozitif, oluşmaması ise lipaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Ertuğrul *et al.* 2007).

Proteaz

İzolatın proteolitik özelliğinin belirlenebilmesi için nutrient broth (20 g/L), yağsız süt tozu (10 g/L) ve agar (15 g/L)'dan oluşan besiyeri hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Besiyeri donduktan sonra, test izolatından bir öze alınarak, katı besiyeri üzerine çizilmiş ve 55°C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Koloni etrafında şeffaf zon oluşumu proteaz pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Panda *et al.* 2013).

Amilaz

İzolatın amilolitik özelliğinin belirlenebilmesi için %1 (w/v)'lik çözünebilir nişasta içeren nutrient agar besiyeri hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Besiyeri donduktan sonra test izolatından bir öze alınarak, katı besiyeri üzerine inoküle edilmiş ve 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, petri lügol solüsyonu ile 20 dk muamele edilmiş ve şeffaf zon oluşumu amilaz pozitif, oluşmaması ise negatif olarak kabul edilmiştir (Yanmis *et al.* 2015).

Antibiyotik dirençlilik testi

Bir mikroorganizma tarafından üretilen veya diğer mikroorganizmaları öldüren-gelişmesini engelleyen kimyasal maddelere 'antibiyotik' denilmektedir (Madigan and Martinko 2012). İzolatın farklı antibiyotiklere karşı dirençliliğinin belirlenebilmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmış olup, TSA besiyerinde 55°C'de 48 saat süreyle üremeye bırakılan izolattan bir öze dolusu alınarak, 100 mL TSB besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere transfer edilmiş ve

48 saat süre ile ön-inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde aktifleştirilen izolattan 100 µL alınarak, TSA besiyerine aseptik koşullarda drigalski özesi ile yayılmıştır. Test edilecek her bir ticari antibiyotik diskinden [Amoxicillin (AML), Cefoperazone (CFP), Chloramphenicol (C), Kanamycin (K), Netilmicin (NET), Ofloxacin (OFX) ve Sulfamethoxazol (SMX)] birer tane petrilerin ortasına konularak, disk difüzyon yöntemi ile izolatın farklı antibiyotiklere karşı dirençliliği tespit edilmeye çalışılmıştır (Patil and Shirsath 2015).

EPS Üreten İzolatın Moleküler Tanılaması

Genomik DNA izolasyonu

Moleküler tanılama çalışmaları için, TSA besiyerinde 55°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılan izolattan tek koloni alınıp, 100 mL TSB besiyeri içeren 250 mL'lik erlene transfer edilmiş ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda gelişen izolata ait genomik DNA, 'Promega WizardR (A2360)' genomik DNA ticari saflaştırma kiti protokolünde belirtilen prosedüre göre izole edilmiş ve elde edilen DNA pelleti kullanılıncaya kadar -86°C'de saklanmıştır (Albayrak *et al.* 2019).

16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesi

İzole edilen genomik DNA'dan 16S rRNA gen bölgesine özgü amplikon elde edebilmek için, son hacim 25 µL olacak şekilde Tablo 1'deki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı hazırlanmış ve Tablo 2'deki reaksiyon koşulları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. *16S rRNA Gen Bölgesine Özgü PCR İçin Gerekli Reaktiflerin Yoğunluk ve Miktarları*

Reaktif	Yoğunluk	Miktar (µL)
PCR tamponu	10 X	3
dNTP	10 mM	0,6
Primerler	5 pmol	3,
$MgCl_2$	25 mM	1,8
DMSO	% 99	1,2
ddH_2O	-	13,1
Kalıp DNA	70 ng/µL	2
Taq DNA polimeraz	5 ünite/µL	0,3

Tablo 2. *16S rRNA Gen Bölgesine Özgü PCR İçin Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayıları*

İşlem	°C	Dakika	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	5	1
Denatürasyon	94	1	33
Bağlanma	48	1	33
Uzama	72	1,5	33
Son Uzama	72	8	1
Saklama	4	∞	

16S rRNA PCR jel elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 gr agaroz tartılmış, üzerine 80 mL 1X TAE tamponu ilave edilerek, karışımın mikrodalga fırında çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra jel, 50°C'ye kadar soğutulmuş ve son yoğunluğu 1 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir. Elde edilen karışım, içerisinde tarak bulunan elektroforez jel küvetine dökülmüş ve jelin donmasının ardından, elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. Marker ve DNA örneklerini yükleme aşamasında, jeldeki ilk çukura 2 µL DNA markırı (10kb, New England Bio Labs, N0550S) ve diğer çukura ise 2 µL 16S rRNA gen bölgesine özgü PCR ürünü ile 1,5 µL 6X yükleme tamponu karışımı yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 110 volta ayarlanarak, örnekler 100 dk yürütülmüştür. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel görüntüleme sistemi Quantum Vilber LouDNAt ile analiz edilmiştir (Adiguzel *et al.* 2011).

Kompotent hücrenin hazırlanması

Klonlama işleminin ilk aşamasında *Escherichia coli* JM101 suşu canlandırılmıştır. Gelişen bu kültürden tek bir koloni alınarak, içerisinde 100 mL Luria-bertani (LB) sıvı besiyeri bulunan 250 mL'lik erlene inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden alınan 300 µL örnek 2700 µL steril saf su ile seyreltilmiş ve 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. 30 mL LB sıvı besiyeri üzerine hesaplanan miktar kadar *E.coli* JM101 önkültüründen eklenerek, 37°C'de absorbans değeri 0,044-0,055 'e ulaşıncaya kadar optik dansite takibi yapılmıştır (Trüper and Schleifer 1992). İstenilen değere ulaşılınca kültür çalkalamalı inkübatörden alınarak, 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmış ve 4400 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Üst fazı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılan *E. coli* JM101 hücrelerini kompotent hale getirebilmek için, çökeleğin üzerine soğuk 10 mL 100 mM $CaCl_2$ ilave edilmiş ve 30-45 dk buzda bekletilmiştir. Süre sonunda tüp, +4°C'de 4400 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj işlemi ile çöktürmeye tabi tutularak, üst faz dikkatlice

uzaklaştırılmış ve daha sonra çökelek üzerine soğuk 2 mL $CaCl_2$ (100 mM) eklenerek, +4°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Baltaci and Adiguzel 2016).

Ligasyon

Ligasyon işlemi için; 5 µL 2X ligasyon tamponu, 3 µL 16S rRNA-PCR ürünü, 1 µL vektör (pGEM-T/Promega) ve 1 µL T4 DNA ligaz PCR tüpünde bir araya getirilmiş ve karışım 16°C'de 13-15 saat boyunca inkübe edilmiştir (Baltaci and Adiguzel 2016).

Transformasyon

Klonlama vektörüne 16S rRNA-PCR ürünü bağlandıktan sonra, bir ependorf tüpüne kompotent hücreden 200 µL konulmuş ve üzerine 2,5 µL ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk buzda bekletilmiştir. Hemen ardından, buzda bekletilen tüpler, 42°C'de sıcak su banyosunda 2 dk daha bekletilerek, kompotent hücre ısı şokuna maruz bırakılmış ve transforme olması sağlanmıştır.

PCR tüpündeki bu solüsyonun üzerine 200 µL LB sıvı besiyeri eklenerek, 37°C'de 100 dk boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra bu transforme hücreler, daha önceden yüzeyine 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG yayılmış olanamfisilinli LB agar besiyerine drigalski özesi ile yayılmıştır. Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra, ligasyon ürünü ve kompotent hücreden oluşan karışımdan 150 µL alınarak petri yüzeyine drigalski özesi ile iyice yayılmış ve petriler, 37°C'de 14 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Baltaci and Adiguzel 2016).

Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım

Transformasyon için gerekli inkübasyon süresinin sonunda petriler, inkübatörden çıkarılarak +4°C'de bir gece bekletilmiş ve petrilerde mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlemlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra her petriden beyaz koloniler seçilip, içerisinde 3 mL amfisilinli LB sıvı besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüplere inoküle edilmiş ve tüpler 37°C'de 14 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Koloni PCR için hazırlık ve PCR reaksiyonu

Amfisilinli LB sıvı besiyerinde üremesi sağlanan bakteriyel kültürden 4 µL alınarak, içerisinde 16 µL steril saf su bulunan PCR tüplerine aktarılmıştır. İlk önce tüpler, 10 dk kaynar su banyosunda ve 2 dk buzda bekletilerek ısı şokuna maruz bırakılmış, daha sonra 12000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Üst faz yeni bir PCR tüpüne aktarılmış ve PCR işlemine geçilmiştir. Bu işlem için kullanılan kimyasallar ve PCR koşulları Tablo 3 ve Tablo 4'de verilmiştir. İstenen geni taşıyan (pozitif) koloni jel üzerinde belirlenmiş ve petriden seçilerek, 3 mL amfisilinli LB sıvı besiyeri içeren 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Sıvı

besiyerine aktarılan pozitif koloni içeren tüp, 37°C'de 14 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda plazmit izolasyon prosedürüne geçilmiştir (Arslan 2017).

Tablo 3. *Koloni PCR İçin Gerekli Reaktiflerin Yoğunluk ve Miktarları*

Reaktif	Yoğunluk	Miktar (µL)
PCR tamponu	10 X	3
dNTP	10 mM	0,6
Primer/Primerler	5 pmol	2/2
$MgCl_2$	25 mM	1,8
DMSO	% 99	1,2
ddH_2O	-	16,1
süpernantant	70 ng/µL	3
Taq DNA polimeraz	5 ünite/µL	0,3

Tablo 4. *Koloni PCR İçin Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayıları*

İşlem	°C	Dakika	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	0,5	1
Denatürasyon	94	0,5	36
Bağlanma	55	0,5	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	10	1
Saklama	4	∞	

Plazmit izolasyonu ve yoğunluklarının belirlenmesi

Plazmit izolasyonu 'Promega (A1330)' izolasyon kiti prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Plazmitin yoğunluğunu belirlemek için 998 µL saf su üzerine, 2 µL plazmit eklenmiş ve 260 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonunda yoğunluğu 100-200 ng aralığında olan plazmitlerden 30-50 µL örnek alınarak, sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir.

DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağacın oluşturulması

Sekans firmasından (Macrogen/Hollanda) elde edilen ham sekans sonuçları, 'BioEdit' programı ile analiz edilerek, FASTA formatına çevrilmiştir. Öncelikle primer dizileri bulunup, primerlerin önünde ve arkasında kalan, vektöre ait olan kısımlar çıkarılmıştır. Daha sonra diziler birleştirilerek, izolatın 16S rRNA gen bölgesine özgü sekansı elde edilmiştir. Daha sonra bu verinin BLAST analizi (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi ve http://www.ezbiocloud.net/ eztaxon/identify) yapılarak izolatın % benzerlik oranı tespit edilmiştir. Bunu takiben, sekans Genbank veritabanına girilerek, izolat için Genbank numarası alınmış ve MEGA 4.0 yazılımı ile neighbor-joining metodu kullanılarak, filogenetik ağaç çizilmiştir (Benson 1999; Albayrak *et al.* 2019).

EPS Karakterizasyonu

Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi

Polisakkaritlerin yapısındaki hidrofilik ve hidrofobik grupların dağılımı, farklı solventler ya da çözücüler içerisindeki EPS'nin çözünürlüğünü belirlemede en önemli etkendir. Elde edilen EPS örneğinin; su, etanol, metanol, kloroform, hekzan, benzen, amonyak, formik asit ve dimetilsülfoksit içerisindeki çözünürlüğü tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, her bir çözücü için, dondurularak kurutulan EPS örneğinden 10 mg tartılmış ve 15 mL'lik cam tüplere alınarak, üzerlerine 2 mL çözücü eklenmiştir. Karışım vorteks yardımıyla yaklaşık 2 dk karıştırılmış ve çözünürlük ya da pellet oluşumu gözlemlenmeye çalışılmıştır (Ai *et al.* 2008; Patil and Shirsath 2015).

Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

Dondurularak kurutulan EPS'nin yoğunluğunu belirlemek için, fenol sülfürik asit yöntemi ile toplam karbonhidrat analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, %20'lik DMSO içerisinde hazırlanan 1 g/L EPS çözeltisinden 0,5 mL alınarak, üzerine %5 (w/v)'lik 0,5 mL fenol çözeltisi ve 2,5 mL saf sülfürik asit eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örnekler hızla soğutularak, köre (EPS içermeyen çözücü ile hazırlanmıştır) karşı spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Standart grafiği oluşturmak için; yoğunluğu 0,1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan glikoz stok çözeltisinden farklı hacimlerde alınarak, son hacim 0,5 Ml'ye ayarlanmış glikoz örnekleri hazırlanmıştır. Üzerine %5 (w/v)'lik fenol çözeltisi ile 2,5 mL saf sülfürik asit eklenmiş ve örnek için olan tüm işlem basamakları standart için de gerçekleştirilmiştir. Standart

eğri yardımıyla da, spektrofotometrede okunan absorbans değerine karşılık gelen toplam karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır (Agrawal *et al.* 2015).

Protein içeriğinin belirlenmesi

Dondurularak kurutulan EPS'nin toplam protein miktarının belirlenmesinde, protein yapıda peptid bağı oluşumuna katılan azot atomu ile biüret ayıracından gelen Cu^{2+}'nin renkli kompleks oluşturması esasına dayanan, Biüre yöntemi kullanılmıştır. Analiz için; %20'lik DMSO içerisinde hazırlanmış 1 g/L EPS çözeltisinden 0,1 mL alınarak, üzerine 0,9 mL saf su ve 5 mL Biüre reaktifi eklenmiş ve 37°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Aynı koşullarda köre (EPS içermeyen çözücü ile hazırlanmıştır) karşı spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafiği oluşturmak için, 0,1 mg/mL yoğunlukta Bovin Serum Albumin (BSA) stok çözeltisinden farklı hacimlerde örnekler alınarak, son hacim 0,1 mL olacak şekilde BSA örnekleri hazırlanmıştır. Üzerine 0,9 mL saf su ve 5 mL Biüre reaktifi eklenmiş ve örnek için olan tüm işlem basamaklar standart için de uygulanmıştır. Standart eğri yardımıyla spektrofotometrede okunan absorbans değerine karşılık gelen toplam protein miktarı hesaplanmıştır (Martina and Vojtech 2015).

Dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde 1 g/L yoğunlukta hazırlanan çözeltisinde, ayrıca 200-1000 nm dalga boyu arasında spektrum taraması gerçekleştirilmiştir (Yu *et al.* 2016).

Moleküler kompozisyonun belirlenmesi

Moleküler kompozisyonun belirlenebilmesi için öncelikle polimer yapının parçalanarak, monosakkarit yapının açığa çıkarılması gerekmektedir. Bunun için, dondurularak kurutulan EPS örneği (10 mg), öncelikle 2M H_2SO_4 ile çözünene kadar kaynatılmış ve soğuduktan sonra 2M NaOH ile nötralize edilmiştir (Yu *et al.* 2016). Nötralizasyon sonrası oluşan safsızlıkları gidermek için monomer çözeltisi önce 4500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuş, ardından 0,45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonuna verilmiştir. HPLC analizi için; Shimadzu CBM-20A sistem kontrolörü ile birlikte 30°C'ye ayarlı Shimadzu CTO-20A kolon fırını, DGU-20A5 degaz ünitesi, SIL-20A HT otosampler, LC-20AD pompa ve 40°C'ye ayarlı RID-10A detektör sistemi kullanılmıştır. Kolon malzemesi Zorbax NH_2 (4,6x250mmx5µm) ve mobil faz olarak asetonitril:su (3:1) karışımı kolona 1,8 mL/dk akış hızında verilmiştir.

Molekül ağırlığının belirlenmesi

Dondurularak kurutulan EPS örneğinin molekül ağırlığı, iç viskozite (intrinsic viscosity) değerleri ile yoğunluk arasında korelasyon sağlanarak belirlenmiştir. Bunun için %20'lik DMSO içerisinde farklı yoğunluklarda hazırlanan EPS örneklerinin, Anton-Paar MCR102 reometrede değişen kayma hızına (1-100s^{-1}) karşılık, viskozite ölçümleri yapılmıştır. Her yoğunluk değeri için oluşturulan empirik denemelerde, Herschel–Bulkley (3.1) akış modeli ve iç viskozite ile moleküler ağırlık arasındaki ilişkiyi tanımlayan Mark-Houwink (3.2) eşitliği yardımıyla, moleküler ağırlık belirlenmiştir (Muralidharan and Jayachandran 2003; Spanò *et al.* 2013; Tian *et al.* 2015; Handayani *et al.* 2019).

$$\sigma = \sigma_0 + K.\gamma^n \quad (3.1)$$

$$\eta = K.Mw^a \quad (3.2)$$

σ; kayma gerilimi (Pa), σ_0; akma gerilimi (Pa), K-a; polimere spesifik sabit değerler, γ; kayma hızı (s^{-1}), η; iç viskozite, Mw; moleküler ağırlık, n; akış indeksi

Fonksiyonel grup analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) üzerine infrared ışığı gönderilerek, spektrumu belirlenen polisakkarit örneğinin fonksiyonel grupları ve yapısal karakterizasyonu hakkında bilgi elde edilmeye çalışılmıştır. Bunun için, dondurularak kurutulan EPS örneği (50 mg), 100 mg potasyum bromid (KBr) ile karıştırılarak ezilmiş ve 1 mm genişliğinde pellet içerisine eklenerek, 400-4000 cm^{-1} frekans aralığında kızılötesi spektrum taraması (Perkin Elmer Spectrum Version 10.5.2) yapılmıştır.

Termogravimetrik analiz

Sıcaklığın etkisiyle polimerlerde meydana gelen kütle kaybı ve/veya kazanımlarının belirlenmesinde kullanılan bu analiz ile polisakkarit yapıda sıcaklığa bağlı kütle değişimleri incelenebilmektedir. Bunun için dondurularak kurutulan EPS örneği (15 mg), 60 mL/dk akış hızına sahip azot gazı varlığında ve 30-850^oC arasında 10^oC/dk aralıklarla sıcaklık analizine maruz bırakılmıştır (Perkin Elmer Thermal Analysis).

Diferansiyel taramalı kalorimetre analizi

Polisakkarit yapının, sıcaklığın etkisiyle enerji seviyesindeki değişimini belirleyebilmek için, diferansiyel taramalı kalorimetre analizi yapılmaktadır. Dondurularak kurutulan EPS (50 mg) örneğinin, iğne deliği bulunan alimünyum pota içerisine hapsedildikten sonra, 60 mL/dk

akış hızına sahip azot gazı varlığında ve 50-500ºC arasında 10ºC/dk aralıklarla enerji seviyesindeki değişimin taraması gerçekleştirilmiştir.

X-ışını kırınımı analizi

Üretilen polisakkaritin kristal yapısını inceleyebilmek için, X ışınlarından yararlanılabilmektedir. Bunun için izolattan elde edilen ve dondurularak kurutulan EPS'nin (100 mg) üzerine, 30º-100º arasında geliş açısına sahip ve 2º/dk artışla X ışınları gönderilerek analiz edilmiştir (Bruker D8 DISCOVER XRD).

Taramalı elektron mikroskopisi

İzolattan elde edilen EPS'nin ileri yapısal analizi, Bayburt Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan FEI Nova Nano SEM 450 mikroskobunda yüksek vakum ile gerçekleştirilmiştir.

Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Dondurularak kurutulan EPS'nin reolojik özelliklerini belirleyebilmek için, bir dizi analiz gerçekleştirilmiştir. %20'lik DMSO içerisinde, farklı yoğunluklarda hazırlanan EPS örneklerinin ve ham ve yoğunlaştırılmış ekstraktların (Kurt and Kahyaoglu 2015), görünür (apparent) viskozite değerlerindeki değişim (1 mm boşluk ile PP50 plate sensör kullanılarak Anton-Paar MCR102 reometrede gerçekleştirilmiştir) 25°C'de değişen kayma hızlarında (20-100s^{-1}) ve sıcaklık (4-50ºC) değerlerinde tespit edilmiştir. Su ve CMC, kör ve kontrol olarak kullanılmıştır (Stredansky *et al.* 1999).

Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite

Hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaç sayılarının ve yapılarının günden güne değişmesi neticesinde, araştırmalar insana, en az zararı verecek, ancak geniş bir mikroorganizma cinsine ve en düşük dozlarda etki edebilecek yeni bileşenlerin bulunması yönünde yapılmaktadır. Bir maddenin antimikrobiyal etkinisini belirleyebilmek için; antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin tespit edilmesi gerekmektedir.

Bütün test mikroorganizmaları (*Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve *Candida albicans* ATCC 10231) Gümüşhane Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. TSA besiyerinde büyütülmüş test bakterileri (*S. enteritidis* ATCC13076, *A. hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B.subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883), 36°C'de 10 mL TSB besiyerinde (%1 inokülasyon oranı ile) 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleştirilen mikroorganizma kültürlerinden 100 µL alınarak, TSA besiyeri üzerine drigalski özesi ile yayılmıştır. Dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 50 µL alınıp, boş antimikrobiyal disklere emdirilmiştir. Örnek emdirilen diskler, kuruyan petrilerin üzerine yerleştirilmiş ve 36°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmış, disklerin etrafında inhibisyon zonu oluşumu takip edilmiştir (Sagdic and Ozcan 2003).

Antifungal aktivitenin belirlenmesi için, agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için TSA besiyerinde büyütülmüş *C. albicans* ATCC 10231, 27°C'de 10 mL potato-dextrose agar (PDA) besiyerinde (%1 inokülasyon oranı ile) 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Steril PDA besiyeri 45°C'ye kadar soğutularak, aktifleştirilen mikroorganizma kültüründen %1 oranında alınarak, besiyerine inoküle edilmiş ve petrilere dökülerek donması sağlanmıştır. Agarlar donduktan sonra, steril 'cork borer' kullanılarak 5 mm çapında kuyucuklar açılmış, dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde çözeltileri hazırlanarak, bunlardan 50 µL alınıp her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Daha sonra petriler, 27°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşumu incelenmiştir (Pérez *et al.* 1999).

Antioksidan aktivite

Aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri gibi metabolik yollarında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS); DNA, protein ve lipit gibi makromolekülleri etkileyerek, oksidatif hasara neden olmaktadırlar. Spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz gibi) tarafından katalize edilen ROS'ların bir diğer engelleyicileri antioksidanlar olarak bilinmektedir. Antioksidanlar kolayca okside olabilen, yani küçük miktarlarda kullanıldıklarında bile materyallerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (MacDonald-Wicks *et al.* 2006). Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen polisakkaritler de antioksidan aktiviteye sahip olabilmektedirler (Hu *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019b). Bu sebeple, dondurularak kurutulan EPS'nin antioksidan aktiviteye sahip olup olmadığı iki farklı yöntem ile belirlenmiştir.

Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)

Öncelikle 40 mmol/L HCl içinde 10 mmol/L 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), 20 mmol/L $FeCl_3$ çözeltisi ve 300 mmol/L sodyum asetat tamponundan (pH 3,6) oluşan FRAP çözeltisi hazırlanmıştır. Dondurularak kurutulan EPS örneği %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış, her birinden 100 µL alınarak, üzerine 3 mL FRAP çözeltisi eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 593 nm dalga boyunda absorbans ölçülmü gerçekleştirilmiştir (Benzie and Szeto 1999).

