T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ MEZOFİLİK VE TERMOFİLİK BAKTERİLERDE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ, OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Firdevs Rozan TUŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Temmuz-2021

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Firdevs Rozan TUŞAR tarafından yapılan “Çeşitli Mezofilik Ve Termofilik Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi, Optimizasyonu Ve Karakterizasyonu ” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Fatma MATPAN BEKLER

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ömer ACER

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 09/07/2021

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2021

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Kemal GÜVEN'e;

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için izole ettiği termofilik bakteri suşlarını temin eden ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan hocam sayın Doç. Dr. Fatma MATPAN BEKLER'e;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana katkıda bulunan, destek olan arkadaşım Nazlı POLAT'a;

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen canım annem ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Firdevs Rozan TUŞAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR ..... **I**

İÇİNDEKİLER ..... **II**

ÖZET ..... **IV**

ABSTRACT ..... **V**

ÇİZELGE LİSTESİ ..... **VI**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **VII**

KISALTMA VE SİMGELER ..... **X**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ÖZETLERİ **5**

2.1. Ekzopolisakkaritler Nedir? 5

2.2. Ekzopolisakkarit Çeşitleri 8

2.4. Ekzopolisakkaritler'in Moleküler Temeli 13

2.5. Ekzopolisakkaritler'in Uygulama Alanları 18

2.6. Ekzopolisakkaritler'in Antibakteriyel Özelliği 20

2.7. Mikroorganizmalarda EPS Üretim Potansiyeli 21

2.8. Termofilik ve Mezofilik Bakterilerin Genel Özellikleri 21

2.8.1. *Bacillus* Cinsi 23

2.8.2. *Bacillus licheniformis* 23

2.8.3. *Bacillus zhangzhounesis* 24

2.9. Termofilik Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretim Potansiyeli 24

3. MATERYAL VE METOT **29**

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler 29

3.2. Aletler 29

3.3. Kimyasallar 29

3.4. Metot 30
3.4.1. Bakterilerin Kültüre Alınması 30
3.4.2. Kullanılan Farklı Besiyerleri 30
3.4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Maya Özütü Kullanımı 31
3.4.4. Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımı 31
3.4.5. Bakteriler tarafından EPS Üretiminin Petri Kutularında Belirlenmesi 31
3.4.6. EPS İzolasyonu 32
3.4.7. Karbonhidrat Tayini 33
3.4.8. Protein Tayini 33
3.4.9. EPS'nin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi 33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 35
4.1. Mezofilik ve Termofilik Bakterilerin Farklı Karbonhidrat İçeren Farklı Bazal Besiyerinde Üremesi 35
4.2. Termofilik Bakterilerin Petri Kutuları Üzerinde EPS Üretimlerinin Belirlenmesi 42
4.3. Termofilik bakterilerde Total EPS Miktar Tayini 44
4.4. Total EPS'lerde Karbonhidrat Miktar Tayini 46
4.5. Total EPS'lerde Protein Miktar Tayini 48
4.6. EPS'lerin Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 57
6. KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 75

ÖZET

ÇEŞİTLİ MEZOFİLİK VE TERMOFİLİK BAKTERİLERDE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ, OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Firdevs Rozan TUŞAR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

2021

Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Moleküler Genetik, Mikrobiyal Biyoteknoloji ve İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan *Bacillus licheniformis* 3ÇA2, *Geobacillus vulcani* 2Çx, *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA, *Bacillus licheniformis* 3ÇA, *Bacillus licheniformis* 2ÇS suşları gibi termofilik bakteriler ve *Acinobacter calcoaceticus* E2, *Pseudomonas aeruginosa* D7, *Enterobacter ludwigi* D8, *Pseudomonas putida* D10, *Acinetobacter pittii* D11, *Pseudomonas rhodesiae* D12 gibi mezofilik suşlar kullanılarak farklı besiyerlerinde (M1, M2 ve M3), farklı karbon kaynakları (fruktoz, galaktoz, glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz) ve farklı oranlarda maya özütü (%0.05, %0.1, %0.15 ve %0.2) kullanılarak suşların besiyerinde üreme düzeyleri incelenmiştir. Termofilik bakterilerin M3 besiyerinde *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi sükroz varlığında 7.06 kat, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisi sükroz varlığında 4.09 kat ve *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisi sükroz varlığında 1.86 kat, glikoz içeren besiyerinde 2.61 kat artış ile üreme gösterdiği bulundu.

Termofilik bakterilerden elde edilen EPS miktarlarına bakıldığında en iyi EPS total kuru ağırlık miktarı M3 besiyerinde, %0.2 maya özütü ve % 1 sükroz içeren *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinden 121 mg olarak elde edildi. Elde edilen EPS'nin karbonhidrat ve protein miktarını bulmak için sırasıyla fenol-sülfürik asit metodu ve Lowry yöntemi kullanıldı. Bu bakteriden elde edilen EPS'de bulunan karbonhidrat miktarı 333.28 µg/mL, protein miktarı ise 0.19 µg/mL olarak belirlendi. En yüksek karbonhidrat miktarına (1087.03 µg/mL) sahip bakteri *B.zhangzhounesis* 2ÇA olarak bulundu.

B.licheniformis 2ÇS, *B.zhangzhounesis* 2ÇA, *B.licheniformis* 3ÇA2 suşlarının patojen *E.coli, S.aureus, K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa* karşı antibakteriyel aktivitesi incelendi. En iyi etki %0.2 maya özütü ve %1 sükroz içeren besiyerinden *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin ürettiği EPS'de görüldü. *E.coli*'ye karşı 16 mm zon çapı ile antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Ekzopolisakkarit üretimi, Termofilik, Fenol-sülfürik asit, Lowry, Antibakteriyel etki

ABSTRACT

PRODUCTION, OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM VARIOUS MESOPHILIC AND THERMOPHILIC BACTERIA

MASTER THESIS

Firdevs Rozan TUŞAR

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2021

In this study, the growth levels of the strains in the medium was investigated by using thermophilic bacteria such as *Bacillus licheniformis* 3CA2, *Geobacillus vulcani* 2Cx, *Bacillus zhangzhounesis* 2CA, *Bacillus licheniformis* 3CA, *Bacillus licheniformis* 2CS and mesophilic bacteria such as *Acinobacter calcoaceticus* E2, *Pseudomonas aeruginosa* D7, *Enterobacter ludwigi* D8, *Pseudomonas putida* D10, *Acinetobacter pittii* D11, *Pseudomonas rhodesiae* D12 in the Molecular Genetics, Microbial Biotechnology and Immunology Research Laboratory of the Dicle University, in different media (M1, M2 and M3), different carbon sources (fructose, galactose, glucose, xylose, lactose, maltose, sucrose) and different ratios of yeast extract (0.05%, 0.1%, 0.15% and 0.2%). Thermophilic bacteria were found to grow in M3 medium compared to other media. *B.licheniformis* 2CS was grown by 7.06 times in the presence of sucrose, *B.zhangzhounesis* 2CA by 4.09 times in the presence of sucrose, while *B.licheniformis* 3CA2 was by 1.86 times in the presence of sucrose, and 2.61 in glucose containing medium.

Considering the EPS amounts produced by thermophilic bacteria, the best total EPS dryweight was obtained as 121 mg from *B.licheniformis* 2CS containing %0.2 yeast extract and %1 sucrose in M3 medium. Both carbohydrate amount and protein amount in EPS was determined by using the phenol-sulfuric acid method and the Lowry method, respectively. The amount of carbohydrate in EPS produced by this bacterium was determined as 333.28 µg/mL, while the amount of protein was determined as 0.19 µg/mL. *B.zhangzhounesis* 2CA was found to be the bacterium with the highest carbohydrate content (1087.03 µg/mL).

The antibacterial activities of EPS from *B.licheniformis* 2CS, *B.zhangzhounesis* 2CA and *B.licheniformis* 3CA2 were investigated against pathogenic *E.coli, S.aureus, K.pneumoniae* and *P.aeruginosa*. The best effect was seen in EPS produced by *B.licheniformis* 2CS bacteria from medium containing %0.2 yeast extract and %1 sucrose. The antibacterial activity against *E.coli* was determined to be a zone diameter of 16 mm.

Keywords: Exopolysaccharide production, Thermophilic, Phenol-sulfuric acid, Lowry, Antibacterial effect

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge no		Sayfa
Çizelge 2.1.	Çeşitli ekzopolisakkaritler	12
Çizelge 3.1.	Besiyerleri ve içerikleri	31
Çizelge 4.1.	*B.licheniformis* 2ÇS bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı	45
Çizelge 4.2.	*B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı	45
Çizelge 4.3.	*B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı	45
Çizelge 4.4.	EPS'lerin antibakteriyel etkileri	55
Çizelge 5.1.	Total EPS'lerde Kuru ağırlık, Karbonhidrat ve Protein miktar tablosu	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil no		Sayfa
Şekil 2.1.	Biyofilm oluşum aşamaları	7
Şekil 2.2.	Levan yapı modeli	8
Şekil 2.3.	Dekstran yapı modeli	9
Şekil 2.4.	Alginat'ın kimyasal yapısı	9
Şekil 2.5.	Bakteriler tarafından üretilen bakteriyel selülozun kimyasal yapısı	10
Şekil 2.6.	Gellan yapı modeli	10
Şekil 2.7.	Hiyalüronik asit yapı modeli	11
Şekil 2.8.	Pullulan kimyasal yapı modeli	11
Şekil 2.9.	*Pseudomonas aeruginosa'*da Aljinat operonu	14
Şekil 2.10.	*Sinorhizobium meliloti*'de Süksinoglikan operonu	15
Şekil 2.11.	Glikozun hücre içindeki EPS biyosentez yolu	16
Şekil 2.12.	EPS'lerin biyolojik olarak aktiviteleri	20
Şekil 4.1.	Mezofilik bakterilerin glikozlu M1 besiyerinde üreme grafiği	35
Şekil 4.2.	%0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında mezofilik *A. calcoacoticus* E2 üreme grafiği	36
Şekil 4.3.	%0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında mezofilik *P. rhodesiae* D12 üreme grafiği	36
Şekil 4.4.	Termofilik bakterilerin glikozlu M1 besiyerinde üreme grafiği	37
Şekil 4.5.	Termofilik bakterilerin glikozlu M2 besiyerinde üreme grafiği	37
Şekil 4.6.	%0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında termofilik *B. zhangzhounesis* 2ÇA üreme grafiği	38
Şekil 4.7.	%0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında termofilik *B. licheniformis* 3ÇA üreme grafiği	39
Şekil 4.8.	Termofilik bakterilerin %0.05 ve %0.1 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği	40
Şekil 4.9.	*B. zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin %0.15 ve %0.2 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği	40
Şekil 4.10.	*B. zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin %0.15 ve %0.2 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği	41
Şekil 4.11.	*B. licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin %0.15 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği	41

Şekil 4.12.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 3ÇA2 bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.1 maya özütü, kontrol; b: %0.1 maya özütü + %1 Sükroz)	42
Şekil 4.13.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 3ÇA2 bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)	42
Şekil 4.14.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.1 maya özütü, kontrol; b: %0.1 maya özütü + %1 sükroz)	42
Şekil 4.15.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)	43
Şekil 4.16.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 2ÇS bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.1 maya özütü, kontrol; b: %0.1 maya özütü + %1 sükroz)	43
Şekil 4.17.	Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 2ÇS bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)	44
Şekil 4.18.	Glikoz standartı	46
Şekil 4.19.	Glikoz standart eğrisi	46
Şekil 4.20.	*B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin EPS karbonhidrat tayini	47
Şekil 4.21.	*B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin EPS karbonhidrat tayini	47
Şekil 4.22.	*B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin EPS karbonhidrat tayini	48
Şekil 4.23.	BSA standartı	48
Şekil 4.24.	BSA ile hazırlanan protein standart eğrisi	49
Şekil 4.25.	*B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin EPS protein tayini	49
Şekil 4.26.	*B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin EPS protein tayini	50
Şekil 4.27.	*B. licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin EPS protein tayini	50

Şekil 4.28. *B.licheniformis* 2ÇS'deki EPS'nin a) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi c) *P.aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkisi 51

Şekil 4.29. *B.licheniformis* 2ÇS'deki EPS'nin a) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi c) *P.aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkisi 52

Şekil 4.30. *B.licheniformis* 3ÇA2'deki EPS'nin a) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi 53

Şekil 4.31. *B.zhangzhounesis* 2ÇA'daki EPS'nin a) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi c) *K.pneumoniae*'ya karşı antibakteriyel etkisi 54

KISALTMA VE SİMGELER

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
BSA	: Bovine serum albümine
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dTDP	: Timidin difosfat
EDTA	: Ethylenediamintetraaceticacide
FCR	:Folin–Ciocalteu reagent
g/L	: Gram/Litre
gr	: Gram
GTF	: Glikozil transferaz
kb	: Kilo baz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mg/mL	: Miligram/Mililitre
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik density
RNA	: Ribonükleik asid

rpm	:Revolutions per minutes (Dakikada dönüş sayısı)
rRNA	: Ribozomal RNA ,
UDP	: Üridin difosfat
UV	: Ultra viyole
w/v	: Ağırlık/Hacim(weight/volume)
µg/mL	: Mikrogram/Mililitre
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Ekzopolisakkaritler (EPS) hücre yüzeyine sıkıca bağlı bulunan kapsül yapısında ya da gevşek bir bağlanma ile hücre yüzeyine bağlı mukoz (slime) yapısında bulunabilen makromoleküller yapılardır (Farag ve ark. 2020).

Ekzopolisakkaritler bakteriler tarafından üretilmelerinin yanı sıra ayrıca bitki, algler, maya ve mantarlar tarafından da üretilirler. Bakteriler tarafından EPS'lerin üretilmesi günler sürerken bitkiler tarafından üretilmesi üç ya da altı ay sürebilir. EPS'ler dallı yapıda olup tekrar eden şeker birimlerinden ve karbonhidrat yapısında olmayan bileşenlerden oluşur. Benzer yapıda veya farklı yapıda bulunan şeker birimlerinin polimerizasyonu sonucunda elde edilen ekzopolisakkaritler organik makromoleküllerdir. Bu şeker birimleri glikoz, galaktoz, ramnoz, fruktoz, mannoz olabileceği gibi N-asetilgalaktozamin ve N-asetilglikozamin gibi bazı şeker türevleride olabilir. EPS'ler şeker birimlerinin yanı sıra proteinler, DNA, fosfolipitler ve karbonhidrat yapısında olmayan piruvat, sülfat, fosfat gibi yapılarıda bulundurabilen bileşiklerdir (Moretto ve ark. 2015, Saadat ve ark. 2019, Sethi ve ark. 2019, Angelin ve Kavitha 2020, Farag ve ark. 2020).

EPS'ler monomerik bileşenlerine bakılarak ayırt edilebilirler. Tek tip monomerik yapıdan oluşan EPS'ler homopolisakkarit olurken iki ya da daha fazla farklı monomerin birleşimiyle oluşan EPS'ler ise heteropolisakkarit olarak birbirinden ayrılırlar.

Homopolisakkaritlerin çoğu nötr glukanlar iken heteropolisakkaritlerin çoğu ise yapılarındaki uronik asitten dolayı polianyoniktirler. Homopolisakkaritler bağ yapısı ve karbonun konumuna bakılarak α-D glukanlar ve β-D glukanlar olarak sınıflandırılabilir (Llamas ve ark. 2012, Zannini ve ark. 2016).

EPS'ler bakteriyi stres, sıcaklık, ışık, pH, ozmotik gibi eksterm koşullardan korunmayı sağlar. Eğer ortamda besin eksikliği varsa mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler organizmanın hayatta kalmasını sağlar. Bazı EPS'lerin farklı bulaşıcı hastalıklarda virülans etkisi yapabileceği gibi

insan sağlığı üzerinde de olumlu yönde etkileri olduğu tespit edilmiştir (Llamas ve ark. 2012, Hidalgo-Cantabrana ve ark. 2014, Caggianiello ve ark. 2016).

Bakteriler tarafından üretilen EPS'ler yiyecek endüstrilerinde de kullanılmaktadır. Bir EPS çeşidi olan ve bakteriler tarafından üretilen dekstran ise ticari olarak kullanılan ilk bakteri ekzopolisakkaritidir. Bazı mantarlar tarafından üretilen EPS'lerin antioksidant, antitümör, antibakteriyel gibi etkileri vardır. Mikroalgler tarafından üretilen EPS'lerin glikoz ya da galaktozdan oluşan homopolimerden veya farklı birkaç şekerin monomerinin birleşimi ile oluşan heteropolisakkarit yapısında bulunabilir (Freitas ve ark. 2017).

EPS'lerin biyosentez aşamasında dört farklı yol kullanılır. Bu yollar Wzx/Wzy bağımlı yol, sentaza bağlı yol, ATP-bağlayıcı (ABC) taşıyıcı yol, tek bir sükraz proteini kullanımına bağlı yoldur (Rajoka ve ark. 2020).

Mikroorganizmalar tarafından elde edilen EPS'lerin miktar tayinini belirlemek için farklı yollar bulunmakta olup bunlar liyofilize ile polimerin kuru kütlesinin ölçümü, Ludwig'in antron sülfürik asit metodu olabilir. Ayrıca fenol-sülfürik asit yöntemi ile EPS'nin karbonhidrat tayini yapılabilir (Leroy ve De Vuyst 2016).

Termofilik ve mezofilik bakteriler kullanılarak farklı karbon kaynakları ve farklı besiyerlerinde EPS varlığının tespiti, elde edilen EPS'lerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda;

1-Termofilik ve mezofilik bakterilerin farklı bazal besiyeri ortamlarında üretiminin sağlanması,

2- Farklı karbon kaynakları kullanılarak termofilik ve mezofilik bakterilerin üretiminin gözlemlenmesi,

3- Elde edilen EPS'lerin kurutulup miktar ölçümü yapılması,

4-Karbonhidrat tayini için fenol-sülfürik asit yönteminin uygulanması, protein tayini için ise Lowry yönteminin uygulanması ile verilerin değerlendirilmesi.

5-Elde edilen EPS'lerin bazı patojenler üzerinde antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Ekzopolisakkaritler Nedir?

Ekzopolisakkaritler, geri dönüşümü sağlanabilen, doğal polimerler olup mikroorganizmalar tarafından bulundukları ortama salgılanırlar. Bu bakteriyel polisakkaritler hücre dışına salgılanabildiği gibi hücre duvarına bağlı bir şekilde de bulunabilirler. Hücre duvarına bağlı olarak bulunan EPS'ler kapsüler ekzopolisakkarit, ortamda serbest halde bulunanlar ise mukoz (slime) ekzopolisakkarit olarak adlandırılmaktadır. Hücre duvarına bağlı olarak bulunan EPS kovalent bağlar ile tutunma işlemini yapabilmektedirler (Yılmaz ve Çelik 2007, Nwodo ve ark. 2012, Soyuçok ve ark. 2016).

Mikroorganizmalar zor şarlar altında veya ortamdaki antibiyotik varlığı sonucunda biyofilm yapısı oluştururlar. Mikroorganizma bu stratejik yol ile kendini korumaktadır. Bu hücre dışı biyofilm yapısının önemli bileşenini ise ekzopolisakkaritler oluşturmaktadır. Hücre içinde bulunan biyopolimer yapıları azdır ve kullanımları ise sınırlıdır. Hücre dışında bulunan biyopolimer yapısı ise hücre dışı biyopolimerlere göre daha geniş aralıkta bulunmaktadır. Bu aralık dört gruba ayrılıp incelenebilir. Bu gruplar polyesterler, poliamidler, inorganik polianhidritler ve polisakkaritler olarak ayrılır. Ekzopolisakkaritler hücre de bulunma durumlarına göre üç grup altında incelenirler. Birincisi hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), ikincisi hücre duvarının bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve üçüncüsü de hücre yüzeyi ile kovalent bağlarla bağlanmayan, hücre dışına atılan (LAM)'dan oluşmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler üç grupta ele alınabilir. Bunlar ekstraselüler polisakkaritler, yapısal formdaki polisakkaritler ve intraselüler (depo) polisakkaritler olarak sentezlenirler. Depo polisakkaritleri, hücre yüzeyine bağlı polisakkaritler, hücre dışı bakteriyel polisakkaritler biyofilm oluşumu ve patojenite için önem teşkil etmektedir (Ostapska ve ark. 2018, Poli ve ark. 2018).

Ele alınan EPS'ler arasında ekstraselüler biyopolimerlerin polisakkarit bileşen miktarı en fazla olandır. Bunların sınıflandırılmasının temeli ise hücrede ki konumuna dayanmaktadır. Hücre duvarında yapısal ve koruma amacına yönelik görev alırlar. Ayrıca

teikoik asitte bileşen olarak bulunurlar. Hücre dışına ise kapsül ya da slime (yapışkan yapı) şeklinde ortama atılırlar (Nwodo ve ark. 2012).

Kapsül ya da hücreye bağlı ekzopolisakkaritler hücre duvarında bulunan N-asetilmuramik asit kalıntılarına kovalent bağ ile bağlıdırlar. Konakçı hücrenin immün sisteminden korunma, fagositozdan korunma mekanizmalarına sahip olmakla birlikte patojenik mikroorganizmaların virülansı açısından da önemlidir (Starr ve ark. 2013, Nachtigall ve ark. 2020).

Biyofilm bakteri, arkeler ve mantarlar tarafından üretilebilen karmaşık mikrobiyal hücreler topluluğudur. Canlı ya da cansız yüzeylere bağlı bir şekilde bulunabilirler. Çoğu bakteri planktonik hücre yerine biyofilm olarak gelişme göstermeyi tercih eder. Bu şekilde büyümeyi tercih etmelerinin nedenleri ise; hücrelerin birlikte topluluk oluşturup bu toplu yaşamın avantaj sağlaması, EPS'nin sunmuş olduğu direnç, hücreler arası iletişimin gerçekleştirilebilmesi, metabolik iş yükünün paylaştırılması ve gen transferi gibi avantajların bulunması hücrelerin biyofilm olarak büyümeyi seçmelerine neden olmaktadır (Mai-Prochnow ve ark. 2021).

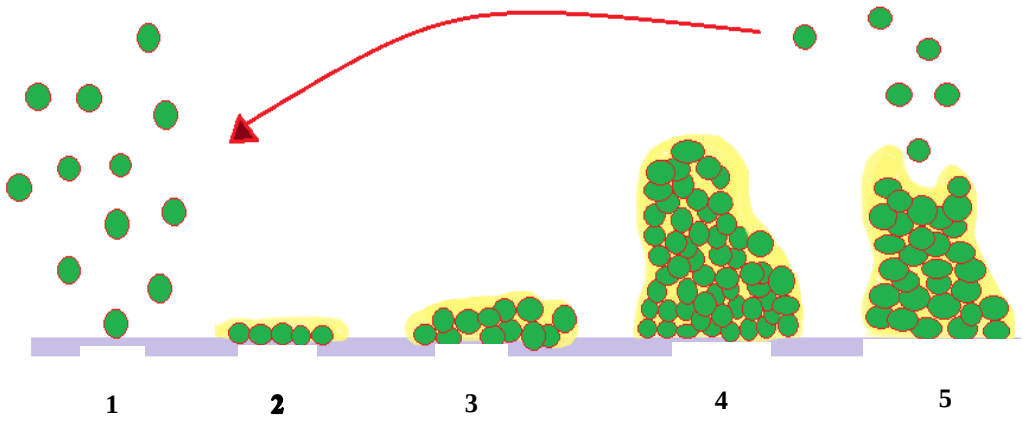
Biyofilmin oluşması bakteriler arasında gerçekleşen etkileşim ve iletişimin sağlanması sonucu oluşur. Bundan dolayı bakterilerin koordineli olarak çalıştığı sonucu çıkarılabilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilm organizmaların doğal habitatlar da göstermiş olduğu baskın yaşam tarzıdır. Biyofilmlerin oluşumu hücrenin yüzeye yapışması ile başlar bu yapışmayı arttıran hidrofobik, daha pürüzlü yüzeylerdir. Yapışmadan sonra yüzeyde koloniler oluşur. Biyofilmin içeriğinde ise polisakkaritlerin yanında ayrıca nükleik asitler, lipidler ve proteinler bulunmaktadır (Davey ve ark. 2000, Simoes ve ark. 2010, Völkel ve ark. 2018, Lopez-Ortega ve ark. 2020).

Biyofilmlerin keşfedilmesi 17. Yüzyılın sonlarına dayanır. Bakterilerin kendilerini antibiyotiklerden, çevresel strestlerden, yüksek ya da düşük sıcaklıktan, pH durumu ve immün yanıt gibi durumlardan korumasını sağlar (Qurashi ve Sabri 2012).

Biyofilm oluşum süreci;

- Bakterilerin yüzeye yapışması ile başlar. Bu yapışma olayından sonra biyofilmin hücre yüzeyinden uzaklaştırılması zorlaşır.

- Hücrelerin koloni oluşturması ve EPS'nin hücre dışına yapışkan (slime) halinde atılması
- Biyofilmin meydana gelmesi
- Konakçı immün mekanizmalarından kendini koruması ve daha da olgunlaşması
- Yeterince olgunlaşan biyofilmin hazır hale gelip bakterilerin dağılması.