DPPH serbest radikalini indirgeme etkisi

Dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve her birinden 50 µL alınıp, 1 mL 0,001 M DPPH-etanol çözeltisi ile karıştırılmıştır. 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra, spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir

Antibiyofilm aktivite

Bakteriyel patojenler tarafından biyofilm oluşumu kistik fibrozis, üretrit, otit ve periodontitis gibi rahatsızlıklara sebep olabilmekte ve halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Çünkü mikrobiyal hastalıkların %65-80'i biyofilm tabanlı olabilmektedir (Spanò *et al.* 2016). Bu amaçla, dondurularak kurutulan EPS'nin antibiyofilm aktivitesi, biyofilm inhibisyonu üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır (Abid *et al.* 2019). Biyofilm inhibisyonunun belirlenmesi için, dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde hazırlanarak, EPS örneklerinden 200 µL alınmış, steril 96 kuyucuklu mikroplakaya konulmuş ve 25ºC'de 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar iki kere steril distile su ile yıkanmıştır. TSB sıvı besiyerinde 16 saat aktifleştirilen biyofilm üreticisi (*S. enteritidis* ATCC13076, *A. hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883 ve *C. albicans* ATCC 10231) standart suşlardan 200 µL alınarak taze TSB sıvı besiyeri ile (1:100 oranında) seyreltilmiş, kuyucuklara eklenmiş ve 37ºC'de 20 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklar, biyofilm oluşturmayan hücreleri uzaklaştırmak için, steril distile su ile üç kere yıkanmış ve oda sıcaklığında 15 dk boyunca metanol ile fikse edildikten sonra, 125 µL %0,1 (w/v)'lik kristal viyole boyası ile 20 dk süre ile boyanmıştır. Son olarak kuyucuklara, 125 µL %33 (v/v)'lük asetik asit (%33) eklenmiş ve spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.

Mikrobiyal biyofilmin inhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır;

$$\text{Mikrobiyal biyofilm inhibisyonu} = \left(1 - \left({}^{A}/_{A_0}\right)\right) * 100$$

A; EPS içeren kuyucuğun 595 nm'deki absorbansı, A_0; EPS içermeyen kuyucuğun 595 nm'deki absorbansıdır.

Antitümör aktivite

Kompozisyon,yük, bağ yapısı, polimerizasyon derecesi gibi parametrelere bağlı olarak farklı özellikler taşıyan polisakkaritler, değişik alanlarda kullanılma olanağı bulunmaktadır. Bunlardan birisi de tıbbi alanda antitümör ajanı olarak tercih edilmektedir. Elde ettiğimiz EPS örneğinin antitümör aktiviteye sahip olup olmadığını belirleyebilmek için; akciğer (A-549), kolon (Caco-2 ve HT-29) ve nöroblastom (SHSY-5Y) hücre hatları ve WST-1 hücre canlılık kiti (BosterBio, USA) kullanılmıştır. Hücre hatları, %10 fetal bovin serumu ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37°C'de ve %7 CO_2 varlığında 24 saat boyuncainkübe edilip çoğaltıldıktan sonra, steril 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde transfer edilmiştir. Ardından, dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 g/L olacak şekilde hazırlanmış ve hücre hatlarına eklenmiştir. Kontrol grubu hücrelerine ise, sadece taze besiyeri eklenmiş, tümü 37°C'de ve %7 CO_2 varlığında 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuğa 3 µL WST-1 eklenmiş ve 2 saat beklenmiştir. Hücrelerin canlılıkları mikroplaka okuyucuda (SpectraMax Molecular Devices, USA), 450 nm dalga boyunda optik dansite ölçümü yapılarak belirlenmiştir (Ngamwongsatit *et al.* 2008).

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Farklı termal kaynaklardan alınan su ve çamur örneklerinden, toplam 118 adet bakteri izole edilmiş ve bunlar arasından petride gözlemlenen koloni farklılıklarına göre, 32 adet bakteri saflaştırılmış ve stok kültürleri oluşturulmuştur. Seçilen bakterilerin EPS üretebilme yeteneklerini taramak için, sükroz ve maya ekstraktından oluşan üretim besiyerinde inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. 55°C 120 rpm'de 48 saat gerçekleştirilen mikrobiyal üretimler sonunda; polisakkarit yapı alkol varlığında çöktürülürken, büyüme spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik dansite takibi yapılarak belirlenmeye çalışılmıştır (Tablo 5). Buna göre, EPS üretebilme yeteneğinde olan 29 adet izolattan (G42, G46 ve G55 hariç) büyük bir kısmından elde edilen EPS miktarının yüksek olduğu ve inkübasyon süresi boyunca büyüme hızına bağlı olarak optik dansite değerinin arttığı görülmüştür. Ancak, bazı bakteriler için polisakkarit üretimi ile mikrobiyal büyümenin birlikte artmadığı gözlemlenmiştir. Örneğin; G42 ve G46 izolatlarının ürettikleri EPS miktarları (0,2 g kuru EPS/L) diğer izolatların üretim miktarlarına nazaran düşük olmasına rağmen, mikrobiyal büyümelerinde artış gözlenmiştir. Aynı şekilde G35 ve G58 izolatlarının inkübasyon süresi boyunca mikrobiyal büyüme hızları diğer izolatlara nazaran daha yavaş artmasına rağmen, ürettikleri EPS miktarlarının (2,8 g kuru EPS/L ve 3,5 g kuru EPS/L) yüksek olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan sadece G55 bakterisinin hem mikrobiyal büyüme hızı hem de EPS üretim miktarı (0,5 g kuru EPS/L) düşük gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, izole edilen bakterilerin mikrobiyal polisakkarit üretim miktarları ile büyüme hızları arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermektedir (Kwon *et al.* 2002).

Tablo 5. *Türkiye'nin Farklı Sıcak Su Kaynaklarından Alınan Termofilik Bakterilerin Ürettikleri EPS Miktarları ve Mikrobiyal Büyüme Değerleri*

İzolat	Kaynak	Mikrobiyal büyüme (OD600)			g kuru EPS/L*
		0.saat	24.saat	48. saat	60. saat
G1	Buharkent/Aydın	0,12	0,33	0,34	9,7
G6	Kurşunlu/Manisa	0,14	0,28	0,31	2,7
G10	Kurşunlu/Manisa	0,06	0,20	0,34	2,7
G11	Kurşunlu/Manisa	0,05	0,18	0,29	18,4
G13	Kurşunlu/Manisa	0,06	0,16	0,35	17,4
G14	Kurşunlu/Manisa	0,07	0,24	0,31	5,4
G17	Kurşunlu/Manisa	0,14	0,12	0,23	7,7
G22	Kurşunlu/Manisa	0,07	0,12	0,33	7,1
G31	Kurşunlu/Manisa	0,10	0,23	0,32	5,0
G32	Kurşunlu/Manisa	0,06	0,17	0,22	8,6
G35	Gönen/Balıkesir	0,07	0,06	0,06	2,8
G39	Gönen/Balıkesir	0,09	0,33	0,34	13,0
G40	Gönen/Balıkesir	0,08	0,27	0,36	3,2
G41	Kurşunlu/Manisa	0,07	0,31	0,29	15,7
G42	Kurşunlu/Manisa	0,06	0,24	0,40	0,2
G43	Gönen/Balıkesir	0,08	0,26	0,38	5,6
G44	Gönen/Balıkesir	0,10	0,16	0,33	1,2
G46	Gönen/Balıkesir	0,07	0,20	0,39	0,2
G55	Kurşunlu/Manisa	0,05	0,06	0,06	0,5
G58	Kurşunlu/Manisa	0,05	0,05	0,06	3,5
G60	Kurşunlu/Manisa	0,05	0,14	0,35	6,4
G76	Kızılcahamam/Ankara	0,07	0,18	0,24	2,9
G80	Kızılcahamam/Ankara	0,05	0,22	0,28	5,7
G91	Kızılcahamam/Ankara	0,10	0,21	0,28	3,7
G99	Sarıkaya/Yozgat	0,12	0,17	0,31	2,3
G108	Sarıkaya/Yozgat	0,13	0,26	0,24	5,7
G109	Bozdağ/İzmir	0,05	0,23	0,24	5,3
G114	Sarıkaya/Yozgat	0,07	0,23	0,25	6,0
G118	Sarıkaya/Yozgat	0,05	0,25	0,34	11,9

* 55°C 120 rpm'de 48 saat gerçekleştirilen inkübasyon neticesinde elde edilen 100 mL ham ekstrakt soğuk etanol ile çöktürülmüş ve dondurularak kurutulmuştur.

Ekzopolisakkarit (EPS) Üreten İzolatın İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu

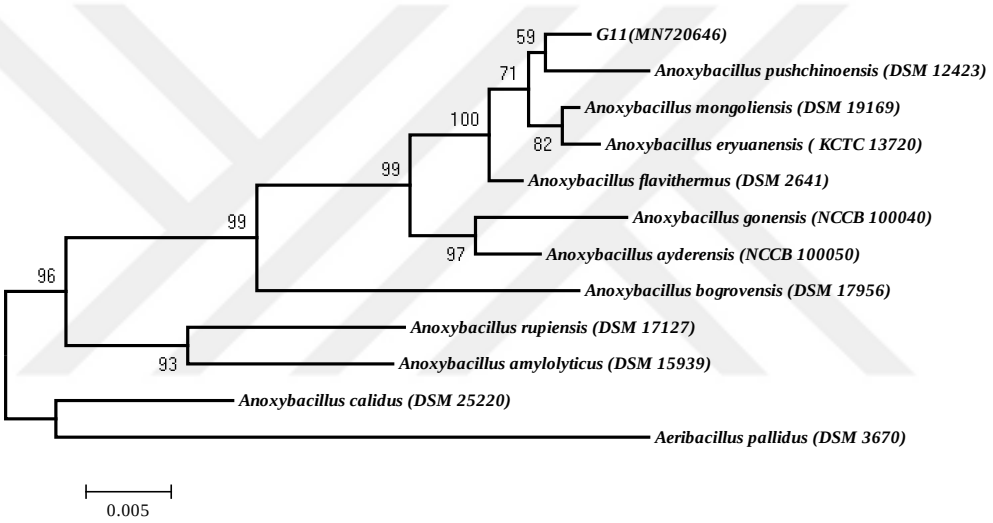
EPS üretebildiği belirlenen 29 adet izolat içerisinden, üretim miktarları ve mikrobiyal büyüme değerleri birlikte değerlendirildiğinde; 18,4 g kuru EPS/L üretim miktarı ile en anlamlı polisakkarit üreten izolat olarak 'G11' belirlenmiş ve bu izolatın 16S rRNA gen bölgesinin sekans bilgisi belirlenerek tanılaması gerçekleştirilmiştir. Yapılan moleküler analiz sonucunda, 16S rRNA gen bölgesine özgü sekans dizisi, GenBank ve Eztaxon'da karşılaştırılmış ve EPS

üreten izolatın %99,6 oranında *Anoxybacillus pushchinoensis*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra *A. pushchinoensis*'e benzeyen 'G11' izolatına ait sekans dizisi GenBank'a girilerek erişim numarası alınmış (MN720646) ve *A. pushchinoensis* G11 olarak adlandırılmıştır. *A. pushchinoensis* G11'in Eztaxon verilerine göre yakın akraba türleri Tablo 6 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.

Tablo 6. *A. pushchinoensis G11'in Eztaxon Veri Tabanına Göre Yakın Akraba Türleri*

	1	**2**	**3**	**4**
Eztaxon Erişim numarası	jgi.1042845	EF654664	AVGH01000041	GQ153549
Benzerlik (%)	99.64	99,36	99.29	99,21
Tamamlanma (%)	100	98	100	100

1: *A. pushchinoensis* K1^T (Pikuta *et al.* 2000); 2: *A.mongoliensis* T4^T (Namsaraev *et al.* 2010); 3: *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13^T (Dai *et al.* 2011); 4: *A. eryuanensis* E112^T (Zhang *et al.* 2011)



Şekil 10. 16S rRNA gen sekans verilerine göre *A. pushchinoensis* G11'in filogenetik ağacı.

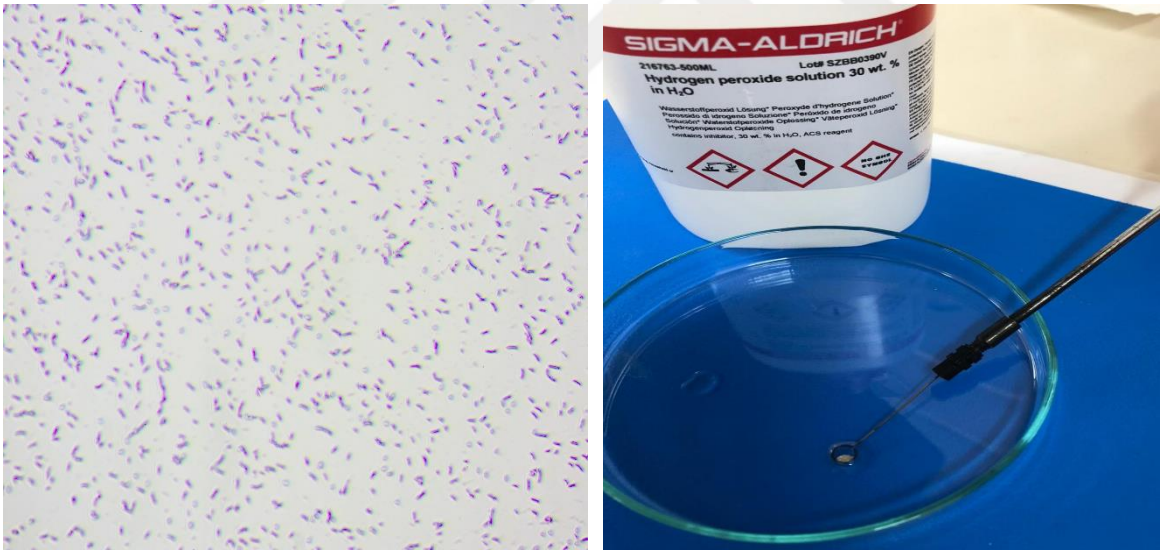
Tablo 7. *A. pushchinoensis G11'in Fizyolojik, Kültürel ve Biyokimyasal Gereksinimleri*

Karakteristik	*A. pushchinoensis* G11
Sıcaklık aralığı (°C)	40-60
pH aralığı	6-10
NaCl aralığı (%)	0-2
Gram	+
Endospor	-
Katalaz	-
oksidaz	-
Oksijen gereksinimi	+/ fakültatif anaerobik
Selülaz	-
Ksilinaz	-
Lipaz	-
Proteaz	-
Amilaz	-

+; pozitif yada üretici, -;negatif yada üretim yeteneği olmayan

Moleküler tanılamanın yanısıra elde edilen izolatın fizyolojik gereksinimleri belirlenmiş ve klasik yöntemler ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre; 40-60°C (120 rpm'de pH 7 tuz içermeyen TSB besiyerinde büyütülmüştür) sıcaklık, 6-10 pH (55°C 120 rpm'de tuz içermeyen TSB besiyerinde büyütülmüştür) ve % 0-2 tuz (NaCl) (55°C 120 rpm'de pH 7 tuz içermeyen TSB besiyerinde büyütülmüştür) yoğunluk değerlerinde büyüyebilen *A. pushchinoensis* G11'in, Gram pozitif (mavi-mor boyanmıştır) ve endospor negatif (sadece vejetatif hücre kırmızıya boyanmıştır) olduğu belirlenmiştir (Tablo 7 ve Şekil 11). Nitrat besiyerinde gelişim gösterebilen *A. pushchinoensis* G11, tüp boyunca gelişim gösterdiği katmana göre (tüpün alt tarafında yoğun büyüme gözlenmiştir) fakültatif anaerobik olarak tanımlanmış ve biyokimyasal enzimleri tarandığında, katalaz ve oksidaz negatif olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, selülaz, ksilinaz, lipaz, proteaz ve amilaz enzimlerinden herhangi birini üretemediği belirlenmiştir.

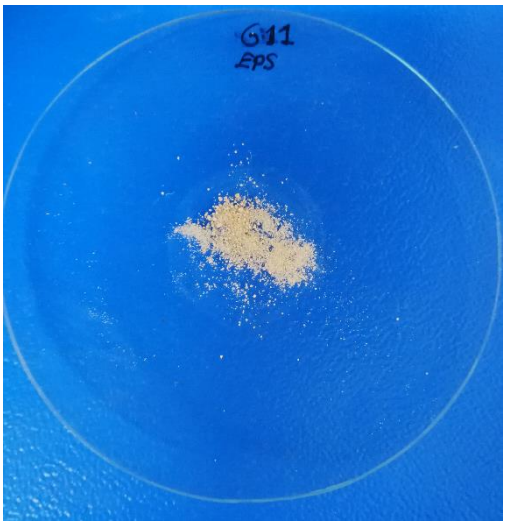
A. pushchinoensis'in ilk tanılaması Pikuta *et al.* (2000) tarafından, gübre örneklerinden yapılmış ve izole edilen K1^T suşu; Gram pozitif, katalaz negatif ve zorunlu anaerobik olarak tanımlanmıştır. Ancak, 2009 yılında yaptıkları bir düzeltme ile *A. pushchinoensis*'in fakültatif aerotolerant olduğunu bildirmişlerdir (Pikuta *et al.* 2009).



Şekil 11. A. pushchinoensis G11'in (a) Gram boyama (Gram pozitif) ve (b) katalaz (negatif) testi sonuçları.

Gram boyama, katalaz ve nitrat test sonuçları benzerlik gösteren *A. pushchinoensis* G11'in büyüdüğü alkalifilik büyüme ortamı ve tuz gereksinimi, K1^T suşunun sonuçlarına (pH 8–10 ve % 0,5-3 NaCl) benzerlik göstermektedir. Ağrı-Diyadin sıcak su kaynağından izole ettikleri *A. pushchinoensis* A8'in ksilinaz üretebildiğini ve fakültatif anaerobik olduğunu rapor edilmiş (Kacagan *et al.* 2008) ve termofilik *Anoxybacilus* sp. R4-33'ün büyümesi için gerekli sıcaklık ve pH değerleri 60°C ve pH 7,5 olarak bildirilmiştir (Liang *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2014). Diğer *Anoxybacillus* türleri incelendiğinde ise, Kevbrin *et al.* (2005)'nın Rusya'nın

jeotermal kaynaklarından izole edip tanımladıkları termofilik ve alkalifilik *A. kamchatkensis*'in optimum 60°C ve pH 6,8-8,5 aralığında büyüdüğü rapor edilmiştir. Moğolistan'da bir alkali jeotermalden izole edilen termotolerant *A. mongoliensis*'in büyüme sıcaklığının 30-75°C, pH aralığının 5-10 ve tuz yoğunluğunun % 0-5 olduğu belirlenmiştir (Namsaraev *et al.* 2010). İtalya'da bir sıcak su kaynağından alınan çamurdan izole edilen gram pozitif ve zorunlu aerobik *A. thermarum*'un, oksidaz negatif ve katalaz pozitif olduğu ve gelişmesi için 55-67°C, 6-7,5 pH ve % 3'den az tuz yoğunluğu gerektiği bildirilmiştir (Poli *et al.* 2009). Cihan *et al.* (2014); Kapadokya yakınlarında sıcak su kaynaklarından izole ettikleri iki bakterinin yeni bir cinse ait olduğunu (*Thermolongibacillus*) ve bu bakterilerin 40-70°C ve 5-11 pH aralığında büyüyebilen *T. altinsuensis* ve *T. kozakliensis* olduğunu bildirmişlerdir. Polisakkarit üreticisi olduğu belirlenen *Geobacillus* sp.'ye ait üç bakterinin büyümesi için gereken tuz yoğunluğunun % 0-5 arasında değişmekte olduğu rapor edilmiştir (Maugeri *et al.* 2002b). Deniz kumundan izole edilen termofilik polisakkarit üreticisi katalaz, oksidaz, nitrat pozitif ve aerobik *Geobacillus* sp. 4004'ün büyümesi için gerekli sıcaklık, ph ve tuz yoğunluk aralıkları 50-75; 6-9 ve % 0-5 olarak bildirilmiştir (Moriello *et al.* 2003). *G. stearothermophilus* ATCC 795'in büyüme sıcaklık değerlerinin ise 33,7-61,8°C arasında olduğu belirlenmiştir. Termotolerant ve polisakkarit üreticisi *B. subtilis*'in 37-50°C ve 7-11 pH değerlerinde büyüyebildiği rapor edilmiştir (Patil and Shirsath 2015). Termotolerant ve halofilik *B. licheniformis* B3-15'in katalaz ve oksidaz pozitif olduğu ve 25-60°C sıcaklıkta, pH 5,5-9 ve % 0-7 tuz yoğunluğunda büyüyebildiği ve polisakkarit üretebildiği bildirilmiştir (Maugeri *et al.* 2002a). Polisakkarit üreticisi *B. thermoantarticus*'un aerobik koşullarda ve 37-65°C ve 5,5-9 pH değerlerinde optimum büyüyebildiği belirtilmiştir (Nicolaus *et al.* 1996).



Şekil 12. A. pushchinoensis G11'den üretim besiyerinde elde edilen ve dondurularak kurutulmuş EPS

A. pushchinoensis G11 üretim besiyerinde 55°C 120 rpm'de 48 saat inkübasyon neticesinde 18,4 g kuru EPS/L üretebilmiştir (Şekil 12). *A. pushchinoensis*'in polisakkarit

üretime ilişkin henüz bir çalışma bildirilmemiştir. Ancak, *Anoxbacillus* cinsinin EPS üretimine dair bazı çalışmalar bulunmaktadır. Zhao *et al.* (2014); *Anoxybacillus sp.* R4-33'ün radyoaktif dirençli bir polisakkarit üreticisi olduğunu bildirmiştir. Amilaz üreticisi *A. amylolyticus*'un, galaktoz (% 1), maya ekstraktı (% 0,06) ve NaCl (% 0,6) içeren sıvı besiyerinde 271 mg EPS/g kuru hücre üretebildiği bildirilmiştir (Poli *et al.* 2006). Cihan *et al.* (2017); *Bacillaceae* ailesine ait suşların biyofilm üretebilme yeteneklerini belirledikleri bir çalışmada *Anoxybacillus* sp.'nin güçlü biyofilm üreticileri olabileceğini vurgulamıştır. Süt endüstrisinde uygulama alanı bulunan *A. favithermus*, bu uygulamalara nasıl uyum sağladığı ile ilgili hipotezlerden biri olarak biyofilm üretebildiği ve bu sayede çelik yüzeylere tutunabildiği bildirilmiştir (Goh *et al.* 2013). Etanol toleransı yüksek yeni bir alt tür olarak bildirilen *A. favithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. ($E13^T$)'nin ayrıca mikrobiyal biyofilm üreticisi olduğu da bildirilmiştir (Dai *et al.* 2011). Zhao *et al.* (2014), termofilik *Anoxybacillus* sp.R4-33'den 1,083 g/L EPS izole ettiklerini bildirmiştir. Malick *et al.* (2017); *G. stearothermophilus*'un polisakkarit üreticisi olduğunu rapor etmiştir. Farklı şekerleri kullanıp EPS üretebilen *Geobacillus* sp. WSUCF1'nin; glikoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında yaklaşık 0,06 g/L EPS üretebildiği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2019a). Moriello *et al.* (2003); *Geobacillus* sp. 4004'ün kesikli kültürde 0,03 g/L, fermentör denemelerinde ise 0,09 g/L EPS üretebildiğini bildirmişlerdir. *G. tepidamans* V264'ün farklı karbon kaynaklarında EPS üretimi takip edilmiş ve en yüksek verim 0,02 g/L olarak maltoz varlığında elde edilmiştir (Kambourova *et al.* 2009). EPS üreticisi *Enterobacter cloacae* ve *Geobacillus* sp. üyesi bir başka bakteri ile oluşturulan transformant bakterinin melas ortamında 8,83 g/L EPS üretebildiği bildirilmiştir (Sun *et al.* 2011). Termofilik *A. pallidus* 418'in kesikli üretimle 0,17 g/L; sürekli üretimle 0,18 g/L EPS üretebildiği belirlenmiştir (Radchenkova *et al.* 2015). Termofilik *B. thermoantarcticus*'un mannoz, glikoz ve sükroz destekli besiyerlerinde ürettiği EPS miktarları 0,165, 0,065 ve 0,1 g/L olarak belirlenmiştir (Manca *et al.* 1996). Denizel sıcak su kaynağından izole edilen termotolerant *B. licheniformis* B3-15'in durağan fazda 0,17 g/L EPS üretebildiği bildirilmiştir (Maugeri *et al.* 2002a). Yildiz *et al.* (2015); *B.termoruber* 423'ün maltoz, früktoz, galaktoz, ksiloz, mannitol, gliserol ve glikoz varlığında en fazla 0,6; 0,4; 0,3; 0,5; 0,5; 0,2 ve 0,3 g/L EPS üretebildiğini belirlemişlerdir. Yildiz *et al.* (2014); *B.termoruber* 423'ün büyük ölçek üretimlerinde en yüksek EPS üretimini durağan fazın başlarında 0,83 g/L olarak belirlemişlerdir. Radchenkova *et al.* (2011); *B. thermoruber* 438'in en yüksek EPS üretimini; % 0,6 yoğunlukta galaktoz kullanıldığında 0,04 g/L olarak belirlemişlerdir. *Rhodothermus marinus* $DSM4252^T$ ve MAT493'ün ürettikleri polisakkaritin en yüksek yoğunluğu laktoz varlığında $8,4x10^{-6}$ ve $8,2x10^{-6}$ g/L olarak bildirildi (Sardari *et al.* 2017).