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları; 1- Hücre yüzeyine tutunma 2-Koloni yapısının oluşmaya başlaması 3-Biyofilm yapısının meydana gelmesi 4-Biyofilm yapısının olgunlaşması 5- Olgunlaşan biyofilmin hazır hale gelip bakterilerin dağılması (Hooshdar ve ark. 2020)

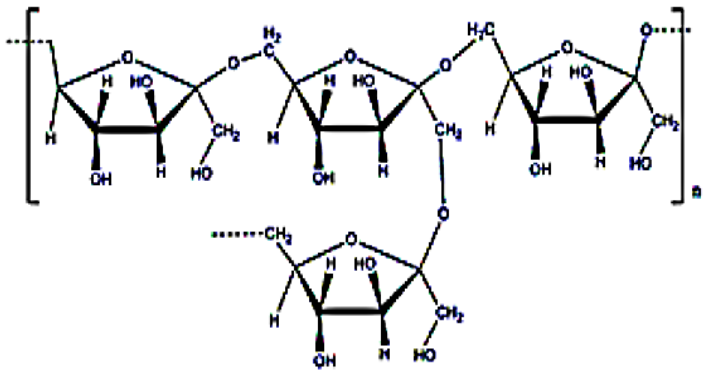
Oluşan biyofilmin yapısı bazı etkilere bağlıdır. Bunlar; yüzeye tutunma, çevresel ortam ve hücre yüzeyine temas süresi gibi faktörler biyofilm yapısının oluşumunu etkiler. Yüzeye tutunma olayında yüzeyin temiz, pürüzsüzlük gibi etkileri bakterinin tutunmasını etkileyen faktörlerdir. Bunun yanında hücrenin fiziksel ve kimyasal özellikleri de tutunma olayını etkilemektedir. Bunlar fosfat, karboksil gibi asit gruplarının yanında hücre yüzeyinde bulunan amin ve bazik grupların varlığı da bakterinin yüzeye bağlanmasında etkilidir. Bakterinin yüzeye temas süresindeki artış bakterinin yüzeye bağlanmasını arttırır (Hooshdar ve ark. 2020, López-Ortega ve ark. 2020).

Biyofilmin patojenite oluşturabilme özelliği olduğundan biyofilm oluşumunu azaltmaya yönelik stratejiler aranmaktadır (Jiang ve ark. 2011). Bu stratejilerin aranmasının nedenlerinden biri insan vücudundaki mikrobiyal enfeksiyonların %80 ve daha fazlasının biyofilmlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.2. Ekzopolisakkarit Çeşitleri

Birçok EPS çeşidi mevcuttur. Bunlar;

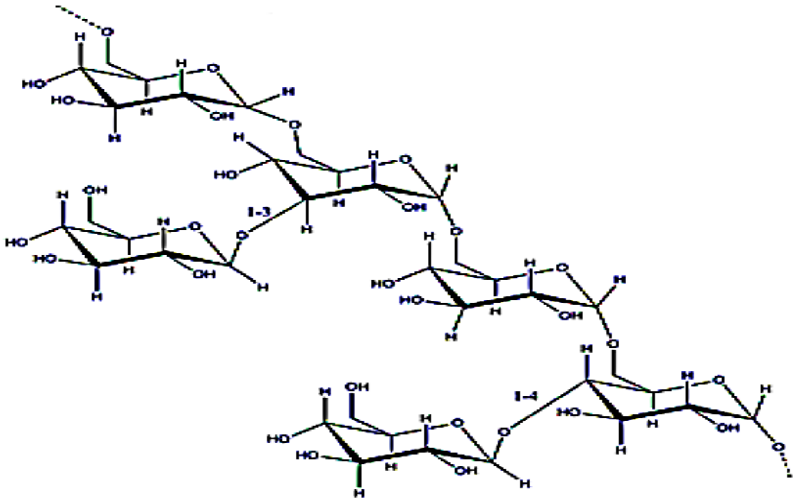
Levan, yapı taşı fruktoz olup bağ yapısı β-2, 6 glikosidik'dir. Üretiminden sorumlu olan mikroorganizmalar *Bacillus, Brenneria, Zymomonas, Lactobacillus, Geobacillus, Halomonas, Saccharomyces* ve *Acetobacter'*dir. Asıl üreticisi ise *Zymomonas mobilis*'dir. Özellikleri ise jel yapısı oluşturmaz, hücre adhezyonunu artırmaktır (Mohite ve ark. 2017).



Şekil 2.2. Levan yapı modeli (Tabernero ve Cardea, 2020)

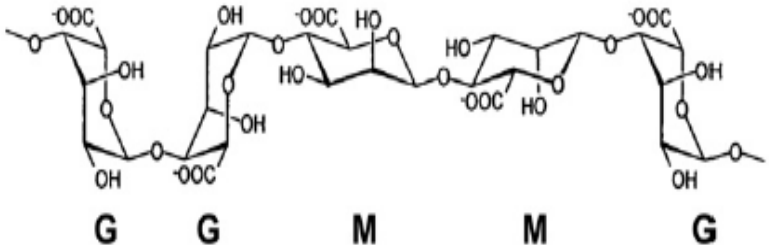
Curdlan, yapı taşı glikoz olup bağları ise dallanmış yapı göstermeyen doğrusal yapıda bulunan ve çözünmeyen homopolisakkarittir. β-1,3-glikosidik bağları ile bir araya gelip oluşmaktadır. *Agrobacterium, Cellulomona, Rhizobium* ve *Bacillus* gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretimi gerçekleştirilir. Jelleşme, toksin yapıda olmama gibi özelliklere sahiptir (Shih ve ark. 2009, Seviour ve ark. 2011).

Dekstran, yapı taşı glikoz olup bağlarını ise α-1,6-glikosidik oluşturmaktadır. Dekstran üretimini sağlayan mikroorganizmalar ise *Leuconostoc, Lactobacillus Streptococcus, Weissella* ve *Pediococcus*'dur. Akışkan davranışı, kararlı yapı ve iyonik olmayan özelliklere sahiptir (Asgher ve ark. 2020).



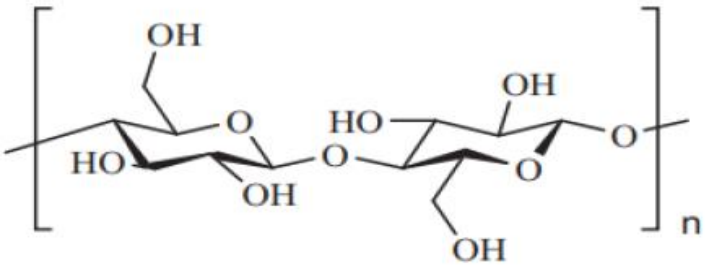
Şekil 2.3. Dekstran yapı modeli (Tabernero ve Cardea, 2020)

Alginat, 1-4 glikosidik bağlanan α-d-mannuronik asit ve α-l-glukuronik asit birimlerinden oluşan EPS çeşididir. Alginat film yapısı oluşturma ve jelleşme gibi özelliklere sahiptir (Moscovici 2015, Tavassoli-Kafrani ve ark. 2016).



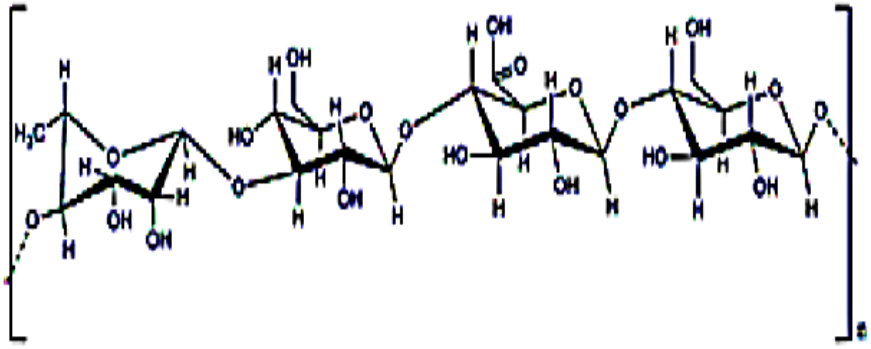
Şekil 2.4. Alginat'ın kimyasal yapısı (Tavassoli-Kafrani ve ark. 2016)

Selüloz, bitki duvar bileşeni olarak yer almasının yanı sıra ayrıca algler, bakteriler ve mantarlar tarafından da üretilir. Yapıtaşını glikoz, bağ yapısı ise β-1,4-glikosidik bağ olup β-D-glukopiranoz birimlerinden meydana gelmektedir. Bakteriler tarafından üretilen bakteriyel selüloz bitki selülozundan daha avantajlı özellikler barındırmaktadır. *Gluconacetobacter, Sarcina Agrobacterium, Salmonella* ve *Rhizobium* gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen selüloz bir ekzopolisakkarittir. Bu mikroorganizmalar arasından selüloz üretiminde etkili olan ise *Gluconacetobacter* türüne aittir (Islam ve ark. 2017).



Şekil 2.5. Bakteriler tarafından üretilen bakteriyel selülozun kimyasal yapısı (Farjadian ve ark. 2018)

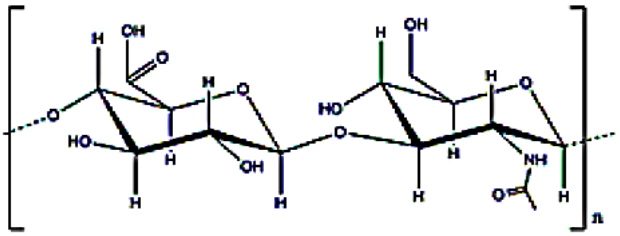
Gellan yapı taşı glikoz olup bağ yapısı ise β-D-glikoz, β-D-glukuronik asit ve α-L-ramnoz'dur. Fermantasyon sonucunda üretilen hücre dışı polisakkarit çeşididir. *Sphingomonas paucimobilis* üretiminden sorumlu mikroorganizmadır (Yildiz ve Karatas 2018).



Şekil 2.6. Gellan yapı modeli (Tabernero ve Cardea, 2020)

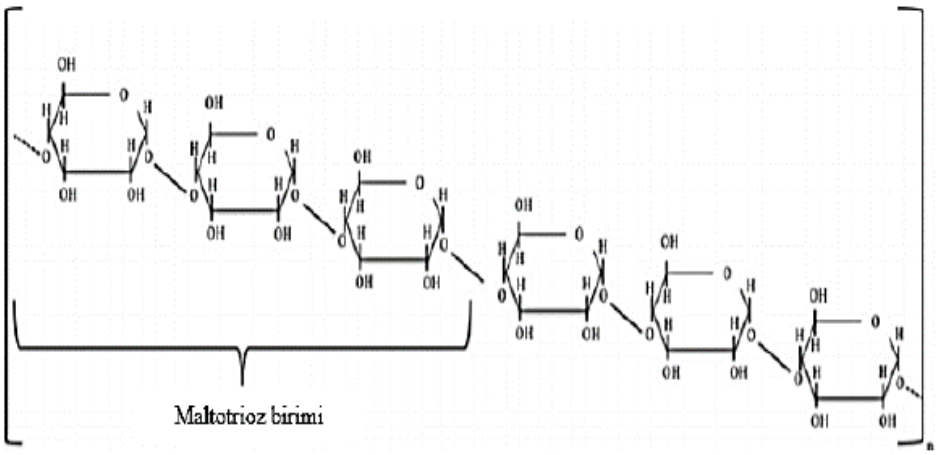
Ksanthan glikoz, pirüvik asit ve glukoronik asit içerirken bağ yapısı ise β-1,4-D-glikoz oluşturmaktadır. Ayrıca ksanthan sakızı olarak da bilinmektedir. Üretimini sağlayan bakteri türü *Xanthomonas campestris*'dir. Güçlü viskozite ve emülsiyon gibi özellikleri ihtiva etmektedir (Hussain ve ark. 2017).

Hiyalüronik asit (hyaluronan) yapı taşları glukoronik asit, N- asetilglikozamin olup bağlarını β-1,3 N-asetilglikozamin ve β-1,4 glukoronik asit oluşturmaktadır. Üretiminden sorumlu olan bakteri türleri *Streptococcus* sp. Çoğunlukla gıda ve kozmetik alanlarında yer almaktadırlar (Yildiz ve Karatas 2018).



Şekil 2.7. Hiyalüronik asit yapı modeli (Tabernero ve Cardea, 2020)

Pullulan, maltotrioz ünitelerinin α-1,6 α-1,4-glikosidik bağlarla bağlanması sonucu oluşan doğrusal bir homopolisakkarittir. α-(1-4)-Glu-α-(1-4)-Glu-α-(1-6) ya da α-(1-4)-Glu-α-(1-4)-Glu-α-(1-6)-Glu-α-(1-6) birimlerin sıralanması sonucu oluşan polimerlerdir. Üretiminden sorumlu olan mikroorganizmalar *Cytaria* spp. *Cryphonectria parasitica, Teloschistes flavicans, Aureobasidium pullulans* ve *Rhodototula bacarum*'dur. Üretimden sorumlu olan asıl mikroorganizma ise *Aurebasidium pullulans*'dır. Özellikleri arasında suda yüksek çözünürlük ve adezyon bulunduğundan film üretiminde yer alabilir (Yildiz ve Karatas 2018, Tabernero ve Cardea 2020)



Şekil 2.8. Pullulan kimyasal yapı modeli (Donot ve ark. 2012)

Çizelge 2.1. Çeşitli ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkarit Çeşitleri	Monomer	Bağ Yapısı	Bakteriler
Selüloz	Glikoz	β-1,4-glikosidik	*Gluconacetobacter, Sarcina Agrobacterium, Salmonella* ve *Rhizobium*
Gellan	Glikoz, Glukoronik Asit, Ramnoz	β-D-glikoz, β-D-glukuronik asit ve α-L-ramnoz	*Sphingomonas paucimobilis Aureomonas elodea* ve *Sphingomonas elodea*
Curdlan	Glikoz	β-1,3 glikosidik	*Agrobacterium, Cellulomonas Rhizobium* ve *Bacillus*
Dekstran	Glikoz	α-1,6-glikosidik	*Leuconostoc, Lactobacillus Streptococcus, Weissella* ve *Pediococcus*
Ksanthan	Glikoz, Pirüvik asit ve Glukoronik asit	1,4- β-D-glikoz	*Xanthomonas campestris*
Hyalüronik Asit	Glukoronik asit N-asetilglikozamin	β-1,3 N-asetilglikozamin ve β-1,4 glukoronik asit	*Streptococcus sp.*
Levan	Fruktoz	B-2,6 glikosidik	*Bacillus, Brenneria, Zymomonas, Lactobacillus Geobacillus, Halomonas, Saccharomyces* ve *Acetobacter*
Pullulan	Maltotrioz	α-1,6 α-1,4-glikosidik	*Cytaria spp. Cryphonectria parasitica Teloschistes flavicans, Aureobasidium pullulans* ve *Rhodototula bacarum*

2.3. Ekzopolisakkarit'lerin Yapıları

EPS'ler 103 ile 108 kDa arasında farklılık gösteren alt birimlerin bir araya gelmesi sonucu oluşan polisakkarit zincirlerinden oluşan bir yapı sergiler. Bu alt ünitelerin tekrarlaması ve şeker kalıntıları ile EPS'lerin kimyasal yapılarının birbirinden ayırt edilmesi sağlanır. EPS'ler monosakkaritlerin basit yapı taşları, üronik asit, glikosidik bağlar ile bağlanmış amino şekerleri, peptid bağları, nükleik asitler, fosfolipitlerin polimerizasyonu sonucu oluşan organik makromolekül yapılarıdır. EPS'ler organik gruplar olarak asetil, piruvil grubu veya süksinil, inorganik grup olarak sülfat taşır. EPS'ler bazı karbonhidrat yapısında olmayan gruplar ve monosakkarit, dissakkarit yapıları ile homo veya heterojen yapıyı oluşturur. Homopolisakkaritler bir tip monosakkarit ihtiva ederken heteropolisakkaritler ise disakkaritlerden heptasakaritlere kadar değişen tekrar eden birimleri ihtiva eder. Monomerik birimlerin birçok olası kombinasyonları glikosidik bağların stereospesifikliği ile birlikte, doğrusal homopolisakkaritlerden yüksek oranda dallanmış heteropolisakkaritlere kadar değişen çözülmesi zor karmaşık kimyasal yapıları meydana getirir (Freitas ve ark. 2011, Dave ve ark. 2020).

Homopolisakkaritlerin birçoğu nötr iken heteropolisakkaritlerin çoğu ise polianyoniktir. Homosakkarit ve heterosakkaritler farklı yapı ve bağları ihtiva ederler. Homopolisakkaritler a-D-glukan, B-D-glukanlar, fruktanlar, poligalaktan gibi çeşitli grupların birleşimidir. Heteropolisakkaritler ise D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin veya glukuronik asit birimlerinin tekrarları ile meydana gelirler. Bunun yanı sıra bazı EPS'ler karbonhidrat olmayan yapılardan oluşurlar. Ayrıca sentezleri ve enzimleri de farklılık göstermektedir. Bulundurdukları bağlardan β-1,4- veya β-1,3 bağları kuvvetli yapıda iken a-1,2 veya a-1,6 bağları ise daha esnek yapıda bulunmaktadır (Rana S. ve Upadhyay 2020).

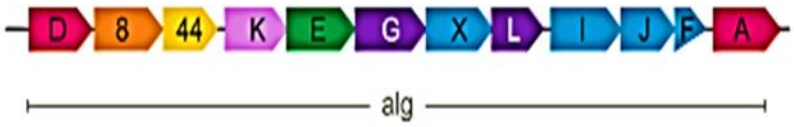
Heteropolisakkarit çeşitleri olarak ksantan, hyaluronik asit örnek verilirken homopolisakkaritlere ise selüloz, dekstran örnekleri verilebilir.

2.4. Ekzopolisakkaritler'in Moleküler Temeli

Ekzopolisakkarit üretimi hücre içinde gerçekleşip, nükleosit difosfat şekerlerini içermektedir. Üretilen ekzopolisakkaritler genellikle 12 ile 17 kb'lık gen dizisi tarafından

üretilirken bu gen uzunluğu ekzopolisakkaritlerin karmaşıklığına da bağlı olarak değişebilmektedir (Suresh Kumar ve ark. 2007).

Glikoziltransferazlar D, K, H, I ve M gum genleri tarafından kodlanırlar. Aljinat üretiminde yer alan *P. aeruginosa'*da bir operon tarafından düzenlenip, tanımlanmış 24 gen vardır. 12 yapısal genin içerdiği gen kümeleri *algD, alg8, alg44, algK, algE, algG, algX, algL, algl, algJ, algF ve alga'*dan oluşmaktadır. Ramnolipid ve lipopolisakkarit biyosentezinde bulunan fosfomannomutazı kodlayan algC geni, kromozom üzerinde ayrı olarak yer almaktadır. Operonda yer alan genler ise aljinat biyosentezinde yer alan proteinleri kodlar. *algD ve algA* öncü sentezi için bulunurken *algI, algF ve algJ* asetilasyon için, *algL* ise bozulma için bulunur. *Azetobacter vinelandii'*de aljinat üretimi ise üç operon halinde bulunan gen kümeleri tarafından düzenleniyor (Suresh Kumar ve ark. 2007, Donot ve ark. 2012).

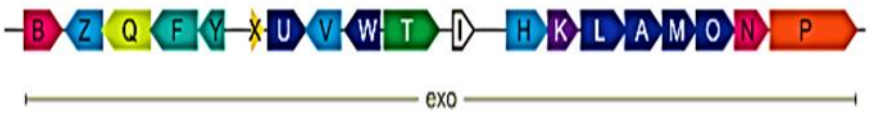


Şekil 2.9. *Pseudomonas aeruginosa'*da Aljinat operon (Schmid ve ark. 2015)

Aljinat biyosentezinde olduğu gibi levan biyosentezinde de birkaç gen tarafından proteinler kodlanır. *Bacillus subtilis*'de EPS operonunda 16 gen bulunup bunlardan *yveK, yvfF* olup EPS'nin modifikasyon işleminde ve hücre dışına atılımında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda iki gen daha tanımlanmış olup bunlar *epsG (yveQ)* ve *epsH (yveR)*'dir. *EpsG*'nin bir proteini kodladığını ve bu proteinin EPS polimerizasyonunda yer aldığı, *epsH*'nin ise glikosiltransferazı kodladığı düşünülmektedir (Donot ve ark. 2012).

Üzerinde genetik ve biyokimya olarak çok çalışmalar yapılan ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen süksinoglikan sentezinde yer alan enzim ve genler karakterize edilmiştir. Yaklaşık olarak 30 gen bu EPS üretimden sorumludur, bunlar; *exoABCDFGHIJKMNOPQRSTUVWXYZ* genleri, *ndvAB* genleri ve *exsABH* genlerinden oluşmaktadır. Kromozomal ve plazmid tarafından süksinoglikan üretiminin düzenlenmesi yapılmaktadır. Bazı bakterilerde üretimden sorumlu olan kromozom iken

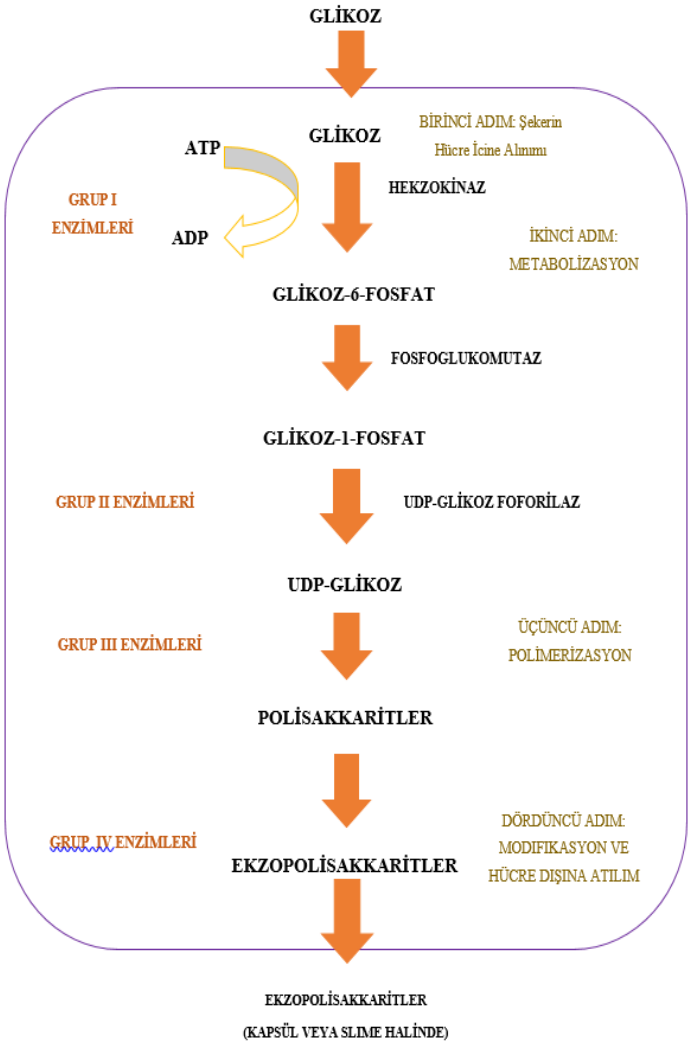
bazılarında ise megaplazmit üretimden sorumludur (Suresh Kumar ve ark. 2007, Donot ve ark. 2012).



Şekil 2.10. *Sinorhizobium meliloti*'de Süksinoglikan operonu (Schmid ve ark. 2015)

EPS biyosentez üretimi çevresel koşulların değişkenliğine bağlı olarak farklı büyüme aşamalarında meydana gelir. EPS üretim oranı stres, besin dengesizliği, tuz, sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. EPS üretimi geç logaritmik ya da durağan faz sırasında hücre içinde sentezlenir. EPS üretimi dört adımda ve üretime yardım eden dört enzim ile gerçekleşir; Birinci adım karbon kaynağı olarak kullanılan şekerin hücre içine alınımı. Bu karbon kaynağının hücre içine alımını düzenleyen bir dizi farklı kontrol proteinleri bulunmaktadır. Ortamdaki bu şeker molekülünün hücre içine alınmasını sağlayan üç farklı taşıma sistemi mevcuttur. Birincil taşıma yolu olan ATP hidroliz, ATPaz şeker taşınması yolu ile doğrudan şekere bağlanır. İkincil taşıma yolu ile iyonlar ve çözünmüş olan maddelerin taşınmasıyla bağlanır. Üçüncü ve en önemli olan taşıma sistemi ise fosfonolpiruvat (PEP) - fosfortansferaz (PTS) sistemidir. Bu taşıma sistemi şeker substratının bağlanması, taransmembran taşınması ve fosforilasyonunu sağlayan bir grup proteini ihtiva eder. İkinci adımda alınan şeker metabolize edilir ve şeker fosforile edilir. Bu adımda görev alan hücre içi enzim olan hekzokinaz'dır. Şeker fosforile edilerek şeker-6-fosfat haline gelir. Bu şeker-6-fosfat fosfoglukomutaz sayesinde şeker-1-fosfata dönüşür. Şeker-1-fosfatlar UDP-glikoz pirofosforilaz ve dTDP-glikoz pirofosforilaz etkisiyle UDP-glikoz ve dTDP-glikoz gibi şeker nükleotidlerinin oluşumu için merkezi metabolitleri sağlar. UDP- glikoz diğer şekerlere dönüşebilen ve katabolik yolun ilerlemesini sağlayan anahtar görevini üstlenmektedir. Üçüncü adım ise polimerizasyon adımıdır. Polimerizasyon tekrar eden şeker ünitelerinin bir araya gelmesi ile gerçekleşir. Üçüncü grup enzimleri olan glikosiltransferazlar tarafından sentezlenir. Bir şeker parçasını izoprenoid alkol olarak tanımlanan bir glikozil lipide bağlayıp tekrar eden yapıya aktarırlar. Lipid taşıyıcının alkol grubu bir prifosfat köprüsü aracılığıyla bir monosakkarit ünitesine bağlıdır. Bunun sonucunda monomerler polimerize edilip

polisakkarit sentezi gerçekleşmiş olur. Dördüncü adımda oluşan polisakkaritler farklı enzimatik aktivelerle örneğin; asilasyon, metilasyon, asetilasyon ve sülfatlama gibi modifiye edilebilir. Modifiye olan polisakkaritler hücrenin yüzeyine taşınıp kapsül ya da yapışkan şeklinde (slime) hücre dışına atılır (Jha 2013, Madhuri ve Prabhakar 2014).