A. pushchinoensis G11'in Antibiyotik Duyarlılığı

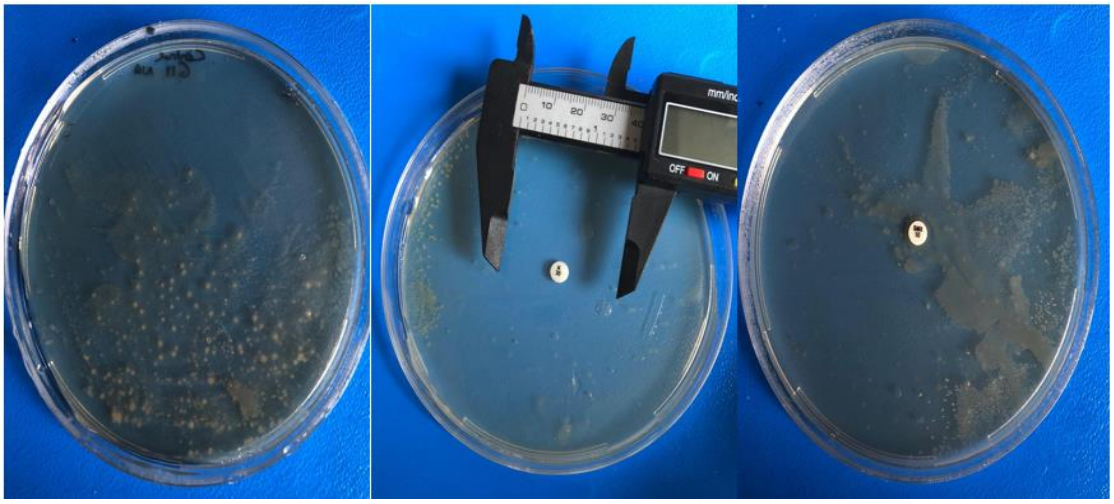
Belirli mikroorganizma grubu içerisinde sınırlı etki gösteren antibiyotikler başlıca, sitoplazmik zar yapısı, hücre duvarı sentezi, protein sentezi, folik asit mekanizması, DNA giraz ve RNA polimeraz gibi enzimlerin aktivitesini etkileyerek durdurucu veya öldürücü etkiyi göstermektedir (Madigan and Martinko 2012).

A. pushchinoensis G11'in farklı antibiyotikler varlığında direnç oluşturması endüstriyel alanlarda özellikle sterilizasyonda önemli olabilmektedir. Bu amaçla, *A. pushchinoensis* G11'in büyümesi üzerine etkisi test edilen antibiyotikler ve *A. pushchinoensis* G11'in bu antibiyotiklere verdiği yanıtlar Tablo 8 ve Şekil 13'da verilmiştir. Buna göre, Sulfamethoxazol (50 µg/disk) varlığında yaşayabilen ve bu antibiyotiğe direnç gösteren *A. pushchinoensis* G11'in Amoxicillin (30 µg/disk), Cefoperazone (75 µg/disk), Chloramphenicol (30 µg/disk), Kanamycin (30 µg/disk), Netilmicin (30 µg/disk) ve Ofloxacin (5 µg/disk) antibiyotiklerinin varlığında büyüyemediği belirlenmiştir.

Tablo 8. *A. pushchinoensis G11'in Farklı Antibiyotikler Varlığında İnhibisyon Değerleri*

Antibiyotik	Dirençlilik	İnhibisyon çapı	Kontrol (*Escherichia coli* O157:H7 35150)
Amoxicillin (30 µg/disk)	-	38 mm (±1,4)	15 mm (±1,6)
Cefoperazone (75 µg/disk)	-	35mm (±1,0)	28 mm (±1,2)
Chloramphenicol (30 µg/disk)	-	32 mm (±1,1)	16 mm (±1,2)
Kanamycin (30 µg/disk)	-	41 mm (±1,3)	88 mm (±1,1)
Netilmicin (30 µg/disk)	-	15 mm (±1,2)	90 mm (±1,3)
Ofloxacin (5 µg/disk)	-	23 mm (±1,6)	88 mm (±1,4)
Sulfamethoxazole (50 µg/disk)	+	-	89 mm (±1,2)

*Denemeler 90 mm çapında petrilerde gerçekleştirilmiştir



Şekil 13. A. pushchinoensis G11'in antibiyotik disk difüzyon sonuçları (soldan sağa doğru; kontrol, Kanamycin, Sulfamethoxazol).

Termofilik *Anoxybacillus* sp. R4-33'ün Penicillin, Neomycin, Erythromycin, Vancomycin, Streptomycin, Gentamycin, Amikacin ve Ampicillin antibiyotikleri varlığında büyüyemediği bildirilmiştir (Liang *et al.* 2011). Poli *et al.* (2006); polisakkarit üreticisi *A. amylolyticus*'un Penicillin G (10 U), Chloramphenicol (10 µg), Kanamycin (5 µg), Tylosin (10 µg), Lincomycin (15 µg), Bacitracin (10 U), Gentamicin (10 µg), Novobiocin (30 µg), Fusidic acid (10 µg), Streptomycin (25 µg), Tetracycline (30 µg) ve Ampicillin (10 mg) antibiyotiklerine karşı hassas olduğunu bildirmişlerdir. Poli *et al.* (2009); termofilik *A. thermarum*'un Neomycin (30 µg), Erythromycin (30 µg), Penicillin G (10 U), Chloramphenicol (50 µg), Kanamycin (30 µg) Ampicillin (25 µg), Gentamicin (30 µg), Novobiocin (30 µg), Bacitracin (10 U), Lincomycin (15 µg), Fusidic acid (10 µg), Streptomycin (25 µg), ve Tetracycline (30 µg)'e karşı hassas olduğunu ve antibiyotik direncine sahip olmadığını rapor etmişlerdir. Moriello *et al.* (2003); *Geobacillus* sp. 4004'ün Nalidixic acid'e karşı dirençli ancak Streptomycin, Tetracycline, Novobiocin, Penicillin G, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Bacitracin ve Polymyxin B'ye karşı hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Bir sülfanilamid olan Sulfamethoxazole (SMZ veya SMX), idrar yolu enfeksiyonu gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir ve bakteriyel büyümeyi inhibe ettiğinden bakteriyostatik olarak kabul edilmektedir. Sulfamethoxazole, para-aminobenzoik asidin (PABA) yapısal bir analoğudur ve folik asit (folat) sentezinde dihidrofolat ara ürününün sentezini engellemektedir. Folat ise, bakteriyel büyüme ve replikasyon için önemli bir metabolittir çünkü DNA sentezinde ve serin, glisin, metiyonin dahil amino asit sentezinde kullanılmaktadır (Eliopoulos and Huovinen 2001). Son zamanlarda, Sulfamethoxazole gibi streptokokal hastalıkların tedavisinde kullanılan sülfa ilaçlara karşı yaygın şekilde bir ilaç direnci oluştuğu gözlenmektedir. Bunun sebebi olarak, dirençli mikroorganizmaların folik asidi dışardan kullanabilme yeteneği geliştirmesinden kaynaklandığı gösterilmektedir (Madigan and Martinko 2012). Dolayısıyla, *A. pushchinoensis* G11'in Sulfamethoxazole karşı direnç göstermesi de folik asidi kullanabilme yeteneğini işaret etmektedir.

A. pushchinoensis G11'in EPS Üretimi ve Karakterizasyonu

Çözünürlük

Polisakkaritlerin yapısında; hidrofilik kalıntıların miktarlarının fazla olması polar çözücüler içerisinde, aşırı hidrofobik kalıntıların bulunması apolar çözücüler içerisinde çözünmenin kolaylaşmasına sebep olmaktadır (Patil and Shirsath 2015). *A. pushchinoensis* G11'den elde edilen EPS'nin çözücüsünü belirlemek için; su (polar), etanol (polar), metanol (polar), kloroform (polar), hekzan (apolar), amonyak (polar), formik asit (polar) ve dimetilsülfoksit (polar aprotik) çözücü olarak kullanılmış ve EPS sadece DMSO içerisinde

çözünürken, diğer çözücüler içerisinde çözünmeden pellet halde kaldığı gözlemlenmiştir. Patil and Shirsath (2015); çalışmalarında kloroform, hekzan, benzen, amonyak, formik asit, metanol, tetrahidrofuran, etanol ve karbon tetrakloriti çözücü olarak kullandıklarında; termotolerant *B.subtilis*'den üretilen EPS'nin sadece su içerisinde çözünebildiğini bildirmişlerdir.

Polar aprotik çözücüler, molekülleri kuvvetli bir elektronegatif atoma bağlanmış hidrojen atomu içermeyen çözücülerdir. (Solomons *et al.* 2002). DMSO, $(CH3)_2SO$ formüllü bir organosülfür bileşiğidir ve hem polar hem de polar olmayan bileşikleri çözebilen bir polar aprotik çözücüdür. Katyonları sararak boş orbitallerine ortaklaşılmamış elektron çiftleri veren ve böylece katyonik bileşiğin çözünmesini sağlayan DMSO, aynı çözücü etkiyi anyonlarda gösterememektedir. Bu sebepten ötürü, *A. pushchinoensis* G11'den elde edilen EPS'nin DMSO içerisinde çözünüyor olması, iyonik doğası olduğunu göstermektedir.

Su ile homojen karışabilen DMSO, yüksek bir erime noktasına (~18,4°C) sahiptir ve özellikle reolojik özelliklerin belirlenmesinde yüksek erime sıcaklığı problem teşkil edebilmektedir. Ayrıca Mancera *et al.* (2004); DMSO'nun su içerisinde azalan yoğunluklarında metil grubu tarafında hidrofilik hidrasyonun arttığını göstermişlerdir. Bu sebeple, %20'lik DMSO-su karışımı çözücü olarak kullanılmıştır (Ai *et al.* 2008).

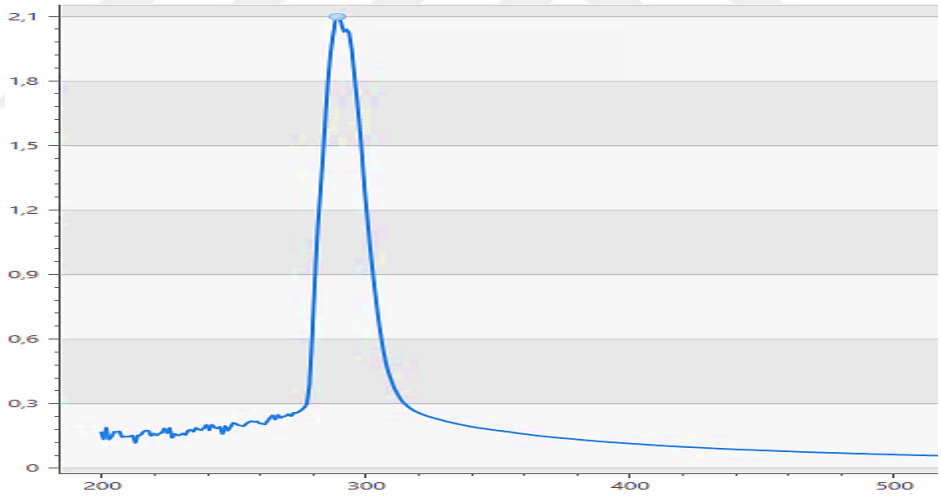
Karbonhidrat ve protein miktarı

Mikrobiyal polisakkaritlerin içerikleri üretici mikroorganizmanın türüne ve beslenme/yaşam koşullarına göre değişebilmekle beraber, genel olarak EPS'ler; polisakkarit, protein, lipit ve nükleik asit gibi majör bileşenler ve hidroksilik, fosforik, amino ve karboksilik asit gibi iyonize olabilen gruplar içerebilmektedir (Liu and Fang 2002). Bu çalışmada, *A. pushchinoensis* G11'den üretilen 18,4 g kuru EPS/L'nin karbonhidrat içeriği belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 1 g/L olacak şekilde çözeltisi hazırlanmış ve fenol sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Buna göre, hazırlanan çözeltideki karbonhidrat miktarı %93 olarak belirlenmiş ve 18,4 g kuru EPS'nin içerdiği toplam karbonhidrat miktarı ise 17,1 g olarak hesaplanmıştır (Kambourova *et al.* 2009).

A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin protein varlığını belirlemek için Biüre yöntemi uygulanmıştır. Cu^{+2} iyonlarının peptid azotlarına bağlanması sonucu bazik çözelti içerisinde, 540-560 nm dalga boyunda maksimum absorbsiyon gösteren renkli bir kompleks oluşumuna dayanan Biüre yöntemi, pratik ve yaygın bir yöntem olmasına karşın duyarlılığı düşük (0,2-1,7 mg protein/mL) bir yöntemdir (Zheng *et al.* 2017). Bu sebeple, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin protein miktarı Biüre yöntemiyle belirlenememiş

(Zheng *et al.* 2017) bunun yerine, spektrofotometrik bir metot olan 'Warburg-Christian' yöntemi ile kullanılmıştır. Bu amaçla belli dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmış ve toplam protein miktarı (%) = 1,55*A_{280}-0,76*A_{260} şeklinde hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin toplam protein oranı %1,08 bulunmuş ve 18,4 g kuru EPS'nin içerdiği toplam protein miktarı 0,16 g olarak hesaplanmıştır. 280-290 nm dalga boyu aralığında görülen yüksek absorbansın ise, tirozin aminoasidinin fenolik grubu ile triptofan aminoasidinin indolik grubunun 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermesi prensibinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Stoscheck 1990).

Spektrum taraması, duyarlılık aralığı 0.05–2.0 g/L arasında olan ve oldukça hızlı bir protein tayin yöntemidir. Bu sebeple, dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 1 g/L olacak şekilde çözeltisi hazırlanmış ve spektrum taraması yapılmıştır. 200-1000 nm dalga boyu aralığında yapılan spektrum taraması sonucunda, 260 nm'de absorpsiyon piki gözlenmemiştir. Bu durum, EPS örneğinin nükleik asit (DNA/RNA) içermediğini göstermektedir (Glasel 1995). Ekstraksiyon aşamasında TCA çöktürmesi ile büyüme ortamından kaynaklı protein kirlilikleri uzaklaştırılan EPS örneği, 280-290 nm aralığında yüksek absorpsiyon piki göstermiştir (Şekil 14).



Şekil 14. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS örneğinin spektrum grafiği.

Geobacillus sp. (DSM 14431)'den elde edilen EPS'nin %81 karbonhidrat, %3 protein ve %2 nükleik asit içerdiği (Nicolaus *et al.* 2002), *G.thermodenitrificans* B3-72'nin ise 350-210 nm aralığında absorpsiyon piki göstermediği bildirilmiştir (Arena *et al.* 2009). Üç fraksiyon halinde elde edilen *Geobacillus* sp. 4004'ün ürettiği polisakkaritin (EPS 1, EPS 2 ve EPS 3) sırasıyla %5 , %20 ve %75 karbonhidrat ile %6, %2 ve %2,6 protein içerdiği rapor edilmiştir (Moriello *et al.* 2003). Sıcak su kaynağından izole edilen *G. tepidamans* V264'ün ürettiği EPS %98 karbonhidrat ve %1,8 protein içermektedir (Kambourova *et al.* 2009). Termofilik *A. pallidus* 418'in kesikli ve sürekli sistemlerde ürettiği nükleik asit içeren EPS'ler sırasıyla %80,5

karbonhidrat/%19 protein ve %95,3 karbonhidrat/%4,3 protein içemektedir (Radchenkova *et al.* 2015). Termal kaynaktan izole edilen ve EPS üretimi karakterize edilen *B. licheniformis* B22'nin ürettiği polimerin %48 karbonhidrat ve %44 protein (Dogan *et al.* 2015) ve termofilik *B. thermoantarcticus'*un ürettiği EPS'nin %96 karbonhidrat ve %2 protein içerdiği belirlenmiştir (Manca *et al.* 1996). Termotolerant *B. licheniformis* T14'ün ürettiği heteropolisakkaritin büyük oranda (%70) karbonhidrat ve düşük miktarlarda protein (%0,6) ve nükleik asitten (%0,8) oluştuğu rapor edilmiştir (Spanò *et al.* 2013). Termofilik *B. thermoruber* 423'ün ürettiği nükleik asit içeren EPS'nin sahip olduğu üç farklı fraksiyonun sırasıyla %92 karbonhidrat / %6 protein, %53 karbonhidrat / %7,3 protein ve %71 karbonhidrat / %8,7 proteinden oluştuğu bildirilmiştir (Yildiz *et al.* 2014). Haloflik ve termotolerant *H. nitroreducens* WB1'in ürettiği EPS'nin %68,9 karbonhidrat ve %2,2 protein içerdiği bildirilmiştir (Chikkanna *et al.* 2018).

Monomer kompozisyonu

A. pushchinoensis G11'in ürettiği ve toplam karbonhidrat miktarı belirlenen EPS'nin kromatografi yöntemi ile monomer kompozisyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için, önce sülfürik asit ile hidrolize tabii tutulan polisakkarit yapı monomerlerine ayrılmış ve hemen ardından bazik bir ajan ile nötralizasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. *A. pushchinoensis G11'in Ürettiği EPS'nin Moleküler Kompozisyonu*

Kompozisyon	Alıkonma süresi (dakika)	İçerik (%)
Arabinoz	4,60	56,6
Früktoz	5,20	26,4
Glikoz	5,90	11,7
Galaktoz	6,40	5,3

A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS heteropolisakkarit yapıda olup (Sardari *et al.* 2017) sülfürik asit ile parçalandığında arabinoz (%56,6), fruktoz (%26,4), glikoz (%11,7) ve galaktoz (%5,3) açığa çıkmaktadır. Dogan *et al.* (2015); termofilik *B. licheniformis* B22'den elde edilen EPS'nin yapısında arabinozu minör bileşen (ksiloz ile birlikte arabinoz oranı %1,49) olarak belirlerken, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin sahip olduğu arabinoz oranının toplam yapının büyük bir kısmını oluşturduğu görülmektedir. *B. subtilis'*in ürettiği heteropolisakkaritin yapısında glikoz, arabinoz, mannoz, galaktoz ve ramnoz oranı sırasıyla %86, %6, %5, %3,4 ve %0,6 (Xu *et al.* 2019) iken, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin yapısında glikoz, arabinoz ve galaktoz oranları sırasıyla %12, %57 ve %5'dir. *B. licheniformis*'in ürettiği EPS arabinoz (%9,06), galaktoz (%11,32), glikoz (%54,38) ve

mannozdan (%25,4) oluşmakta iken (Singh *et al.* 2011), Kwon *et al.* (2002); deniz suyuna maruz bıraktıkları cam yüzeylerde biyofilm oluşumunu gözlemledikleri çalışmada, izole ettikleri sekiz izolatın ürettikleri EPS'lerin yapısında glikoz ve galaktozu ortak monosakkarit yapı olarak belirlemişlerdir. *G. tepidamans* V264'ün ürettiği EPS'nin monomer kompozisyonun sırasıyla; 1:0,07:0,02:0,04 oranında glikoz, galaktoz, fruktoz ve fukozdan oluştuğu belirlenmiştir (Kambourova *et al.* 2009). Termofilik *B. thermoantarticus*'un ürettiği EPS'nin eşit oranda glikoz ve mannozdan oluştuğu bildirilmiştir (Manca *et al.* 1996). *B. tequilensis* FR9'un ürettiği EPS glikoz (%68), galaktoz (%17,8), mannoz (%9,8), arabinoz (%3,5) ve ksilozdan (%1,4) oluşmakta iken glikoz baskın bileşen arabinoz ise minör bileşen olarak bildirilmiştir (Rani *et al.* 2017). Ayrıca, Singh *et al.* (2013); sucul ortamdan izole edilen *B. flexus* (GU592213)'un ürettiği EPS'nin monomerik olarak %14,01; %16,43; %3,35; %23,52; %37,09 ve %5,6 oranlarında fukoz, riboz, ksiloz, mannoz, galaktoz ve glikozdan oluştuğunu belirlemişlerdir.

İç viskozite ve Molekül ağırlığı

Belirli bir çözücü içinde belirli bir polimer tarafından kaplanan hidrodinamik hacmin bir ölçüsü olan iç viskozite (η) aynı zamanda bir polimerin bir çözeltinin viskozitesine olan katkısının da bir ölçümüdür (Freitas *et al.* 2011). Bir polimere ait düşük iç viskozite değeri, zayıf kalınlaşma kabiliyetine sahip olduğunu ve yüksek viskozite isteniyorsa daha yüksek yoğunluk kullanılması gerektiğini gösterir. Diğer taraftan, daha yüksek molar kütle ya da moleküler ağırlık ise daha yüksek kalınlaşma yeteneği anlamına gelmektedir.

EPS örneğinin molekül ağırlığı, iç viskozite (intrinsic viscosity) değerleri ile yoğunluk arasında korelasyon sağlanarak belirlenmiştir. Bunun için dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde farklı yoğunluklarda çözeltileri hazırlanmış ve viskozite analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir yoğunluk değerinde elde edilen sonuçlar; sırasıyla rölatif, spesifik ve indirgenmiş viskozite değerleri cinsinden yeniden hesaplanmıştır ve iç viskozite değeri belirlenmiştir;

$$\text{Rölatif viskozite; } \eta_r = {}^{\eta}/_{\eta_0}$$

$$\text{Spesifik viskozite; } \eta_{sp} = \eta_r - 1$$

$$\text{İndirgenmiş viskozite; } \eta_{red} = {}^{\eta_{sp}}/_{C}$$

η; çözeltinin viskozitesi, η_0; çözücü viskozitesi ve C; konsantrasyondur.