Şekil 2.11. Glikozun hücre içindeki EPS biyosentez yolu

EPS biyosentezi için bilinen dört mekanizma bulunmaktadır. Wzx/Wzy bağımlı yol, sentaza bağlı yol, ATP-bağlayıcı (ABC) taşıyıcı yol, tek bir sükraz proteini kullanılarak hücre dışına aktarım yolu, EPS sentez yollarıdır.

Wzx/Wzy bağlı yol, Wzy proteini içeren tekrar eden ünite oluşana kadar lipit taşıyıcıya bağlı GTF'ler tarafından aktif şekerler bağlanır. İç zarda C55 lipit bağlayıcısına bağlı şeker üniteleri, GTF'ler ve Wzx flippase (zardan geçebilen lipit taşıyıcı proteinler fosfolipit moleküllerinin hareketine yardımcı olur) tarafından membran boyunca yer

değiştirirler. Wzy proteini periplazmik boşlukta, hücre dışına aktarılmadan önce oligosakkaritler polimerize edilirler. Tekrar eden şeker ünitelerinin periplazmadan hücre yüzeyine taşınmasında etkili olan; PCP yardımcı polimeraz proteini ve OPX'dir. Farklı şeker yapılarının bir araya gelmesi ile meydana gelen ve heteropolisakkaritler olarak kategorize edilen polisakkaritler bu yol ile polimerize edilirler. İkinci yol ise esas olarak kapsüler polisakkarit biyosentezin de bulunup ABC taşıyıcısına bağlı yoldur. Kapsüler polisakkaritin sentezi ABC taşıyıcısına bağlı yolla hücre zarının iç yüzeyinde konumlanmış olan glikoziltransferazların etkisi ile meydana gelir. ABC taşıyıcı yol hücre içi membranın sitoplazmik yüzeyinde bulunan GT'lerin etkisine bağlıdır. Birleştirme için tek bir GT içerdiği zaman bunun sonucunda homopolimer yapı oluşmakta iken birçok GT kullanıldığında ise heteropolimer yapı meydana gelmekte. Üçlü kompleks akış pompasına benzer yapı polimer yapıdaki şeker zincirlerinin hücrenin iç zarından hücre yüzeyine taşınmasını sağlar. Bu kompleks yapıda iç zar boyunca konumlanmış olan ABC-taşıyıcı yol, periplazmik proteinler ve PCP ve OPX ailesine ait proteinler yer almakta. Bu yol ile oluşan bütün kapsüler ekzopolisakkaritler fosfatidilgliserol ve poli-2-jeto-3-deoksioktulosonikasit (Kdo) bağlayıcıdan oluşan korunmuş glikolipit taşır. Kdo bağlayıcının varlığı ABC-taşımaya bağlı yol ile Wzx/Wzy arasındaki ana farklardandır. Üçüncü yol sentaz bağlı yoldur. Polimer zincirinin hücre zarı ve hücre duvarı boyunca sentezini sağlayan ve tekrar eden şeker birimlerinin hareketini flippase dan bağımsız olarak gerçekleştiren yoldur. Hem sentez hem de taşınma işlemini gerçekleştiren sentaz proteinleridir. Sentaz bağlı yol genellikle tek tip şekerlerin birleşmesi sonucu oluşan homopolimerlerin birleştirilmesinde kullanılır. Hyalünorik asit biyosentez yolunda ise hem polimerizasyon hem de hücre dışına salgılanma işlemini zara gömülü olarak bulunan hyalüronan sentaz tarafından gerçekleştirilir. Hem omurgalılarda hem de prokaryotlarda üretilebilir. Hyalüronik asit disakkarit yapısında olup glukoronik asit, N-asetilglikozamin'den meydana gelir. Bu polisakkaritin sentezi sentaz bağlı yoldan farklı olsa da protein seviyesi olarak diğerleri ile benzerlik göstermektedir. Dördüncü yol hücre dışı sentez yolu veya sükraz aracılı yoldur. Bu biyosentez yolunda disakkarit molekülü monosakkarit molekülüne dönüştürülerek hücre dışında uzayan polisakkarit zincirine eklenir ve polimerizasyon meydana gelir. Şekerin hidrolizi sonucu oluşan enerji monosakkaritin bir alıcı moleküle transferini sağlayan glikansükrazın homopolisakkarit zincirinin uzaması için bu katalitik olayın gerçekleşmesini sağlar. GTF'ler

heteropolisakkarit yapıdaki EPS'lerin hücre içinde ki üretimini birçok adımda gerçekleştirir. Son adım olan tekrar eden şeker birimlerinin polimerizasyon işlemini ise hücre dışında meydana getirmektedir. Bunun tersi olarak homopolisakkarit yapıdaki EPS'ler ise GTF'ler tarafından hücre dışı olarak sentezlenir. Hücre dışında gerçekleşen bu üretim hücre dışı GTF'ler tarafından homopolisakkaritlerin üretimini sağlar (Ates 2015, Schmid ve ark. 2015, Rana ve Upadhyay 2020, Yang ve ark. 2020).

2.5. Ekzopolisakkaritler'in Uygulama Alanları

Fiziksel ve kimyasal yapısı, su bağlama özelliği, moleküler yapısı, modifiye edilebilir olması gibi özellikler EPS'lerin farklı uygulama alanlarında kullanılabilmesini sağlamıştır (Roca ve ark. 2015).

EPS'ler birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanlara kozmetik, sağlık, yiyecek ve daha birçoğu örnek verilebilir. Bu alanlarda EPS'nin kullanılmasını sağlamak için EPS'lerin yapısal, fiziksel ve kimyasal özeliklerinin iyi bilinmesi gerekir. Biyoteknolojik uygulamalar arasında ise EPS'lerin endüstriyel atık ya da ağır metal gibi zararlı maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayarak EPS'lerin çevreyi düzenleyici etkisi oluşturulmaktadır (Freitas ve ark. 2017, Barcelos ve ark. 2020).

Sağlık alanında kullanılan ekzopolisakkaritler antioksidan, anti tümör, antiviral ve kolesterol düşürücü gibi yararlı etkileri vardır. Bu alan da kullanılan EPS çeşitleri olarak ksanthan ve curdlan bulunmaktadır (Maheswari ve ark. 2019). Birçok alanda kullanılan EPS'lerin modifiye edilerek kullanım alanları daha geniş alanlara yayılması, kullanılan EPS'lerin daha etkili olmaları sağlanabilir ve EPS'lerin üretimi için gerekli olan maliyetin düşürülmesi sağlanabilir.

Anti kanser aktivitesinde EPS'ler hem iyi huylu kanser hem de kötü huylu kanser üzerine etki göstermiştir. Polisakkaritler bu etkiyi büyüyen kanser hücrelerini baskılama ile göstermektedir. Tümör taşıyan farelerde EPS'nin tümör üzerine etkisi şu şekilde olabilir, konakçının bağışıklık hücrelerini uyararak tümör hücrelerine yanıt vermesini sağlamak ya da tümör hücrelerinin poliferasyonunu inhibe etmek. Polisakkaritlerin anti kanser aktivitesi moleküler ağırlık, yapısal özellik ve yapısal konformasyonu ile ilişkilidir (Chaisuwan ve ark. 2020).

Polisakkaritlerin ilaç sektöründe kullanılmasını sağlayan; güvenli olması, toksin yapıda bulunmaması ve maliyet açısından ucuz olması bu alanda kullanılmalarını sağlamıştır. EPS'ler bakteriyel enfeksiyona neden olan biyofilm oluşumunu inhibe etmek için yeni terapötik ilaçların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Andhare ve ark. 2014). EPS çeşitleri birçok alanda bulunmaktadır bunlar; alginat antireflü etkisi, hyaluronik asit yaraların iyileştirilmesin de, selüloz ise doku mühendisliği gibi alanlarda yer almaktadır (Moscovici 2015).

Yaraların iyileştirilmesin de EPS'ler yaranın olduğu bölgeye bağlanıp yeni hücreler üretilmesine ve yaranın iyileşmesini sağlar (Maheswari ve ark. 2019).

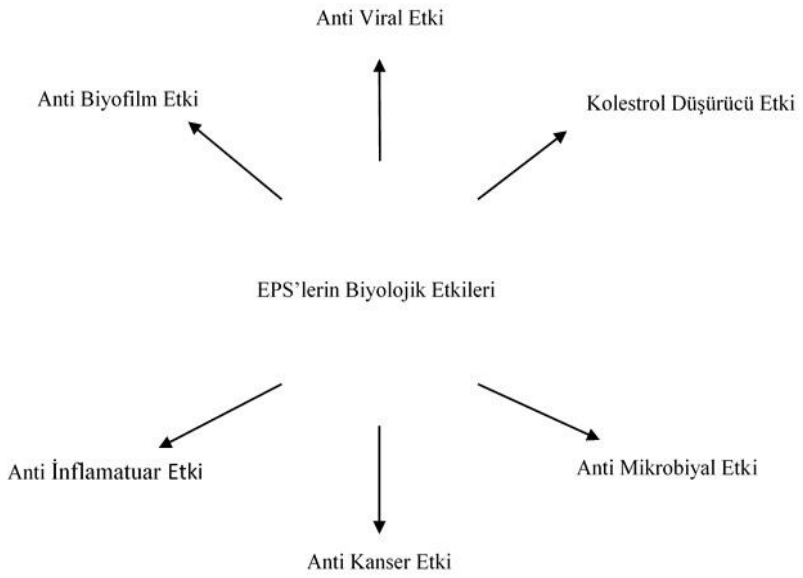
İnsan vücudunda meydana gelen oksidatif hasarlara karşı polisakkaritlerin antioksidan etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Tespit edilen bu durum sonucunda nörodejeneratif hastalıkların iyileştirilmesinde etkili olabilirler. Ekstromofolik bakterilerden elde edilen EPS'lerin patojenik etkisi olmaması ve yüksek çeşitlilik özelliği göstermesi bu bakterilerden elde edilen EPS'lerin antioksidan ve birçok çeşitte biyoteknolojik aktivitede kullanılmasını mümkün kılar (Wang ve ark. 2019).

Serbest radikal ve anti oksidant ajanlar arasında ki dengesizlik ve serbest radikal sayısında ki artış oksidatif strese neden olmakta ve DNA, RNA, proteinlerde hasar oluşturmaktadır. Birçok hastalığın oluşmasında direk ya da dolaylı olarak neden olmaktadır. Bu hastalıklar; Alzheimer, kanser, kalp damar hastalıkları, nöral bozukluklar, Parkinson demansıdır. Yapılan birçok çalışma sonucunda EPS'lerin antioksidan aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Polisakkaritlerin konjugantları, yapıları ve bileşimleri antioksidan aktivitesini etkileyen unsurlardır. EPS'ler oksidasyonu önlemek için bir radikal temizleyici gibi görev aldığı ve radikal türlerle reaksiyona girmesi için hidrojen atomları verdiği düşünülmektedir (Chaisuwan ve ark. 2020).

Yiyecek endüstrisinde kullanılan EPS'ler yiyeceklerin viskozite, stabilite ve tüketim ömrü gibi özellikleri iyileştirme, geliştirmede kullanılırlar. EPS çeşidi olan pullulan ürettiği film sayesinde meyvelerin üzerinde pürüzsüz yapı oluşturarak meyvelerin tazeliklerini korumalarına ve taşıma esnasında dış etkenlerden korunmasını sağlar. Bunun yanı sıra mikrobiyal selüloz da bu alanda kullanılıp sağlık için kolesterol düşürücü etkide bulunmaktadır (Andhare ve ark. 2014).

Anti kanser amacıyla kullanılan EPS'ler yüzey reseptörüne bağlanarak mevcut olan tümör hücresinin apoptoz olması için indükler. Mantar, alg ve bitkiler tarafından üretilen EPS'lerin anti kanser etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ekstremofilik bakteriler tarafından üretilen EPS'ler meme kanserinde terapötik ilaç olabilir. (Wang ve ark. 2019).

EPS çeşidi olan levana aldehit grubu eklenerek modifiye edilmesiyle elde edilen yeni levanın hücre içi olarak insan tümörüne karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Sarilmiser ve Oner 2014).



Şekil 2.12. EPS'lerin biyolojik olarak aktiviteleri

2.6. Ekzopolisakkaritler'in Antibakteriyel Özelliği

Mikrobiyal polisakkaritler arasında laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'ler genellikle güvenli olduklarından in vitro, in vivo koşullarda çeşitli biyolojik aktivitelerde kullanılırlar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler antibakteriyel ajanlar, immün sistemi uyarıcı olarak kullanılabilen doğal kimyasaldırlar. Bu bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin patojenik bakterilere karşı antagonistik etki özelliği birkaç araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Angelin ve Kavitha 2020).

Çeşitli ekzopolisakkaritlerden dekstan, kefiran, levan anti bakteriyel özelliklere sahiptirler.

2.7. Mikroorganizmalarda EPS Üretim Potansiyeli

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin yanı sıra bitkiler ve hayvanlarda EPS üretiminde yer alırlar. Mikrobiyal EPS'lerin daha fazla yer almasının nedeni avantajlı olanaklar sunmasıdır (Dhagat ve Jujjavarapu 2021).

Ekstremofiller zor şartlar altında yaşamayı başarabilen mikroorganizmalardır. Hayatta kalmalarını sağlayan mekanizmalardan biri de EPS'nin biyosentezidir. Ekstremofiller (termofiller, halofiller, alkalifiller, asidofiller ve psikofiller) zor şartlara uyum sağlamaları ve EPS üretimi özellikleri onları farklı endüstriyel alanlarda yer almalarını sağlar (Wang ve ark. 2019).

Streptococcus, Xanthomonas ve *Acetobacter* cinsleride dahil olmak üzere bakteriler arasında polisakkaritin salgılama özelliği büyük bir alana dağılmıştır. *Leuconostoc, Streptococcus, Weisella, Pediococcus* ve *Lactobacillus* laktik asit bakterileri tarafından üretilip ticari olarak yer alan dekstran ilk bakteriyel EPS'dir. Mantarlar arasında da EPS üretimi geniş bir yer tutmaktadır. *Aureobasidium, Candida, Cryptococcus* cinsleride bu alanda yer almaktadır. Ürettikleri EPS'ler çoğunluk olarak yapı bakımından homopolisakkarittir ama heteropolisakkarit yapısında bulunanlar da yaygındır. Mikro alglerin ürettiği EPS'ler glikoz ya da galaktoz homopolimeri veya birkaç farklı şekerin birleşimi olan heteropolisakkarite göre kimyasal yapısına bakılarak karakterize edilir. Diğer mikrobiyal EPS üreticileri ile kıyaslandığında ise aynı şeker monomerini kullanıp daha yüksek çeşitte EPS üretimini mikro algler yapabilmekte. Sülfat ve üronik asidin bulunması algal EPS arasında yaygındır ve bunların varlığı onların ayırt edilmelerine katkı sağlar (Feritas ve ark. 2017).

2.8. Termofilik ve Mezofilik Bakterilerin Genel Özellikleri

Miquel tarafından 1879 yılında çamur, çöl, toprak ve akarsu çamurlarından izole edilen termofilik bakterilerin 72 °C'de üreyebilen bakteriler olduğu tespit edilmiştir (Gül Güven 2011).

Canlılar rRNA sekanslarına bakılarak üç domaine ayrılmıştır, bunlar; arkea, bakteri ve ökaryotlardır (Woese 1987). Sıcaklık isteklerine bağlı olarak ise mikroorganizmalar psikofilikler, termofilikler ve mezofilikler diye gruplandırılırlar. Termofiller sıcaklıklarına göre sınıflandırıldığında 50-60 °C arasında çoğalanlar orta

termofiller, 60-80 °C arasında çoğalanlar ekstrem termofiller, 80-110 °C arasında çoğalanlar ise hipertermofiller olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak en iyi büyüme gösterdikleri sıcaklıkları ise 45 °C ile 70 °C olarak söylenebilir.

Termofilik bakterilerin sınıflandırılması gram pozitif ve gram negatif olabileceği gibi, aerobik ve anaerobik koşullar altında da varlıklarını sürdürebilirler. Bunun yanı sıra bazıları sporlar oluşturabilirler. Termofilik bakteriler kaplıcalarda ve jeotermal gibi sıcak yerlerde bulunurlar. Bu bakterilerin bu tür sıcak ortamlarda yaşamalarını sağlayan bulundurdukları termostabil enzimler sayesindedir (Niehaus ve ark. 1999, Gomes ve Steiner 2004, Akhmaloka ve ark. 2006, Cihan ve ark. 2012, Deive ve ark. 2012, Mohammad ve ark. 2017).

Mezofiller 20 ile 40 derece arasında çoğalan mikroorganizmalardır. Optimum sıcaklık derecesi ise 30-39 derecedir. Optimum sıcaklık, pH ve tuz gibi imkânlar sağlandığında bu bakteriler 20-30 dakika arasında popülasyonlarını ikiye katlayabilirler. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* gibi mezofilik bakteriler insan vücut ısısı olan 37 derece de büyüyebilirler ve patojenite etkisi gösterebilirler (Schiraldi ve Rosa 2014).

Bu bakteriler endüstriyel uygulamalar açısından da birçok avantaj sağlar. Yüksek sıcaklığa adapte olmaları, pH, tuz konsantrasyonu gibi özelliklerinden dolayı endüstri alanında önemli bir yer tutmaktadırlar. Termofilik bakterilerin ürettiği termostabil enzimlerin endüstri açısından önemli olmasının nedeni farklı işlemler altında direnç göstermeleridir (Baltaci ve ark.2017, Taslimi ve ark. 2013). Mezofillerden daha düşük EPS üreten termofillerin ticari olarak mezofillerden daha önemli olmasının nedeni kısa fermantasyon sürecine sahip olmasıdır (Wang ve ark. 2019). Termofillerin besiyerinde üremesi için kullanılan karbon ve enerji kaynağı olan şekerin optimize edilmesi EPS üretimi açısından önemli görülmektedir.

Sıcak su kaynakları, derin ve sığ kaplıcalar EPS üreten çeşitli termofilik bakterilerin elde edilip izole edilmesi açısından kaynak olarak yer alır. *Bacillus* cinsine ait termofilik bakteriler EPS üreticisi olarak bildirilmiştir. Bunlar *Bacillus thermoantarcticus* ve *Bacillus licheniformis*'dir. Özellikle endüstriyel uygulamalarda dikkat çeken *Bacillus* cinsine ait bakteriler bakteriyel EPS üretimi için önemli türlerdir.

Ürettikleri EPS'lerin viskoz özelliğe sahip olduğu da bildirilmiştir (Nicolaus ve ark. 2010, Radchenkova ve ark. 2013).

2.8.1. *Bacillus* Cinsi

Bacillus suşları *Bacillaceae* familyasında yer alan bu bakteri suşları çomak şeklinde, gram pozitif ve endospor oluşturmak aerob veya fakültatif anaerob şartlarda üremek gibi özeliklere sahiptirler (Rey ve ark. 2004). Bu bakteri cinsleri hücre duvarına sahipken çekirdek bulundurmazlar. Boyutları 1 µm ile 10 µm arasında değişmektedir. Bulundukları yerler sıcak su kaynakları, kaplıcalar, deniz suyu, tatlı sular ve çöl toprakları olabilmekte (Wong 2015).

Optimum gelişim gösterdikleri sıcaklık 25- 37 °C'de olup, termofilik ve psikofilik bakteriler ise 75 °C'den fazla ve 3 °C'den az sıcaklıklarda gelişim gösterebilirler. Bazı türleri pH 2 ile pH 10 arasında aşırı asit ve alkali ortamlarda gelişebilirler (Drobnıewski 1993).

Türkiye'de termal alanlarda *Anoxybacillus, Bacillus, Geobacillus, Brevibacillus, Thermus* ve *Aeribacillus* cinslerinde termofilik bakterilerin varlığı bildirilmiştir. *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (Gül Güven ve ark. 2008), *Anoxybacillus* sp. KP1 (Matpan Bekler ve Guven 2014), *Anoxybacillus* sp. AH1 (Acer ve ark. 2015), *Anoxybacillus* sp. KB4 (Matpan Bekler 2016), *G. subterraneus* subsp. *aromaticivorans* (Poli ve ark. 2012), *Geobacillus* sp. DB2 (Matpan Bekler 2017), *Bacillus cereus* KG5 (Gül Güven 2007, Ahmetoglu ve ark. 2015), *B. licheniformis* KG9 (Gül Güven 2007, Matpan Bekler ve ark. 2015a), *Bacillus licheniformis* DV3 (Matpan Bekler ve ark. 2015b).

2.8.2. *Bacillus licheniformis*

Gram pozitif ve endospor oluşturabilen saprofitik bakteriler olup diğer *Bacillus*'lar gibi aerobik değil fakültatif anaerobtur. Bundan dolayı farklı ekolojik şartlarda gelişim gösterebilir. Fizyolojik ve metobolik olarak bakıldığında bulunduğu *Bacillus*'lardan ayırt edilebilir. Hücre dışı olarak ürettikleri ürünlerinin ticari anlamda fayda sağlamasından dolayı bu mikroorganizma türlerini ekonomik açıdan ilginç kılmaktadır (Lee ve ark. 2017).

2.8.3. *Bacillus zhangzhounesis*

Çin'de yer alan bir şehir olan Zhangzhou'dan izole edildiği için *Bacillus zhangzhounesis* olarak adlandırılmıştır. Gram pozitif olup diğer *Bacillus* cinslerinde olduğu gibi şekil olarak çubuk yapısında ve aerobiktir (Liu ve ark. 2016).

2.9. Termofilik Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretim Potansiyeli

Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler termofillerin sahip olduğu termostabilite, yüksek sıcaklıklarda viskozite gibi özelikleri ihtiva etmesinden dolayı farklı alanlarda yer almakta. Bu alanlar kozmetik, gıda, ilaç sektörleri olabilmekte (Dhagat ve Jujjavarapu 2021). Üretilen EPS'ler termofillerin hücrelerini çevreleyip kurumaya karşı hidratlanmış sınır oluşturup termofilik koşullardan korumalarına yardımcı olmaktadır (Wang ve ark. 2019).

EPS üreten birkaç termofilik bakteri ve arkea bilinmektedir. EPS üretim temsilcisi *Bacilli* cinsinden *B.thermoantarcticus* ve *B.licheniformis, Geobacillus* cinsinden ise *G. thermodenitrificans* bakterisi olarak rapor edilmiştir (Kambourova 2018). *Bacillus* ve bu cinsle ilişkili olan cinslerin karbon ve nitrojen kaynağı olarak minimum besiyerlerinde hızlı büyüme durumları EPS üretimi açısından özel yapmakta (Radchenkova ve ark. 2013).

Roberson ve ark. (1992), kuruma ile hücre dışı polisakkaritlerin (EPS) üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmak için topraktan izole edilen bir *Pseudomonas* türünü kullanılarak araştırmışlardır. Kurumaya maruz kalan kültürler bir kum matrisinde büyüyenler, yüksek su potansiyelinde büyüyenlere göre daha fazla EPS ve daha az protein içerirken, kaynakların kurumaya tepki olarak EPS üretimine tahsis edildiğini öne sürmüşler. EPS ile değiştirilen kum, önemli ölçüde daha fazla su tuttu ve değiştirilmemiş kumdan önemli ölçüde daha yavaş kuruduğunu, bu da bir EPS matrisinin bazı kuruma etkilerinden bakteri kolonilerini tamponlanabileceği anlamına geldiğini ve kurumanın hayatta kalmasını sağlamak için bakterilerin mikro ortamlarını değiştirmek için EPS üretimini kullanabileceği sonucuna varmışlardır.