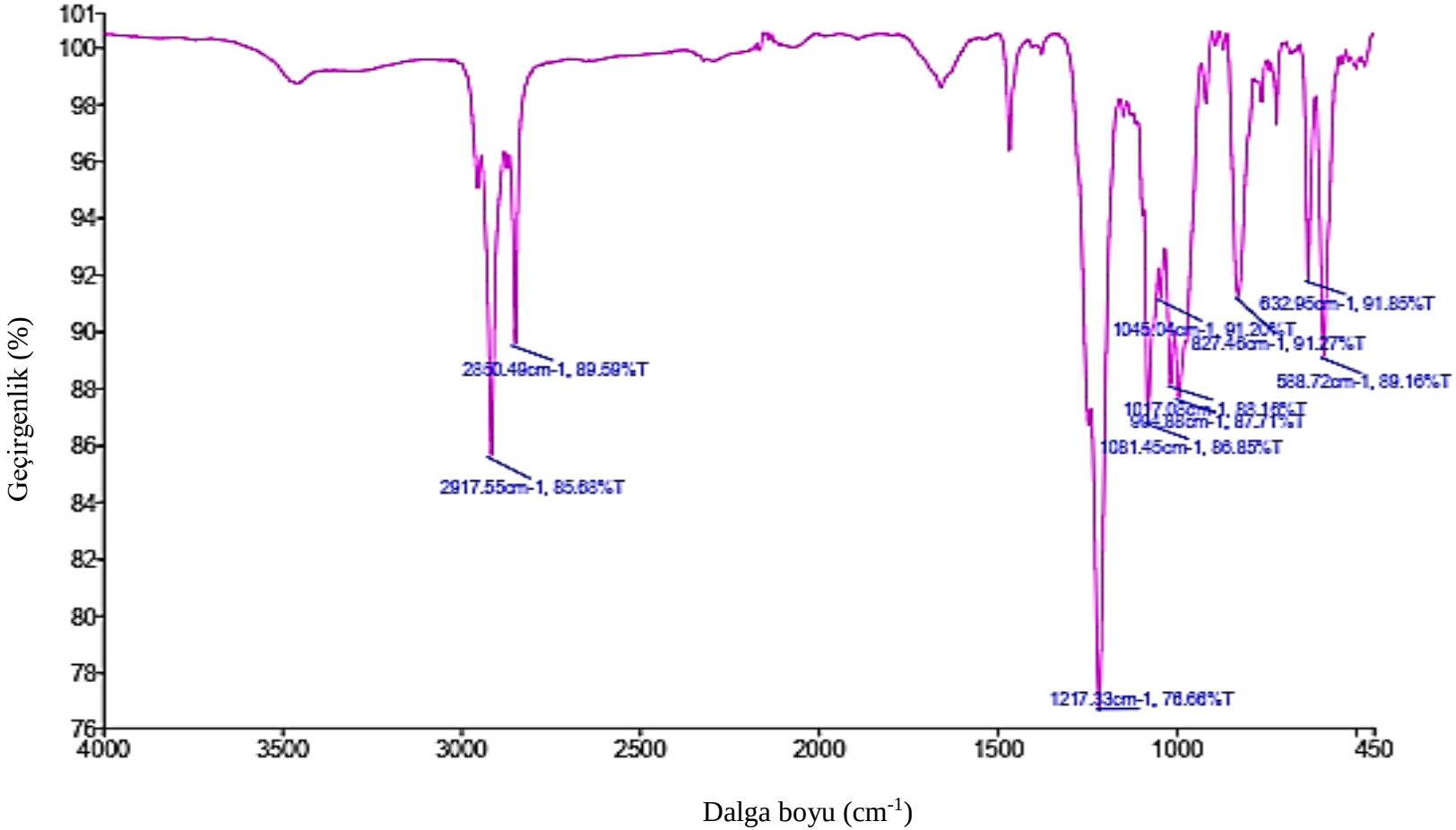
Yine her bir yoğunluk değeri için oluşturulan empirik denemelerde gerçekleştirilen viskozite analizlerinde, Herschel–Bulkley (3.1) modeline göre elde edilen sabit değerler ile

Mark-Houwink (3.2) eşitliği yardımıyla, moleküler ağırlık belirlenmiştir. Buna göre, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin iç viskozite değeri 24,2 dL/g ve molekül ağırlığı 75,5 kDa olarak belirlenmiştir.

Han *et al.* (2015); *B. amyloliquefaciens* LPL061'den elde edilen EPS'nin iç viskozite değerini 27,8 dL/g ve molekül ağırlığını 98,1 kDa olarak bildirmişlerdir. *B. licheniformis* 14580 ve *B. amyloliquefaciens* 23350'nin ürettikleri EPS'nin moleküler ağırlığı 5-30 kDa aralığında belirlenirken (Malick *et al.* 2017), *B. mojavensis* DAS10-1'den elde edilen EPS'nin 1,15 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirtilmiştir (Berekaa and Ezzeldin 2018). Termofilik *R. marinus* DSM4252^{T} ve MAT493'ün ürettikleri EPS'lerin molekül ağırlıkları ise ortalama 80 kDa olarak belirlenmiştir (Sardari *et al.* 2017).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin TCA çöktürmesi sonrası FT-IR spektrumu incelendiğinde on farklı pik elde edilmiştir. 2917 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1217 cm^{-1}, 1081 cm^{-1}, 1045 cm^{-1}, 1017 cm^{-1}, 994 cm^{-1}, 827 cm^{-1}, 632 cm^{-1} ve 588 cm^{-1} aralığındaki titreşimlerden sırasıyla %85,6; %89,5; %76,7; %86,9; %91,2; %88,2; %87,7; %91,3; %91,9 ve %89,2 geçirgenlik tespit edilmiştir (Şekil 15).



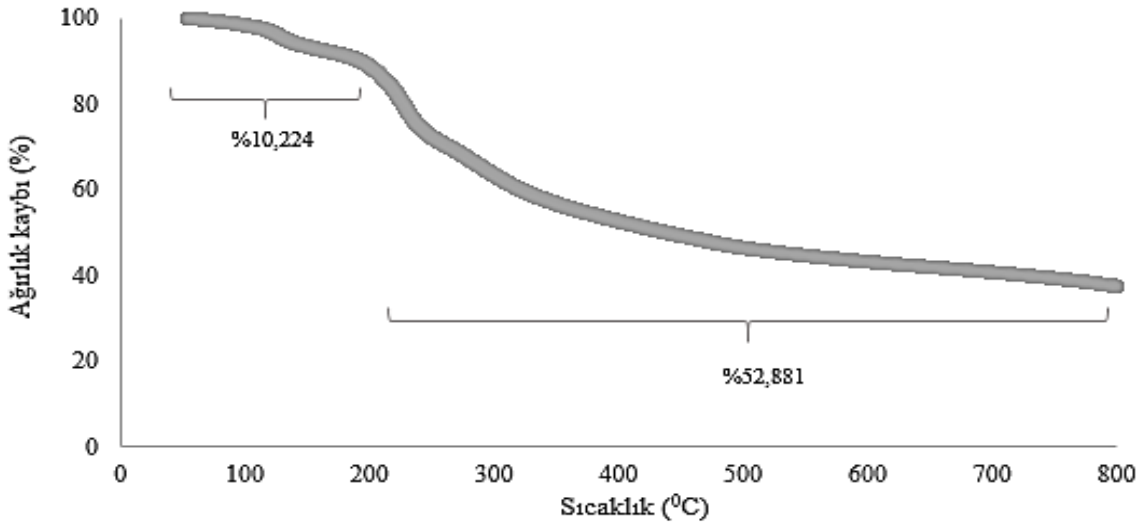
Şekil 15. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin FT-IR diyagramı.

Bu titreşimlerden büyük çoğunluğunun polisakkarit örneklerinde yaygın olduğu görülmektedir. Orta şiddetli titreşimler olan 2917 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} C-H germe titreşiminin varlığını göstermektedir (Yu *et al.* 2016; Rani *et al.* 2017). 1217 cm^{-1} O-S-O grubuna ait bağ titreşimini (Sardari *et al.* 2017), orta şiddetteki 1081 cm^{-1} germe titreşimi ise amin grup içerisindeki C-N titreşimini göstermektedir (Vidhyalakshmi *et al.* 2016). Tüm polisakkaritlerde ortak olan 1200-1000 cm^{-1} aralığındaki titreşimler yani 1045 cm^{-1} ve 1017 cm^{-1} anomerik bölge hakkında bilgi vermekte ve özellikle glikopiranoz (glucopyranose) biriminin C4 pozisyonundaki C-O ya da C-O-C bağlarından kaynaklanmaktadır (Mitić *et al.* 2011; Miao *et al.* 2014; Vidhyalakshmi *et al.* 2016; Rani *et al.* 2017; Sardari *et al.* 2017; Prathyusha *et al.* 2018). 1000-700 cm^{-1} aralığındaki bantlar (994 cm^{-1} ve 827 cm^{-1}) polisakkarit yapı içerisindeki α ve β konformasyonlarını göstermekte iken (Li *et al.* 2017; Sardari *et al.* 2017), daha düşük spektrumlardaki titreşimler ise (632 cm^{-1} ve 588 cm^{-1}) EPS içerisindeki glikozidik bağları işaret etmektedir (Rani *et al.* 2017).

Manca *et al.* (1996); *B. thermoantarticus*'un ürettiği EPS'nin 1240 cm^{-1}'de gösterdiği titreşimin S=O bağına ait olduğunu bildirmişlerdir ve Trabelsi *et al.* (2009); Senni *et al.* (2011)'a göre, O-S-O bağ titreşimi mikrobiyal polisakkaritin yapısında sülfat esterinin varlığını işaret etmektedir yani *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin yapısında sülfat esteri bulunmaktadır. Çözücü ve çözünenin molekülleri birbirine ne kadar benzer ise çözünürlük o kadar yüksek olmaktadır ve yapısında sülfat bulunması *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin neden sadece DMSO içerisinde çözünebildiğini de açıklamaktadır. Ayrıca, yapısında sülfat gruplarının bulunması, mikrobiyal polisakkaritin (antitümör, antibiyofilm gibi) biyolojik aktiviteye sahip olabileceğini işaret etmektedir ve bu durum, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin ilaç sanayisinde kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir.

Termogravimetrik analiz (TGA)

Sıcaklığa karşı kararlı yani termostabil polimerler, ticari alanda hem kabul edilebilir hem de kolay uygulanabilir maddelerdir. Isı akışındaki değişime karşılık *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin termal özellikleri TGA analizi ile ağırlık kaybı olarak incelenmiştir. Elde edilen termograma göre (Şekil 16), EPS'nin sıcaklıkla parçalanması iki aşamalı olarak gerçekleşmiştir. İlk basamakta, sıcaklık artarken 200°C değerine kadar başlangıç kütlesinin yaklaşık %10,224'ü azaldığı, ikinci basamakta sıcaklık 200°C'den 800°C'ye doğru yaklaşırken %52,881 azalma ile başlangıç kütlesinin %63,105'inin kaybolduğu gözlemlenmiştir.

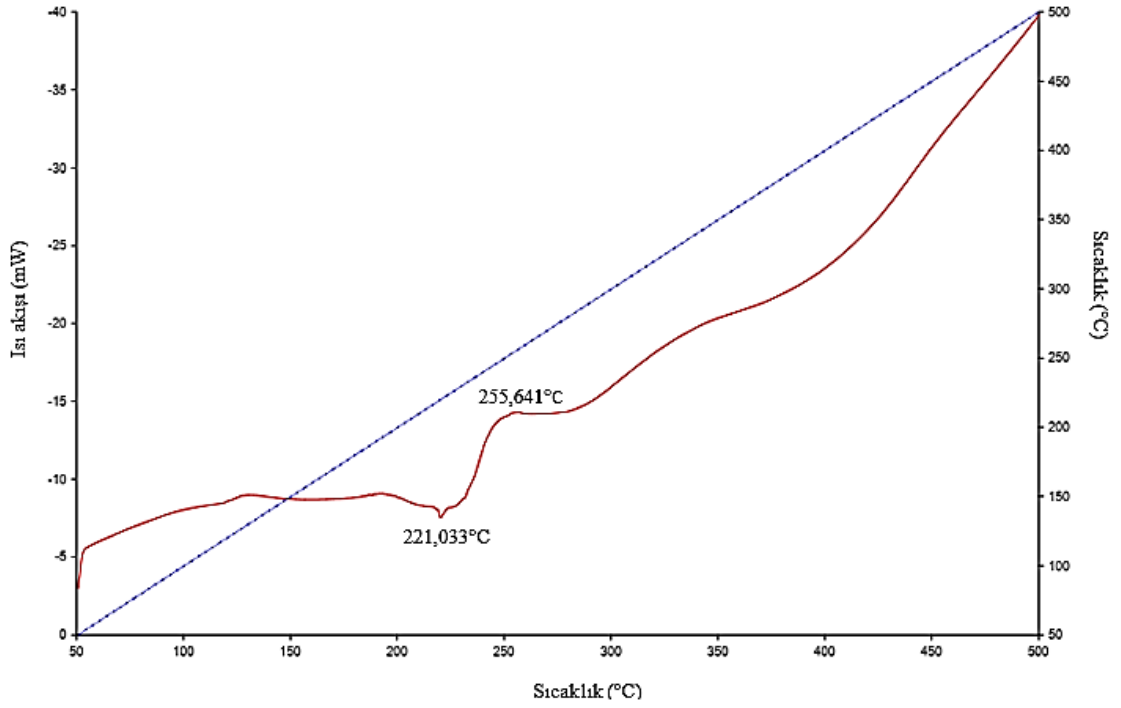


Şekil 16. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin termogravimetrik analiz diyagramı.

İlk basamakta gözlenen parçalanma yüksek karboksil grubu içeriği nedeniyle daha fazla su molekülünün bağlanmasından yani EPS'nin nem içeriğinden kaynaklanmıştır (Kumar *et al.* 2004). İkinci basamakta gözlenen ve 250°C değerinden sonra belirginleşmeye başlayan yüksek ağırlık kaybı ise, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin degradasyon yani parçalanma sıcaklığı (Td) hakkında bilgi vermektedir. 800°C sıcaklık değerine ulaştıktan sonra, başlangıç kütlesinin 36,895'lik kısmını koruyabilmiştir. Benzer durumda, *B.pumilus* UW-02'den elde edilen EPS'nin 600°C'ye ulaşan analiz sonunda toplam ağırlığının sadece %15'ini koruyabildiği bildirilmiştir (Chowdhury *et al.* 2011). Spanò *et al.* (2013); termofilik *B. licheniformis* T14'den elde ettikleri heteropolisakkaritin 60-80°C aralığında nem kaybına uğradığını, 240°C'den sonra parçalanmaya başladığını ve 260°C'de ağırlığının %50'sini kaybettiğini bildirmişlerdir. Termofilik *G. tepidamans* V264'ün ürettiği heteropolisakkarit 280°C'de parçalanırken (Kambourova *et al.* 2009), *G. thermodenitrificans* B3-72'nin ürettiği EPS 240°C'de parçalanmaya başladığı gözlemlenmiştir (Arena *et al.* 2009). *B. tequilensis* FR9'dan elde edilen EPS'nin termogravimetrik analizinde ise parçalanma sıcaklığının 239,72°C olduğu ve 823°C'de polisakkaritin tamamen parçalandığı belirtilmiştir (Rani *et al.* 2017). Dogan *et al.* (2015); termofilik *B. licheniformis* B22'nin ürettiği EPS'nin TGA analizinde, 500°C'den yüksek sıcaklık değerlerinde ilk iki basamak azalmadan ayrı olarak üçüncü bir azalma evresi daha tespit ettiklerini ve bu basamağın mikrobiyal polisakkaritlerde kalsit ($CaCO_3$) kristallerinin varlığını gösteren bir basamak olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin TGA analizinde bu durumun gözlemlenmemiş olması, yapısında $CaCO_3$ kristallerinin olmadığını göstermektedir. 800°C sıcaklıkta ağırlığının bir kısmını koruyabildiği göz önüne alındığında *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin yüksek sıcaklığa karşı kararlı olduğu ve endüstriyel alanlarda kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

A. pushchinoensis G11'in ürettiği ve dondurularak kurutulan EPS'in sıcaklığın etkisiyle enerji seviyesindeki değişim incelendiğinde; iki adet pik oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 17). Bunlardan, ilki 221,033°C'de (T_{set}:220,679°C) gerçekleşen kristalinizasyon sıcaklığını (*Tc*) göstermekte iken, ikincisi 255,641°C'de (T_{set}:255,304°C) gerçekleşen erime sıcaklığını (*Tm*) göstermektedir.



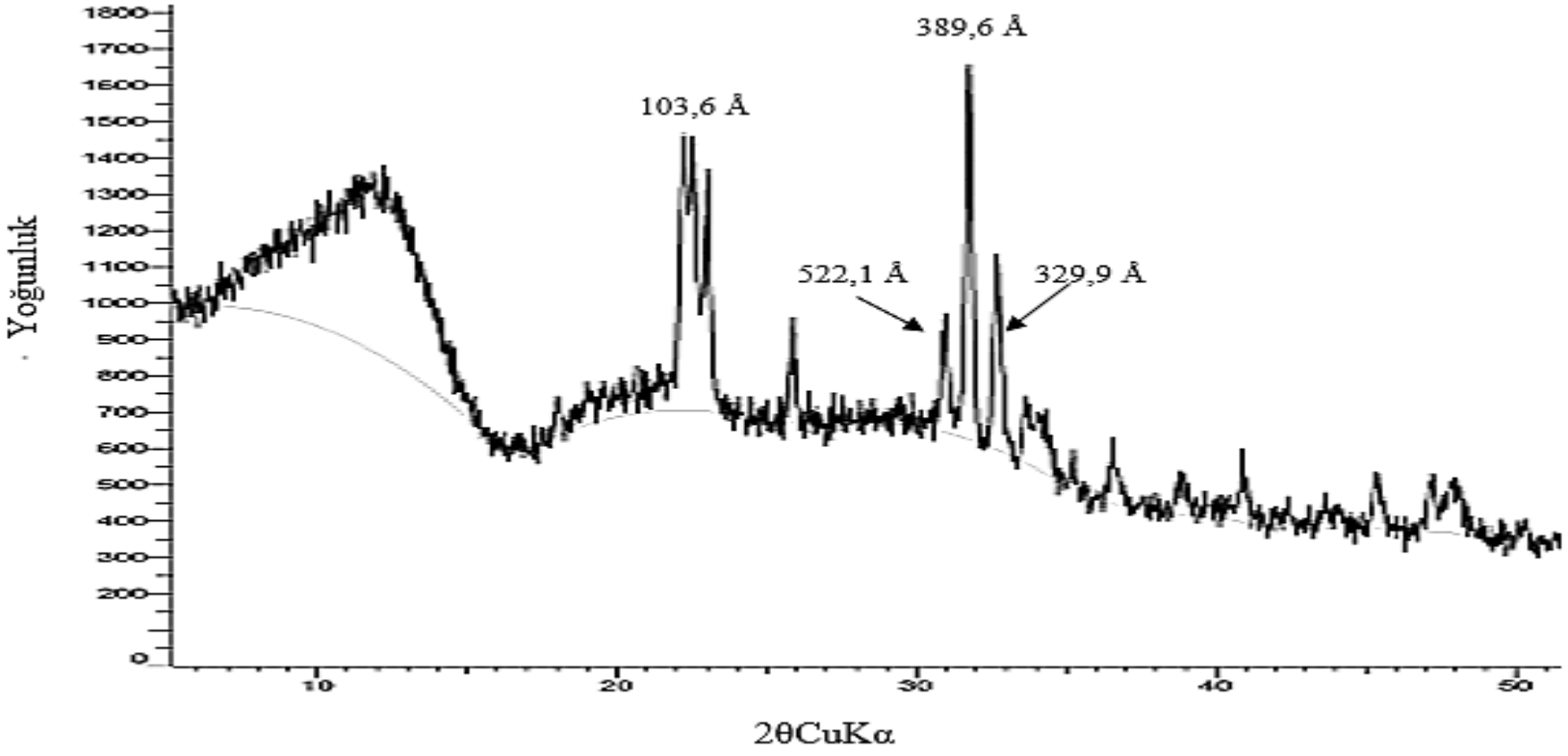
Şekil 17. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin diferansiyel kalorimetre diyagramı.

B. amyloliquefaciens'in ürettiği iki farklı EPS fraksiyonunun kristalinizasyon sıcaklıkları 123,79°C ve 125,82°C; erime sıcaklıkları ise 224,09°C ve 295,21°C olarak bildirilmiştir (Han *et al.* 2015). Mikrobiyal polisakkarit üreticisi *B. pumilus* UW-02'nin DSC analizi neticesinde, 160,8°C'de endotermik ve 467°C'de ekzotermik olmak üzere iki adet pik gözlendiği belirtilmiştir (Chowdhury *et al.* 2011). Ayrıca, *B. licheniformis* WSF-1'in ürettiği EPS'nin 145-150°C'de camsı geçiş sıcaklığına ve 200-207,5°C'de erime sıcaklığına sahip olduğu rapor edilmiştir (Angel *et al.* 2018).

X-ışını difraktometresi (XRD)

X-ışınlarına verdiği kırılım yanıtını ölçerek mikrobiyal polimerin detaylı yapısal incelenmesine olanak sağlayan XRD analizine göre, yüksek ve dar pikler kristal yapıyı belirtmekte, küçük ve geniş pikler ise ekzopolisakakritin amorf bölümlerinin varlığını göstermektedir. Buna göre *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin analizine göre; X ışınlarının geliş açılarının 0-20° (2θ) olduğu bölgede amorf bölgeyi belirten bir adet küçük ve

geniş pik elde edilmiştir. Işınların geliş açısına göre, 30-60° (2θ) bölgesinde ise kristal yapıyı işaret eden yoğun, yüksek ve dar pikler gözlemlenmiştir (Şekil 18). Kristal yapıyı işaret eden dört adet pikin kristalinite büyüklükleri sırasıyla 103,6; 522,1; 389,6 ve 329,9 Å'dur. Dolayısıyla, A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin yapısında hem amorf hem de kristalin bölgeler birlikte bulunmaktadır. *B. tequilensis* FR9'un ürettiği EPS'nin 20-70° (2θ) spektrum bölgesinde yapılan analiz neticesinde hem kristalin hem de amorf bölgeler birlikte gözlemlenirken (Rani *et al.* 2017), *B. pumilus* UW-02'nin ürettiği polisakkaritin ise 10-50° (2θ) geliş açısının olduğu bölgede yalnızca amorf yapıya ait sonuçlar elde edilmiştir (Chowdhury *et al.* 2011).



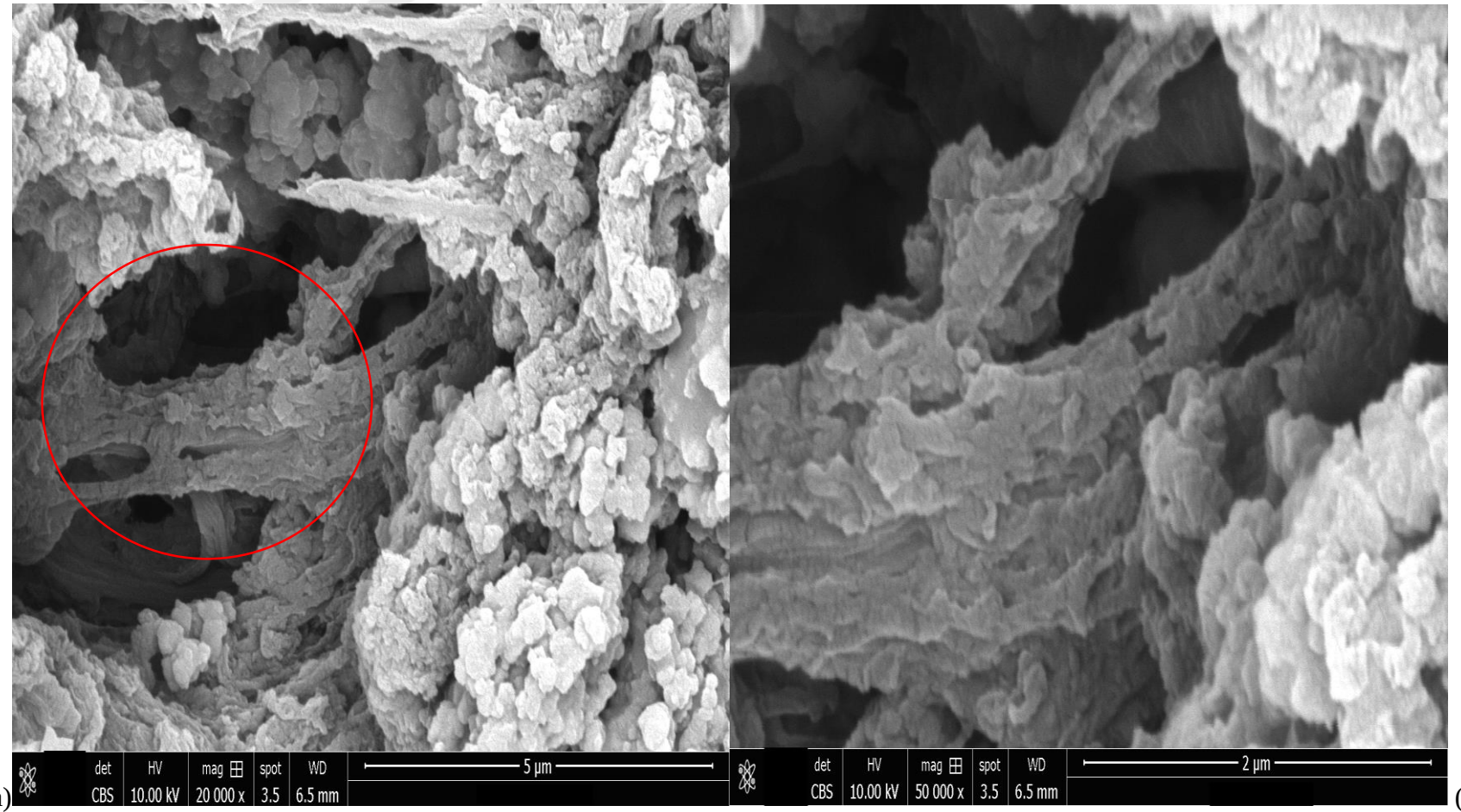
Şekil 18. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin X-ışını kırınım deseni.

Taramalı elektron mikroskopi (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu polisakkaritin yüzey özelliklerini belirlemek ve fiziksel özelliklerini tanımlayabilmek için kullanılabilecek önemli bir enstrümandır. *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin taramalı elektron mikroskobu ile detaylı yapısal analizi neticesinde, amorf (Şekil 19) ve kristal (Şekil 20) yapıların bir arada oldukları ancak düzensiz formda ve heterojen dağıldığı belirlenmiştir (Han *et al.* 2015).

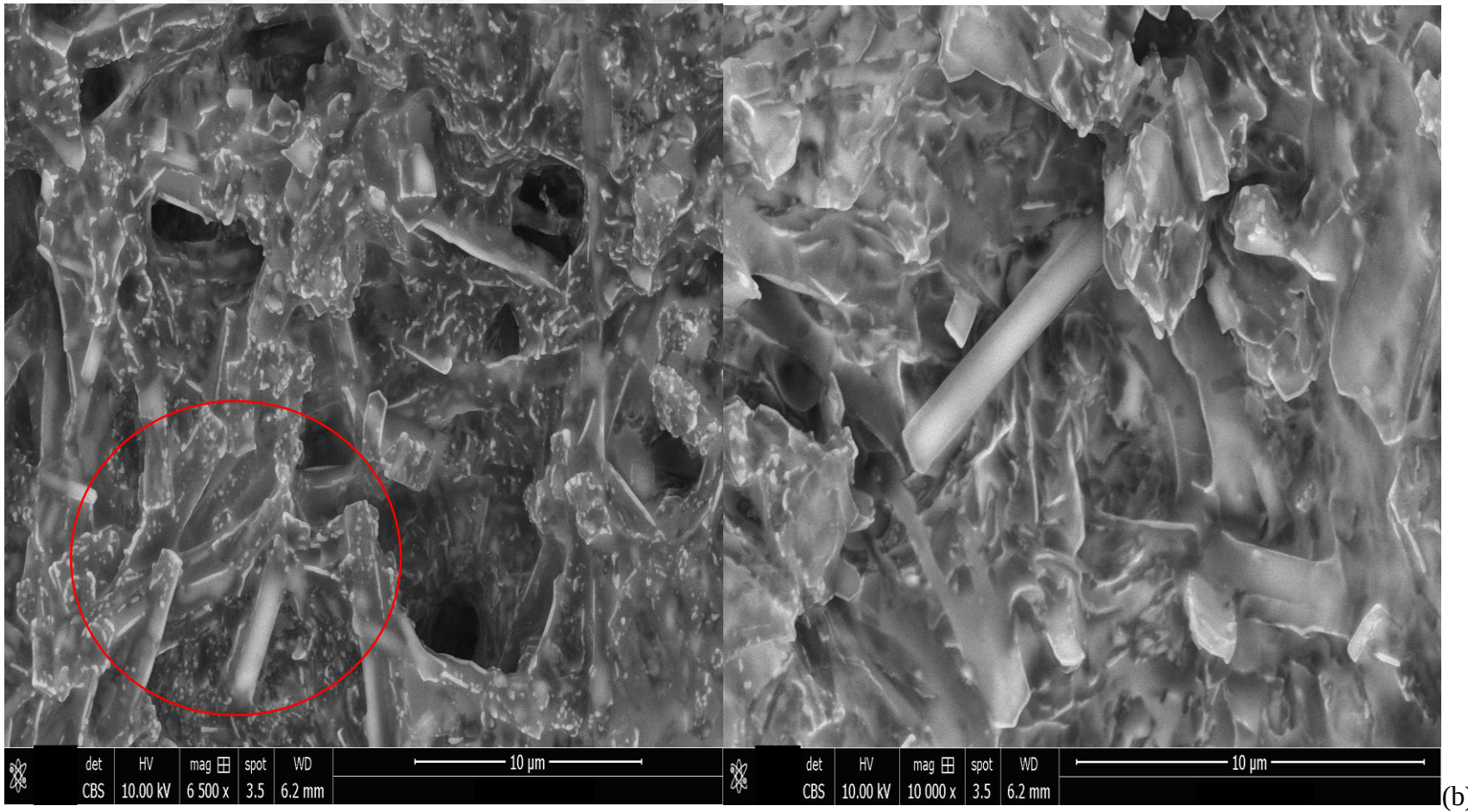
Şekil 19a'da elde edilen görüntüde kristal yapıya benzemeyen bölgede 2,5 kat daha fazla büyütme yapıldığında (Şekil 19b), o bölgenin amorf bölge olduğu doğrulanmıştır. Aynı şekilde, Şekil 20a'da kristal oluşumların gözlemlendiği bölgede 1,5 kat daha fazla büyütme yapıldığında ise (Şekil 20b), kristal yapılar gözlemlenebilmiştir.

Rani *et al.* (2017); mikrobiyal polisakkarit yapı içerisinde nisbi olarak kristal yapının amorf yapıdan daha belirgin olmasının, üretilen polisakkaritin hücre yüzeyine tutunma özelliğinin olmadığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin taramalı elektron mikroskobu ile detaylı yapısal analizi neticesinde kristal yapı amorf yapıya oranla nispeten daha baskın olarak belirlenmiştir. Ayrıca, üretilen polisakkaritin kapsüler yapıda olması durumunda hücreler uzaklaştırıldıktan sonra EPS yapı içerisinde düzgün şekilli yuvarlak boşluklar kalacağını iddia etmektedirler. *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntülerinde düzgün şekilli yuvarlak boşluklar bulunmamaış, aksine düzensiz ve şekilsiz boşluk oluşumları gözlemlenmiştir. Bu durum, elde edile EPS'nin kapsüler polisakkaritten ziyade EPS olduğunu kanıtlamaktadır.

(a) 

(b)

Şekil 19. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin amorf bölgesine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (a; 20.000X büyütme gücü, b; 50.000X büyütme gücü).

(a) 

(b)

Şekil 20. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin kristal bölgesine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (a; 6.500X büyütme gücü, b; 10.000X büyütme gücü)

Reolojik Karakterizasyon

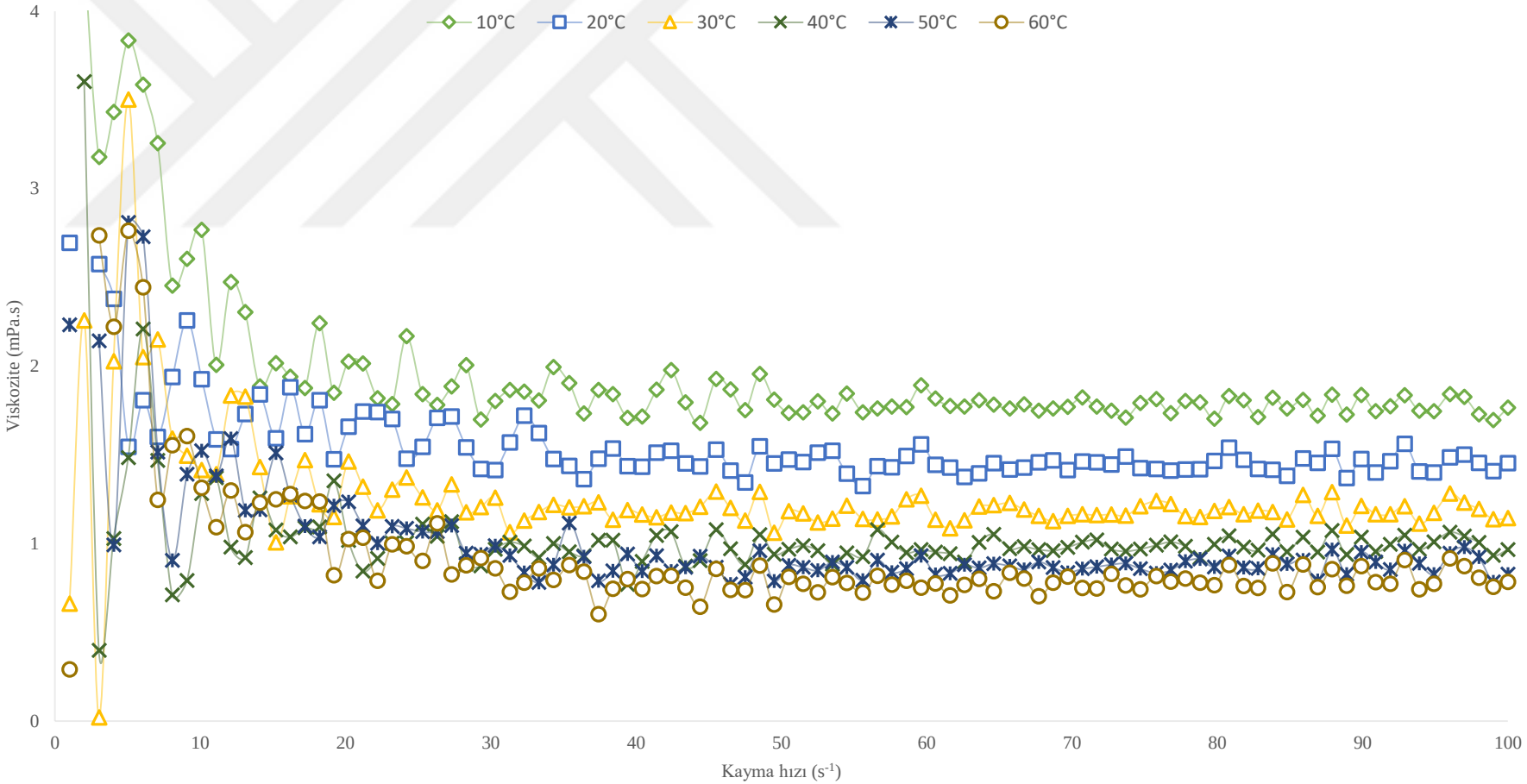
Viskozite, bir akışkanın, yüzey gerilimi altında deforme olmaya karşı gösterdiği direncin ölçüsü olan viskozite, akışkanın akmaya karşı gösterdiği iç direnç olarak da tanımlanabilir ve reolojik veriler ürün kalitesinin değerlendirilmesinde ve proses tasarımında gerekli olabilmektedir.

A. pushchinoensis G11 üretim besiyerinde 55°C 120 rpm'de 48 saat inkübe edildikten sonra santrifüj ile hücreler çöktürülmüş ve uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant ham ekstrakttır ve etanol eklenerek yoğunlaştırılmış ekstrakt elde edilmiştir. Bu aşamada, ham ve yoğunlaştırılmış ekstratın değişen kayma hızlarında ve artan sıcaklıklarda görünür viskozite değerlerindeki değişimler takip edilmiştir (Şekil 21 ve Şekil 22). Ayrıca, dondurularak kurutulan EPS'nin %20'lik DMSO içerisinde %1, %0,5 ve %0,2 yoğunluklarda çözeltileri hazırlanmış ve farklı kayma hızlarında görünür viskozite değerlerindeki değişimler ile birlikte (sabit kayma hızında 50 s^{-1}) sıcaklık taraması gerçekleştirilmiştir (Şekil 23 ve Şekil 24).

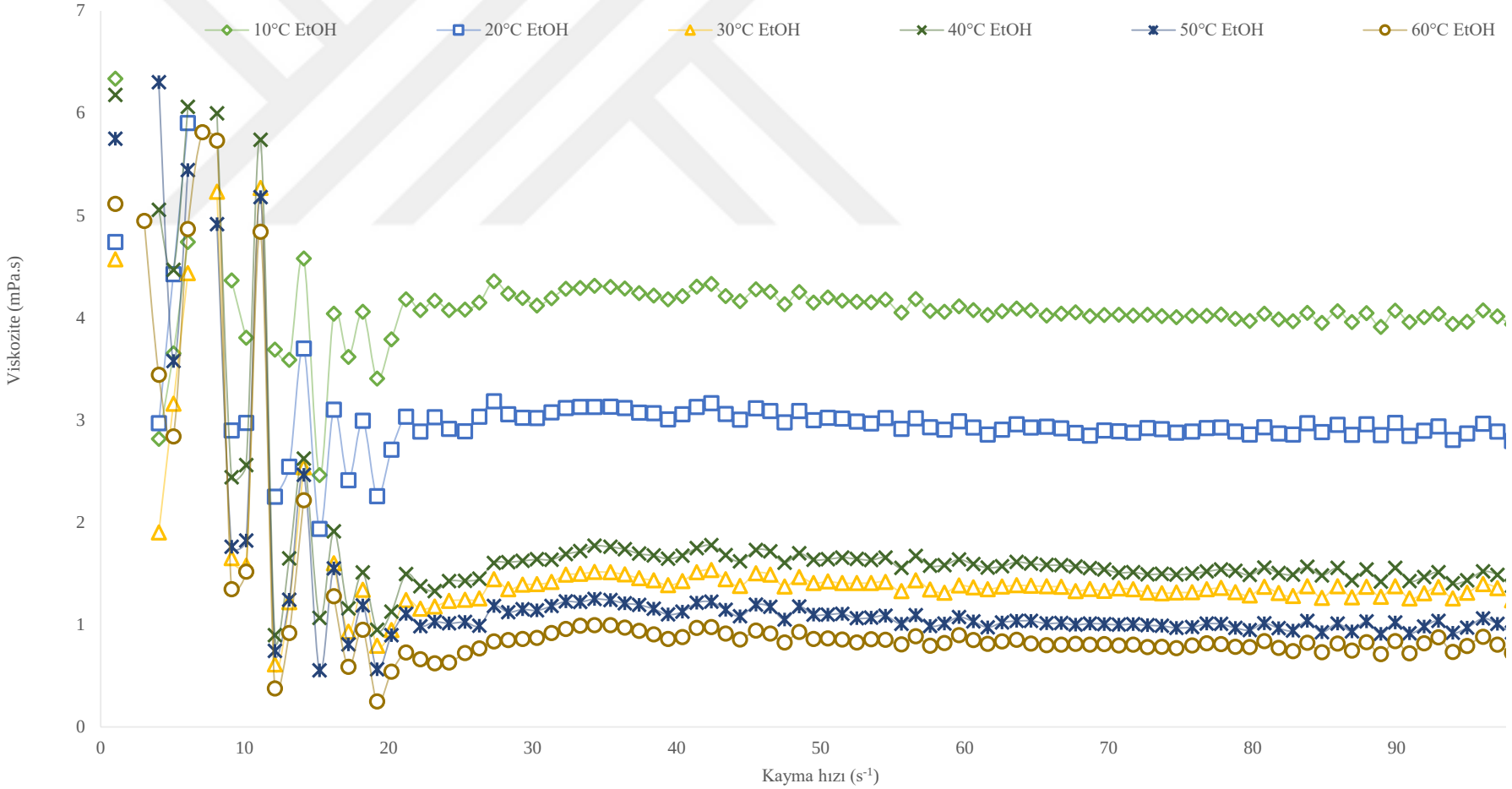
Analiz sonuçlarına göre, 25°C'de, kayma hızına karşılık viskozite grafiğinde ham ve yoğunlaştırılmış ekstraktın viskoziteleri her sıcaklık değerinde sabit kalmıştır. Aynı zamanda ham ve yoğunlaştırılmış ekstraktın sabit kayma hızında sıcaklığa karşı viskozite değişimi incelendiğinde (Şekil 21 ve Şekil 22), sıcaklık arttıkça viskozitenin düştüğü gözlenmiştir (Yildiz *et al.* 2014). %20'lik DMSO içerisinde hazırlanan farklı yoğunluklardaki EPS çözeltilerinin değişen kayma hızına göre viskozitesindeki değişim incelendiğinde, yoğunluk azaldığında görünür viskozite değerlerinin de azaldığı (Şekil 23) görülmüş, 25°C'de sabit kayma hızında yoğunluk azaldığında ve sıcaklık arttığında (Şekil 24) görünür viskozite de azalma belirlenmiştir (Yildiz *et al.* 2014; Li *et al.* 2017). Ayrıca, tüm örneklerde kayma hızına karşılık viskozitenin sabit kaldığı yani *A. pushchinoensis* G11'den elde edilen EPS'nin Newtonian akış gösterdiği belirlenmiştir. Chhabra (2010); organik bazlı ve düşük moleküler ağırlıklı maddelerin Newtonian akış karakteristikleri gösterdiğini bildirmiştir ve elde edilen sonuçlara uygun olarak bu tür maddelerin viskozitelerini etkileyen tek faktör sıcaklık olmaktadır.

B. amiloliquefaciens LPL061'den elde edilen EPS'nin reolojik incelemesinin bir sonucu olarak, polisakkaritin yüksek molekül ağırlıklı olmasının viskozitesini etkileyeceği sonucuna varılmıştır (Han *et al.* 2015). Ancak, yüksek molekül ağırlıklı (98,1 kDa) bu EPS'nin 50 s^{-1} sabit kayma hızındaki görünür viskozite değeri yaklaşık 1 mPa.s iken, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği aynı yoğunluktaki EPS'nin (75,5 kDa) 50 s^{-1} sabit kayma hızındaki görünür viskozite değeri 2,03 mPa.s olarak belirlenmiştir.

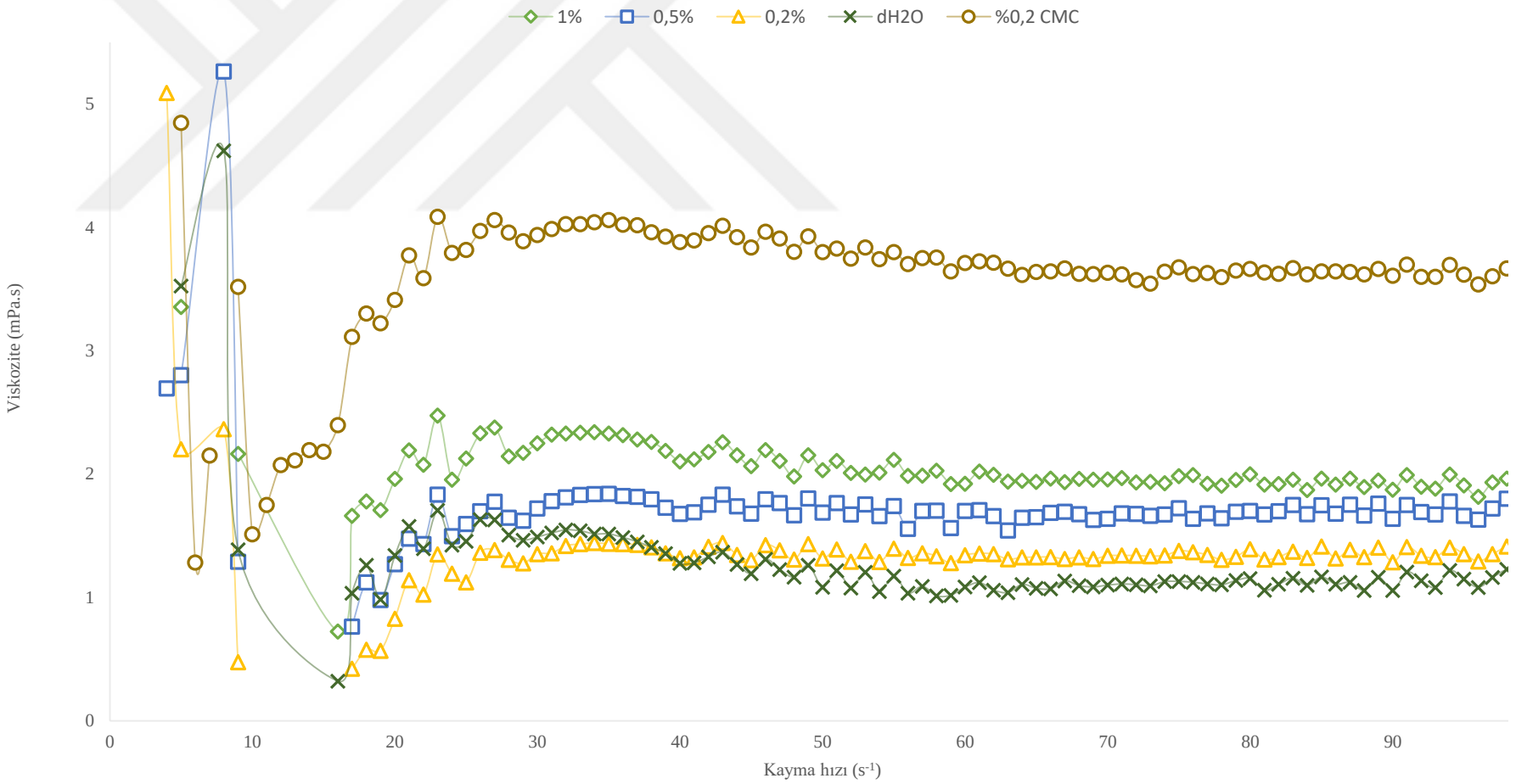
B. themoruber 423, Newtonian akış karakteristiğine sahip EPS üretebilen termofilik bir bakteri iken (Yildiz *et al.* 2014), Alves *et al.* (2009); elde ettikleri EPS'nin 10-100 s^{-1} kayma hızlarında ve düşük yoğunluklarda (<%0,3) Newtonian davranışına sahip olduğunu bildirmişlerdir.



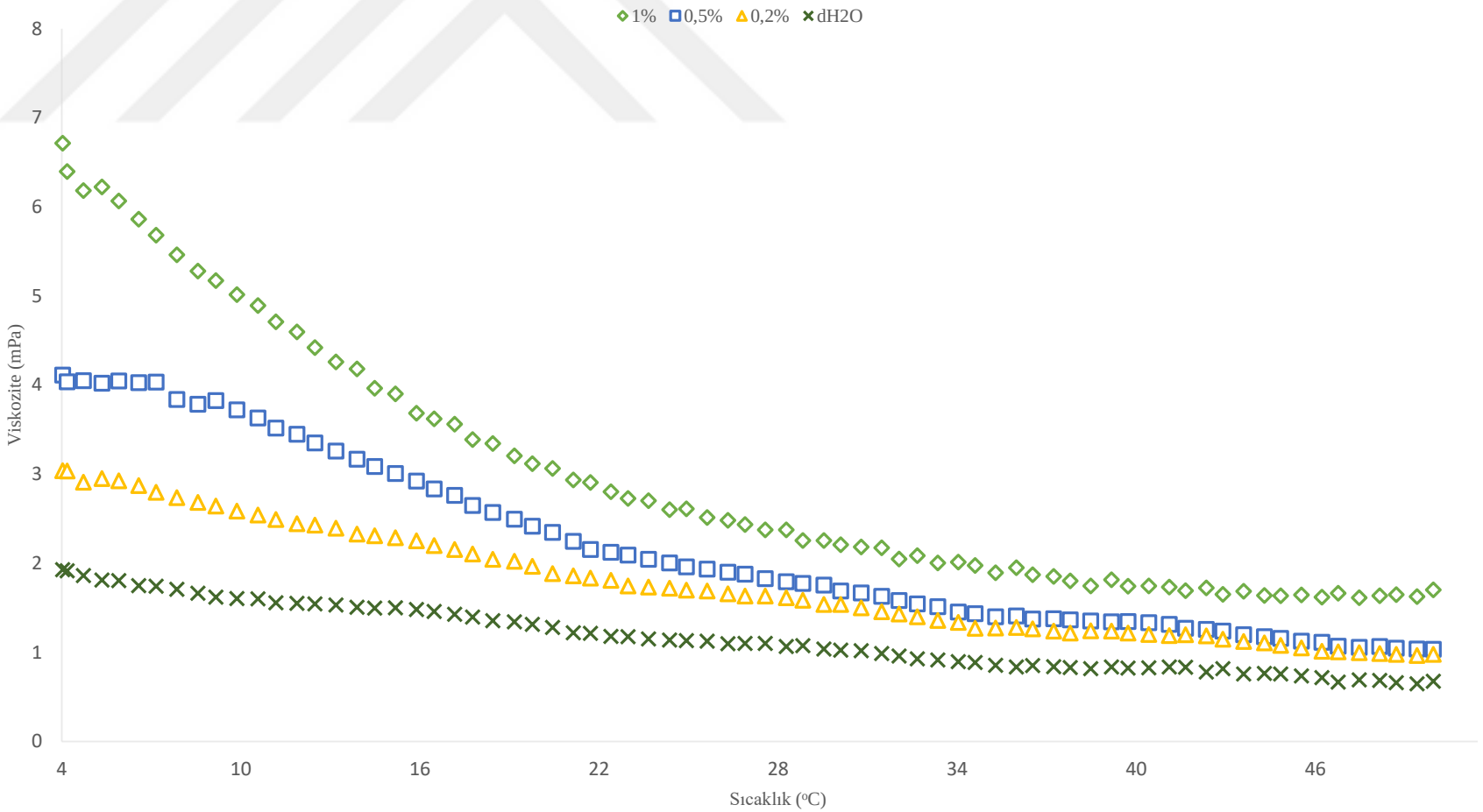
Şekil 21. A. pushchinoensis G11'in EPS ürettiği, farklı sıcaklıklardaki ham ekstraktın farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim.