Cerning ve ark. (1994), *Lactobacillus casei* CG11 tarafından ekzopolisakkarit üretimi bazal minimum ortamda çeşitli karbon kaynakları (galaktoz, glikoz, laktoz, sakaroz, maltoz, melibiyoz) içeren 2, 5, 10 ve 20 g/L konsantrasyonlarda çalışılmış. *L.*

casei CG11, aşağıdakileri içeren bazal minimum ortamda ekzopolisakkaritler üretti: test edilen şekerlerden laktoz ve galaktoz en fakir karbon kaynağı ve glikoz açık arayla en verimli karbon kaynağı sonucunu elde etmişlerdir.

Grobben ve ark. (1998), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 suşunu, kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda kesikli kültürlerde büyütüp, besin gereksinimlerini belirlemek için ortam bileşenlerinin tek bir ihmal tekniği uygulamışlardır. Aspartik asit, glutamik asit veya glisinin ihmali büyümeyi çok az etkilemiş ve glutamin, asparagin veya treonin ihmali büyümede daha güçlü bir azalma ile sonuçlanmıştır. Amino asitlerin çoklu ihmalleri, neredeyse tam bir büyüme kaybına neden olduğunu bulmuşlardır. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bireysel vitaminler olarak sadece riboflavin, kalsiyum pantotenat ve nikotinik asit gerekliydi. Şaşırtıcı bir şekilde, ortamda sadece bu vitaminler bulunduğunda ve diğer vitaminler olmadığında, tam ortama göre daha az büyüme gözlemişlerdir, ancak üretilen ekzopolisakkarit miktarı önemli ölçüde daha fazla olmuştur. Basitleştirilmiş ortamdaki nihai optik yoğunluk daha düşük olmasına rağmen, ekzopolisakkaritlerin üretimi tam ortama göre yaklaşık iki kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Danese ve ark. (2000), bir *E.coli* K-12 EPS'si olan kolanik asidin biyofilm oluşumundaki potansiyel rolünü incelemek için genetik bir yaklaşım uygulamışlardır. Kolanik asit üretimi konusunda yetkin veya eksik suşlar büyütüldü ve abiyotik yüzeylere yapışmalarına izin verildi ve daha sonra hem makroskopik hem de mikroskobik olarak incelemişlerdir. Şaşırtıcı bir şekilde, yüzeye tutunma için kolanik asit üretiminin gerekli olmadığını bulmuşlar. Aksine kolanik asit, *E. coli* biyofilmlerinin karmaşık üç boyutlu yapısının ve derinliğinin oluşumu için kritik öneme sahip olduğunu tespit etmişler.

Mozzi ve ark. (2001), şeker kaynağının ekzopolisakkarit (EPS) üretimi üzerindeki etkisini ve *Lactobacillus casei* CRL 87'de şeker nükleotidlerinin sentezinde görev alan enzimlerin aktivitelerini incelemeyi amaçlamışlardır. Bu enzimler ile EPS oluşumu arasındaki ilişki belirlemişlerdir.

Vijayendra ve ark. (2003), çeşitli heksoz şekerlerin (glikoz, sükroz ve laktoz), seçilmiş bakteri kültürleri (*Agrobacterium, Alcaligenes, Pseudomonas* ve *Xanthomonas*) tarafından EPS üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir.

Arena ve ark. (2006), EPS-1, Vulcano Adası'ndaki (İtalya) sığ deniz kaplıcasından izole edilmiş, ısıya dayanıklı bir *Bacillus licheniformis* türü tarafından üretilen yeni bir hücre dışı polisakkarit olup EPS-1'in antiviral ve immünomodülatör etkileri değerlendirmişlerdir.

Yuksekdag ve ark. (2008), ekzopolisakkarit (EPS) üretimi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) bakterileri çeşitli karbon kaynakları (glikoz, fruktoz, sükroz veya laktoz) içeren ortamda üretimine bakılmışlardır. Tüm suşlar için glikozun en verimli karbon kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir.

Borgio ve ark. (2009), *Bacillus subtilis* NCIM 2063, *P.aeruginosa* NCIM 2862 ve *Streptococcus mutans* MTCC 1943, laboratuvar seviyesinde eksopolisakkarit (EPS) üretme yetenekleri açısından incelenmişlerdir. Bazal tuz çözeltisi (BSS), minimum tuz ortamı (MSM), azot içermeyen ortam (NFM), kimyasal olarak tanımlanmış ortam (CDM), süt ortam (MLM)'larını kullanmışlardır. Azot içermeyen ortam daha fazla EPS üretimini desteklediğini ve En yüksek EPS üretiminin, 7 günlük inkübasyondan sonra nitrojensiz ortamda yetiştirilen *P. aeruginosa*'da tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (2010), yüksek ekzopolisakkarit (EPS) üretim kabiliyetine sahip bir *B.licheniformis* 8-37-0-1 suşu izole etmişler ve bakterinin 16S rDNA dizilerine, morfolojik ve fizyolojik özelliklerine ve filogenetik analizine dayanılarak tanımlamışlardır. Enzimoliz, izopropanol çökeltme, anyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi ile suş fermantasyon et suyundan yeni bir EPS tipi izole edilmiş. EPS'nin ana zincir boyunca ortalama olarak her yedi kalıntıda bir C-1 konumunda tek bir d-fruktoz ile (2 → 6) bağlı bir omurga içeren bir levan olduğunu tespit etmişler.

Radchenkova ve ark. (2013), ekzopolisakkarit üretebilen termofilik aerobik spor oluşturan bakteriler, Bulgaristan'daki hidrotermal kaynaklardan izole etmişler ve *Aeribacillus pallidus, Geobacillus toebii, Brevibacillus thermoruber* ve *Anoxybacillus kestanbolensis* gibi dört türe atıfta bulunmuşlardır. En yüksek üretim, filogenetik ve fenotipik özellikleri *A. pallidus* türüne yönlendiren 418 suşu için oluşturuldu. Maltoz ve NH_4Cl'nin buna bağlı olarak en iyi karbon ve nitrojen kaynakları olduğu gözlemlemişler ve kültür durumu optimizasyonu sürecinde üretim veriminin iki kattan fazla arttığını tespit etmişler.

Han ve ark. (2016), yüksek ekzopolisakkarit üretimine sahip 19 *Streptococcus thermophilus*, geleneksel Çin fermente süt ürünlerinden izole etmişler. Bu 19 izolat tarafından fermente edilen sütün ekzopolisakkarit ve viskozitesini test etmişler. *S.thermophilus* zlw TM11 suşları, fermente sütü en yüksek ekzopolisakkarit içeriğine (380 mg /L) ve viskoziteye (7716 mpa /s) sahip olduğunu tespit etmişler.

Spanò ve ark. (2016), Panarea Adası'nın (Eolian Adası, İtalya) sığ bir hidrotermal bacasından izole edilmiş, termofilik *B.licheniformis* T14 tarafından üretilen fruktoz ve fukoz bakımından zengin ekzopolisakkarit (EPS1-T14), dirençli klinik suşlar tarafından *E.coli, K.pneumoniae, P.aeruginosa* ve *S.aureus* biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerine bakmışlardır.

Ergene ve Avcı (2018), 12 *Bacillus* suşunun EPS üretimi araştırılmış ve en iyi üretici olan *Bacillus sp.* ZBP4 fermantasyon koşullarının EPS'lerin biyosentezi üzerindeki etkilerini belirlemek için daha ileri çalışmalar için seçilmiştir. EPS üretimi için çeşitli karbon kaynakları (glikoz, nişasta, laktoz, peynir altı suyu, mannitol, sükroz, pancar pekmezi) test edilmiş ve en iyisi pancar pekmezi olarak bulunmuştur. Optimize edilmiş koşullar altında (pH 5.0 ve 45 °C'de tripton ve 60 g L^{-1} pancar pekmezi kullanılarak) optimizasyon çalışmalarından önce 143 mg L olan EPS üretiminde (1071 mg L^{-1}) önemli bir artış elde etmişlerdir.

Wang ve ark. (2019), *Geobasillus* WSUCF1 suşunu kullanılarak karbon kaynağı olarak farklı şekerleri kullanıp EPS üretme kabiliyetini gösterilmiştir. WSUCF1'in tam genom analizi, nükleotid şeker öncüsü biyosentezi, monosakkarit birimlerinin montajı, polisakkarit zincirinin ihracatı ve EPS üretiminin düzenlenmesi ile ilişkili temel genleri açıklamak için gerçekleştirilmiştir.

Asgher ve ark. (2020), *B. licheniformis*'ten mango kabukları substratının katı hal fermantasyonunda atık-değer temasıyla uygun maliyetli EPS üretimini gerçekleştirmişlerdir. *B. licheniformis*, EPS verimini (3.4'ten 4.6 g/L'ye) önemli ölçüde artıran kısa dalga boylu ultraviyole (UV) radyasyonlara maruz bırakıldı. Optimal olarak elde edilen fraksiyon, HPLC, FTIR ve SEM analizi kullanılarak karakterize edilmiş. HPLC, mannoz (%20.60), glikoz (%46.80) ve fruktoz (%32.58) alt birimlerini içeren EPS'nin hetero-polimerik doğasını ortaya çıkardı. FT-IR spektroskopisi, hidroksil ve karboksil fonksiyonel grupların ve monosakkaritler arasında glikosidik bağlantıların

varlığını ortaya çıkardı. SEM mikroyapısı, EPS'nin daha az gözenekli ile daha pürüzsüz bir yüzey içerdiğini göstermiştir. EPS'nin, mükemmel emülsiyonlaştırma özellikleri sergilediği, test edilen tüm hidrokarbonlara ve yağlara karşı iyi bir stabilite gösterdiğini tespit etmişler.

Farag ve ark. (2020), anti tümör EPS elde etmeyi ve farklı optimizasyon yaklaşımları kullanarak üretimini optimize etmeyi amaçlamışlar. Çamur örneklerinden EPS üreten seksen bakteri elde edilmiş ve izolat BS4, en güçlü anti tümör EPS üreticisi olarak seçilmiş ve 16S rRNA gen dizisi analizi kullanılarak *Bacillus mycoides* BS4 olarak tanımlamışlardır.

Dhagat ve Jujjavarapu (2021), yerel bir kaplıcadan gelen termofilik bakteriler, ekzopolisakkarit üretimi için taranmış ve en iyi üretici olan *Brevibacillus borstelensis* MK878423'ün büyüme kinetiğini incelemişlerdir. Bakteri üreme çalışması optimum üretim süresinin 40 saat olduğunu ve maksimum ürünün 30 g/L glikozda oluştuğunu ortaya koymuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada farklı termofilik ve mezofilik bakteriler kullanıldı. Çalışmada, Diyarbakır ili Çermik sıcak su kaynağından izole edilen ve tanımlanan termofilik bakteriler [*Bacillus licheniformis* 3ÇA2 (GenBank erişim kodu: MT350123), *Geobacillus vulcani* 2Çx (GenBank erişim kodu: MT350132), *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA (GenBank erişim kodu: MT350124), *Bacillus licheniformis* 3ÇA (GenBank erişim kodu: MT350128), *Bacillus licheniformis* 2ÇS (GenBank erişim kodu: MT350130)] kullanılmıştır (Matpan Bekler ve ark. 2020). Ayrıca, petrolle kirletilmiş topraklardan izole edilen ve tanımlanan mezofilik bakteriler [*Acinobacter calcoaceticus* E2 (GenBank erişim kodu: MT374267), *Pseudomonas aeruginosa* D7 (GenBank erişim kodu: MT374260), *Enterobacter ludwigi* D8 (GenBank erişim kodu: MT374261), *Pseudomonas putida* D10 (GenBank erişim kodu: MT374263), *Acinetobacter pittii* D11 (GenBank erişim kodu: MT374264), *Pseudomonas rhodesiae* D12 (GenBank erişim kodu: MT374265) kullanılmıştır. Antibakteriyel testi için Dicle Üniversitesi Araştırma Hastanesinin Tıbbı Mikrobiyoloji laboratuvarından *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri temin edildi.

3.2. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden otoklav (Hirayama), hassas terazi (Daihan), spektrofotometre (Libra Biochrom), manyetik karıştırıcı (Weightlab Instruments WF-H380a), inkübatör (Mipro), steril kabin (Biobase), santrifüj (Nuve), çalkalamalı su banyosu (Jencons), vorteks (Grant-bio), pH metre (Hanna Instruments), otomatik pipetler (Eppendorf) tedarik edilerek kullanılmıştır.

3.3. Kimyasallar

Çalışmada besiyeri hazırlamak için kullanılan kimyasallar Nutrient Broth (NB, Merck), Agar agar (Fluka), kalsiyum klorür ($CaCl_2$), magnezyum sülfat heptahdrat ($MgSO_4.7H_2O$), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum klorid (NaCl), amonyum sülfat ($(NH_4)_2.SO_4$, Merck), maya özütü (Merck),

karbon kaynakları olarak fruktoz, galaktoz, glikoz (Merck), ksiloz (Sigma), laktoz (Sigma), maltoz (Sigma), sükroz (Fluka), Lowry için kullanılan kimyasallar; FCR (Folin–Ciocalteu reagent, Merck), Bovine serum albümine (BSA, Sigma), sodyum karbonat (Na_2CO_3), Na-K-Tartarat (Merck), $CuSO_4.5H_2O$ (Merck), Fenol-sülfürik asit için kullanılan kimyasallar; fenol (Sigma), sülfirik asit (Merck), ayrıca saf etil alkol (Sigma), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kimysalları kullanıldı.

3.4. Metot

3.4.1. Bakterilerin Kültüre Alınması

Çalışmada kullanılan Çermik sıcak su kaynağından izole edilen (Doç. Dr. Fatma Matpan Bekler ve Prof. Dr. Kemal GÜVEN tarafından) ve tanımlaması yapılan termofilik bakteriler ve petrolle kirletilmiş topraklardan izole edilen (Ayşe EREN ve Prof. Dr Kemal GÜVEN tarafından) tanımlaması yapılmış olan mezofilik bakteriler Dicle Üniversitesi Moleküler Genetik, Mikrobiyal Biyoteknoloji ve İmmünoloji Araştırma Laboratuvarından -40 °C'de stoktan alınıp NB agar besiyerine yayma şeklinde ekimi yapıldı. Mezofilik bakteriler etüvde 30 °C'de, termofilik bakteriler ise 50 °C'de etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda katı kültürden tek kolini seçimi yapılarak NB sıvı besiyerine öze yardımı ile aktarılarak çalkalamalı su banyosunda uygun sıcaklıkta 24 saat inkübe edildi. Elde edilen sıvı bakterileri kültürü çalışmada kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.4.2. Kullanılan Farklı Besiyerleri

Stok olarak -40 derecede muhafaza edilen bakterilerin üretiminin sağlanması için %1.5 agar içeren katı besiyeri ve Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanıldı.

EPS üretimini araştırmak için minimal miktarlarda kimyasal içeren farklı besiyerleri (BM) kullanıldı. M1 besiyeri Ergene ve Avcı (2018)'ya göre, M2 besiyeri Berekaa ve Ezzeldin (2018)'ne göre ve modifiye edilmiş M3 besiyeri Matpan Bekler ve ark. (2019)'a göre hazırlandı. Bu besiyerlerine farklı oranlarda maya özütü (%0.05, %0.1, %0.15 ve %0.2), farklı karbon kaynakları (fruktoz, galaktoz, glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Besiyerleri ve içerikleri

M1 Besiyeri	Yeast extract 5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L ve $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L
M2 Besiyeri	K_2HPO_4 8 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/L, $(NH_4)_2.SO_4$ 5 g/L ve traces yeast extract
M3 Besiyeri	$CaCl_2$ 0.05 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, NaCl 2 g/L, $(NH_4)_2.SO_4$ 2 g/L ve farklı oranlarda yeast extract (% 0.05-0.2)

3.4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Maya Özütü Kullanımı

Farklı besiyeri içeriklerine sahip üç besiyerinin kullanılmasının yanı sıra besiyerlerinde nitrojen kaynağı olarak kullanılan maya özütünün farklı konsantrasyonlarının bakterilerin üremesi üzerine etkisi araştırıldı. M1 besiyerinde %0.5 maya özütü eklenirken, M2 besiyerine %0.005 maya özütü ve M3 besiyerine ise %0.05, %0.1, %0.15, %0.2 konsantrasyonlarında maya özütü eklenip bakterilerin bu besiyerlerinde üremeleri gözlemlendi. Hazırlanan besiyerlerine en son olarak yüzdelik oranlarına göre hesaplanan maya özütü miktarları hassas terazide tartılıp besiyerlerine eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözünmesi sağlandı. Çözünen ve hazır hale gelen besiyerleri erlenlere mezür ile paylaştırıldı. Besiyerleri steril edilmek üzere 121 °C'de 15 dk otoklavlandı.

3.4.4. Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımı

Farklı karbon kaynaklarının (fruktoz, galaktoz, glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz) bakteri üretimine etkisini incelemek amacıyla otoklavlanan sıvı besiyerlerine %1 konsantrasyonunda olacak şekilde eklendi. Karbon kaynakları besiyerine eklenmeden önce 20 dk UV'de bekletilip steril edildi, daha sonra saf steril su ile çözünen karbon kaynakları filtreden (0.2 μm, AXIVA) geçirilerek bakteri ekimi yapılmadan önce besiyerlerine eklendi.

3.4.5. Bakteriler tarafından EPS Üretiminin Petri Kutularında Belirlenmesi

Bakteri kolonilerinin petri kutularında EPS üretimini tespit etmek için 10 kat seyreltilmiş NB besiyeri ve %0.1, %0.2 maya konsantrasyonu içeren M3 besiyerleri

hazırlandı. Besiyerlerine ayrıca %1.5 agar eklendi. Bu besiyerleri 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Otoklavlanan besiyerlerine %1 konsantrasyonunda olacak şekilde sükroz ilave edildi. Petri kaplarına dökülen besiyerleri 10 dk UV altında bekletildi. Katılaşan besiyerlerine diskler yerleştirildi.

B.licheniformis 3ÇA2, *G.vulcani* 2Çx, *B.zhangzhounesis* 2ÇA ve *B.licheniformis* 2ÇS suşlarının ekimi yapılmadan önce NB besiyerinde bulunan bakteriler alınıp iki kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkanan bakterilerden 20 µl, 40 µl ve 60 µl alınıp diskler üzerine bırakıldı. 50 °C etüvde 24 saat bekletilen besiyerlerinde üreme ve EPS üretim durumları gözlemlendi.

3.4.6. EPS İzolasyonu

Otoklavlanan besiyerlerine %1 olacak şekilde karbon kaynağının eklenmesi ile bakteri suşları ekime hazır hale getirildi. Bunun için, NB besiyerinde bir gün çalkalamalı su banyosunda inkübe edilerek üretilen bakteriler alınıp yıkama işlemi yapıldı. Bu çalışmada üç farklı besiyeri kullanıldığı için ekimi yapılmak istenen besiyerine göre yıkama işlemi gerçekleştirildi. Pellet üzerine BM besiyeri eklenip 9 000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi toplamda iki kez yapılmış oldu.

Yıkanan bakteriler spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.05-0.1 absorbans arasında ölçüm sonucu elde edilecek şekilde 100 mL BM besiyerlerine ekim yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 3-5 günlük zaman diliminde üremeleri için çalkalamalı su banyosunda bırakıldı. Üreyen bakteriler spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçümü biten besiyerleri tüplere alınıp 9 000 rpm 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp üzerine 4 °C'de muhafaza edilen soğuk saf etil alkol 1(örnek):2(alkol) oranında eklendi. Alkol eklenen örnekler -18 °C'de 1 gün bekletildi. Bir gün -18 °C'de tutulan örnekler alınıp 9 000 rpm 30 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı dökülüp pellet kısmı muhafaza edildi.

Ortamda bulunan fazla iyonlardan ve küçük moleküllerden kurtulmak amacıyla diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz tüpleri 1 mM 250 mL EDTA çözeltisinde 10 dk kaynatıldı. Daha sonra diyaliz tüpleri saf suda 10 dk kaynatılıp kullanılmaya hazır hale getirildi. Pellet kısmına 1-3 mL steril sıcak saf su eklenip çözünmesi sağlandı. Çözünen pelletler diyaliz tüplerine alındı. Diyaliz tüpleri saf suda (çalkalamalı ortamda ve sürekli değiştirilen saf suda) 48 saat bekletildi. İkinci günün sonunda diyaliz tüplerinden alınan

örnekler temiz ependorflara alınıp 60 °C'de 48 saat etüvde kurutuldu. Kuruyan örnekler hassas terazi yardımı ile tartılıp kuru ağırlık tespit edildi.

3.4.7. Karbonhidrat Tayini

Toplam karbonhidrat miktarının tayin etmek için Dubois ve ark. (1956)'nın fenol sülfürik asit metodu uygulandı. Standart grafiği oluşturmak için yoğunluğu 1 mg/mL olacak şekilde stok glikoz çözeltisi hazırlandı. EPS miktarını hesaplamak için 2-300 µg/mL glikoz örnekleri hazırlandı. Çalışmada uzun cam tüpler kullanıldı. Kurutulmuş EPS örnekleri 500 µL saf su ile çözündü. Cam tüplere alınan EPS örnekleri ve standart oluşturmak için glikoz örneklerinin üzerine %80'lik fenolden 25 µL, %95-%98 sülfürik asitten (Merck) 2.5 mL eklenip örnekler karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra ısınan tüpler hızlıca soğutuldu. Örnekler spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda okundu. Bir standart elde edilerek toplam karbonhidrat miktarı hesaplandı.

3.4.8. Protein Tayini

Protein miktar tayini için Lowry ve ark. (1951)'nın yöntemi kullanıldı. Konsantrasyonunu bildiğimiz standart protein çözeltisi (10 mg/ 1 mL BSA) hazırlandı. Artan konsantrasyonlarda standart tüpleri oluşturuldu. Kurutulmuş örnekler 500 µL'de çözündü ve örneklerden 100 µL alındı ve üzerine 400 µL saf su eklendi. Cam tüplere alınan örneklerin üzerine 2 mL alkalin çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Etüvde 15 dk 40 °C'de bekletildi. Etüvden alınan örneklere 1:1 oranında seyreltilen FCR (Folin–Ciocalteu reagent) 500 µL eklendi. Karıştırılıp 30 dk karanlık ortamda bekletildi. Kör tüp ile sıfırlanıp 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Alkalin çözeltisi hazırlanışı

100 mL %4'lük Na_2CO_3 hazırlandı. %4'lük Na-K tartarat ve %2'lik $CuSO_4.5H_2O$ hazırlanıp, 100 mL olan karışım içerisine 1 mL Na-K tartarat ile 1 mL $CuSO_4.5H_2O$ eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Karışım kullanılmak üzere erlene aktarıldı ve folyo ile sarılıp ışık alması engellendi.

3.4.9. EPS'nin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

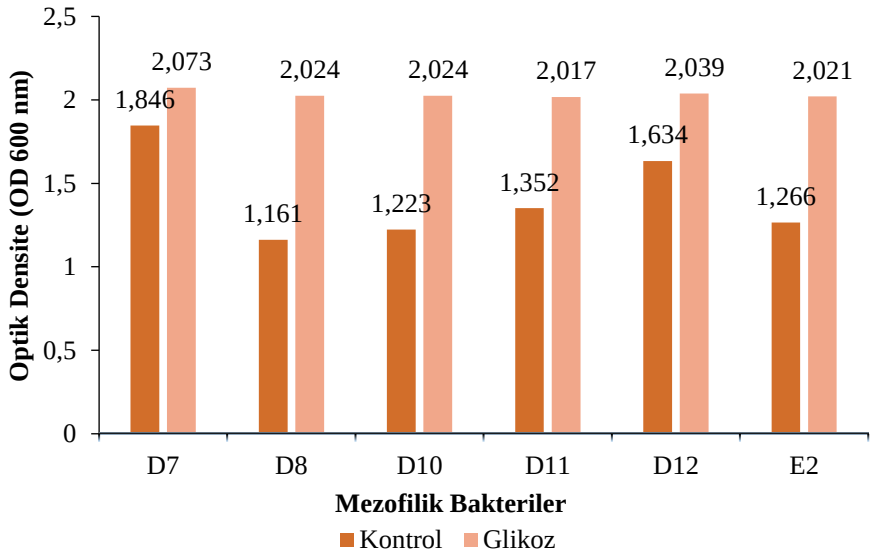
NB sıvı besiyeri ve agar içeren NB besiyerleri hazırlanıp 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Stokta muhafaza edilen dört patojen bakteri *E.coli, S.aureus, K.*

pneumoniae ve *P.aeruginosa* alınıp NB sıvı besiyerine ekimi yapıldı. Sıcak su banyosunda 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen bakterilerden 1 mL alınıp sıvı besiyerlerine aktarıldı. Besiyerleri sıcak su banyosunda 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Petrilere dökülen besiyerlerine üreyen bakterilerden 500 µL eklenip cam baget yardımı ile yayma işlemi yapıldı. Besiyeri üzerine daha sonra kör diskler (Bioanalyse) yerleştirildi. Bu disklerin üzerine 10 µL EPS örneklerinden eklendi. Etüvde 35 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gün sonra zon çaplarının ölçümü yapıldı. Gentamicin (10 µg) referans antibiyotik olarak denendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

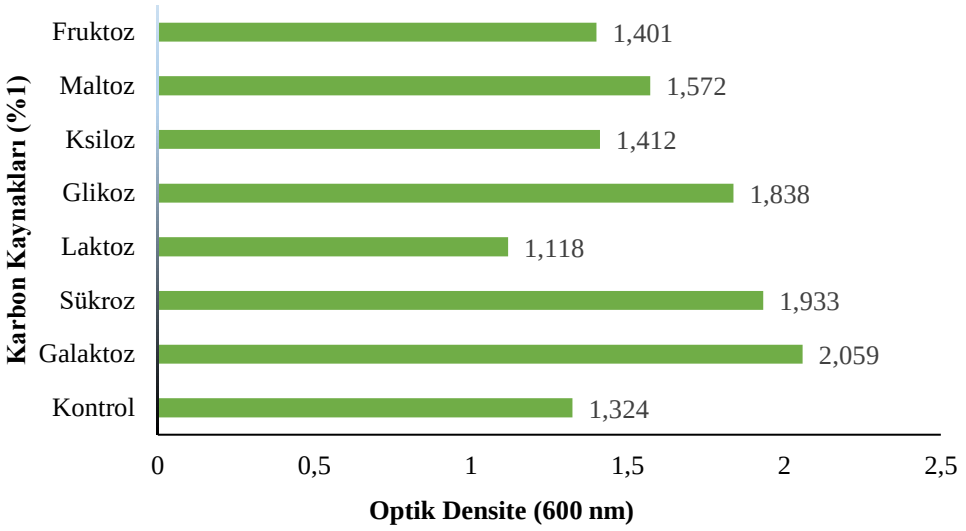
4.1. Mezofilik ve Termofilik Bakterilerin Farklı Karbonhidrat İçeren Farklı Bazal Besiyerlerinde Üremesi

Mezofilik bakteriler olan *P. aeruginosa* D7, *E. ludwigii* D8, *P. putida* D10, *A. pitti* D11, *P. rhodesia* D12 ve *A. calcoacaticus* E2 suşları %0.5 maya içeren M1 besiyerine ve %0.005 maya özütü içeren M2 besiyerine glikoz eklenip 3-5 gün 30 °C'de üremesi için çalkalamalı su banyosuna bırakıldı. Şeker içermeyen besiyeri kontrol olarak alındı ve kontrole göre üremeleri değerlendirildi. Elde edilen kültürlerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.