Şekil 22. A. pushchinoensis G11'in EPS ürettiği, farklı sıcaklıklardaki etanolle yoğunlaştırılmış ekstraktın farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim.



Şekil 23. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin farklı kayma hızlarında viskozitesindeki değişim (kontrol olarak saf su ve %0,2'lik CMC kullanılmıştır).

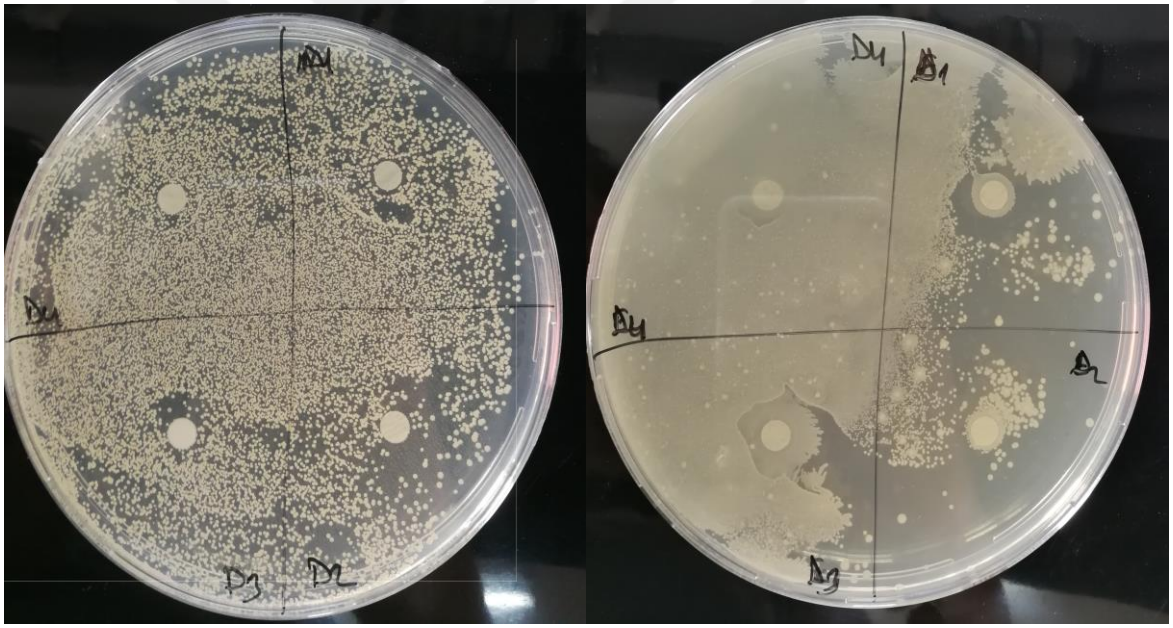


Şekil 24. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin sabit kayma hızında (50 s^{-1}) sıcaklık taraması (kontrol olarak saf su kullanılmıştır).

Biyolojik Aktivite

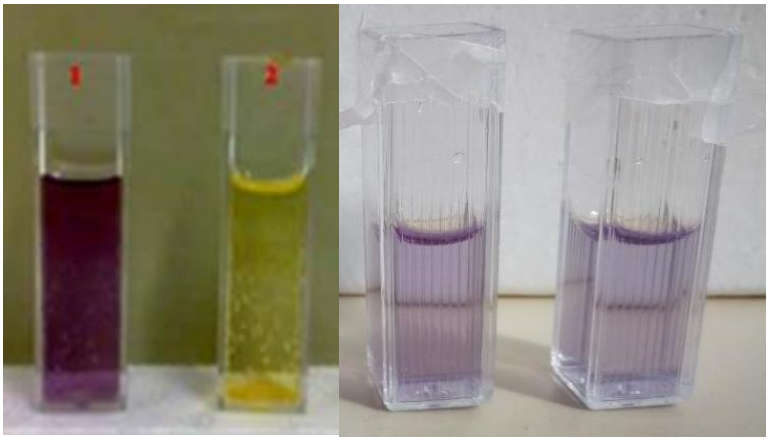
Mikrobiyal polisakkaritlerin birçok alanda olduğu gibi medikal ve farmasötik alanında kullanılmalarını sağlayan oldukça önemli özellikleri bulunmaktadır. Bunları belirleyebilmek için, dondurularak kurutulan EPS örneğinin %20'lik DMSO içerisinde son yoğunluğu 0,01, 0,25, 1, 1,25 ve 2,5 mg/mL olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve bu örneklerin antimikrobiyal, antioksidan, antibiyofilm aktiviteleri ve kanser hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin ilk aşamasında, disk difüzyon yöntemi uygulanmış ancak kullanılan standart patojen bakterilere (*S. enteritidis* ATCC13076, *A. hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883) karşı herhangi bir antibakteriyel aktivitenin varlığı gözlemlenememiştir (Şekil 25). İkinci aşamada ise, *C. albicans* ATCC 10231'e karşı antifungal aktivite belirlenmeye çalışılmış ancak herhangi bir antifungal aktiviteye rastlanılmamıştır.



Şekil 25. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (soldaki; E. coli O157:H7 35150, sağdaki; S. typhimurium ATCC 23566)

Zhang et al. (2018); *B. amyloliquefaciens*'in ürettiği ve gümüş nanopartiküllere immobilize edilen levanın *S. aureus* ve *E. coli*'nin büyümesini inhibe edebildiğini bildirmişlerdir. *B. vallismortis* WF4'den elde edilen EPS; *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite sergileyebildiğini rapor etmişlerdir (Song et al. 2019)



Şekil 26. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin DPPH antioksidan tayin yöntemi sonuçları [1 pozitif kontrol; , 2; kör (Mowsumi et al. 2015)].

A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin antioksidan aktivitesini belirlemek için hem DPPH hem de FRAP analizi gerçekleştirilmiştir ancak her ikisinde de negatif sonuç alınmış ve antioksidan aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 26). Kanmani *et al.* (2013); *E. faecium* MC13'den elde edilen EPS'nin askorbik aside oranla çok düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiş, Lobo *et al.* (2019); süt tozunun büyüme ortamına eklendiği koşulda *S. thermophilus* CRL1190'un ürettiği EPS'nin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, halofilik termotolerant *H. nitroreducens* WB1'in güçlü antioksidan aktiviteye sahip polisakkarit üreticisi olduğunu rapor etmişlerdir (Chikkanna et al. 2018)

Tablo 10. *A. pushchinoensis G11'in Ürettiği EPS'nin Standart Suşlara Karşı Antibiyofilm Aktiviteleri*

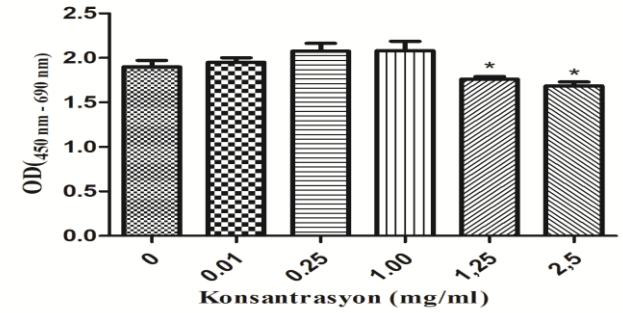
Standart suş	Antibiyofilm aktivite (% İnhibisyon)
S. enteritidis ATCC13076	4,31 (±0,51)
A. hydrophila ATCC 35654	-
E. coli ATCC 25922	4,29 (±0,50)
S. aureus ATCC 25923	10,46 (±1,1)
B. subtilis ATCC 6633	6,85 (±1,67)
P. aeruginosa ATCC 27853	-
C. albicans ATCC 10231	5,28 (±1,28)
K. pneumoniae ATCC 13883	6,86 (±0,75)

Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi için, *S. enteritidis* ATCC13076, *A. hydrophila* ATCC 35654, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları ile biyofilm inhibisyonu üzerinden antibiyofilm aktivite ölçülmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 10'da verilmiş olup; *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin öncesi *S. enteritidis* ATCC13076, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 10231 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883'ya karşı antibiyofilm aktiviteye

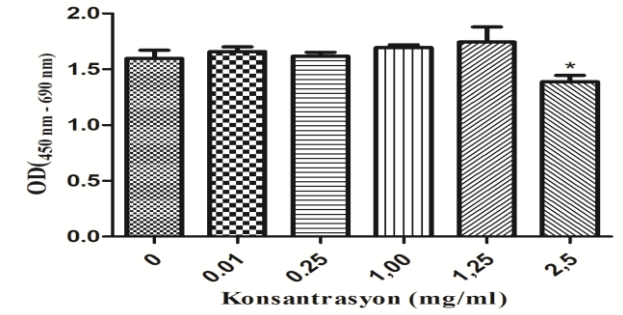
sahip olduğu belirlenmiştir. *A. hydrophila* ATCC 35654 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853'ya karşı antibiyofilm aktivite gösteremediği belirlenmiştir. Abid *et al.* (2019); *B. tequilensis* GM suşundan izole ettikleri EPS'nin *E. faecalis, E. coli* ve *L. monocytogenes*'e karşı antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Tüm patojenik suşlar için inhibisyon ve degredasyon oranlarının 1 mg/mL'nin üstündeki yoğunluk değerlerinde sabit olduğu görülmüş olup; en yüksek inhibisyon oranı E. *faecalis*'e karşı % 89,9 iken; en yüksek degredasyon oranı E. *coli*'ye karşı % 81,7 olarak bildirilmiştir. Spanò *et al.* (2016); termofilik *B. licheniformis* T14'den elde edilen EPS'nin *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* ve *S. aureus*'e karşı konsantrasyona bağlı olarak antibiyofilm inhibisyonu gösterdiğini ve polisakkaritin sahip olduğu antibiyofilm aktivitenin patojenik suşa göre de değişebileceğini belirtmişlerdir. Kanmani *et al.* (2013); *E. faecium* MC13'ün ürettiği polisakkaritin *L. monocytogenes, S. typhi, P. aeroginosa, B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı biyofilm inhibisyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek inhibisyon oranı *L. monocytogenes*' e karşı belirlenirken; en düşük inhibisyon etkisinin *P. aeroginosa*'ya karşı olduğu gözlemlenmiştir.

Antitümör aktivitenin belirlenebilmesi için, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan EPS örneklerinin; akciğer (A-549), kolon (Caco-2 ve HT-29) ve nöroblastom (SHSY-5Y) hücre hatları üzerinde WST-1 kiti kullanılarak kanser hücrelerinin inhibisyonu belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 27'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin sitotoksik etkisi A-549, Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarında konsantrasyondan bağımsız olarak (dose-independent) gerçekleşmiştir. Ancak, SHSY-5Y hücre hattında beklenen sitotoksik etkinin aksine, EPS'nin konsantrasyon bağımlı olarak indükleyici etkisi ortaya çıkmıştır. A-549, Caco-2 ve HT-29 hücre hatları için sitotoksik etki 2,5 mg/mL yoğunlukta ortaya çıkarken, SHSY-5Y hücre hattı için indükleyici etki 1,25 mg/mL yoğunlukta belirginleşmeye başlamış ve 2,5 mg/mL yoğunlukta en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

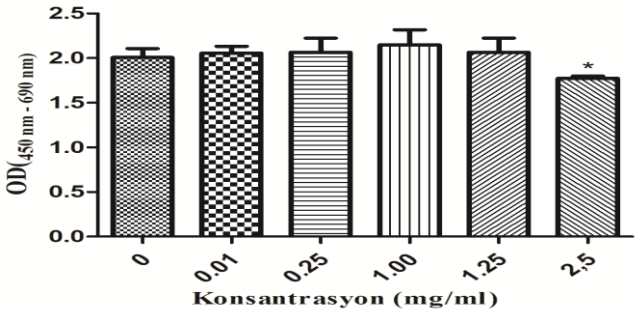
Arena *et al.* (2009); *G. thermodenitrificans* B3-72'den elde edilen EPS'nin insan periferik kan mononükleer normal hücreleri üzerinde farklı yoğunluklarda (1; 0,8; 0,6; 0,5; 0,4 ve 0,3 mg/mL) sitotoksik etkisini incelemişler ve sağlıklı hücrelerin üzerinde sırasıyla %51, 40, 29, 12 ve 4 inhibisyon gözlemlemişlerdir. Kambourova *et al.* (2009); *G. tepidamans* V264'ün ürettiği EPS'nin avarol tarafından oluşturulan sitotoksisitenin inhibisyonu üzerine etkisini incelemişler ve bu biyopolimerin anti-sitotoksik bir bileşik olduğu bildirilmişlerdir. Yildiz *et al.* (2014); termofilik *B. thermoruber* 423'ün ürettiği EPS'nin faklı yoğunluklarının (0,001-0,5 mg/mL); maymun böbrek fibroblast hücre hattı (Cos-7) üzerindeki hücre canlılığını WST-1 testi ile belirlemişler ve EPS yoğunluğu arttıkça hücre canlılığının da azaldığını bildirmişlerdir.



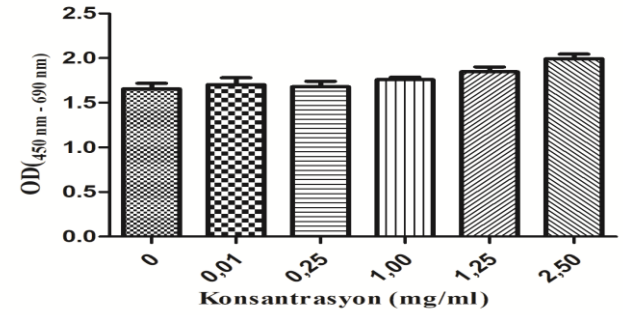
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 27. A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin (a) A-549 (b) Caco-2 (c) HT-29 ve (d) SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki antitümör aktivitesi (0 mg/ml kontrol grubudur. Veriler ortalama ± standart sapma olarak hesaplanmıştır. $p<0.05$)

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, farklı termal kaynaklardan su ve çamur örnekleri toplanmış ve EPS üretebilen bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örnek toplanan kaplıcalardan 29 adet izolatın EPS üretebilme yeteneğinde olması, bu sıcak su kaynaklarını dikkat çekici hale getirmiş ve Türkiye'nin ulusal ve uluslararası alanda EPS üretimi için önemli bir mikrobiyal rezerv olabilme potansiyelini göstermiştir. Elde edilen izolatların, EPS üretimleri sırasında mikrobiyal büyümeleri takip edilmiş ve izolatlar arasında birbirinden farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Ancak, tüm sonuçların ortak noktası; örnek toplanan kaplıcalardan izole edilen mikrobiyal polisakkarit üreticileri için mikrobiyal büyüme ile EPS üretiminin her zaman doğrusal bir ilişkisinin olmadığıdır.

En iyi EPS üretebilme yeteneğindeki izolat, moleküler tekniklerle *A. pushchinoensis* G11 olarak belirlenmiştir ve *A. pushchinoensis*'in EPS üretimi üzerine daha önceden yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Termofilik ve alkalifilk *A. pushchinoensis* G11, ayrıca birçok antibiyotiğe karşı hassasiyet göstermiş ancak, ilk defa bir antibiyotiğe, Sulfamethoxazole'e karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Antibiyotik hassasiyeti, mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek için önemli parametrelerden biridir ve *A. pushchinoensis* G11'in Sulfamethoxazole antibiyotiğine karşı oluşan dirençliliğinin önemli bir araştırma konusu olabileceği düşünülmektedir.

A. pushchinoensis G11'in ürettiği polisakkaritin heteropolisakkarit yapıda olduğu belirlenmiştir. Nükleik asit içermediği tespit edilen EPS; %93 karbonhidrat ve %1,08 protein içermektedir. Protein yapının varlığı, hem görünür bölgedeki spektrum taraması hem de kızılötesi spektroskopisinde bağ analizi ile belirlenmiştir. Karbonhidrat bileşenlerini belirlemek için yapılan HPLC analizi neticesinde; EPS'nin polisakkarit omurgasının; arabinoz (%56,6), früktoz (%26,4), glikoz (%11,7) ve galaktoz (%5,3)'dan oluştuğu tespit edilmiştir.

A. pushchinoensis G11'den elde edilen polisakkaritin sadece polar aprotik bir çözücü olan DMSO içerisinde çözünebildiği gözlemlenmiştir. DMSO; yüksek erime noktasına (18°C) sahip bir çözücü olduğu için, direk kullanımı ilerleyen analizler için uygun görülmemiş ve seyreltik hali çözücü olarak kullanılmıştır. Çözücünün DMSO olmasından dolayı, molekül ağırlığının belirlenmesi için kullanılan ileri analiz teknikleri (kütle spektroskopisi, ışık saçılımı vs..) ile çalışılamamıştır. Bunun yerine, viskozite ile molekül ağırlığının ilişkisinden yola çıkılmış ve molekül ağırlığı hassas ölçümlerle reometre cihazında gerçekleştirilen analizler ile

belirlenmiştir. *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin iç viskozite ve molekül ağırlığı değerleri literatürle uyumlu bulunmuştur

A. pushchinoensis G11'in ürettiği EPS'nin termal özellikleri incelendiğinde çok yüksek sıcaklıklarda dahi belirgin oranda parçalanmadan kalabildiği ve termal kararlılık gösterdiği belirlenmiştir ve bu durum, EPS'nin endüstriyel koşullarda karşılaşılan değişken sıcaklık durumlarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Kimyasal bağ yapılarının belirlendiği Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizinde dikkat çeken bir diğer sonuç ise, sülfat esterinin varlığını işaret eden bağ titreşimi olmuştur. Bu durum, ekstrakte edilen ve dondurularak kurutulan EPS örneğinin sadece DMSO içerisinde çözünmesinin sebebini aydınlatmıştır.

İleri yapısal analiz sonuçlarına göre *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS hem kristal hem de amorf yapıyı birlikte içermektedir ki bu sonuç, taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntülerle doğrulanmıştır. SEM analizine göre; üretilen polisakkarit kapsüler polisakkaritlerden farklı olarak hücre yüzeyine hiçbir şekilde tutunmadan direkt ortama salınmakta yani mukoid yapıda mikrobiyal polisakkarittir.

Akış davranışı incelendiği zaman, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin değişen kayma hızlarına karşılık Newtonian tipi davranış göstermiştir. Hâlihazırda *Anoxybacillu*s türlerinden EPS elde edilen çalışmalar bulunmakta ancak reolojik değerlendirmesi bulunmamaktadır. Bu sebeple, bu çalışma *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin ilk reolojik değerlendirmesidir. Çoğunlukla psöudo-plastik özellik gösteren EPS'lerin aksine *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS Newtonian akış göstermiştir.

Bir polimere ait iç viskozite değerinin yükselmesi neticesinde, daha yüksek görünür viskozite değerleri elde edilmektedir ve bu durum, daha düşük EPS yoğunluğu kullanmayı beraberinde getirmektedir. Bakteriyel EPS'lerin sıvı kültürde üretimi beraberinde fermentasyon sıvısının viskozitesinde artışa neden olabilmektedir. Ancak bu artış aynı zamanda havanın homojen olmayan dağılımına da en önemli sebeptir. Bu durumda oksijen mikrobiyal büyüme için kısıtlayıcı bir faktör haline gelmekte ve EPS üretimini ve kalitesini olumsuz etkilemektedir. Endüstriyel uygulamalarda kısıtlayıcı parametre olduğu için ne çok yüksek ne de çok düşük viskozite değerleri istenmemektedir. Dolayısıyla, *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS'nin, viskoziteye olan olumlu etkisinden dolayı endüstriyel anlamda kullanıma oldukça elverişli olduğu düşünülmüştür.

Farklı kaynaklardan izole edilen bakteriyel EPS'lerin medikal alanlarda kullanılmalarını sağlayan değerli özellikler barındırdıkları bildirilmiştir. Bunlar arasında özellikle düşük

molekül ağırlıklı ve sülfat içerikli mikrobiyal polisakkaritler dikkat çekmektedir. *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği EPS ise antibiyofilm ve antitümör aktivite gösterebilmiş, sülfat içerikli ve düşük molekül ağırlıklı bir polimerdir ve medikal alanda kullanım için önemli bir potansiyel barındırdığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; *A. pushchinoensis* G11'in ürettiği heteropolisakkarit, farklı ve değişken koşullara uyum sağlayabilecek, özellikle akış ve sıcaklık uygulamalarının temel alındığı farklı endüstriyel proseslerde kararlılık gösterebilecek bir polimer olup, gıda, medikal ve farmasötik alanlarda kullanılabilirliği yüksektir. Ayrıca, gıdalarda viskoziteyi artırma, stabilizasyonu sağlama ve su bağlama gibi fonksiyonel özellikler sağladığı için, EPS üreten *A. pushchinoensis* G11'in kullanımı bazı durumlarda ticari stabilizerlere karşı bir alternatif oluşturabilir. Ayrıca bu EPS, Türkiye'nin global EPS üretimine önemli bir kaynak oluşturabilecek endüstriyel potansiyeli bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

Abid, Y. Azabou S. Casillo A. Gharsallah H. Jemil N. Lanzetta R. Attia H. Corsaro M. M., 2019. Isolation and structural characterization of levan produced by probiotic *Bacillus tequilensis* GM from Tunisian fermented goat milk. International Journal of Biological Macromolecules, 133, 786-794.

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

Adiguzel, A. Inan K. Şahin F. Arasoglu T. Gulluce M. Belduz A. O. Baris O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). Turkish Journal of Biology, 35 (3), 267-274.

Agrawal, N. Minj D. K. Rani K., 2015. Estimation of total carbohydrate present in dry fruits. IOSR-Journal of Environmental Science,Toxicology and Food Technology, 1, 24-27.

Aguilar, A., 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. FEMS Microbiology Reviews, 18 (2-3), 89-92.

Ahmad, N. Muhammadi, 2007. Characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus* strain CMG1447. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 29 (4), 346-351.

Ai, L. Zhang H. Guo B. Chen W. Wu Z. Wu Y., 2008. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. Carbohydrate Polymers, 74 (3), 353-357.

Albayrak, S. Genc B. Ozkan H. Taskin M. Adiguzel A., 2019. Presence of different bacterial species in thermal sources and novelty in their industrial enzyme productions. Journal of Pure and Applied Microbiology, 13 (3), 1375-1387.

Alves, V. D. Freitas F. Torres C. A. Cruz M. Marques R. Grandfils C. Gonçalves M. Oliveira R. Reis M. A., 2009. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. Carbohydrate Polymers, 81 (4), 758-764.