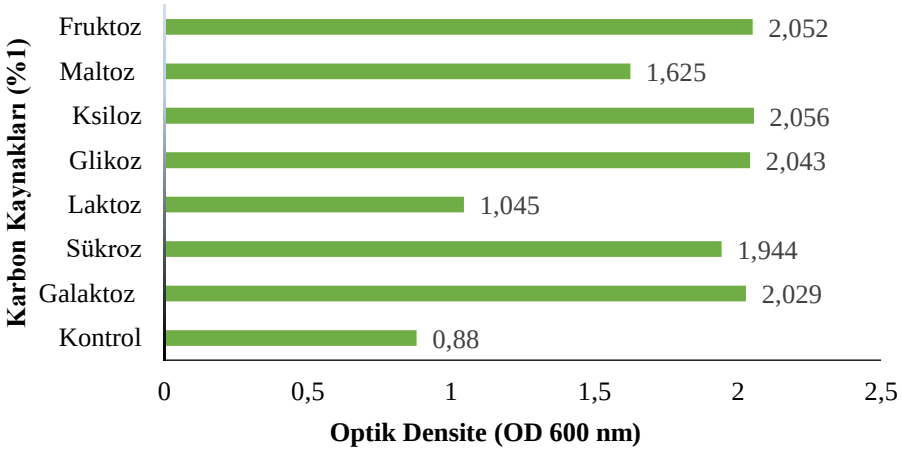
Şekil 4.1. Mezofilik bakterilerin glikozlu M1 besiyerinde üreme grafiği

Kontrolle kıyaslandığında D7 bakterisinde üremede 1.12 kat bir artış, D8 bakterisinde 1.74 kat bir artış, D10 bakterisinde 1.65 kat bir artış, D11 bakterisinde 1.5 kat artış, D12 bakterisinde 1.24 kat artış ve E2 bakterisinde ise 1.6 kat artış gözlemlendi.



Şekil 4.2. %0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında mezofilik *A. calcoacoticus* E2 üreme grafiği

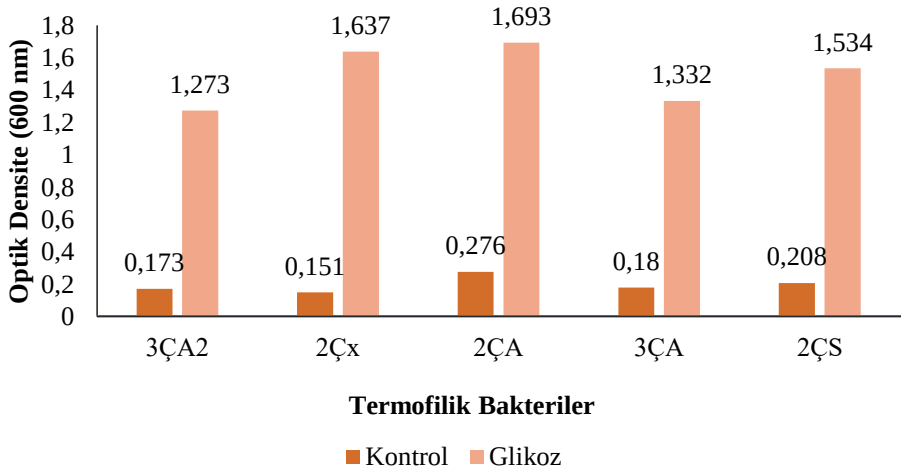
Kontrolle kıyaslandığında *A.calcoacoticus* E2 bakterisinin üremesinde galaktozun 1.55 kat, sükrozun 1.46 kat, glikozun 1.38 kat, ksilozun 1.06 kat, maltozun 1.18 kat, fruktozun 1.05 kat artış sağladığı gözlemlenmiştir. Laktoz ise kontrolden daha az üremiştir.



Şekil 4.3. %0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında mezofilik *P. rhodesiae* D12 üreme grafiği

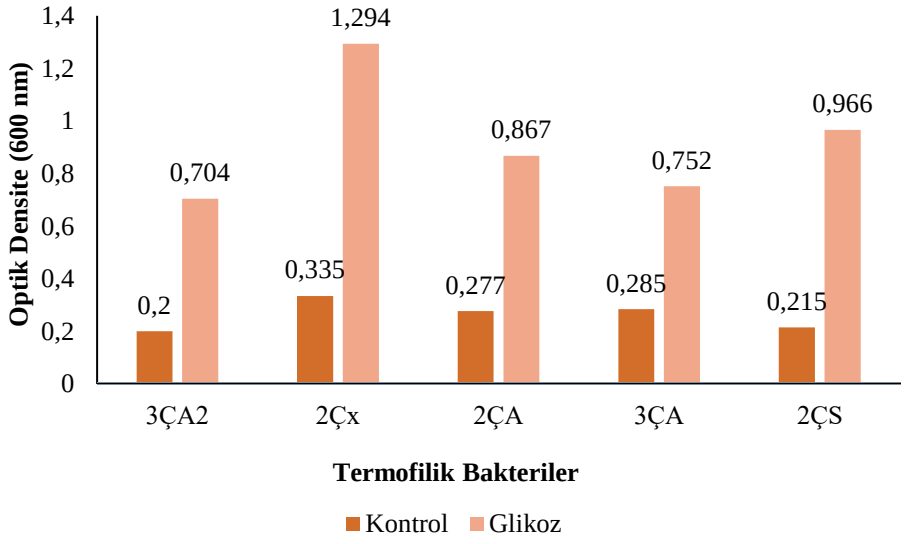
Kontrolle kıyaslandığında *P.rhodesiae* D12 bakterisinin üremesinde galaktozun 2.30 kat, sükrozun 2.20 kat, laktozun 1.18 kat, glikozun 2.32 kat, ksilozun 2.33 kat, maltozun 1.84 kat, fruktozun 2.33 kat artış sağladığı gözlemlendi.

Termofilik bakteriler olan *B.licheniformis* 3ÇA2, *G.vulcani* 2Çx, *B.zhangzhounesis* 2ÇA, *B.licheniformis* 3ÇA ve *B.licheniformis* 2ÇS suşları %0.5 maya içeren M1 ve %0.005 maya özütü içeren M2 besiyerine glikoz eklenip 3-5 gün 50 °C'de çalkalamalı su banyosuna bırakıldı. Elde edilen kültürlerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 4.4. Termofilik bakterilerin glikozlu M1 besiyerinde üreme grafiği

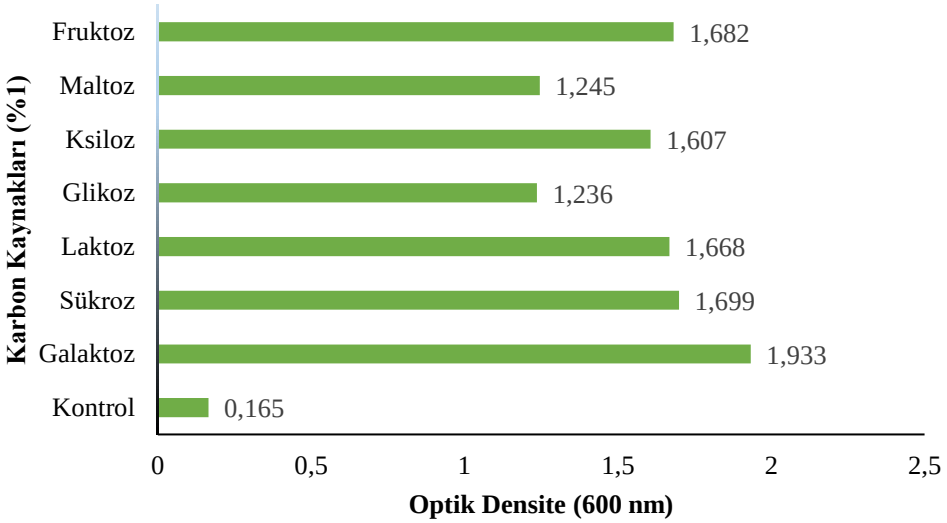
Kontrolle kıyaslandığında 3ÇA2 bakterisinde üremede 7.35 kat artış, 2Çx bakterisinde 10.8 kat artış, 2ÇA bakterisinde 6.13 kat artış, 3ÇA bakterisinde 7.4 kat artış, 2ÇS bakterisinde 7.37 katlık bir artış gözlemlendi.



Şekil 4.5. Termofilik bakterilerin glikozlu M2 besiyerinde üreme grafiği

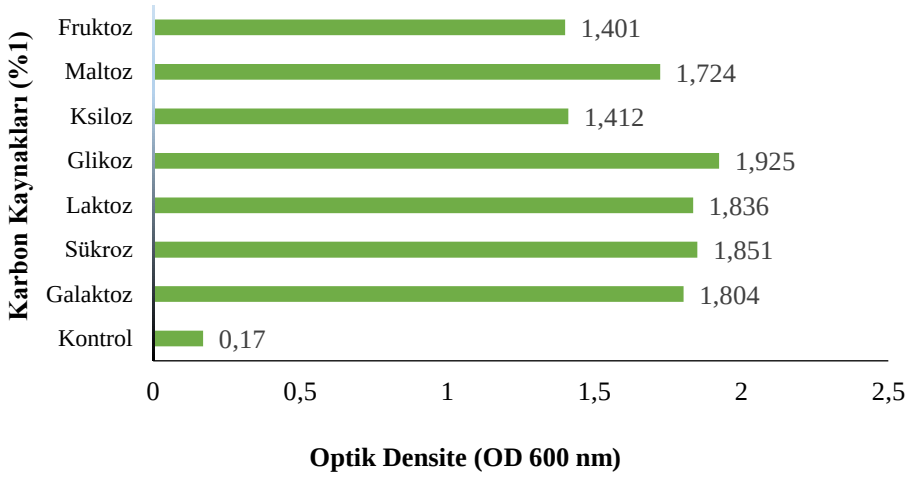
Kontrolle kıyaslandığında 3ÇA2 bakterisinde üremede 3.52 kat artış, 2Çx bakterisinde 3.86 kat artış, 2ÇA bakterisinde 3.81 kat artış, 3ÇA bakterisinde 2.63 kat artış, 2ÇS bakterisinde 4.49 katlık bir artış gözlemlendi.

Bu sonuçlar doğrultusunda M2 besiyerinde tuz içerik oranı fazla olduğundan ve çökme durumu meydana gelebileceğinden M2 besiyeri elimine edildi. %0.5 maya oranı içeren M1 besiyeri seçilip termofilik bakterilerden 2ÇA ve 3ÇA suşları seçilip maltoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, sükroz, laktoz ve glikoz şekerleri denendi. 50 °C'de 3-5 gün çalkalamalı su banyosunda üremeleri için bırakıldı.



Şekil 4.6. %0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında termofilik *B. zhangzhounesis* 2ÇA üreme grafiği

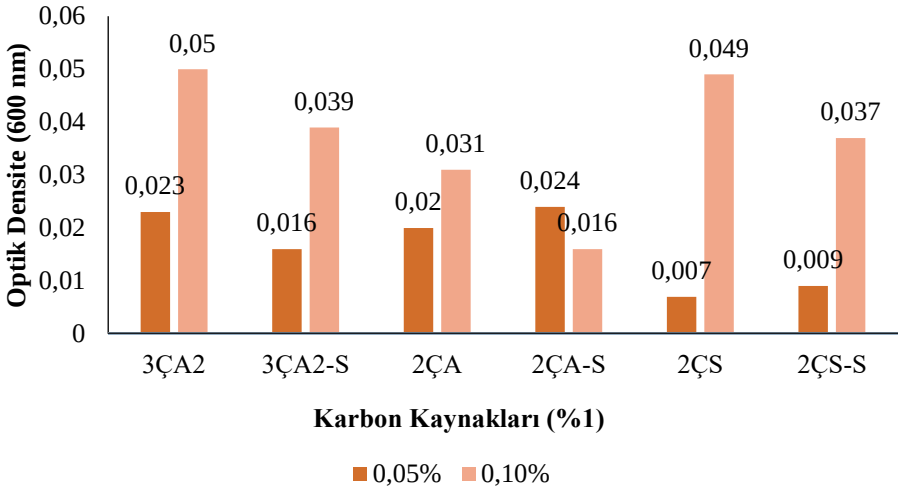
Kontrolle kıyaslandığında *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin üremesinde galaktozun 11.7 kat, sükrozun 10.2 kat, laktozun 10 kat, glikozun 7.5 kat, ksilozun 9.73 kat, maltozun 7.5 kat, fruktozun ise 10 kat artış sağladığı gözlemlendi.



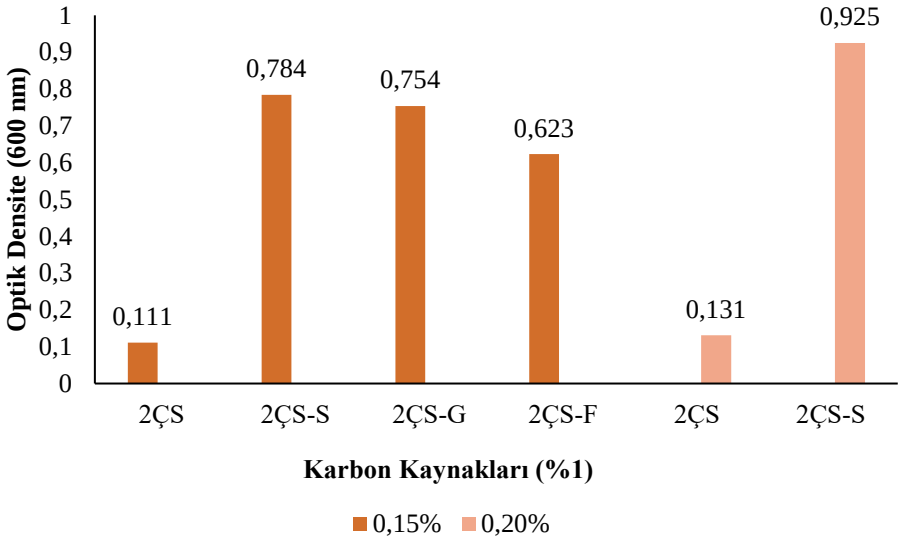
Şekil 4.7. %0.5 maya oranı içeren M1 besiyerinde farklı karbon kaynaklarında termofilik *B. licheniformis* 3ÇA üreme grafiği

Kontrolle kıyaslandığında *B.licheniformis* 3ÇA bakterisinin üremesinde galaktozun 10.6 kat, sükrozun 10.8 kat, laktozun 10.8 kat, glikozun 11.3 kat, ksilozun 8.3 kat, maltozun 10.1 kat, fruktozun ise 8.2 kat artış sağladığı gözlemlendi.

%0.5 maya konsantrasyonunda üremesi sağlanan bakterileri daha düşük maya konsantrasyonlarında üremelerini gözlemlemek amacıyla %0.05, %0.1, %0.15, %0.2 konsantrasyonlarında maya kullanıldı. Çalışmanın bu kısmında besiyeri olarak M3 besiyeri ve karbon kaynağı olarak da kullanılan şekerler ise sükroz, glikoz ve fruktoz oldu. Termofilik bakterilerden 3ÇA2, 2ÇA ve 2ÇS suşlarının bu besiyerlerine ekimi yapılıp 50 °C'de üremeleri gözlemlendi. Bu bakterilerin %0.05 ve %0.1 maya konsantrasyonu içeren M3 besiyerinde üremesi sağlanamadı.

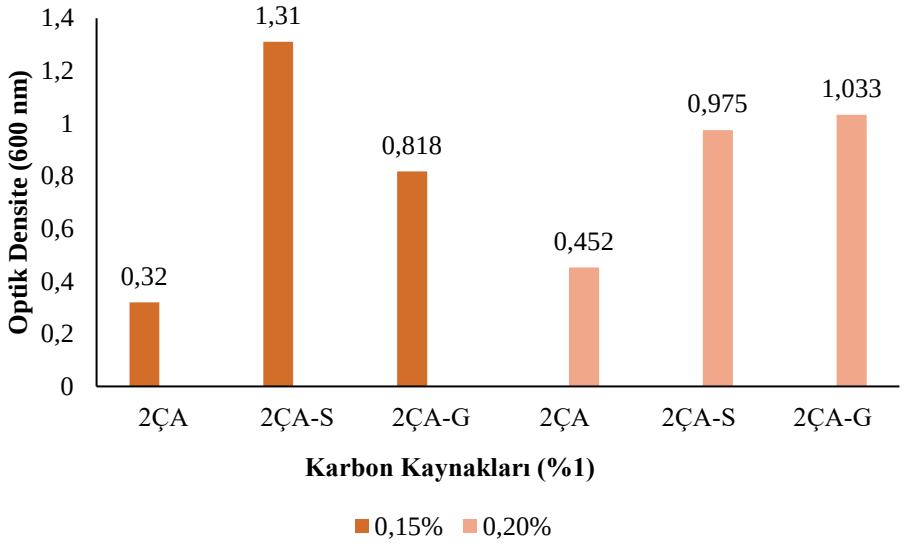


Şekil 4.8. Termofilik bakterilerin %0.05 ve %0.1 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği



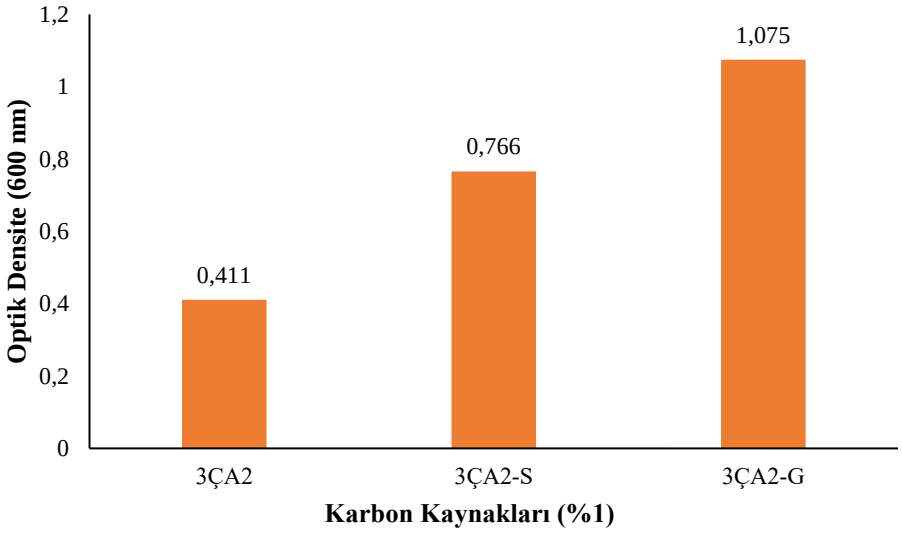
Şekil 4.9. *B. licheniformis* 2ÇS bakterisinin %0.15 ve %0.2 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği

Kontrolle kıyaslandığında *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin üremesinde %0.15 maya özütü içeren besiyerinde sükrozun 7.06 kat, glikozun 6.79 kat, fruktozun 5.6 kat, %0.2 maya özütü içeren besiyerinde sükrozun 7.06 kat artış sağladığı gözlemlendi.



Şekil 4.10. *B. zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin %0.15 ve %0.2 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği

Kontrolle kıyaslandığında *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin üremesinde %0.15 maya içeren besiyerinde sükrozun 4.09 kat, glikozun 2.55 kat, %0.2 maya içeren besiyerinde sükrozun 2.15, glikozun 2.28 kat artış sağladığı gözlemlendi.

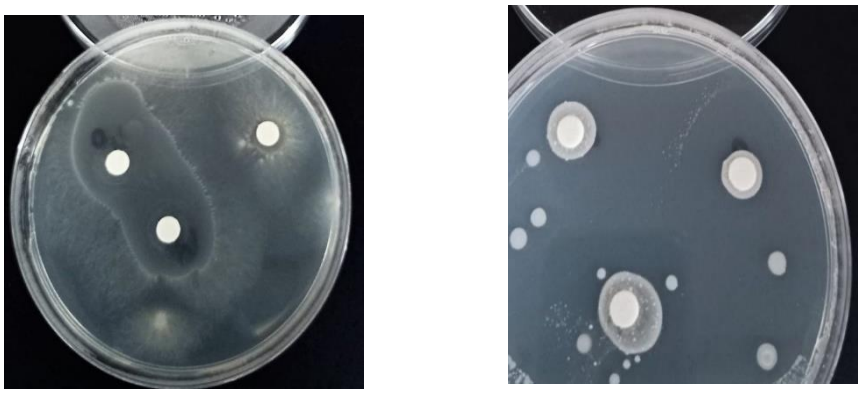


Şekil 4.11. *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin %0.15 maya içeren M3 besiyerinde üreme grafiği

Kontrolle kıyaslandığında *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin üremesinde %0.15 maya içeren besiyerinde sükrozun 1.86 kat, glikozun ise 2.61 kat artış sağladığı gözlemlendi.

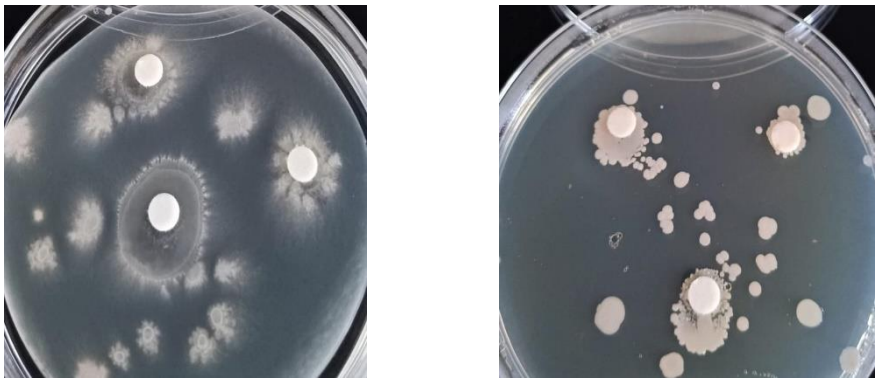
4.2. Termofilik Bakterilerin Petri Kutuları Üzerinde EPS Üretimlerinin Belirlenmesi

Besiyerinde slime yapısının oluşup oluşmadığına bakmak, besiyerinde tabaka halinde üreme olup olmadığını incelemek amacıyla bu deney yapıldı. %0.1 ve %0.2 maya özütü içeren minimal besiyerlerine ve 10 kat seyreltilmiş NB besiyerine %1 konsantrasyonunda sükroz eklendi. Besiyeri üzerine bırakılan disklere termofilik bakteri olan *B. licheniformis* 3ÇA2, *B.zhangzhounesis* 2ÇA ve *B. licheniformis* 2ÇS suşları aktarıldı. İnkübasyon için etüvde 50 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu EPS üretim durumları gözlemlendi.