Angel, J. S. Vidyadharani G. Santhosh S. Dhandapani R., 2018. Optimization and characterisation of thermo stable exopolysaccharide produced from *Bacillus licheniformis* WSF-1 strain. Journal of Polymers and the Environment, 26 (9), 3824-3833.

Antón, J. Meseguer I. Rodriguez-Valera F., 1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. Applied and Environmental Microbiology, 54 (10), 2381-2386.

Aragno, M., 1992. Aerobic, chemolithoautotrophic, thermophilic bacteria. Thermophilic bacteria. J. K. Kristjansson. Iceland, CRC Press LLC: 77-103.

Araud-Razou, I. Vasse J. Montrozier H. Etchebar C. Trigalet A., 1998. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solancearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. European Journal of Plant Pathology, 104 (8), 795-809.

Arena, A. Gugliandolo C. Stassi G. Pavone B. Iannello D. Bisignano G. Maugeri T. L., 2009. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. Immunology Letters, 123 (2), 132-137.

Arslan, S., 2017. Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Erzurum.

Baltaci, M. O. Adiguzel A., 2016. Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. Research Journal of Biotechnology, 11 (2), 32-38.

Banerjee, A. Rudra S. G. Mazumder K. Nigam V. Bandopadhyay R., 2018. Structural and functional properties of exopolysaccharide excreted by a novel *Bacillus anthracis* (strain PFAB2) of hot spring origin. Indian Journal of Microbiology, 58 (1), 39-50.

Batchelor, G., 2000. An introduction to fluid dynamics. Place Cambridge university press, 609 p, Cambridge University Press

Becerra, F. Y. G. Acosta E. J. Allen D. G., 2010. Alkaline extraction of wastewater activated sludge biosolids. Bioresource Technology, 101 (18), 6972-6980.

Becker, A. Katzen F. Pühler A. Ielpi L., 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Applied Microbiology and Biotechnology, 50 (2), 145-152.

Bekers, M. Upite D. Kaminska E. Laukevics J. Grube M. Vigants A. Linde R., 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry, 40 (5), 1535-1539.

Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, 27 (2), 573.

Benzie, I. F. Szeto Y., 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (2), 633-636.

Berekaa, M. M. Ezzeldin M. F., 2018. Exopolysaccharide from *Bacillus mojavensis* DAS10-1; production and characterization. Journal of Pure and Applied Microbiology, 12 (2), 633-640.

Bermpohl, A. Dreier J. Bahro R. Eichenlaub R., 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp michiganensis with tomato plants. Microbiological Research, 151 (4), 391-399.

Beveridge, T., 2001. Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic & Histochemistry, 76 (3), 111-118.

Blanc, M. Marilley L. Beffa T. Aragno M., 1999. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. FEMS Microbiology Ecology, 28 (2), 141-149.

Broadbent, J. R. McMahon D. J. Welker D. L. Oberg C. J. Moineau S., 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. Journal of Dairy Science, 86 (2), 407-423.

Calazans, G. Lopes C. Lima R. De Franc F., 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnology Letters, 19 (1), 19-21.

Carrión, O. Delgado L. Mercade E., 2015. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. Carbohydrate Polymers, 117, 1028-1034.

Caruso, C. Rizzo C. Mangano S. Poli A. Di Donato P. Finore I. Nicolaus B. Di Marco G. Michaud L. Lo Giudice A., 2018. Production and biotechnological potential of extracellular polymeric substances from sponge-associated antarctic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 84 (4), 1-18.

Casillo, A. Parrilli E. Sannino F. Mitchell D. E. Gibson M. I. Marino G. Lanzetta R. Parrilli M. Cosconati S. Novellino E. Randazzo A. Tutino M. L. Corsaro M. M., 2017. Structure-activity relationship of the exopolysaccharide from a psychrophilic bacterium: A strategy for cryoprotection. Carbohydrate Polymers, 156, 364-371.

Catley, B. J. McDowell W., 1982. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. Carbohydrate Research, 103 (1), 65-75.

Cerning, J. Renard C. Thibault J. Bouillanne C. Landon M. Desmazeaud M. Topisirovic L., 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Applied and Environmental Microbiology, 60 (11), 3914-3919.

Cheesbrough, M., 2006. District laboratory practice in tropical countries. Place Cambridge university press, 440 p,

Chen, B. L. You W. L. Huang J. Yu Y. Chen W. P., 2010. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26 (5), 833-840.

Chen, J. R. Lee S. M. Mao Y., 2004. Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157 : H7 to osmotic and oxidative stress. International Journal of Food Microbiology, 93 (3), 281-286.

Chen, Y. Mao W. J. Tao H. W. Zhu W. M. Qi X. H. Chen Y. L. Li H. Y. Zhao C. Q. Yang Y. P. Hou Y. J. Wang C. Y. Li N., 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. Bioresource Technology, 102 (17), 8179-8184.

Chhabra, R. P., 2010. Non-newtonian fluids: an introduction. Rheology of complex fluids. J. M. KrishnanA. P. Deshpande and P. B. S. Kumar. New York, NY, Springer New York: 3-34.

Chiang, W. C. Nilsson M. Jensen P. O. Hoiby N. Nielsen T. E. Givskov M. Tolker-Nielsen T., 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57 (5), 2352-2361.

Chidambaram, J. S. C. A. Veerapandian B. Sarwareddy K. K. Mani K. P. Shanmugam S. R. Venkatachalam P., 2019. Studies on solvent precipitation of levan synthesized using *Bacillus subtilis* MTCC 441. Heliyon, 5 (9), e02414.

Chikkanna, A. Ghosh D. Kishore A., 2018. Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. PeerJ, 6, e4684.

Chowdhury, S. R. Basak R. K. Sen R. Adhikari B., 2011. Characterization and emulsifying property of a carbohydrate polymer produced by *Bacillus pumilus* UW-02 isolated from waste water irrigated agricultural soil. International Journal of Biological Macromolecules, 48 (4), 705-712.

Cihan, A. C. Karaca B. Ozel B. P. 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.

Cihan, A. C. Koc M. Ozcan B. Tekin N. Cokmus C., 2014. *Thermolongibacillus altinsuensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermolongibacillus kozakliensis* sp. nov., aerobic, thermophilic, long bacilli isolated from hot springs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64 (1), 187-197.

Cockerill, F. Wikler M. Alder J. Dudley M. Eliopoulos G. Ferraro M. Hardy D. Hecht D. Hindler J. Patel J., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. Place Clinical and Laboratory Standards Institute, 47 p,

Comte, S. Guibaud G. Baudu M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. Enzyme and Microbial Technology, 38 (1-2), 237-245.

Conover, M. S. Mishra M. Deora R., 2011. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. PloS One, 6 (2), e16861.

Dahech, I. Fakhfakh J. Damak M. Belghith H. Mejdoub H. Belghith K. S., 2013. Structural determination and NMR characterization of a bacterial exopolysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules, 59, 417-422.

Dai, J. Liu Y. Lei Y. Gao Y. Han F. Xiao Y. Peng H., 2011. A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. yunnanensis ssp. nov. with very high ethanol tolerance. FEMS Microbiology Letters, 320 (1), 72-78.

Degeest, B. de Vuyst L., 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Applied and Environmental Microbiology, 65 (7), 2863-2870.

Dogan, N. M. Doganli G. A. Dogan G. Bozkaya O., 2015. Characterization of extracellular polysaccharides (EPS) produced by thermal *Bacillus* and determination of environmental conditions affecting exopolysaccharide production. International Journal of Environmental Research, 9 (3), 1107-1116.

Domínguez, L. Rodríguez M. Prats D., 2010. Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: influence of extraction methods over three-dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. Desalination, 261 (1-2), 19-26.

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

Du, R. Qiao X. Zhao F. Song Q. Zhou Q. Wang Y. Pan L. Han Y. Zhou Z., 2018. Purification, characterization and antioxidant activity of dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* from homemade wine. Carbohydrate Polymers, 198, 529-536.

Duboc, P. Mollet B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal, 11 (9), 759-768.

Dunne, W. M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clinical Microbiology Reviews, 15 (2), 155-166.

Dwek, R. A., 1996. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. Chemical Reviews, 96 (2), 683-720.

Eliopoulos, G. M. Huovinen P., 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clinical Infectious Diseases, 32 (11), 1608-1614.

Ertuğrul, S. Dönmez G. Takaç S., 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazardous Materials, 149 (3), 720-724.

Farina, J. Sineriz F. Molina O. Perotti N., 1998. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: influence of medium composition. Biotechnology Letters, 20 (9), 825-831.

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

Freitas, F. Alves V. D. Carvalheira M. Costa N. Oliveira R. Reis M. A., 2009. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. Carbohydrate Polymers, 78 (3), 549-556.

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

Gaignard, C. Laroche C. Pierre G. Dubessay P. Delattre C. Gardarin C. Gourvil P. Probert I. Dubuffet A. Michaud P., 2019. Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers. Algal Research, 44, 101711.

Gaignard, C. Macao V. Gardarin C. Rihouey C. Picton L. Michaud P. Laroche C., 2018. The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer. Journal of Applied Phycology, 30 (5), 2803-2814.

Gallo, N. Nasser H. Salvatore L. Natali M. L. Campa L. Mahmoud M. Capobianco L. Sannino A. Madaghiele M., 2019. Hyaluronic acid for advanced therapies: promises and challenges. European Polymer Journal, 117, 134-147.

Gänzle, M. Follador R., 2012. Metabolism of oligosaccharides and starch in *Lactobacilli*: a review. Frontiers in Microbiology, 3 (340), 1-15.

Garcıa-Ochoa, F. Santos V. Casas J. Gomez E., 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances, 18 (7), 549-579.

Gaur, R. Singh R. Gupta M. Gaur M. K., 2010. *Aureobasidium pullulans,* an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. African Journal of Biotechnology, 9 (47), 7989-7997.

Gauthier, G. Gauthier M. Christen R., 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas, Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45 (4), 755-761.

Ge, H. M. Zhang J. Zhou X. P. Xia L. Hu C. X., 2014. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polymeric substances from *Microcoleus vaginatus* (*Cyanophyceae*). Phycologia, 53 (2), 167-173.

Genc, B. Nadaroglu H. Adiguzel A. Baltaci O., 2015. Purification and characterization of an extracellular cellulase from *Anoxybacillus gonensis* O9 isolated from geothermal area in Turkey. Journal of Environmental Biology, 36 (6), 1319-1324.

Giavasis, I. Harvey L. M. McNeil B., 2000. Gellan gum. Critical Reviews in Biotechnology, 20 (3), 177-211.

Glasel, J., 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. Biotechniques, 18 (1), 62-63.

Glenn, S. A. Gurich N. Feeney M. A. González J. E., 2007. The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in Sinorhizobium meliloti. Journal of Bacteriology, 189 (19), 7077-7088.

Goh, K. M. Kahar U. M. Chai Y. Y. Chong C. S. Chai K. P. Ranjani V. Illias R. M. Chan K.-G., 2013. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (4), 1475-1488.

Goo, B. G. Baek G. Choi D. J. Park Y. I. Synytsya A. Bleha R. Seong D. H. Lee C. G. Park J. K., 2013. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology, 129, 343-350.

Goyal, N. Gupta J. Soni S., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology, 37 (7), 723-734.

Gruyer, S. Legin E. Bliard C. Ball S. Duchiron F., 2002. The endopolysaccharide metabolism of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus hydrothermalis* : polymer structure and biosynthesis. Current Microbiology, 44 (3), 206-211.

Guagliardi, A. Martino M. Iaccarino I. De Rosa M. Rossi M. Bartolucci S., 1996. Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase from a novel strain of *Bacillus stearothermophilus* growing at 70 C. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 28 (2), 239-246.

Gugliandolo, C. Maugeri T. L. Caccamo D. Stackebrandt E., 2003. *Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy). Systematic and Applied Microbiology, 26 (2), 172-176.

Haggag, W. M., 2007. Colonization of exopolysaccharide-producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. African Journal of Biotechnology, 6 (13), 1568-1577.

Haki, G. Rakshit S., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89 (1), 17-34.

Han, Y. Liu E. Liu L. Zhang B. Wang Y. Gui M. Wu R. Li P., 2015. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. Carbohydrate Polymers, 115, 230-237.

Handayani, D. Rachma A. Marliyana S., 2019. Synthesis of copoly-(eugenol-stearyl acrylate) via cationic polymerization. Journal of Physics: Conference Series, 1153 (1), 1-9.

Hernández-González, A. C. Téllez-Jurado L. Rodríguez-Lorenzo L. M., 2019. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: a review. Carbohydrate Polymers, 115514.

Hoa, P. Nair L. Visvanathan C., 2004. The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. Water SA, 29 (4), 437-442.

Hu, X. Pang X. Wang P. G. Chen M., 2019. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. Carbohydrate Polymers, 204, 9-16.

Huang, W.-C. Chen S.-J. Chen T.-L., 2008. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. Biochemical Engineering Journal, 40 (3), 460-464.

Insulkar, P. Kerkar S. Lele S., 2018. Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. International Journal of Biological Macromolecules, 120, 1441-1450.

Islam, M. U. Ullah M. W. Khan S. Shah N. Park J. K., 2017. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. International Journal of Biological Macromolecules, 102, 1166-1173.

Jennings, L. K. Storek K. M. Ledvina H. E. Coulon C. Marmont L. S. Sadovskaya I. Secor P. R. Tseng B. S. Scian M. Filloux A. Wozniak D. J. Howell P. L. Parsek M. R., 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112 (36), 11353-11358.

Jin, L.-H. Um H.-J. Yin C.-J. Kim Y.-H. Lee J.-H., 2008. Proteomic analysis of curdlan-producing *Agrobacterium* sp. in response to pH downshift. Journal of Biotechnology, 138 (3-4), 80-87.

Kacagan, M. Canakci S. Sandalli C. Inan K. Colak D. N. Belduz A. O., 2008. Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. Biologia, 63 (5), 599-606.

Kalogiannis, S. Iakovidou G. Liakopoulou-Kyriakides M. Kyriakidis D. A. Skaracis G. N., 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. Process Biochemistry, 39 (2), 249-256.

Kambourova, M. Mandeva R. Dimova D. Poli A. Nicolaus B. Tommonaro G., 2009. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. Carbohydrate Polymers, 77 (2), 338-343.

Kanmani, P. Suganya K. Yuvaraj N. Pattukumar V. Paari K. Arul V., 2013. Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. Applied Biochemistry and Biotechnology, 169 (3), 1001-1015.

Kasapis, S. Morris E. R. Gross M. Rudolph K., 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. Carbohydrate Polymers, 23 (1), 55-64.

Kevbrin, V. V. Zengler K. Lysenko A. M. Wiegel J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. Extremophiles, 9 (5), 391-398.

Khanafari, A. Sepahei A. A., 2007. Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from whey degradation. International Journal of Environmental Science and Technology, 4 (4), 427-432.

Koutsoudis, M. D. Tsaltas D. Minogue T. D. von Bodman S. B., 2006. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii subspecies stewartii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (15), 5983-5988.

Kristjansson, M. M. Asgeirsson B., 2002. Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology Handbook of Food Enzymology. J. R. WhitakerD. W. Wong and A. G. Voragen, CRC Press: 92-115.

Krylova, T. Y. Popova L. Y. Pechurkin N. Kashperova T. Belyavskaya V., 2000. Population heterogeneity of plasmid-bearing and plasmid-free *Bacillus subtilis* strains under different environmental conditions. Microbiology, 69 (2), 220-224.

Kumar, A. S. Mody K., 2009. Microbial Exopolysaccharides: Variety and Potential Applications. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. B. H. Rehm, Caister Academic Press.

Kumar, C. G. Joo H.-S. Choi J.-W. Koo Y.-M. 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.

Kurt, A. Kahyaoglu T., 2015. Rheological properties and structural characterization of salep improved by ethanol treatment. Carbohydrate Polymers, 133, 654-661.

Kwon, K. K. Lee H. S. Jung S.-Y. Yim J.-H. Lee J.-H. Lee H. K., 2002. Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. Journal of Microbiology, 40 (4), 260-266.

Lan, S. B. Wu L. Yang H. J. Zhang D. L. Hu C. X., 2017. A new biofilm based microalgal cultivation approach on shifting sand surface for desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. Bioresource Technology, 238, 602-608.

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

Lee, M. J. Geller A. M. Bamford N. C. Liu H. Gravelat F. N. Snarr B. D. Le Mauff F. Chabot J. Ralph B. Ostapska H. Lehoux M. Cerone R. P. Baptista S. D. Vinogradov E. Stajich J. E. Filler S. G. Howell P. L. Sheppard D. C., 2016. Deacetylation of fungal exopolysaccharide mediates adhesion and biofilm formation. Mbio, 7 (2), e00252-00216.

Lee, S. M. Chen J. R., 2004. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in set yogurt as influenced by the production of an exopolysaccharide, colanic acid. Journal of Food Protection, 67 (2), 252-255.

Lee, W. Y. Park Y. Ahn J. K. Ka K. H. Park S. Y., 2007. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. Enzyme and Microbial Technology, 40 (2), 249-254.

Li, J. Xu H. Chen X. Xu L. Cheng R. Zhang J. Wang S., 2017. Characterization of an exopolysaccharide with distinct rheological properties from *Paenibacillus edaphicus* NUST16. International journal of biological macromolecules, 105, 1-8.

Li, W. W. Zhou W. Z. Zhang Y. Z. Wang J. Zhu X. B., 2008. Flocculation behavior and mechanism of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. Bioresource Technology, 99 (15), 6893-6899.

Liang, T.-W. Wang S.-L., 2015. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities. Marine Drugs, 13 (4), 1847-1863.

Liang, X. Yang L. Zhang H. Zhang L., 2011. Isolation and characterization of a radiation resistant thermophilic bacterium from radon hot spring. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 25 (3), 488-493.

Liu, C. H. Lu J. Lu L. L. Liu Y. H. Wang F. S. Xiao M., 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. Bioresource Technology, 101 (14), 5528-5533.

Liu, H. Fang H. H., 2002. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. Biotechnology and Bioengineering, 80 (7), 806-811.

Liu, J. Wang X. Pu H. Liu S. Kan J. Jin C., 2017. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: production, structural characterization, physiological role and biological activity. Carbohydrate Polymers, 157, 1113-1124.

Lobo, R. E. Gómez M. I. de Valdez G. F. Torino M. I., 2019. Physicochemical and antioxidant properties of a gastroprotective exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CRL1190. Food Hydrocolloids, 96, 625-633.

Lu, Y. Lu H. Wang S. W. Han J. Xiang H. Jin C., 2017. An acidic exopolysaccharide from *Haloarcula hispanica* ATCC33960 and two genes responsible for its synthesis. Archaea, 1-12.

Luo, Z. Dai Y. Gao H., 2019. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery. Acta Pharmaceutica Sinica B, 9 (6), 1099-1112.

MacDonald-Wicks, L. K. Wood L. G. Garg M. L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86 (13), 2046-2056.

Madigan, M. T. Martinko J. M., 2012. Brock, mikroorganizmaların biyolojisi. Place Palme Yayıncılık, 143 p, Ankara

Mahapatra, S. Banerjee D., 2013. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. Carbohydrate Polymers, 97 (2), 627-634.

Malick, A. Khodaei N. Benkerroum N. Karboune S., 2017. Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 102, 539-549.

Manca, M. C. Lama L. Improta R. Esposito E. Gambacorta A. Nicolaus B., 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. Applied and Environmental Microbiology, 62 (9), 3265-3269.

Mancera, R. L. Chalaris M. Samios J., 2004. The concentration effect on the 'hydrophobic'and 'hydrophilic'behaviour around DMSO in dilute aqueous DMSO solutions. A computer simulation study. Journal of Molecular Liquids, 110 (1-3), 147-153.

Martina, V. Vojtech K., 2015. A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg's proteins. Proceedings of the Mendel Net, 394-398.

Maugeri, T. L. Gugliandolo C. Caccamo D. Panico A. Lama L. Gambacorta A. Nicolaus B., 2002a. A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. Biotechnology Letters, 24 (7), 515-519.

Maugeri, T. L. Gugliandolo C. Caccamo D. Stackebrandt E., 2002b. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. Systematic and Applied Microbiology, 25 (3), 450-455.

McIntosh, M. Stone B. A. Stanisich V. A., 2005. Curdlan and other bacterial (1→3)-β-d-glucans. Applied Microbiology and Biotechnology, 68 (2), 163-173.

Meng, G. Fütterer K., 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. Nature Structural & Molecular Biology, 10 (11), 935.

Miao, M. Ma Y. Jiang B. Huang C. Li X. Cui S. W. Zhang T., 2014. Structural investigation of a neutral extracellular glucan from *Lactobacillus reuteri* SK24.003. Carbohydrate Polymers, 106, 384-392.

Mishra, A. Jha B., 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. Bioresource Technology, 100 (13), 3382-3386.

Mitić, Ž. Cakić M. Nikolić G. M. Nikolić R. Nikolić G. S. Pavlović R. Santaniello E., 2011. Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper (II)-polysaccharide pullulan complexes by UV–vis, ATR-FTIR, and EPR. Carbohydrate Research, 346 (3), 434-441.

Mohamed, S. S. Amer S. K. Selim M. S. Rifaat H. M., 2018. Characterization and applications of exopolysaccharide produced by marine *Bacillus altitudinis* MSH2014 from Ras

Mohamed, Sinai, Egypt. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 5 (3), 204-209.

Moosavi-Nasab, M. Layegh B. Aminlari L. Hashemi S. M. B., 2010. Microbial production of levan using date syrup and investigation of its properties. World Academy of Science, Engineering and Technology, 68, 1238- 1244.

Moriello, V. S. Lama L. Poli A. Gugliandolo C. Maugeri T. Gambacorta A. Nicolaus B., 2003. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30 (2), 95-101.

Mowsumi, F. R. Rahaman A. Sarker N. C. Choudhury B. K. Hossain S., 2015. In vitro relative free radical scavenging effects of Calocybe indica (milky oyster) and Pleurotus djamor (pink oyster). World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4(07).

Muralidharan, J. Jayachandran S., 2003. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. Process Biochemistry, 38 (6), 841-847.

Namsaraev, Z. Babasanova O. Dunaevsky Y. Akimov V. Barkhutova D. Gorlenko V. Namsaraev B., 2010. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia. Microbiology, 79 (4), 491-499.

Ngamwongsatit, P. Banada P. P. Panbangred W. Bhunia A. K., 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. Journal of Microbiological Methods, 73 (3), 211-215.

Nicolaus, B. Kambourova M. Oner E. T., 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. Environmental Technology, 31 (10), 1145-1158.

Nicolaus, B. Lama L. Esposito E. Manca M. C. Gambacorta A. di Prisco G., 1996. *Bacillus thermoantarcticus* sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species. Polar Biology, 16 (2), 101-104.

Nicolaus, B. Lama L. Esposito E. Manca M. C. Improta R. Bellitti M. R. Duckworth A. W. Grant W. D. Gambacorta A., 1999. *Haloarcula* spp. able to biosynthesize exo- and endopolymers. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 23 (6), 489-496.

Nicolaus, B. Lama L. Panico A. Moriello V. S. Romano I. Gambacorta A., 2002. Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of Flegrean Ares (Italy). Systematic and Applied Microbiology, 25 (3), 319-325.

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

Nicolaus, B. Moriello V. S. Lama L. Poli A. Gambacorta A., 2004. Polysaccharides from extremophilic microorganisms. Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 34 (1-2), 159-169.

Nouha, K. Kumar R. S. Balasubramanian S. Tyagi R. D., 2018. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. Journal of Environmental Sciences, 66, 225-245.

O'Toole, G. Kaplan H. B. Kolter R., 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54 (1), 49-79.

Ozturk, S. Aslim B. Suludere Z., 2009. Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. Bioresource Technology, 100 (23), 5588-5593.

Panda, M. K. Sahu M. K. Tayung K., 2013. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. Iranian Journal of Microbiology, 5 (2), 159.

Parikh, A. Madamwar D., 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. Bioresource Technology, 97 (15), 1822-1827.

Parolis, H. Parolis L. A. Boán I. F. Rodríguez-Valera F. Widmalm G. Manca M. C. Jansson P.-E. Sutherland I. W., 1996. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). Carbohydrate Research, 295, 147-156.

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

Pedraza, M. C. C. Novais T. F. Faustoferri R. C. Quivey R. G. Terekhov A. Hamaker B. R. Klein M. I., 2017. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. Biofouling, 33 (9), 722-740.

Peng, J. Xu W. Ni D. Zhang W. Zhang T. Guang C. Mu W., 2019. Preparation of a novel water-soluble gel from *Erwinia amylovora* levan. International Journal of Biological Macromolecules, 122, 469-478.

Pérez, C. Agnese A. M. Cabrera J. L., 1999. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests. Journal of Ethnopharmacology, 66 (1), 91-96.

Pikuta, E. Lysenko A. Chuvilskaya N. Mendrock U. Hippe H. Suzina N. Nikitin D. Osipov G. 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. Cleland D., 2009. Genus IV. *Anoxybacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Williams & Wilkins Co, 134-141.

Pina, S. Oliveira J. M. Reis R. L., 2015. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review. Advanced Materials, 27 (7), 1143-1169.

Poli, A. Esposito E. Lama L. Orlando P. Nicolaus G. de Appolonia F. Gambacorta A. Nicolaus B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). Systematic and Applied Microbiology, 29 (4), 300-307.

Poli, A. Nicolaus B. Denizci A. A. Yavuzturk B. Kazan D., 2013. *Halomonas smyrnensis* sp nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide producing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 10-18.

Poli, A. Romano I. Cordella P. Orlando P. Nicolaus B. Berrini C. C., 2009. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. Extremophiles, 13 (6), 867-874.

Pollock, T. J., 2005. Sphingan group of exopolysaccharides (EPS). Biopolymers, 5, 239-257.

Powers, E. M., 1995. Efficacy of the ryu nonstaining KOH techniques for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts Applied and Environmental Microbiology, 61 (10), 3756-3758.

Prajapati, V. D. Jani G. K. Zala B. S. Khutliwala T. A., 2013. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. Carbohydrate Polymers, 93 (2), 670-678.

Prathyusha, A. Sheela G. M. Bramhachari P., 2018. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. Biotechnology Reports, 19, e00277.

Prescott, L. M. Harley J. P. Klein D. A., 2002. Laboratory exercises in microbiology. Place McGraw-Hill Companies, p,

Radchenkova, N. Panchev I. Vassilev S. Kuncheva M. Dobreva S. Kambourova M., 2015. Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. Journal of Applied Microbiology, 119 (5), 1301-1309.

Radchenkova, N. Tomova A. Kambourova M., 2011. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25 (sup1), 77-79.

Radchenkova, N. Vassilev S. Martinov M. Kuncheva M. Panchev I. Vlaev S. Kambourova M., 2014. Optimization of the aeration and agitation speed of *Aeribacillus palidus* 418 exopolysaccharide production and the emulsifying properties of the product. Process Biochemistry, 49 (4), 576-582.

Radchenkova, N. Vassilev S. Panchev I. Anzelmo G. Tomova I. Nicolaus B. Kuncheva M. Petrov K. 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.

Rafigh, S. M. Yazdi A. V. Vossoughi M. Safekordi A. A. Ardjmand M., 2014. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. International Journal of Biological Macromolecules, 70, 463-473.

Rangaswamy, V. Jain D., 2008. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*. Biotechnology Letters, 30 (3), 493-496.

Rani, R. P. Anandharaj M. Sabhapathy P. Ravindran A. D., 2017. Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. International Journal of Biological Macromolecules, 96, 1-10.

Reinhold, B. B. Chan S. Y. Reuber T. L. Marra A. Walker G. C. Reinhold V. N., 1994. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. Journal of Bacteriology, 176 (7), 1997-2002.

Rinker, K. D. Kelly R. M., 1996. Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 62 (12), 4478-4485.

Rinker, K. D. Kelly R. M., 2000. Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production for the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*. Biotechnology and Bioengineering, 69 (5), 537-547.

Roca, C. Lehmann M. Torres C. A. V. Baptista S. Gaudêncio S. P. Freitas F. Reis M. A. M., 2016. Exopolysaccharide production by a marine *Pseudoalteromonas* sp. strain isolated from Madeira Archipelago ocean sediments. New Biotechnology, 33 (4), 460-466.

Rosalam, S. England R., 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris* sp. Enzyme and Microbial Technology, 39 (2), 197-207.

Ryu, J. H. Beuchat L. R., 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157 : H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. Applied and Environmental Microbiology, 71 (1), 247-254.

Sagdic, O. Ozcan M., 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control, 14 (3), 141-143.

Sardari, R. R. Kulcinskaja E. Ron E. Y. Björnsdóttir S. Friðjónsson Ó. H. Hreggviðsson G. Ó. Karlsson E. N., 2017. Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. Carbohydrate Polymers, 156, 1-8.

Sari, B. Faiz O. Genc B. Sisecioglu M. Adiguzel A. Adiguzel G., 2018. New xylanolytic enzyme from *Geobacillus galactosidasius* BS61 from a geothermal resource in Turkey. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 1017-1026.

Schaffer, C. Scherf T. Christian R. Kosma P. Zayni S. Messner P. Sharon N., 2001. Purification and structure elucidation of the N-acetylbacillosamine-containing polysaccharide from *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. European Journal of Biochemistry, 268 (3), 857-864.

Schramm, G., 1994. A practical approach to rheology and rheometry. Place Gebrueder HAAKE GmbH p, Karlsruhe

Selbmann, L. Crognale S. Petruccioli M., 2002. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glucanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. Letters in Applied Microbiology, 34 (1), 51-55.

Senni, K. Pereira J. Gueniche F. Delbarre-Ladrat C. Sinquin C. Ratiskol J. Godeau G. Fischer A.-M. Helley D. Colliec-Jouault S., 2011. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. Marine Drugs, 9 (9), 1664-1681.

Seper, A. Fengler V. H. I. Roier S. Wolinski H. Kohlwein S. D. Bishop A. L. Camilli A. Reidl J. Schild S., 2011. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. Molecular Microbiology, 82 (4), 1015-1037.

Severina, L. O. Usenko I. A. Plakunov V. K., 1989. Biosynthesis of an exopolysaccharide by the extreme halophilic archaebacterium *Halobacterium mediterranei* Microbiology, 58 (4), 441-445.

Sheng, G.-P. Yu H.-Q. Yu Z., 2005. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila*. Applied Microbiology and Biotechnology, 67 (1), 125-130.

Shih, L. Yu J.-Y. Hsieh C. Wu J.-Y., 2009. Production and characterization of curdlan by *Agrobacterium* sp. Biochemical Engineering Journal, 43 (1), 33-40.

Shingel, K. I., 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. Carbohydrate Research, 339 (3), 447-460.

Siddiqui, N. N. Aman A. Silipo A. Ul Qader S. A. Molinaro A., 2014. Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohydrate Polymers, 99, 331-338.

Simionato, A. S. Navarro M. O. P. de Jesus M. L. A. Barazetti A. R. da Silva C. S. Simoes G. C. Balbi-Pena M. I. de Mello J. C. P. Panagio L. A. de Almeida R. S. C. Andrade G. de Oliveira A. G., 2017. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. Frontiers in Microbiology, 8, 1-9.

Simsek, S. Mert B. Campanella O. H. Reuhs B., 2009. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. Carbohydrate Polymers, 76 (2), 320-324.

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

Singh, R. P. Shukla M. K. Mishra A. Reddy C. R. K. Jha B., 2013. Bacterial extracellular polymeric substances and their effect on settlement of zoospore of *Ulva fasciata*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 103, 223-230.

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

Solomons, G. Fryhle C. Okay G. Yıldır Y., 2002. Organik Kimya, 7. basımdan Çeviri. Okay. G., Yıldırır, Y., Literatür yayıncılık, 583 (594), 604-609.

Son, C. Chung S. Lee J. Kim S., 2002. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. Journal of Microbiology and Biotechnology, 12 (5), 722-728.

Song, B. Zhu W. Song R. Yan F. Wang Y., 2019. Exopolysaccharide from *Bacillus vallismortis* WF4 as an emulsifier for antifungal and antipruritic peppermint oil emulsion. International Journal of Biological Macromolecules, 125, 436-444.

Spanò, A. Gugliandolo C. Lentini V. Maugeri T. L. Anzelmo G. Poli A. Nicolaus B., 2013. A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). Current Microbiology, 67 (1), 21-29.

Spanò, A. Laganà P. Visalli G. Maugeri T. L. Gugliandolo C., 2016. In vitro antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. Current Microbiology, 72 (5), 518-528.

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

Srikanth, R. Reddy C. H. S. Siddartha G. Ramaiah M. J. Uppuluri K. B., 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. Carbohydrate Polymers, 120, 102-114.

Stasinopoulos, S. J. Seviour R. J., 1990. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids Biotechnology and Bioengineering, 36 (8), 778-782.

Stern, R. Jedrzejas M. J., 2006. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. Chemical Reviews, 106 (3), 818-839.

Stoscheck, C. M., 1990. Quantitation of protein. Methods in Enzymology, 182, 50-68.

Stredansky, M. Conti E. Navarini L. Bertocchi C., 1999. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. Process Biochemistry, 34 (1), 11-16.

Sun, S. Zhang Z. Luo Y. Zhong W. Xiao M. Yi W. Yu L. Fu P., 2011. Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery. Bioresource Technology, 102 (10), 6153-6158.

Suresh Kumar, A. Mody K. Jha B., 2007. Bacterial exopolysaccharides–a perception. Journal of Basic Microbiology, 47 (2), 103-117.

Sutherland, I. W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology, 147 (1), 3-9.

Tabata, K. Kosuge T. Nakahara T. Hoshino T., 1993. Physical map of the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 chromosome. FEBS Letters, 331 (1-2), 81-85.

Tarrand, J. J. Gröschel D., 1982. Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. Journal of Clinical Microbiology, 16 (4), 772-774.

Taslimi, P. Nadaroglu H. Adıguzel A., 2013. Removal of some textile dyes from aquous solution by using a catalase-peroxidase from *Aeribacillus pallidus* (P26). Journal of Pure and Applied Microbiology, 7 (4), 26-29.

Tavares, A. P. M. Agapito M. S. M. Coelho M. A. Z. da Silva J. A. L. Barros-Timmons A. Coutinho J. A. P. Xavier A., 2005. Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21 (8-9), 1499-1507.

Tavassoli-Kafrani, E. Shekarchizadeh H. Masoudpour-Behabadi M., 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. Carbohydrate Polymers, 137, 360-374.

Tavernier, P. Portais J. Nava S. Courtois J. Courtois B. Barbotin J., 1997. Exopolysaccharide and poly-(beta)-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. Applied and Environmental Microbiology, 63 (1), 21-26.

Tian, Y. Kuzimenkova M. V. Halle J. Wojdyr M. Diaz de Zerio Mendaza A. Larsson P.-O. Müller C. Scheblykin I. G., 2015. Molecularweight determination by counting molecules. The Journal of Physical Chemistry Letters, 6 (6), 923-927.

Tiwari, P. Misra A. K., 2008. Synthesis of oligosaccharide fragments corresponding to the exopolysaccharide released by *Streptococcus macedonicus* Sc 136. Glycoconjugate Journal, 25 (2), 85-99.

Tomita, K. Kuroki Y. Nagai K., 1999. Isolation of thermophiles degrading poly (L-lactic acid). Journal of Bioscience and Bioengineering, 87 (6), 752-755.

Ton-That, H. Marraffini L. A. Schneewind O., 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1694 (1-3), 269-278.

Trabelsi, L. M'sakni N. H. Ouada H. B. Bacha H. Roudesli S., 2009. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14 (1), 27-31.

Triveni, R. Shamala T. R. Rastogi N. K., 2001. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. Process Biochemistry, 36 (8-9), 787-795.

Trüper, H. Schleifer K., 1992. Principles of characterization and identification of prokaryotes. The prokaryotes. New York, Springer: 126-148.

Tunç, M. T., 2012. Yağsız fındık ürünlerinin pirinç ekmek formülasyonlarında kullanılması. Yüksek Lisans Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Samsun.

Vaningelgem, F. Zamfir M. Mozzi F. Adriany T. Vancanneyt M. Swings J. De Vuyst L., 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. Applied and Environmental Microbiology, 70 (2), 900-912.

Vidhyalakshmi, R. Valli N. C. Kumar G. N. Sunkar S., 2016. *Bacillus circulans* exopolysaccharide: production, characterization and bioactivities. International Journal of Biological Macromolecules, 87, 405-414.

Vijayendra, S. V. N. Palanivel G. Mahadevamma S. Tharanathan R. N., 2008. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. Carbohydrate Polymers, 72 (2), 300-307.

Villay, A. Laroche C. Roriz D. El Alaoui H. Delbac F. Michaud P., 2013. Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. Bioresource Technology, 146, 732-735.

Wang, J. Goh K. M. Salem D. R. Sani R. K., 2019a. Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium - *Geobacillus* sp. WSUCF1. Scientific Reports, 9 (1), 1-12.

Wang, J. Salem D. R. Sani R. K., 2019b. Extremophilic exopolysaccharides: a review and new perspectives on engineering strategies and applications. Carbohydrate Polymers, 205, 8-26.

Wery, N. Cambon-Bonavita M.-A. Lesongeur F. Barbier G., 2002. Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. FEMS Microbiology Ecology, 41 (2), 105-114.

Whitfield, C. Valvano M. A., 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. Advances in Microbial Physiology, 35, 135-246.

Wolfaardt, G. Lawrence J. Robarts R. Caldwell S. Caldwell D., 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm community. Applied and Environmental Microbiology, 60 (2), 434-446.

Wu, D. Li A. Ma F. Yang J. Xie Y., 2016. Genetic control and regulatory mechanisms of succinoglycan and curdlan biosynthesis in genus *Agrobacterium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 100 (14), 6183-6192.

Xu, L. Lu Y. Cong Y. Zhang P. Han J. Song G. Wang G. Chen K., 2019. Polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* using burdock oligofructose as carbon source. Carbohydrate Polymers, 206, 811-819.

Yang, H. L. He G. Q., 2008. Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 24 (12), 2903-2907.

Yang, Y. Feng F. Zhou Q. Zhao F. Du R. Zhou Z. Han Y., 2018. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. International Journal of Biological Macromolecules, 114, 529-535.

Yang, Y. P. Peng Q. Guo Y. Y. Han Y. Xiao H. Z. Zhou Z. J., 2015. Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. Carbohydrate Polymers, 133, 365-372.

Yanmis, D. Baltaci M. O. Gulluce M. Adiguzel A., 2015. Identification of thermophilic strains from geothermal areas in Turkey by using conventional and molecular techniques. Research Journal of Biotechnology, 10 (1), 39-45.

Ye, F. Peng G. Li Y., 2011a. Influences of influent carbon source on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge. Chemosphere, 84 (9), 1250-1255.

Ye, F. Ye Y. Li Y., 2011b. Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. Journal of Hazardous Materials, 188 (1-3), 37-43.

Ye, G. Chen Y. Wang C. Yang R. Bin X., 2018. Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. International Journal of Biological Macromolecules, 120, 1315-1321.

Yildiz, S. Y. Anzelmo G. Ozer T. Radchenkova N. Genc S. Di Donato P. Nicolaus B. Oner E. T. Kambourova M., 2014. *Brevibacillus themoruber*: a promising microbial cell factory for exopolysaccharide production. Journal of Applied Microbiology, 116 (2), 314-324.

Yildiz, S. Y. Radchenkova N. Arga K. Y. Kambourova M. Oner E. T., 2015. Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (5), 2277-2289.

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

Yuksekdag, Z. N. Aslim B., 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). Brazilian Archives of Biology and Technology, 51 (3), 581-585.

Zamani, H. Salehzadeh A. Abdolhosseini M., 2018. Isolation and molecular identification of a cellulotic bacterium from muncipal waste and investigation of its cellulase production. Bioscience Journal, 34 (3), 761-768.

Zhang, C.-M. Huang X.-W. Pan W.-Z. Zhang J. Wei K.-B. Klenk H.-P. Tang S.-K. Li W.-J. Zhang K.-q., 2011. *Anoxybacillus tengchongensis* sp. nov. and *Anoxybacillus eryuanensis* sp. nov., facultatively anaerobic, alkalitolerant bacteria from hot springs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61 (1), 118-122.

Zhang, J. Yue X. Zeng Y. Hua E. Wang M. Sun Y., 2018. *Bacillus amyloliquefaciens* levan and its silver nanoparticles with antimicrobial properties. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32 (6), 1583-1589.

Zhao, S. Cao F. Zhang H. Zhang L. Zhang F. Liang X., 2014. Structural characterization and biosorption of exopolysaccharides from *Anoxybacillus* sp. R4-33 isolated from

radioactive radon hot spring. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172 (5), 2732-2746.
Zheng, K. Wu L. He Z. Yang B. Yang Y., 2017. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. Measurement, 112, 16-21.
Zhou, J. Zhang R. Gao Y. Li J. Tang X. Mu Y. Wang F. Li C. Dong Y. Huang Z., 2012. Novel low-temperature-active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4-β-mannanase from a new *Sphingomonas* strain. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113 (5), 568-574.
Zhou, W. Wang J. Shen B. Hou W. Zhang Y., 2009. Biosorption of copper (II) and cadmium (II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 72 (2), 295-302.
Zhu, G. Sheng L. Tong Q., 2014. Preparation and characterization of carboxymethyl-gellan and pullulan blend films. Food Hydrocolloids, 35, 341-347.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Berna GENÇ
Doğum tarihi:	02 Ağustos 1985
Doğum Yeri:	Merkez/Malatya
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Gümüşhane Üniversitesi Gentik ve Biyomühendislik Bölümü
Tel:	0505 391 41 85
E-mail:	bber_yal@yahoo.com
Eğitim	
Lise:	Malatya Anadolu Lisesi
Lisans:	Ege Üniversitesi/Mühendislik Fakültesi/Biyomühendislik Bölümü (2010)
Yüksek lisans:	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü/ Biyoteknoloji ve Biyomühendislik (2013)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik AnaBilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Görev aldığı projeler	
1. *Aspergillus sojae* mutantı kullanarak portakal endüstrisi atıklarından sıvı kültürde poligalakturonaz üretiminin optimizasyonu, BAP, Araştırmacı, 2011-2013 (ULUSAL) 2. Karadut Morus Nigra Etanolik Ekstraktının Kolon Kanser Hücre Serilerinde hTERT Ekspresyonu Üzerine Etkisi, BAP, Araştırmacı, 2013-2014 (ULUSAL) 3. *Lactobacillus plantarum* M24 Bakterisinden Lipaz Enziminin Saflaştırılması Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 23/06/2015-23/12/2016 (ULUSAL) 4. Türkiye'nin Farklı Jeotermal Alanlarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu Moleküler Karakterizasyonu ve Bu Bakterilerde Endüstriyel Önemi Olan Enzimlerin Varlığının Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 23/06/2015-23/06/2016 (ULUSAL) 5. Beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu, Araştırmacı, 23/06/2015 - 25/10/2017 (ULUSAL) 6. Sucuktan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Ksilanaz Enziminin Saflaştırılması Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından	

destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 23/06/2015 - 17/07/2017 (ULUSAL)

Yayınlar

1. Çanakçı Adıgüzel Gülşah, Faiz Özlem, Şişecioğlu Melda, Sarı Bilge, Baltacı Mustafa Özkan, Arslan Sumeyya, **Genç Berna**, Adıgüzel Ahmet (2019). A novel endo-β-1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25 purification, characterization and application in clarification of fruit juices. International Journal of Biological Macromolecules, 129, 571-578. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.054 (Yayın No: 4846052).
2. Albayrak Şeyda, **Genç Berna**, Adiguzel Gülşah Çanakçı, Adiguzel Ahmet, Taşkın Mesut (2019). Presence of Different Bacterial Species in Thermal Sources and Novelty in their Industrial Enzyme Productions. Journal of Pure and Applied Microbiology, 13 (3), 1375-1387 (Yayın No: 5579470).
3. Sarı Bilge, Faiz Özlem, **Genç Berna,** Şişecioğlu Melda, Adıgüzel Ahmet, Çanakçı Adıgüzel Gülşah (2018). New xylanolytic enzyme from *Geobacillus galactosidasius* BS61 from a geothermal resource in Turkey. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 1017-1026 (Yayın No: 4613094).
4. Baltacı Mustafa Özkan, **Genç Berna,** Arslan Sumeyya, Çanakçı Adıgüzel Gülşah, Adıgüzel Ahmet (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Geothermal Areas in Turkey and Preliminary Research on Biotechnologically Important Enzyme Production. Geomicrobiology Journal, 34(1), 53-62., Doi: 10.1080/01490451.2015.1137662 (Yayın No: 4083001).
5. **Genç Berna,** Nadaroğlu Hayrunisa, Adıgüzel Ahmet, Baltacı Mustafa Özkan (2015). Purification and characterization of an extracellular cellulase from *Anoxybacillus gonensis* O9 isolated from geothermal area in Turkey. Journal of Environmental Biology, 36(6), 1319-1324 (Yayın No: 1033033).
6. **Genç Berna**, Adıgüzel Ahmet (2019). Production and Rheological Behavior of Carboxymethylcellulase by Bacterial Isolates from Thermophilic Region of Turkey. 3. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences, ICAFOP (Tam metin/Sözlü Sunum) (Yayın No: 4929421).
7. Demir Duygu, Güneş Mehmet, **Genç Berna**, Akay Şeref (2019). Fungal Cellulase Production from Waste Olive Pomace Through Solid State Fermentation. 3. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences, ICAFOP (Poster) (Yayın No: 4929435).
8. Kılınç Kağan, Turan İbrahim, Demir Selim, Arslan Burnaz Nesibe, **Genç Berna**, Örem Asım, Alver Ahmet (2016). Flow Cytometric Assessment of the *Rosa Canina* Extracts on Different Cancer Types. 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 3260827).
9. Arslan Sümeyye, **Genç Berna**, Çanakçı Adıgüzel Gülşah, Adıgüzel Ahmet (2016). A research on Thermophilic Bacteria and Their Enzyme Profile in Different Geothermal regions of Turkey Poster Sessions. 41ST FEBS CONGRESS, Doi: 10.1111/febs.13808 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 4471137).
10. Arslan Sümeyye, Tarakçıoğlu Selma, Sarı Bilge, **Genç Berna**, Çanakçı Adıgüzel Gülşah, Baltacı Mustafa Özkan, Adıgüzel Ahmet (2016). Isolation Identification and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria of White

Cheese Samples Collected from Erzurum and Kars Regions. International conference on advances in natural and applied sciences, ICANAS (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 3260284).

11. Yıldırım Vildan, **Genç Berna**, Baltacı Mustafa Özkan, Şişecioğlu Melda, Adıgüzel Ahmet (2015). Purification Characterization and Biotechnological Applicability of Alkaline Protease by *Aeribacillus pallidus* C10. International Eurasia Pharmacy Congress (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 1540733).

12. Baltacı Mustafa Özkan, **Genç Berna**, Çanakçı Adıgüzel Gülşah, Arslan Sümeyye, Sarı Bilge, Tarakçıoğlu Selma, Adıgüzel Ahmet (2014). Isolation and Identification of Thermophilic Bacteria from Different Geothermal Areas in Turkey. III. International Congress of the Molecular Biology Association (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 1522865).

13. **Genç Berna**, Nadaroğlu Hayrunisa, Baltacı Mustafa Özkan, Adıgüzel Ahmet (2014). A Novel Cellulase from *Anoxybacillus gonensis* O9 Isolated from Geothermal Area in Turkey. III. International Congress of the Molecular Biology Association (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No: 1087648).

14. **Genç Berna**, Adıgüzel Ahmet (2018). Termofilik Karboksimetilselülazın *Anoxybacillus thermarum*'dan Üretimi, Saflaştırılması ve Kinetik Karakterizasyonu. 24. Ulusal Biyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No: 4440193).