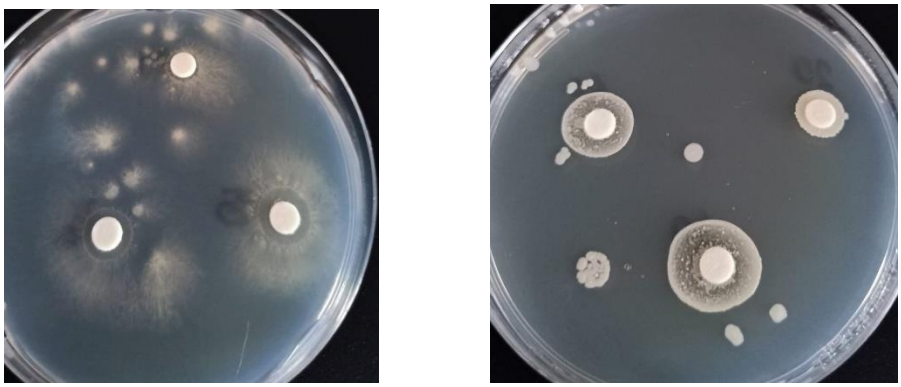
a) **b)**

Şekil 4.12. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 3ÇA2 bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.1 maya özütü, kontrol; b: %0.1 maya özütü + %1 Sükroz)



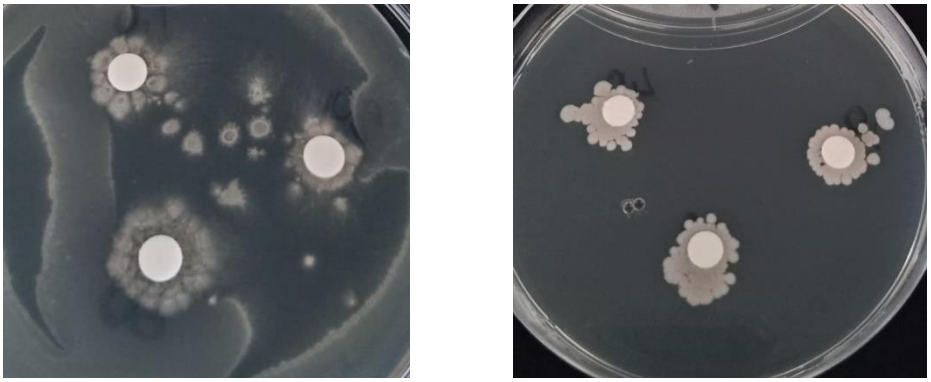
a) **b)**

Şekil 4.13. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 3ÇA2 bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)



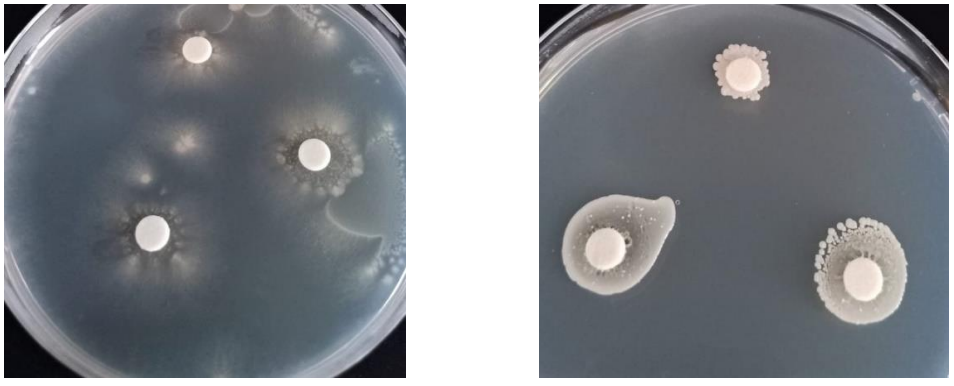
a) **b)**

Şekil 4.14. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.1 maya özütü, kontrol; b: %0.1 maya özütü + %1 sükroz)



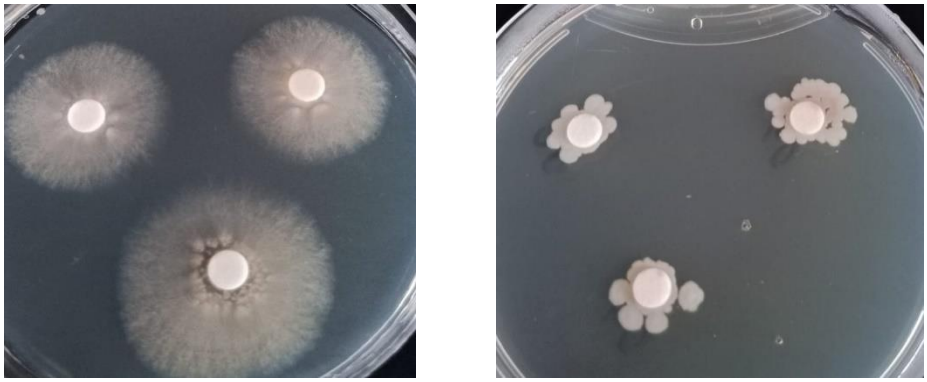
a) **b)**

Şekil 4.15. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)



a) **b)**

Şekil 4.16. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 2ÇS bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a:%0.1 maya özütü, kontrol; b:%0.1 maya özütü+%1 sükroz)



a) **b)**

Şekil 4.17. Sükroz eklenen BM besiyerinde *Bacillus licheniformis* 2ÇS bakterisinde EPS üretiminin tespiti (a: %0.2 maya özütü, kontrol; b: %0.2 maya özütü + %1 sükroz)

Minimal katı besiyerlerinde kontrol ile şeker içeren besiyerlerinde üreme durumları gözlemlenip sonuç elde edildi. Buna göre karbon kaynağı olarak şeker içermeyen besiyerinde bakterilerin dağılarak yayılma şeklinde ürediği, karbon kaynağı olarak şeker içeren besiyerlerinde ise slime yapıda tabaka oluşturma ve bir arada bulunarak üreme eğilimi gösterdiği sonucu elde edildi. Bütün bakterilerin kontrol besiyerinde dağılarak üreme, sükroz içeren besiyerinde ise slime yapıda tabaka oluşturarak üreme eğilimi gösterdiği sonucu elde edildi. Bu oluşum da bakteri suşlarının elde edilen slime yapıdan dolayı EPS ürettikleri sonucunu vermektedir. *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi ve *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinde %0.1 maya özütü ve sükroz içeren besiyerinde en iyi EPS üretiminin mevcut olduğu gözlemlendi.

4.3. Termofilik bakterilerde Total EPS Miktar Tayini

B.licheniformis 2ÇS, *B.zhangzhounesis* 2ÇA ve *B.licheniformis* 3ÇA2 termofilik bakterileri için M3 besiyerinde total EPS üretimi için sükroz, glikoz ve fruktoz şekerleri kullanıldı. Alkol ile çöktürme işleminden sonra örnekler santrifüj edildi. Pellet kısmı sıcak saf su ile çözündü ve örnekler diyaliz tüplerine aktarıldı. Diyaliz tüplerinden alınıp ependorf tüplerine aktarılan örnekler kurutulmaları için etüvde 60 °C'ye bırakıldı. Geriye sıvı kalmayacak şekilde kuruyan örnekler alınıp hassas terazi yardımı ile tartıldı. Bunun sonucunda elde edilen tartım sonuçları ise tablo olarak verildi.

B.licheniformis 2ÇS bakterisi için %0.15 ve %0.2 maya özütü içeren M3 besiyerinden elde edilen EPS kuru ağırlık miktarı;

Çizelge 4.1. *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı

Besiyerleri	**Tartım sonucu (mg/100 mL)**
%0.15-Kontrol	4.5
%0.15-Sükroz	10.5
%0.15-Glikoz	7.1
%0.15-Fruktoz	12.1
%0.2-Kontrol	3.3
%0.2-Sükroz	121

B.zhangzhounesis 2ÇA bakterisi için %0.15 ve %0.2 maya özütü içeren M3 besiyerinden elde edilen EPS kuru ağırlık miktarı;

Çizelge 4.2. *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı

Besiyerleri	**Tartım Sonucu (mg/100 mL)**
%0.15-Kontrol	6
%0.15-Sükroz	45
%0.15-Glikoz	7
%0.2-Kontrol	5
%0.2-Sükroz	30
%0.2-Glikoz	10.3

B.licheniformis 3ÇA2 bakterisi için %0.15 maya özütü içeren M3 besiyerinden elde edilen EPS kuru ağırlık miktarı;

Çizelge 4.3. *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisi için EPS kuru ağırlık miktarı

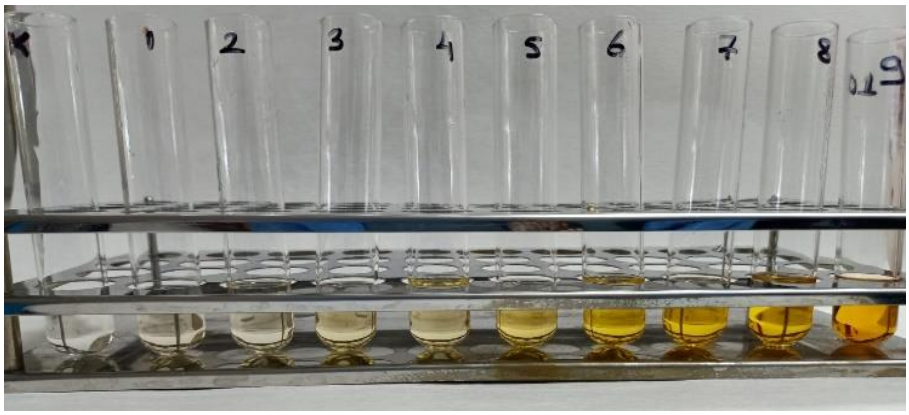
Besiyerleri	**Tartım Sonucu (mg/100 mL)**
%0.15- Kontrol	11.8
%0.15- Glikoz	10.9
%0.15-Sükroz	32.4

100 mL olarak hazırlanan besiyerlerinden *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi için elde edilen en iyi sonuç %0.2- sükroz 121 mg/mL, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisi için en iyi

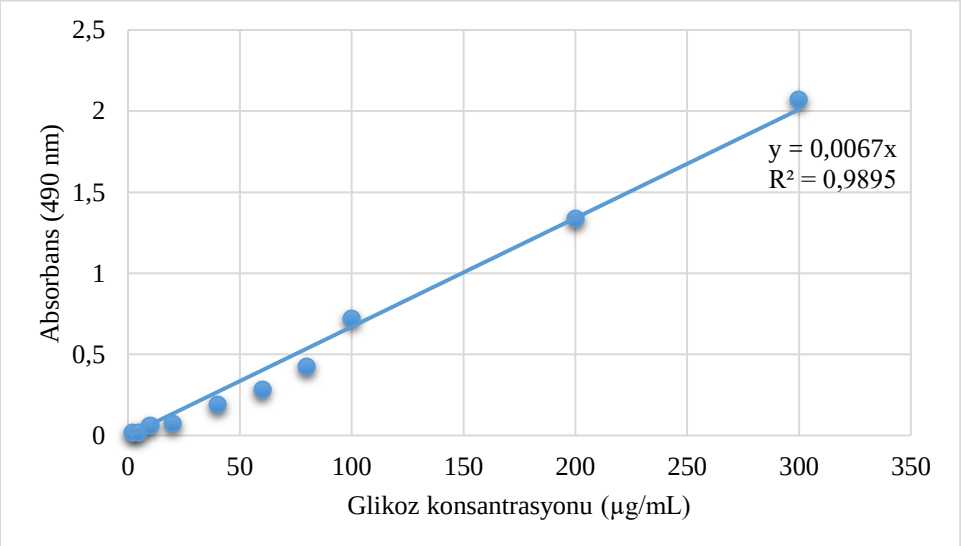
sonuç %0.15-sükroz 45 mg/mL, *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi için elde edilen en iyi sonuçlar %0.15- sükroz 12.1 mg/mL, %0.15- fruktoz 12.1 mg/mL, *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisi için en iyi sonuç %0.15- sükroz 32.4 mg/mL oldu.

4.4. Total EPS'lerde Karbonhidrat Miktar Tayini

Kurutulan örnekler saf su ile çözünüp karbonhidrat tayini için hazır hale getirildi. Cam tüplere alınan örneklerin üzerine fenol ve sülfürik asit eklendi. Kör ile spektrofotometre sıfırlandı. Hazırlanan örnekler ve glikoz standartı (Şekil 4.16.) 490 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

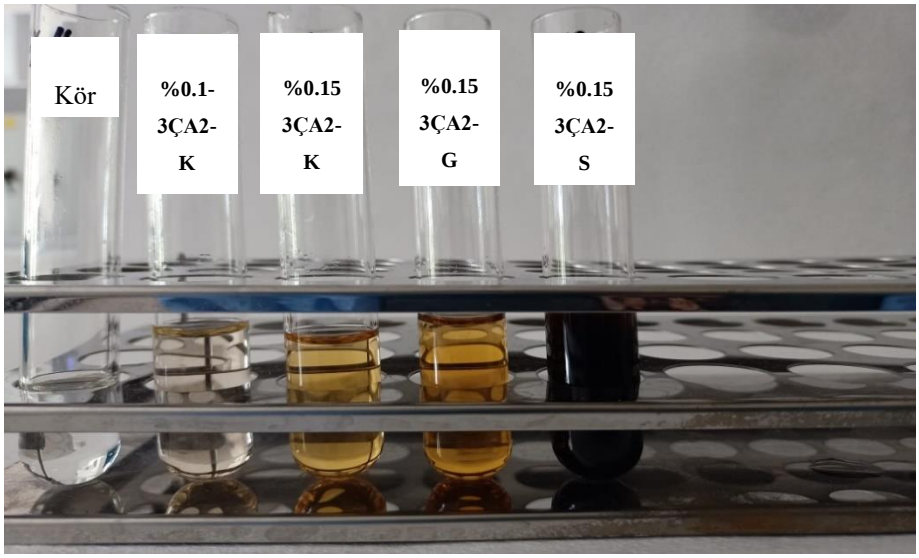


Şekil 4.18. Glikoz standartı

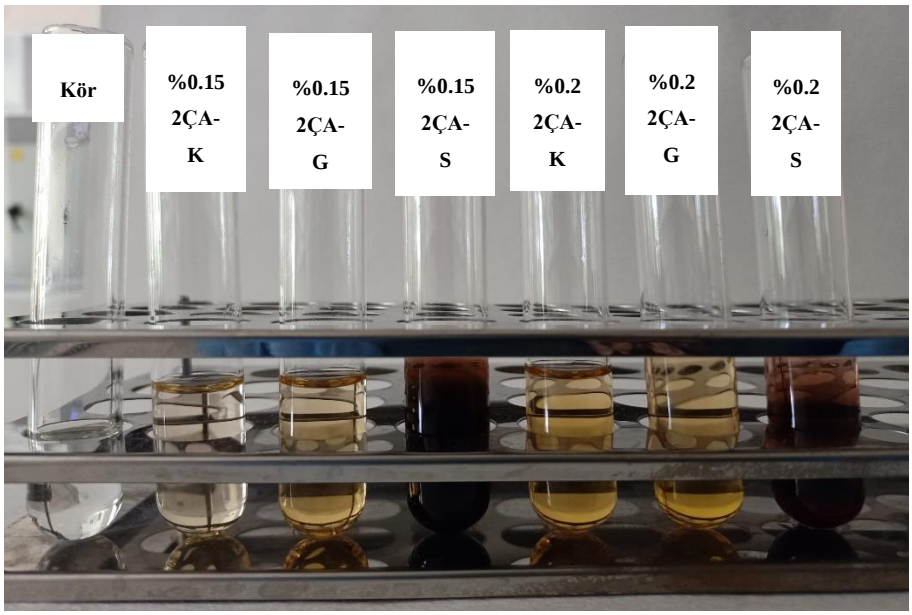


Şekil 4.19. Glikoz standart eğrisi

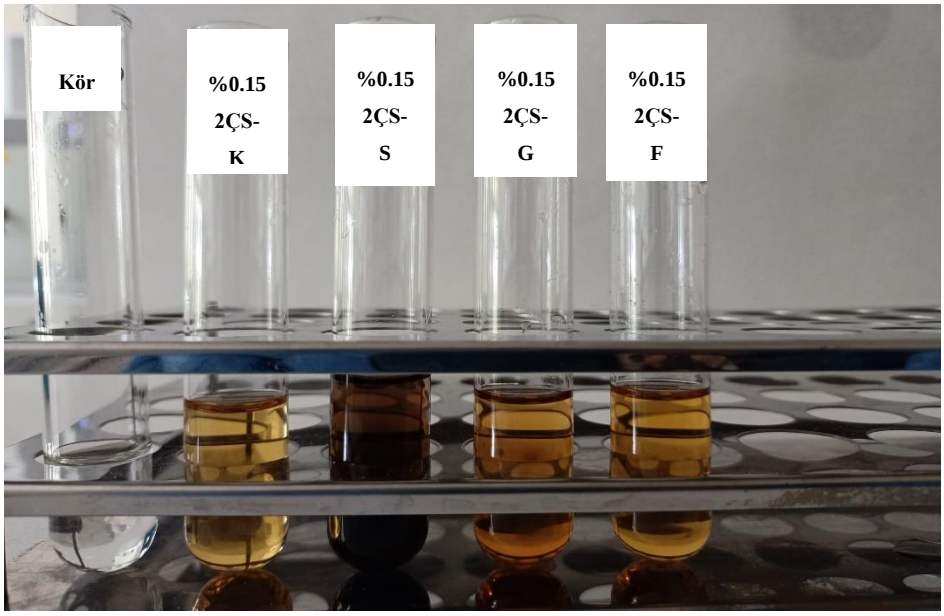
Spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda grafik oluşturuldu. Elde edilen grafiğin denklemi y= 0.0067x, R^2 =0.98895 olarak bulundu.



Şekil 4.20. *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin EPS karbonhidrat tayini



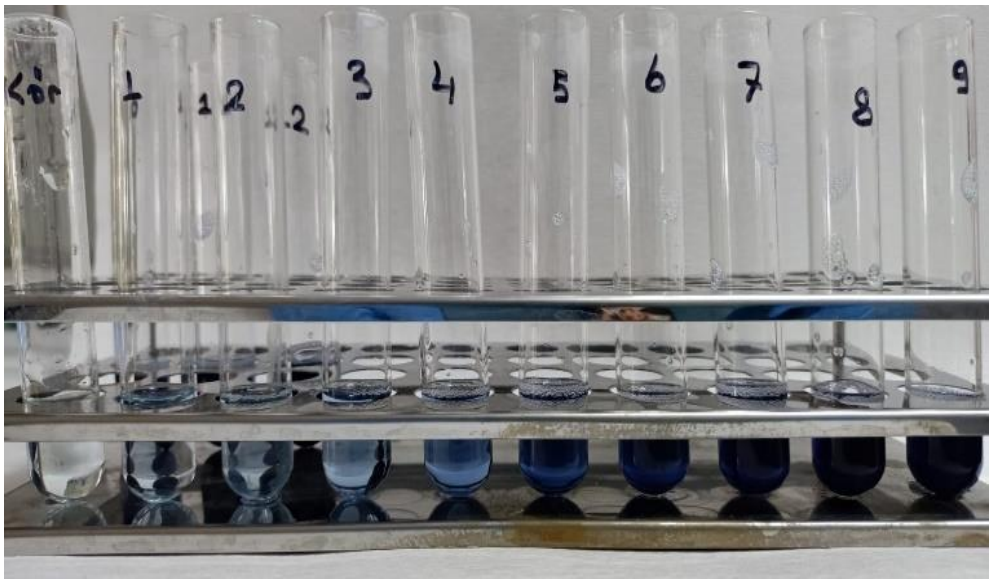
Şekil 4.21. *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin EPS karbonhidrat tayini



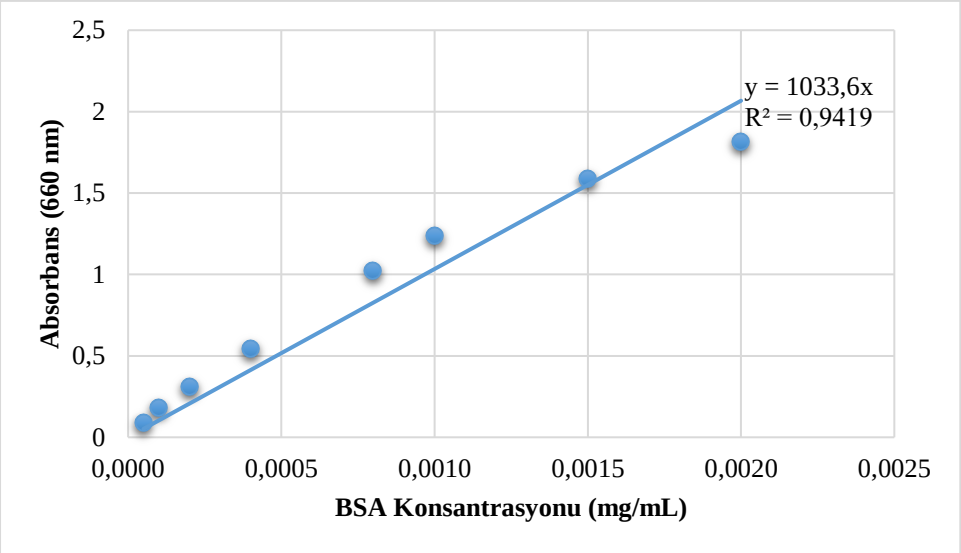
Şekil 4.22. *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin EPS karbonhidrat tayini

4.5. Total EPS'lerde Protein Miktar Tayini

Kurutulan örnekler saf su ile çözündü. Cam tüplere alınan örneklere alkalin çözeltisi ve FCR eklendi. Kör ile spektrofotometre sıfırlandı. Hazırlanan örnekler ve BSA standartı (Şekil 4.21.) 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

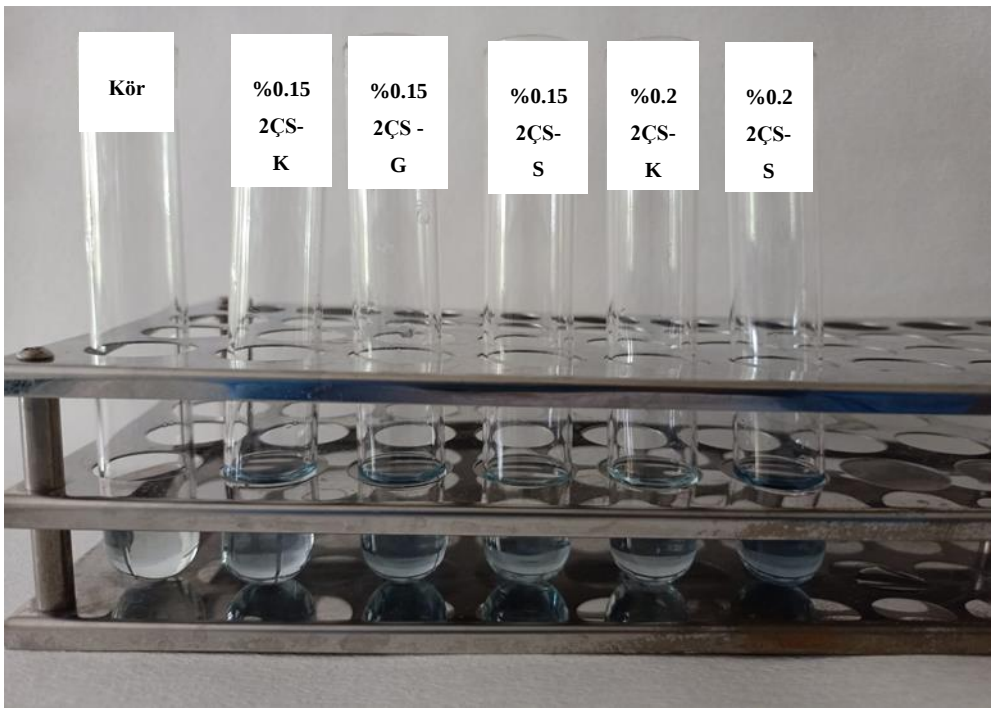


Şekil 4.23. BSA standartı

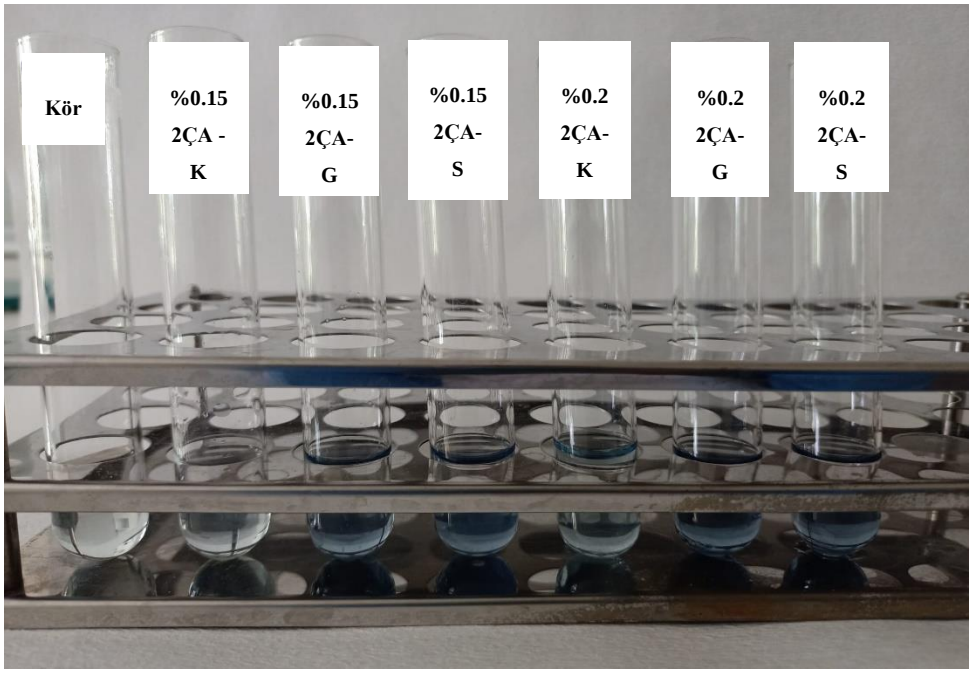


Şekil 4.24. BSA ile hazırlanan protein standart eğrisi

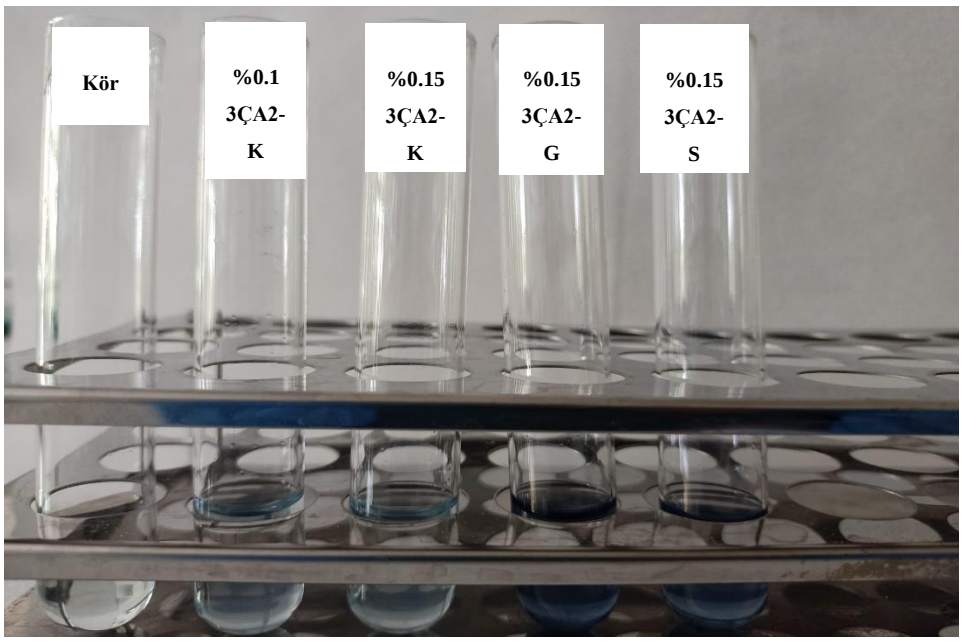
Spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda grafik oluşturuldu. Elde edilen grafiğin denklemi y= 1033.6x, R^2 =0.9419 olarak bulundu.



Şekil 4.25. *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin EPS protein tayini



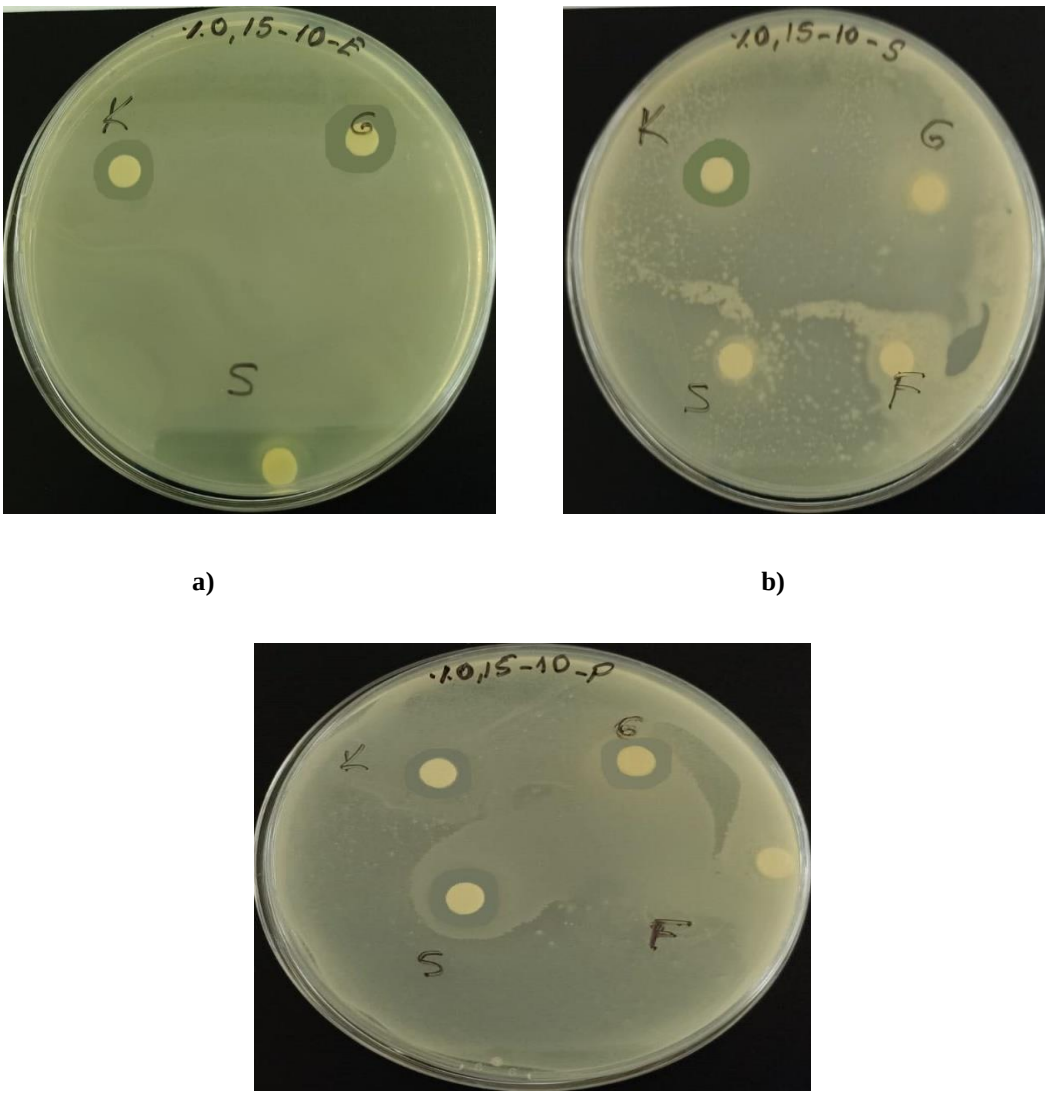
Şekil 4.26. *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin EPS protein tayini



Şekil 4.27. *B. licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin EPS protein tayini

4.6. EPS'lerin Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi

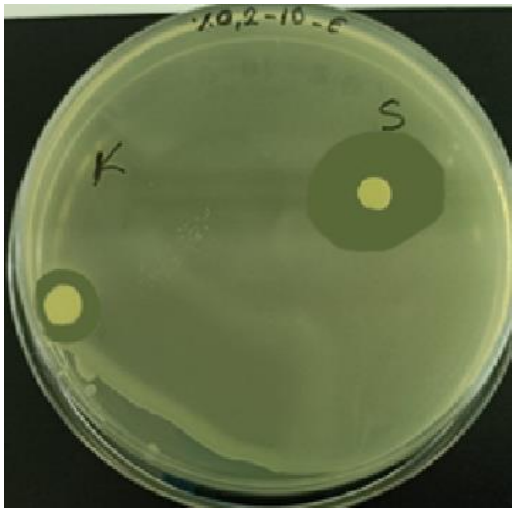
Besiyerine patojen dört bakterinin ekimi yapıldıktan sonra besiyeri üzerine diskler yerleştirildi. Bu disklerin üzerine örnekler eklendi. Disk üzerine bırakılan örnekler etüvde bir gün inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra etüvden alınan örneklerin zon çapları ölçüldü. Referans zon çapı sonuçları *E.coli* Gentamicin (10 µg) 18 mm, *S.aureus* Gentamicin (10 µg) 21 mm, *P.aeruginosa* Gentamicin (10 µg) 20 mm, *K.pneumoniae* Gentamicin (10 µg) 19 mm olarak elde edildi.



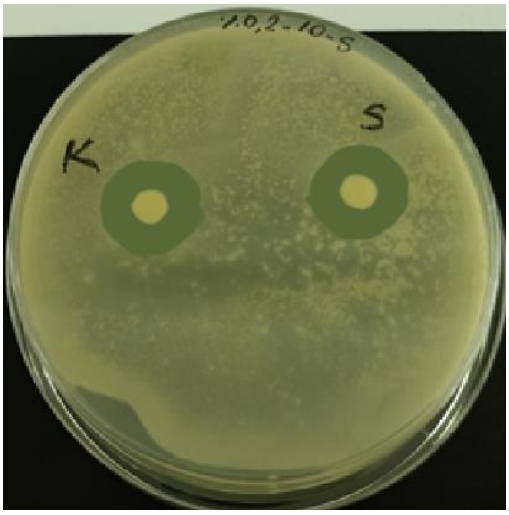
a) **b)**

c)

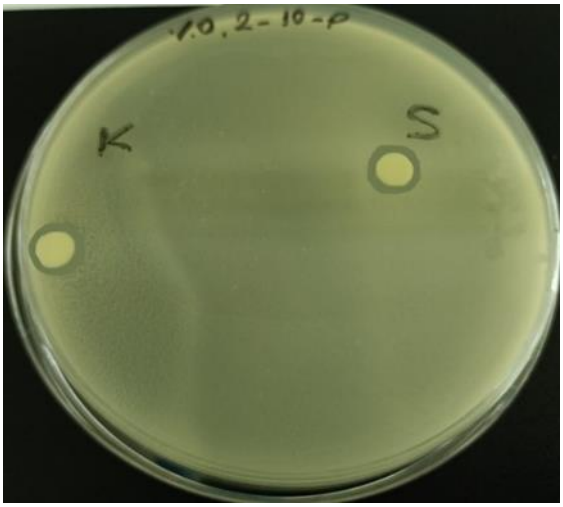
Şekil 4.28. *B.licheniformis* 2ÇS'daki EPS'nin
a) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi
b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi
c) *P.aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkisi



a)

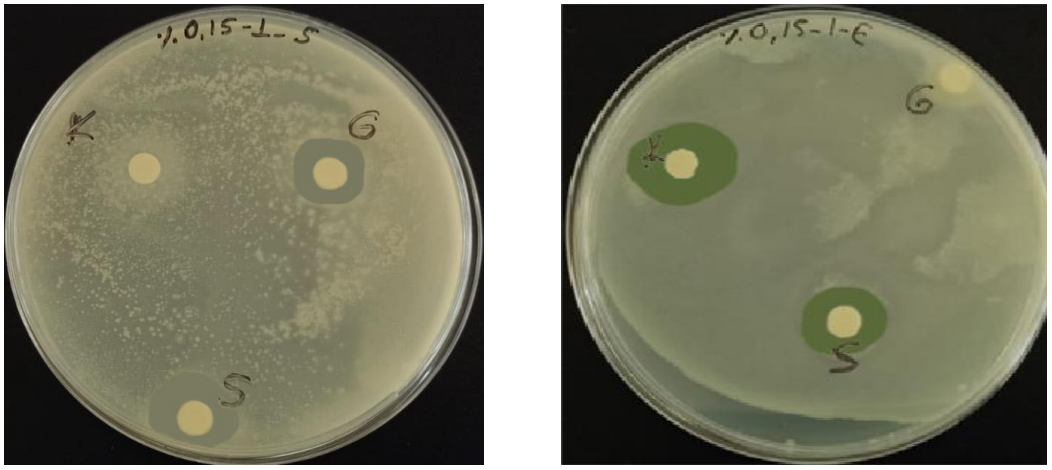


b)



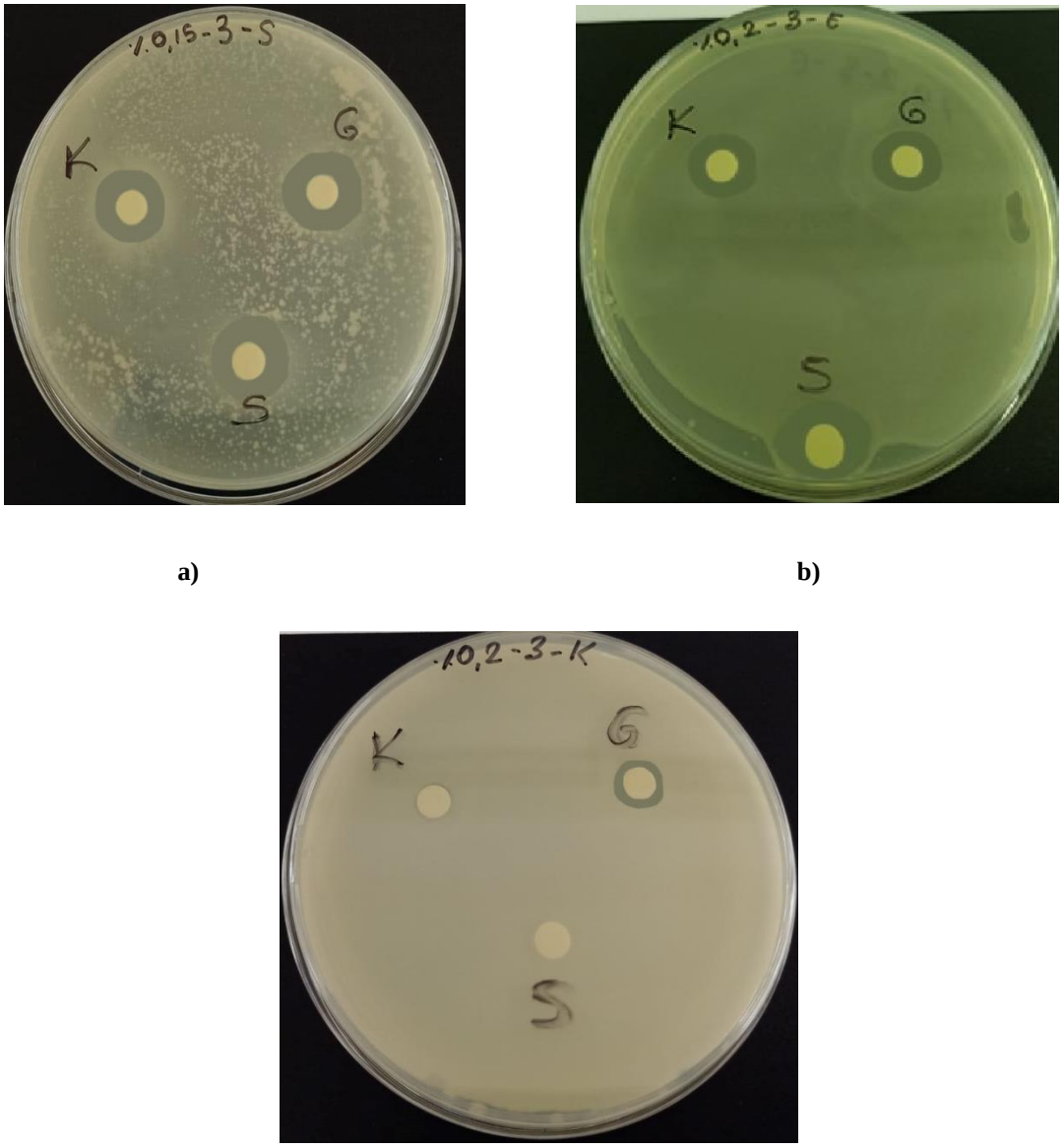
c)

Şekil 4.29. *B.licheniformis* 2ÇS'daki EPS'nin
a) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi
b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi
c) *P.aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkisi



a) **b)**

Şekil 4.30. *B.licheniformis* 3ÇA2'daki EPS'nin a) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi



a) **b)**

c)

Şekil 4.31. *B.zhangzhounesis* 2ÇA'daki EPS'nin
a) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi
b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi
c) *K.pneumoniae*'ya karşı antibakteriyel etkisi

Çizelge 4.4. EPS'lerin antibakteriyel etkileri

Örnekler	*E.coli*	*S.aureus*	*K.pneumoniae*	*P.aeruginosa*
%0.15- 2ÇS	K- 10 mm	K- 10 mm	-	K- 8 mm
		G -		G- 8 mm
	G- 12 mm	S -		S- 8 mm
	S -	F -		F -
%0.2- 2ÇS	K- 8 mm	K-12 mm	-	K- 6 mm
	S- 16 mm	S- 12 mm		S- 6 mm
%0.15- 3ÇA2	K- 12 mm	K -	-	-
	G -	G- 10 mm		
	S- 8 mm	S- 14 mm		
%0.15- 2ÇA	-	K- 10 mm	-	-
		G- 12 mm		
		S- 12 mm		
%0.2- 2ÇA	K- 6 mm	-	K -	-
	G- 6 mm		G- 6 mm	
	S- 10 mm		S -	

K: kontol, G: glikoz, S: sükroz ve F: fruktoz olarak ifade edildi. Zon çapları milimetre olarak ölçülmüştür.

%0.15 maya özütü içeren minimal besi ortamında sükroz şeker varlığında *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinden elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisine bakıldığında **Çizelge 4.4**.'de görüldüğü gibi *P.aeruginosa*'ya karşı glikozlu ortamdan elde edilen EPS'nin 8 mm, sükrozlu ortamdan elde edilen EPS'nin 8 mm ve glikozlu ortamda 8 mm, *E.coli*'ye karşı glikozlu ortamdan elde edilen EPS'nin 12 mm, zon çapıyla antibakteriyel aktivite gösterdiği, *S.aureus* ve *K. pneumoniae*'ya karşı etki göstermediği belirlenmiştir. Fruktozlu ortamdan elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisi gözlemlenmemiştir. %0.2 maya özütü içeren minimal besi ortamında sükroz varlığında

B.licheniformis 2ÇS bakterisinden elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisine bakıldığında *P.aeruginosa, E.coli* ve *S.aureus*'a karşı 6 mm, 16 mm, 12 mm, zon çapı ile antibakteriyel etki gösterdiği ancak *K.pneumoniae*'ya karşı etki göstermediği belirlendi. %0.15 maya özütü içeren minimal besi ortamında sükroz varlığında *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinden elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisine bakıldığında *E.coli*'ye karşı 8 mm, *S.aureus*'a karşı sükroz varlığında 14 mm, glikoz varlığında 10 mm, zon çapı ile antibakteriyel etki gösterdiği ancak *K.pneumoniae*'ya ve *P.aeruginosa*'ya karşı etki göstermediği belirlendi. %0.15 maya özütü içeren minimal besi ortamında sükroz varlığında *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinden elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisine bakıldığında *S.aureus*'a karşı 12 mm, glikoz varlığında 12 mm, zon çapı ile antibakteriyel etki gösterdiği ancak *E.coli, K.pneumoniae* ve *P.auruginosa*'ya karşı etki göstermediği belirlendi. %0.2 maya özütü içeren minimal besi ortamında sükroz varlığında *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinden elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisine bakıldığında *E.coli*'ye karşı 10 mm, glikoz varlığında 6 mm, *K.pneumoniae*'ya karşı glikoz varlığında 6 mm, zon çapı ile antibakteriyel etki gösterdiği ancak *S.aureus* ve *P.auruginosa*'ya karşı etki göstermediği belirlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal polimerler olan EPS'ler benzersiz ve karmaşık kimyasal yapıya sahiptir. Bu yapıları onları gıda, petrol, ilaç ve diğer birçok endüstriyel alanda ilginç kılmakta. Prokaryot (gram negatif ve gram pozitif bakteriler) ve ökaryotların (mantarlar ve bazı algler) EPS üretimini gerçekleştirebildiği bilinmektedir (Sardari ve ark. 2017).

Birçok mikroorganizma zor şartlar altında hayatta kalmak amacıyla ekzopolisakkarit üretirler. Ekstremofiller tarafından üretilen ekzopolisakkaritler zorlu şartlar altında mikroorganizmanın biyopolimer üretmesi için uyarır. Yüksek sıcaklıkta genellikle çoğu kimyasal reaksiyonun hızı artar ve belirli zaman aralığında kümülatif üretimi iyileştirir. Bundan dolayı termofiller önemli bileşiklerin sentezinde ticari olarak değere sahiptir ve birçok endüstri alanında ilgi görmektedir (Wang ve ark. 2019).

Ekstremofilik mikroorganizmalar ve onların ürettiği EPS'ler çeşitli biyoteknolojik avantaj sunmaktalar. Örneğin termofiller için kısa fermantasyon, psikofillerden EPS'lerin stabil emülsiyon gibi avantajları vardır. Mezofilik EPS üreticilerinin birçoğu patojeniktir bunlardan farklı olarak ekstremofilik EPS üreticileri gıda alanı için uygun, ilaç ve kozmetik endüstrisinde emülgatör olarak patojenik olmayan ürünler sağlar (Nicolaus ve ark. 2010)

Termofilik bakterilerden *B.licheniformis* 3ÇA2, *G.vulcani* 2Çx, *B.licheniformis* 3ÇA, *B.licheniformis* 2ÇS ve *B.zhangzhounesis* 2ÇA suşları mezofilik bakterilerden *A.calcoaceticus* E2, *P.aeruginosa* D7, *E.ludwigi* D8, *P.putida* D10, *A.pittii* D11 ve *P.rhodesiae* D12 suşlarının EPS üretim kapasitelerinin belirlendiği üç farklı besiyeri, farklı oranlarda maya özütü ve farklı karbon kaynakları tez çalışmasında kullanıldı.

Kullanılan bakterilerin karbon kaynağı varlığında üreyip üremediğini gözlemlemek amacıyla besiyerlerinde ilk önce glikoz kullanıldı. Bunun sonucunda M1 besiyerinde *E.ludwigi* D8 bakterisinin 1.74 kat, *G.vulcani* 2Çx bakterisi 10.8 kat, M2 besiyerinde ise *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin 4.49 kat artış ile en iyi üreme gösterdiği gözlemlendi

M1 besiyerinde *A.calcoacoticus* E2 bakterisinin üremesinde galaktozun 1.55 kat, *P.rhodesiae* D12 bakterisinin üremesinde ksilozun ve fruktozun 2.33 kat, glikozun 2.33 kat, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin üremesinde galaktozun 11.7 kat ve *B.licheniformis* 3ÇA bakterisinin üremesinde glikozun 11.3 kat ile en iyi üreme gösterdiği

tespit edildi. Sükroz içeren M3 besiyerinde *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin üremesinde 7.06 kat, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin 4.09 kat ve *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisi glikoz içeren besiyerinde 2.61 kat artış ile en iyi üreme gösterdiği gözlemlendi.

Razack ve ark. (2013) toprak izolatından, *B.subtilis'ten* geliştirilmiş EPS üretimi için, her seferinde bir faktör yöntemiyle bir ortamı optimize etmeye çalışmışlardır. Karbon kaynağı olarak belirli tarımsal substratlar, şeker kamışı pekmezi ve pirinç kepeğini kullanmışlar. %2'lik konsantrasyonda şeker kamışı pekmezi 4.86 g EPS/L ile en yüksek verimi, sükrozlu ortama kıyasla (2.98 g EPS/L), elde etmişlerdir. Berekaa (2014), filogenetik olarak *B.licheniformis'e* yakın olan bakteriyi kullanmış ve bakterinin glikoz veya sükroz içeren bazal tuz ortamında 1.9-2.8 kat EPS üretiminde artış olduğunu göstermiştir. Moghannem ve ark. (2018), *B.velezensis* KY498625 suşu ile maksimum EPS üretimi için optimal büyüme ortamı kompozisyonunu açıklamak için çeşitli faktörleri değerlendirmişler. Farklı karbon ve azot kaynakları kullanılmış olup, bu deneyden elde edilen sonuçları; en iyi karbon kaynağı 4.2 g/L, %4 w/v şeker kamışı iken, en düşük konsantrasyon nişasta ile 1.88 g/L (%4 w/v) bulmuşlardır. En iyi nitrojen kaynağı 4,4 g/L, 3 g/L maya özütü konsantrasyonunda bulmuşlar. Wang ve ark. (2019), karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz kullanıldıklarında termofilik bakteri olan *Geobacillus* WSUCF1 suşu, istatistiksel olarak daha yüksek miktarda EPS ürettiğini ($p<0.05$) bulmuşlardır.

Çizelge 5.1. Total EPS'lerde Kuru ağırlık, Karbonhidrat ve Protein miktar tablosu

Bakteriler	**EPS Kuru Ağırlık (mg/100 mL)**	**Karbonhidrat Miktarı (µg/mL)**	**Protein Miktarı (µg /mL)**
%0.15-2ÇS-K	4.5	133.74	0.25
%0.15-2ÇS-S	10.5	272.46	0.52
%0.15-2ÇS-G	7.1	216.56	1.29
%0.15-2ÇS-F	12.1	235.07	0.80
%0.2-2ÇS-K	3.3	54.63	0.03

Çizelge 5.1. Total EPS'lerde Kuru ağırlık, Karbonhidrat ve Protein miktar tablosu (devamı)

%0.2-2ÇS-S	121	333.28	0.19
%0.15-2ÇA-K	6	135.45	0.21
%0.15-2ÇA-G	7	403.39	0.96
%0.15-2ÇA-S	45	985.57	1.38
%0.2-2ÇA-K	5	628.48	0.51
%0.2-2ÇA-G	10.3	672.31	1.08
%0.2-2ÇA-S	30	1087.03	1.14
%0.15-3ÇA2-K	11.8	183.13	0.41
%0.15-3ÇA2-G	10.9	318.81	0.65
%0.15-3ÇA2-S	32.4	326.87	1.01

Çizelge 5.1.'de görüldüğü üzere *B.licheniformis* 2ÇS bakterisi için en yüksek total EPS kuru ağırlık miktarı %0.2 maya özütü içeren M3 besiyerinden 121 mg/100 mL, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisi için %0.15 maya özütü içeren besiyerinden 45 mg/100 mL ve *B.licheniformis* 3ÇA2 için 32.4 mg/100 mL EPS miktarı ürettiği tespit edildi. Berekaa (2014), *B.licheniformis* QS5 suşunun sükroz varlığında ürettiği EPS miktarını 3.78 g/g olarak elde etmişler. Ergene ve Avcı (2018), *Bacillus sp*. ZBP4 suşu EPS üretimi için çeşitli karbon kaynakları olan glikoz, nişasta, laktoz, peynir altı suyu, mannitol, sükroz, pancar pekmezini test etmişler ve en iyi sonucu pancar pekmezinde bulmuşlar. 143 mg/L olan EPS miktarını deney sonucunda 1071 mg/L olarak tespit etmişler. Angel ve ark. (2018), *B.licheniformis* WSF-1 suşunu %12 glikoz, sakaroz, laktoz, maltoz, ksiloz ve fruktoz gibi farklı karbonhidratların EPS üretimi üzerindeki etkisi inceleyerek optimum karbon kaynağı belirlemişler. En iyi karbon kaynağının %25 konsantrasyon ile sükroz olduğunu ve 2.9 g/mL ekzopolisakkarit ürettiğini bulmuşlardır. Ashger ve ark. (2021), farklı konsantrasyonlarda etil(metansülfonat) (EMS) kullanarak hiper EPS üreten *B.licheniformis* mutantını geliştirmek için tasarlamışlar 120 dakikalık süreler boyunca 50 µg/mL'ye maruz kalan *B. licheniformis* suşu en yüksek EPS üretimini sağladı toplam karbonhidrat içeriği %87.3 ile 2.855 g/L olarak tespit etmişler. Optimize edilmiş kültür

koşullarında ise *B.licheniformis* M4, fermantasyon parametrelerinin optimizasyonundan önce elde edilen verimden önemli ölçüde daha yüksek olan 9.006 g/L'lik maksimum EPS üretimi ile sonuçlandığını görmüşlerdir. Miri ve ark. (2021), *B.zhangzhouensis* BZ16 suşunun 125 g/L sükroz ve 30 g/L maya özütü içeren ortamda en iyi EPS miktarını 12.37 g/L olarak elde etmişlerdir.

Çizelge 5.1.'de görüldüğü üzere kullanılan bakteri suşlarının ürettiği EPS'lerin karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit yöntemiyle, protein miktarı ise Lowry metodu ile bulundu. Bunun sonucunda *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin karbonhidrat miktarı 333.28 µg/mL, B.*zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin karbonhidrat miktarı 985.57 µg/mL ve *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin karbonhidrat miktarı 326.87 µg/mL olarak tespit edildi. *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin protein miktarı 0.19 µg /mL, *B. zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin protein miktarı 1.38 µg /mL ve *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin protein miktarı 1.01 µg /mL olarak tespit edildi. Singh ve ark. (2011), *B.licheniformis* tarafından üretilen EPS miktarını 576 mg/L, karbonhidrat miktarını 343.14 mg/L, protein miktarını 107.68 mg/L olarak bulmuştur. Angel ve ark. (2018), *Bacillus licheniformis* WSF-1 suşu tarafından üretilen EPS'de toplam karbonhidrat miktarını 58 ± 0.017 mg/mL, protein miktarını 12 ± 0.021 mg/mL olarak tespit etmişler.

Antibakteriyel aktiviteye bakıldığında en iyi etki gösteren, *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinin sükroz varlığında üretilen EPS'nin *E.coli*'ye karşı 16 mm, *S.aureus*'a karşı 12 mm, *B.licheniformis* 3ÇA2 bakterisinin sükroz varlığında üretilen EPS'nin *S.aureus*'a karşı 14 mm, *B.zhangzhounesis* 2ÇA bakterisinin sükroz varlığında üretilen EPS'nin *S.aureus*'a karşı 12 mm ve glikoz varlığında 12 mm zon çapı ile antibakteriyel etkisi tespit edildi. Mohamed ve ark. (2018), *Bacillus alttitudinis* MSH2014'ten elde edilen EPS'nin 75 µg/disk konsantrasyonunun *S.aureus*'a karşı 12.2 mm, *E.coli*'ye karşı 12.9 mm ve *P.aeruginosa*'ya karşı 7.7 mm zon oluşturduğunu, 100 µg/disk konsantrasyonunda *S.aureus'a* karşı 15.1 mm, *E.coli*'ye karşı 17.7 mm, *P.aeruginosa*'ya karşı 10.6 mm zon oluşturduğunu bulmuşlardır.

Yapılan tez çalışması sonucunda en iyi total EPS kuru ağırlık olarak %0.2 maya özütü ve %1 sükroz içeren M3 besiyerinden *B.licheniformis* 2ÇS bakterisinden elde edildi. Elde edilen EPS kuru ağırlık miktarı 121 mg, karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi ile 333.28 µg/mL olarak tespit edildi. Bunun yanında *B.zhangzhounesis* 2ÇA

bakterisinin ürettiği EPS miktarı 30 mg iken en iyi karbonhidrat içeriğine sahip olduğu (1087.03 µg/mL) tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara bağlı olarak aşağıda verilen çalışmalar önerilebilir:

1- Kullanılan besiyerinde farklı oranlarda ve farklı çeşitte karbon kaynağının kullanılması, farklı oranlarda ve farklı çeşitte nitrojen kaynağının kullanılması, besiyeri içeriğinin zenginleştirilmesi ile EPS üretiminin artırılması sağlanabilir.

2- Sıcaklık, pH, stres gibi faktörlerin EPS üretimi üzerindeki etkileri incelenebilir. Bu etkilerin EPS üretimini artıran ya da azaltan bir etkisi olup olmadığı araştırılabilir.

3- Elde edilen EPS'nin moleküler ağırlığı, kimyasal yapısı, hangi çeşit EPS olduğu, elektron mikroskobu ile EPS'nin görüntüsünün elde edilmesi sağlanabilir.

4- EPS'nin anti kanser, anti biyofilm gibi etkileri incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

Acer O, Pirinccioglu H, Matpan Bekler F, Gul Guven R, Guven K (2015) *Anoxybacillus* sp. AH1, an amylase producing thermophilic bacterium isolated from Dargecit hot spring. ***Biologia*** 70(7):853–862

Ahmetoglu N, Matpan Bekler F, Acer O, Guven G, Guven K (2015) Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG5. ***Eurasia J Biosci*** 9:1–11

Akhmaloka, A., Suharto, A., Nurbaiti, S., Tika, I. N., & Warganegara, F. M. (2006). Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater. ***Journal of Engineering and Technological Sciences***, 38(1), 1-10.

Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., & Pathak, H. (2014). Microbial exopolysaccharides: advances in applications and future prospects. ***Biotechnology***, 3(July 2015), 25.

Angel, S. J., 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.

Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. ***International Journal of Biological Macromolecules***.

Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., & Bisignano, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis. ***International immunopharmacology***, *6*(1), 8-13.

Asgher, M., Qamar, S. A., & Iqbal, H. M. (2020). Microbial exopolysaccharide-based nano-carriers with unique multi-functionalities for biomedical sectors. ***Biologia***, 1-13.

Asgher, M., Rani, A., Khalid, N., Qamar, S. A., & Bilal, M. (2021). Bioconversion of sugarcane molasses waste to high-value exopolysaccharides by engineered Bacillus licheniformis. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 3, 100084.

Asgher, M., Urooj, Y., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020). Improved exopolysaccharide production from Bacillus licheniformis MS3: optimization and structural/functional characterization. ***International journal of biological macromolecules***, *151*, 984-992.

Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. ***Front Bioeng Biotechnol*** 3: 200.

Baltaci, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., & Adiguzel, A. (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.

Barcelos, M. C., Vespermann, K. A., Pelissari, F. M., & Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 60(9), 1475-1495.

Berekaa, M. M. (2014). Improved exopolysaccharide production by Bacillus licheniformis strain-and application of statistical experimental design. ***Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci***, *3*, 876-886.QS5

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.

Borgio, J. F., Bency, B. J., Ramesh, S., & Amuthan, M. (2009). Exopolysaccharide production by Bacillus subtilis NCIM 2063, Pseudomonas aeruginosa NCIM 2862 and Streptococcus mutans MTCC 1943 using batch culture in different media. ***African Journal of Biotechnology***, *8*(20).

Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. ***Applied microbiology and biotechnology***, *100*(9), 3877-3886.

Cerning, J. C. M. C., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., 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.

Chaisuwan, W., Jantanasakulwong, K., Wangtueai, S., Phimolsiripol, Y., Chaiyaso, T., Techapun, C., ... & Seesuriyachan, P. (2020). Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: Fermentation, modifications and bioactivities. ***Food Bioscience***, 35, 100564.

Cihan, A. C., Tekin, N., Ozcan, B., & Cokmus, C. (2012). The genetic diversity of genus Bacillus and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. ***Brazilian Journal of Microbiology***,43(1), 309-324.

Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. ***Journal of bacteriology***, *182*(12), 3593-3596.

Dave, S. R., Upadhyay, K. H., Vaishnav, A. M., & Tipre, D. R. (2020). Exopolysaccharides from marine bacteria: production, recovery and applications. ***Environmental Sustainability***, *3*(2), 139-154.

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. ***Microbiology and molecular biology reviews***, 64(4), 847-867.

Deive, F. J., Álvarez, M. S., Morán, P., Sanromán, M. A., & Longo, M. A. (2012). A process for extracellular thermostable lipase production by a novel Bacillus thermoamylovorans strain. ***Bioprocess and biosystems engineering***, 35(6), 931-941.

Dhagat, S., & Jujjavarapu, S. E. (2021). Biorefinery system for production of thermostable exopolysaccharide by a novel thermophile Brevibacillus borstelensis MK878423 and its study on impact of glucose utilization. ***Biomass Conversion and Biorefinery***, 1-11.

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

Drobniewski, F. A. (1993). Bacillus cereus and related species. ***Clinical microbiology reviews***, *6*(4), 324-338.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. ***Analytical Chemistry***, 28(3), 350-356.

Ergene, E., & Ayşe, A. V. C. I. (2018). Effects of cultural conditions on exopolysaccharide production by Bacillus sp. ZBP4. ***Journal of Agricultural Sciences***, *24*(3), 386-393.

Farag, A., Gamil, W., & Essawy, E. EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION, EXTRACTION, AND CHARACTERIZATION FROM SOIL ISOLATE Bacillus spp.

Farag, M. M., Moghannem, S. A., Shehabeldine, A. M., & Azab, M. S. (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by Bacillus mycoides. ***Microbial pathogenesis***, *140*, 103947.

Farjadian, F., Moghoofei, M., Mirkiani, S., Ghasemi, A., Rabiee, N., Hadifar, S., ... & 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., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. ***Trends in biotechnology***, *29*(8), 388-398.

Freitas, F., Torres, C. A., & Reis, M. A. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. ***Bioresource technology***, *245*, 1674-1683.

Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. ***Food technology and Biotechnology***, 42(4), 223-225.

Grobben, G. J., Chin-Joe, I., Kitzen, V. A., Boels, I. C., Boer, F., Sikkema, J., ... & de Bont, J. A. (1998). Enhancement of Exopolysaccharide Production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. ***Applied and Environmental Microbiology***, *64*(4), 1333-1337.

Gul Guven R (2007) Isolation and identification of bacteria from hot springs, and β-galactosidase purification from *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmanii*. PhD thesis, Dicle University,Diyarbakir

Gul Guven R, Guven K, Poli A, Nicolaus B (2008) *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman. ***J Gen Appl Microbiol*** 54:337–354

Güven, R. G. (2011). Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. ***Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR***, *9*(1), 1-10.

Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. (2016). Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. ***BioMed research international,*** *2016*.

Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in Bifidobacterium spp. ***Applied and Environmental Microbiology***, 80(1), 9-18.

Hooshdar, P., Kermanshahi, R. K., Ghadam, P., & Khosravi-Darani, K. A Review on Production of Exopolysaccharide and Biofilm in Probiotics Like Lactobacilli and Methods of Analysis.

Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. ***International journal of biological macromolecules***, 94, 10-27.

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.

Jha, A. M. B. (2013). 5 Microbial Exopolysaccharides

Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., & Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium Vibrio sp. QY101. ***PLoS One***, 6(4), e18514.

Kambourova, M. (2018). Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. ***Engineering in Life Sciences***, *18*(11), 758-767.

Lee, C., Kim, J. Y., Song, H. S., Kim, Y. B., Choi, Y. E., Yoon, C., ... & Roh, S. W. (2017). Genomic analysis of Bacillus licheniformis CBA7126 isolated from a human fecal sample. ***Frontiers in pharmacology***, *8*, 724.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. ***Journal of dairy science***, 99(4), 3229-3238.

Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., & 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, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2016). Bacillus zhangzhouensis sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, *66*(3), 1193-1199.

Llamas, I., Amjres, H., Mata, J. A., Quesada, E., & Béjar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium Halomonas almeriensis. ***Molecules***, *17*(6), 7103-7120.

López-Ortega, M. A., Rodríguez-Hernández, A. I., Camacho-Ruíz, R. M., Córdova, J., del Rocío López-Cuellar, M., Chavarría-Hernández, N., & González-García, Y. (2020). Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon Haloferax mucosum. ***International journal of biological macromolecules***, *142*, 152-162.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. ***Journal of Bioogical Chemistry,*** 193: 265- 275

Madhuri, K. V., & Prabhakar, K. V. (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. ***Oriental journal of chemistry***, 30(3), 1401-141

Maheswari, P., Kumar, K. A., Mahendran, S., Sankaralingam, S., & Sivakumar, N. (2019). A REVIEW ON APPLICATIONS AND FUTURE PROSPECTUS OF EXOPOLYSACCHARIDES.

Mai-Prochnow, A., Zhou, R., Zhang, T., Ostrikov, K. K., Mugunthan, S., Rice, S. A., & Cullen, P. J. (2021). Interactions of plasma-activated water with biofilms: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. ***npj Biofilms and Microbiomes***, *7*(1), 1-12.

Matpan Bekler F (2016) Isolation and identification of a novel thermo-alkalophilic *Anoxybacillus* sp. strain KB4 from Kusburnu hot spring in Turkey. ***BioDiCon*** 9(2):169–179

Matpan Bekler F (2017) Physio-biochemical characterization and 16S rRNA sequencing of thermophilic *Geobacillus* sp. strain DB2 from Dibekli hot spring, Turkey. ***Iğdır Univ J Inst Sci Tech*** 7(1):63–71

Matpan Bekler F, Acer O, Guven K (2015b) Co-Production of thermostable, calcium-independent α-amylase and alkali-metallo protease from newly isolated *Bacillus licheniformis* DV3. ***Innov Rom Food Biotechnol*** 16:21–30

Matpan Bekler F, Guven K (2014) Isolation and production of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. KP1 from Diyadin hot spring in Ağri. ***Turkey Biologia*** 69(4):419–427

Matpan Bekler F, Stougaard P, Guven RG, Guven K, Acer O (2015a) Isolation and cloning of extracellular thermostable β-galactosidases from a newly isolated thermophilic *Bacillus licheniformis* KG9. ***Cell Mol Biol*** 61(3):71–78

Matpan Bekler, F., Yalaz, S., Güven, K., & Güven, R. G. (2020). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Hot spring in Çermik, Diyarbakır. *3. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)*, 19 - 20 April 2020 Ankara, Turkey. (Sözlü Full-Text Bildiri) Proceeding Book pp:132-139.

Matpan Bekler, F., Yalaz, S., Güven, R. G., & Güven, K. (2019). Optimization of the thermostable alkaline and Ca-dependent alpha-amylase production from Bacillus paralicheniformis by statistical modeling. ***Journal of the Serbian Chemical Society***, *84*(10), 1093-1104.

Miri, M., Bergayou, H., Belmouden, A., Moukrim, A., Baazizi, H., & Boum'handi, N. (2021). Medium optimization for exopolysaccharides production by Bacillus Zhangzhouensis BZ 16 strain isolated from Khnifiss Lagoon. In E3S Web of Conferences (Vol. 234, p. 00099). EDP Sciences.

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

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.

Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: Bacillus licheniformis and Thermomonas hydrothermalis isolates as potential producers of thermostable enzymes. ***International journal of microbiology***, 2017.

Mohite, B. V., Koli, S. H., Narkhede, C. P., Patil, S. N., & Patil, S. V. (2017). Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 183(2), 582-600.

Moretto, C., Castellane, T. C. L., Lopes, E. M., Omori, W. P., Sacco, L. P., & de Macedo Lemos, E. G. (2015). Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. ***International journal of biological macromolecules***, 81, 291-298.

Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. ***Frontiers in microbiology***, 6, 1012

Mozzi, F., Rollan, G., De Giori, G. S., & De Valdez, G. F. (2001). Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in Lactobacillus casei CRL 87. ***Journal of applied microbiology***, *91*(1), 160-167.

Nachtigall, C., Vogel, C., Rohm, H., & Jaros, D. (2020). How Capsular Exopolysaccharides Affect Cell Surface Properties of Lactic Acid Bacteria. ***Microorganisms***, 8(12), 1904.

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

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. ***Applied microbiology and biotechnology***, 51(6), 711-729.

Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. ***International journal of molecular sciences***, 13(11), 14002-14015.

Ostapska, H., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2018). Deacetylated microbial biofilm exopolysaccharides: It pays to be positive. ***PLoS pathogens***, *14*(12), e1007411.

Poli, A., Di Donato, P., Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., Finore, I., & Nicolaus, B. (2018). Exopolysaccharide-Producing Microorganisms from Extreme Areas: Chemistry and Application.

In ***Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications*** (pp. 405-433). Springer, Singapore

Poli, A., Guven, K., Romano, I., Pirinccioglu, H., Guven, R. G., Euzeby, J. P. M., ... & Nicolaus, B. (2012). Geobacillus subterraneus subsp. aromaticivorans subsp. nov., a novel thermophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a hot spring in Sırnak, Turkey. ***The Journal of general and applied microbiology***, 58(6), 437-446.

Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels. ***Journal of basic microbiology***, 52(5), 566-572.

Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., ... & 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.

Rajoka, M. S. R., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M., & Zhao, L. (2020). Lactobacillus exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. ***Trends in Food Science & Technology***.

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

Razack, S. A., Velayutham, V., & Thangavelu, V. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by Bacillus subtilis using synthetic sources and agro wastes. ***Turkish Journal of Biology***, *37*(3), 280-288.

Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., ... & Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species. ***Genome biology***, *5*(10), 1-12.

Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil Pseudomonas sp. ***Applied and environmental microbiology***, *58*(4), 1284-1291.

Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. ***Frontiers in microbiology***, 6, 288.

Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., & Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. ***Carbohydrate polymers***, 217, 79-89.

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.

Sarilmiser, H. K., & Oner, E. T. (2014). Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from Halomonas smyrnensis AAD6T. ***Biochemical engineering journal***, 92, 28-34.

Schiraldi, C., & De Rosa, M. (2014). Mesophilic Organisms. ***Encyclopedia of Membranes***, 1–2. doi:10.1007/978-3-642-40872-4_1610-2

Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. ***Frontiers in microbiology***, 6, 496.

Sethi, D., Mohanty, S., & Pattanayak, S. K. (2019). Effect of different carbon, nitrogen and vitamine sources on exopolysaccharide production of Rhizobium species isolated from root nodule of redgram. ***Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*** *(IJBB), 56*(1), 86-93.

Seviour, R. J., McNeil, B., Fazenda, M. L., & Harvey, L. M. (2011). Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. ***Critical reviews in biotechnology***, 31(2), 170-185.

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.

Simoes, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. ***LWT-Food Science and Technology***, 43(4), 573-583.

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.

Soyuçok, A., Teslime, E. K. İ. Z., & KILIÇ, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. ***Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi***, *5*, 332-344.

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.

Starr, K. F., Porsch, E. A., Heiss, C., Black, I., Azadi, P., & Geme III, J. W. S. (2013). Characterization of the Kingella kingae polysaccharide capsule and exopolysaccharide. ***PLoS One***, 8(9), e75409.

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

Tabernero, A., & Cardea, S. (2020). Microbial Exopolysaccharides as Drug Carriers. ***Polymers***, 12(9), 2142.

Tabernero, A., & Cardea, S. (2020). Supercritical carbon dioxide techniques for processing microbial exopolysaccharides used in biomedical applications. ***Materials Science and Engineering***: C, 110940.

Taslimi, P., Nadaroglu, H., & Adıguzel, A. (2013). Removal of some textile dyes from aqueous solution by using a catalase-peroxidase from Aeribacillus pallidus (P26). ***J Pure Appl Microbiol***, 7(4), 2629-2640.

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

Vijayendra, S. V. N., Yamini, D., Sudhamani, S. R., & Prasad, M. S. (2003). Effect of hexose sugars on exopolysaccharide production by selected bacterial cultures. ***Journal of Food Science and Technology***, *40*(6), 611-614.

Völkel, S., Fröls, S., & Pfeifer, F. (2018). Heavy metal ion stress on Halobacterium salinarum R1 planktonic cells and biofilms. ***Frontiers in microbiology***, *9*, 3157.

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

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. ***Carbohydrate polymers***, 205, 8-26.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. ***Microbiological reviews***, 51(2), 221.

Wong, L. S. (2015). Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus Bacillus: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. ***Journal of Cleaner Production***, *93*, 5-17.

Yang, S., Yang, X., & Zhang, H. (2020). Extracellular polysaccharide biosynthesis in Cordyceps. ***Critical Reviews in Microbiology***, 46(4), 359-380.

Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. ***Process Biochemistry***, *72*, 41-46.

Yılmaz, M., & Çelik, G. Y. (2007). Bakteriyel ekstraselüler polisakkaritler (EPS). ***Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi***, *5*(2), 7-13.

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.

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. ***Applied microbiology and biotechnology***, *100*(3), 1121-1135.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: TUŞAR, Firdevs Rozan

Yabancı Dil

İngilizce (B1) /Fransızca (A1)

Yayınlar

Kemal Güven, Fatma Matpan Bekler, Seçil Yalaz, Reyhan Gül Güven, Merve Demirtaş, Mert İpekçi, Firdevs Rozan Tuşar, Nazlı Polat (2020). Evaluation of Antibacterial Effects of Some Traditional Plants Against Pathogen Microorganisms. Banat's journal of Biotechnology. XI(21):38-49. DOI: 10.7904/2068–4738–XI(21)–38 (Indexing:ESCI)

Bildiriler

Kemal Güven, Firdevs Rozan Tuşar, Fatma Matpan Bekler, Reyhan Gül Güven, Seçil Yalaz (2018). Antibacterıal activity of Sorbus sp. and Epilobium sp. on antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. International Engineerıng and Natural Sciences Conference (IENSC) 14-17 November 2018 Diyarbakır/Turkey (Poster Bildiri) Abstract Book pp:5

Kemal Güven, Firdevs Rozan Tuşar, Fatma Matpan Bekler, Reyhan Gül Güven, Seçil Yalaz (2018). Antimicrobial Activity of Some Traditional Plant Extracts on *Escherichia coli*. International Engineerıng and Natural Sciences Conference (IENSC) 14-17 November 2018 Diyarbakır/Turkey (Poster Bildiri) Abstract Book pp:6

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Firdevs Rozan TUŞAR
ÖĞRENCİ NO	19820001
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2019-2021
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Moleküler Biyoloji ve Genetik
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Çeşitli Mezofilik ve Termofilik Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	76
BENZERLİK ORANI	%5
RAPORLAMA TARİHİ	03/08/ 2021

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 76 sayfalık kısmına ilişkin, 03/08/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %5'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

☒Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Öğrencinin
Adı ve Soyadı: Firdevs Rozan TUŞAR
Tarih: 03/08/2021
İmza:

Tez Danışmanı	Moleküler Biyoloji ve Genetik **Anabilim Dalı Başkanı**
Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Kemal GÜVEN	Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Veysel TOLAN
Tarih: 03/08/2021	Tarih: 03/08/2021
İmza:	İmza: