

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACILLUS* SUŞLARI İLE MELASTAN  
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİM KOŞULLARININ  
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Erdi ERGENE**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI**

**Aralık 2015**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACILLUS* SUŞLARI İLE MELASTAN  
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİM KOŞULLARININ  
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Erdi ERGENE**

**Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ**

**Bu tez 14/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.**

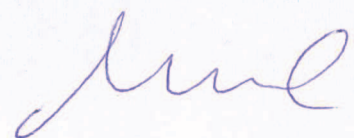
**Yrd. Doç Dr.  
Ayşe AVCI  
Jüri Başkanı**



**Doç. Dr.  
Serap COŞANSU AKDEMİR  
Üye**



**Doç. Dr.  
Nur KOÇBERBER KILIÇ  
Üye**



## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Erdi ERGENE  
14.12.2015

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini esirgemeyen, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında bilgi ve tecrübesiyle yardımcı olan, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2014-50-01-013) teşekkür ederim.

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine ve Arş. Gör. Ayşe SARIÇAM'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda hep yanımda olan, manevi desteği ile beni yalnız bırakmayan değerli hayat arkadaşım Damla ERGENE'ye tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bugüne kadarki çalışmalarım ve eğitimim boyunca her türlü maddi ve manevi desteklerini gördüğüm başta kıymetli Annem Emine ERGENE'ye, Babam Necati ERGENE'ye, Kardeşlerim Erol ERGENE ile Emel ERGENE'ye ve ailemizin tüm bireyelerine teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	4
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler.....	4
2.1.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	4
2.1.2. Bazı önemli <i>Bacillus</i> türleri.....	7
2.1.3. <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerin kullanım alanları.....	11
2.2. Melas.....	11
2.2.1. Melasın genel özellikleri.....	11
2.2.2. Melasın kullanım alanı.....	13
2.3. Mikrobiyel Ekzopolisakkaritler.....	14
2.3.1. Genel özellikleri.....	14
2.3.2. EPS biyosentezi.....	17
2.3.3. EPS üreten mikroorganizmalar.....	19

2.3.4. EPS üretiminde kullanılan hammaddeler.....	20
2.3.5. EPS üretimi.....	21
2.3.6. EPS'nin endüstriyel önemi.....	23

### BÖLÜM 3.

MATERYEL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyel.....	26
3.1.1. Kullanılan melas.....	26
3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar.....	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler.....	26
3.2.2. Kullanılan besiyerleri.....	27
3.2.3. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	27
3.2.4. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi.....	29
3.2.5. Melasın hazırlanması.....	29
3.2.6. EPS üretimi.....	29
3.2.7. Maksimum EPS üreten mikroorganizmanın belirlenmesi....	29
3.2.8. İnkübasyon süresinin EPS üretimine etkisinin belirlenmesi..	30
3.2.9. Optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi.....	30
3.2.10. pH'nın EPS üretimine etkisi.....	30
3.2.11. Gelişme sıcaklığının EPS üretimine etkisi.....	30
3.2.12. Havalandırma hızının EPS üretimine etkisi.....	31
3.2.13. Azot kaynaklarının EPS üretimine etkisi.....	31
3.2.14. Çeşitli karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi.....	31
3.3. Laboratuvar Analizleri.....	31
3.3.1. EPS miktarının belirlenmesi.....	31
3.3.2. Mikroorganizma gelişiminin belirlenmesi.....	32
3.3.3. Üretilen EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi..	34
3.3.4. Demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini.....	34
3.3.5. Hidroksil (OH <sup>-</sup> ) radikalini yakalama aktivitesi.....	35

## BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1. <i>Bacillus</i> Suşunun Seçimi.....	36
4.2. İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	36
4.3. Melas Konsantrasyonunun EPS Üretimine Etkisi.....	37
4.4. Gelişme pH'sının EPS Üretimine Etkisi.....	39
4.5. Gelişme Sıcaklığının EPS Üretimine Etkisi.....	40
4.6. Havalandırma Hızının EPS Üretimine Etkisi.....	40
4.7. Azot Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi.....	41
4.8. Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi.....	42
4.9. Antioksidan Aktivite Değerleri.....	43

## BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: 3,5-Dinitro Salisilik Asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
G	: Guanin
Gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
Kb	: Kilo baz
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LPS	: Lipopolisakkarit
M.S.	: Milattan sonra
mg	: Miligram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
N	: Normalite
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PAS	: Peynir altı suyu tozu
PGL	: Poligalakturanaz liyaz
pH	: Pondus Hidrojeni
RNA	: Ribonükleik Asit



rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
spp.	: Alt tür
UV	: Ultra viole
v	: Hacim
vb.	: Ve Benzeri
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\delta$	: Delta

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Fenol-sülfürik asit ile toplam şeker tayinine kullanılan standart eğri.....	29
Şekil 3.2. DNS yönteminde kullanılan standart eğri .....	30
Şekil 4.1. Farklı melas konsantrasyonlarında <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi.....	39
Şekil 4.2. Farklı glukoz konsantrasyonlarında <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi.....	39
Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi.....	40
Şekil 4.4. Farklı sıcaklık değerlerinde <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretim...41	
Şekil 4.5. Farklı havalandırma derecelerinde <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi.....	42
Şekil 4.6. Çeşitli azot kaynaklarında <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi...43	
Şekil 4.7. Farklı şeker kaynaklarında <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi..43	
Şekil 4.8. Demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini.....	44
Şekil 4.9. Hidroksil (OH <sup>-</sup> ) radikalini yakalama aktivitesi.....	45

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Bacillus</i> cinsinin taksonomisi .....	4
Tablo 4.1. 12 farklı <i>Bacillus subtilis</i> suşunun ürettiği EPS miktarları.....	37
Tablo 4.2. Farklı inkübasyon sürelerinde <i>Bacillus subtilis</i> ZBP4 suşunun EPS üretimi.....	38
Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda melas ve glukoz kullanılarak üretilen EPS'lerin verimleri.....	40
Tablo 4.4. Aynı konsantrasyondaki melas ve glukozun EPS verimleri.....	40

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Ekzopolisakkarit üretimi, EPS, *Bacillus subtilis*, Melas

Bu çalışmada, *Bacillus* cinsine ait 12 adet bakterinin (*Bacillus* spp. BAT3, *Bacillus* spp. GİT2, *Bacillus* spp. BAST2, *Bacillus* spp. BMZE2, *Bacillus* spp. BMZE3, *Bacillus* spp. BMZE4, *Bacillus* spp. ZGT1, *Bacillus* spp. ZGT3, *Bacillus* spp. ZGT5, *Bacillus* spp. ZGT9, *Bacillus* spp. ZBP4 ve *Bacillus* spp. ZBP10) EPS üretimi araştırılmıştır. İncelenen suşların 0-143 mg/L arasında EPS ürettiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en fazla EPS'yi üreten suşun *Bacillus* spp. ZBP4 olduğu saptanmış ve optimizasyon çalışmalarına bu mikroorganizma ile devam edilmiştir. *Bacillus* sp. ZBP4 suşunun EPS üretimine inkübasyon süresi (24-72 saat), sıcaklık (30-45°C), besiyeri başlangıç pH'sı (4,0-9,0), melas konsantrasyonu (10-60 g/L), havalandırma hızı (80-200 rpm), çeşitli azot kaynaklarının (amonyum sülfat, pepton, tripton, maya özütü) ve karbon (glukoz, laktoz, mannitol, nişasta, inülin, peynir altı suyu) kaynaklarının EPS üretimine etkisi belirlenmiştir. Oluşan EPS'in izolasyonu için santrifüj yardımıyla hücreler uzaklaştırıldıktan sonra süpernatant kaynatılmış ve proteinler trikloroasetik asit ile çöktürülmüştür. Proteini uzaklaştırılan sıvı kısma soğuk etanol eklenerek bir gece 4°C'de bekletilmiş ve santrifüj ile EPS çöktürülmüştür. Fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılarak EPS miktarı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi EPS üretiminin, başlangıç pH'sı 5,0 olan ortamda 60 g/L melas konsantrasyonu ve azot kaynağı olarak tripton kullanıldığında, 45°C'de 120 rpm havalandırma hızında 24 saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu koşullarda mikroorganizma 1071 mg/L EPS üretmiştir. Araştırma sonunda melasın EPS üretimi için karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

# OPTIMIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION CONDITIONS FROM MOLASSES BY SOME *Bacillus* STRAINS

## SUMMARY

Keywords: Exopolysaccharide production, EPS, *Bacillus subtilis*, Molasses

In this study, 12 *Bacillus* strains, namely *Bacillus* spp. BAT3, *Bacillus* spp. GİT2, *Bacillus* spp. BAST2, *Bacillus* spp. BMZE2, *Bacillus* spp. BMZE3, *Bacillus* spp. BMZE4, *Bacillus* spp. ZGT1, *Bacillus* spp. ZGT3, *Bacillus* spp. ZGT5, *Bacillus* spp. ZGT9, *Bacillus* spp. ZBP4 ve *Bacillus* spp. ZBP10, have been screened for their EPS productions. The strains produced varying amounts of EPSs ranging from 0 to 143, mg/L. As the highest EPS produced by the strain *Bacillus* sp. ZBP4, it was used for the further optimization studies. The effects of time ( 24-72 h), temperature (30-45°C), pH (4,0-9,0), molasses concentration (10-60 g/L), aeration rate (80-200 rpm), various nitrogen (ammonium sulfate, peptone, tryptone, yeast extract) and carbon (glucose, lactose, mannitol, starch, inuline, whey) sources on the EPS production have been determined. In order to isolate EPS, cells were removed by centrifugation, then cell-free extract was boiled and proteins were precipitated by using trichloroacetic acid. Cold ethanol was added to the supernatant and kept at 4°C for overnight and the EPS was precipitated by centrifugation. Phenol-sulfuric acid method was used to determine the EPS content using glucose as standard. The strain produced the highest amount of EPS in the medium having initial pH of 5,0, at 60 g/L molasses concentration, at 45°C and 120 rpm agitation speed in 24 h. Tryptone was the best nitrogen source for EPS production. The microorganism produced 1071 mg/L EPS under the optimized conditions. The results showed that the molasses can be used as a carbon and nitrogen source for production of EPS. However there is a need for more studies in this topic.

## BÖLÜM 1.GİRİŞ

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS), temel olarak monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan, düz veya dallanmış yapıya sahip biyopolimerlerdir. EPS türleri çoğunlukla heksozlardan oluşmasına rağmen bazı EPS'lerin yapısında pentozlar da bulunabilmektedir (Bhaskar ve Bhosle, 2005; Ruijssenaars, 2001). Polisakkaritlerin dışında EPS'ler protein, nükleik asit, fosfolipit gibi bileşikleri de içerebilmektedirler (Singh ve ark., 2011).

EPS'nin başlıca görevi hücreyi olumsuz dış etmenlerden korumaktır. Hücrenin EPS tabakası ile çevrenmesi hücreyi kuruma ve protozon istilasına karşı korur (Donot ve ark., 2012). EPS, genetik bilginin korunması, protein, fosfat ve silikon gibi makromoleküllerin depolanması, enerji üretimi ya da enerji indirgenmesi, ağır metal ve antibakteriyel etkenler vb. tehlikeli çevresel faktörlere karşı savunma gibi önemli roller üstlenir (Fazio ve ark., 1982; Öner, 2013). Dış polisakkarit tabakasının anyonik yapısı esansiyel mineral ve bileşenlerin korunmasına da yardımcı olur (Donot ve ark., 2012).

Birçok bakteri, maya, küf ve arke türlerinin mikrobiyal ekzopolisakkarit üretme yeteneğinde oldukları ancak bakterilerin miktar ve çeşit bakımından en iyi EPS üreticileri oldukları belirlenmiştir (Kumar, 2012). EPS üreten başlıca mikroorganizmalar *Bacillus* spp., *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, ve *Streptococcus* spp., *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas* spp., *Acetobacter chorococcum*, *Acetobacter xylinium*, *Streptococcus equii*'dir (Yılmaz, 2006; Kumar, 2012).

Mikroorganizmalardan birkaç gün içinde üretim sağlanırken bitkilerde bu süreç 3-6 ay sürebilir. Ayrıca bitkisel üretim coğrafik veya mevsimsel koşullardan oldukça fazla etkilenmektedir (Donot ve ark., 2011; Öner, 2013). Mikrobiyal üretim için güneş enerjisine ihtiyaç yoktur ve mikroorganizmalar çok çeşitli organik kaynakları fermantasyon kaynağı olarak kullanabilirler. Enerji verimi, endüstriyel atıkların değerlendirilebilirliği ve alan ihtiyacının daha az olması gibi avantajlara da sahiptir (Donot ve ark., 2011).

EPS'ler sahip oldukları farklı fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri sayesinde gıda, ilaç, kozmetik, petrol, tekstil vb. gibi birçok alanda kullanım imkânına sahiptir. Bu durum mikrobiyal kaynaklı EPS'lere olan ilginin giderek artmasına, onların daha değerli hale gelmesine olanak sağlamıştır (Onbaşılı, 2006; Vu ve ark., 2009).

*Bacillus* cinsi ürettiği enzim, antimikrobiyal, vitamin vb. maddelerin yanı sıra EPS üretimi ile de endüstride kullanım alanına sahiptir (Erem ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar neticesinde *Bacillus* cinsinin levan türü EPS ürettiği belirlenmiştir. Levan gıda, ilaç, kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Freitas ve ark., 2011).

Mikrobiyal EPS'ler sahip oldukları olumlu özelliklerinin yanı sıra üretim maliyetlerinin diğer ekzopolisakkaritlerden yüksek olmasından dolayı endüstride bitkisel ve hayvansal kaynaklı ekzopolisakkaritler önemli ölçüde kullanıma sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda, topraktan izole edilmiş, EPS üreten, *Bacillus subtilis* türüne ait 12 farklı suş incelenmiş ve en yüksek EPS üreten suş seçilerek üretim koşulları optimize edilmiştir. Ayrıca üretim maliyetini düşürmek, atık olarak görülen ve daha düşük derecede değerlendirilen şeker pancarı melası karbon ve azot kaynağı olarak değerlendirilmiş ve EPS üretimine olan katkısı incelenmiştir.

Araştırmada incelenen *Bacillus* spp. BAT3, *Bacillus* spp. GİT2, *Bacillus* spp. BAST2, *Bacillus* spp. BMZE2, *Bacillus* spp. BMZE3, *Bacillus* spp. BMZE4, *Bacillus* spp. ZGT1, *Bacillus* spp. ZGT3, *Bacillus* spp. ZGT5, *Bacillus* spp. ZGT9, *Bacillus* spp. ZBP4 ve *Bacillus* spp. ZBP10 suşlarının EPS üretimleri incelenmiş ve EPS üretimi fenol-sülfürik asit (Dubois, 1956) metodu ile belirlenmiştir. EPS üretici

suş belirlendikten sonra 7 farklı parametre (süre, sıcaklık, pH vb.) araştırılmış ve maksimum EPS üretimi için gerekli koşullar belirlenmiştir.



## BÖLÜM 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1. *Bacillus* Cinsi Bakteriler

#### 2.1.1. *Bacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

*Bacillus* cinsi Firmicutes filumu *Bacillaceae* familyasına üyedir. *Bacillaceae* familyası *Bacillus* cinsi ve diğer 18 bakteri cinsinden oluşmaktadır. Taksondaki türlerin çoğu aerobik veya fakültatif anaerobiktir ancak bazı türleri zorunlu anaerob, Gram pozitif bakterilerden oluşur. Çoğunluk çubuk şekilli kemoorganotroflardan oluşur. *Bacillus* cinsi 1835 yılında Christian Gottfried Ehrenberg tarafından adlandırılmıştır. 16S rRNA sekans analizine göre 142 adet *Bacillus* cinsi bakteri adlandırılmıştır (Vos ve ark., 2009; URL-1, 2014).

*Bacillus* cinsi hem filogenetik hem de fenotik açıdan heterojen yapıya sahiptir (Ivanova ve ark., 1999). Taksonomik çalışmalarla DNA baz içeriğine göre G+C oranının yaklaşık olarak %32-69 aralığında değişebildiği belirlenmiştir (EPA, 1997). *Bacillus* cinsinin taksonomisi Tablo 2.1.'de verilmiştir (Vos ve ark., 2009).

Tablo 2.1. *Bacillus* cinsinin taksonomisi (Vos ve ark., 2009)

Domain	Bacteria ( <i>Eubacteria</i> )
Alem	<i>Firmicutes</i> (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Ordo	<i>Bacillales</i>
Family	<i>Bacillaceae</i>
Genus	<i>Bacillus</i>

*Bacillus* cinsi bakteriler Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz pozitif veya negatif, endospor oluşturan çubuk şekilli, hareketli bakterilerdir. Hücreler 1,2-1,5 µm

çapında ve 5 µm uzunluğundadır (Berber, 2004; Yılmaz, 2006; Şahin ve Başoğlu, 2011). Çoğunluğu mezofilik olup gelişim için optimum 30-45°C sıcaklığa ihtiyaç duyar ama bazı termofilik cinslerde mevcut olup 65°C gibi yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar. Ayrıca 0°C'de gelişip spor oluşturabilen psikrofil cinsler de vardır (Todar, 2014). Genelde optimum gelişim pH 6-8 aralığında olmasına rağmen pH 4-4,5'e kadar gelişimlerini sürdürebilirler. Bunun yanında pH 2-5 aralığında etkin olan türler de mevcuttur (Şahin ve Başoğlu, 2011).

Elektron mikroskopunda hücre duvarı 20-50 nm kalınlığında, amorf ve protoplast membranının altında kalın bir tabaka olarak gözükür. *Bacillus* türlerinin hücre duvarı çapraz bağlı peptidoglukanlardan oluşur. Genelde anyoniktir ve polimerler bağlanmıştır. *Bacillus* cinsinin her bir üyesinin hücre zarı sitoplazmik membran, hücre duvarı ve proteinli yüzey tabakasından oluşur. Ayrıca yüzey yapısında kapsül, flagella, fimbria gibi yapılar da bulunabilir (Sonenshein, 1993). Hücre duvarı bakteri ağırlığının %20-40'ını oluşturur. Hücre duvarı taykoik asit, polisakkarit ve birçok protein içerir (Yılmaz, 2006). Sitoplazma içi depo polisakkariti glikojen yapısındadır (Güven ve Zorba, 2013). Hücre duvarının yapısındaki taykoik asidin otolitik aktiviteyi düzenlediği ve iyon kovucu olduğu düşünülmektedir. *Bacillus* türünün yüzeyi adhezyon, direnç ve taktiksel cevap oluşum özelliklerini belirler (Todar, 2014).

Gram pozitif bakteriler içinde *Bacillus* cinsi bakteriler önemli gıda kaynaklı hastalık ve bozulma etmeni bakterilerdir. Bu nedenle erken tanı yapılabilmesi gıda güvenliğinin sağlanması ve ekonomik kayıpların engellenebilmesi için önem arz eder (Antelo ve ark., 2014). Çoğu *Bacilli* polisakkarit veya L-glutamik asit içeren kapsül oluşturur. Kapsül bakterinin virülens faktörü üzerinde etkilidir. Kapsül oluşumu agarda mukoid ya da sümüksü form oluşturabilir (Vos ve ark., 2009; Todar, 2014). Salgıladıkları kollagenaz, proteaz, lesitinaz, hemolizinler ve oksinler gibi bakterilerin dokuda yayılmasına olanak sağlayan ve doku zararına yol açan ekzojen ürünler de virülens faktörü olarak rol oynar (Miksits ve Hahn, 2013).

*Bacillus* cinsi bakteriler tüm aminoasitleri karbon, azot ve enerji kaynağı olarak metabolize edebilirler. Aerobik ortam koşullarında karbon kaynağı olarak organik asitleri metabolize ederek heterotrofik olarak yaşayabilirler (Yılmaz, 2006).

Çoğu tür nutrient agar, kanlı agar gibi sıradan besiyerlerinde gelişebilir. Koloni morfolojisi ve boyutu türler arasında veya türler içinde değişkendir (Vos ve ark., 2009). Laboratuvar ortamında optimum koşullarda jenerasyon süresi yaklaşık olarak 25 dakika olarak belirtilmektedir (Todar, 2014). Koloninin özellikleri çevresel şartlara göre şekillenmektedir. Besiyerinde görülen koloni şekilleri besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklerine göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü kenarlı koloniler şeklinde olabilir. Besiyerinde oluşan koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru farklı renk skalasında olabilir. Çoğu *Bacillus* türü renk pigmenti oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besiyerlerinde farklı renk pigmentleri üretebilir (Yılmaz, 2006). Türler, biyokimyasal özelliklerine göre ayırt edilirler; tüm patojen türler için lesitinaz oluşturma ortak özelliktir (Miksits ve Hahn, 2013).

Doğada yaygın bulunur, çoğunlukla topraktan izole edilir veya direk ya da dolaylı olarak topraktan kontamine olmuş çevrelerden izole edilebilirler. Ayrıca su, gıda ve klinik örneklerde de bulunabilirler (Vos ve ark., 2009). Bazı *Bacillus*'lar, düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkali veya tuzlu ortamlara, üre içeren, ekstrem pH noktasında olan ortamlara kadar çeşitli ekstrem habitatlardan izole edilebilmişlerdir (Yılmaz, 2006; Çöleri, 2007).

Ortamda besin kaynağı bulunmadığı zaman *Bacillus* türlerinin büyüyen hücreleri sporlaşmaktadır. Spor oluşumunu tetikleyen en önemli unsur besin kaynağı olmasına rağmen aşırı yüksek ya da düşük sıcaklıklarda, mineral madde, tuz ve şeker gibi hipertonic ortam koşullarında spor oluşumu meydana gelebilmektedir (Erem ve ark., 2013). Metabolik ürünlerin fazlalığı da endospor oluşumuna yöneltebilir. Yüksek derecede dehidre olmuş endospor DNA, az miktarda RNA, ribozom, enzim ve bazı önemli küçük molekülleri içerir (Güven ve Zorba, 2013). *Bacillus* türlerine ait sporlar, vejetatif hücre formlarıyla karşılaştırıldığında besin yetersizliği, ısı, dezenfektanlar, UV radyasyonu ve hidrojen peroksit gibi okside edici ajanlara karşı

daha fazla dirençlidirler (Çöleri, 2007). Endosporlar, aktif gelişim ve hücre bölünmesi esnasında oluşmamaktadırlar. Oluşumları, besin eksikliğinin bir sonucu olarak vejetatif hücre gelişimin eksponensiyal (durgun) fazını sonlandırdıkları zaman başlamaktadır (Todar, 2014). Sporu oluşturan proteinler çevre faktörlerinin etkisiyle aktifleşir. Sporulasyon evresi yaklaşık 8 saat sürer ve bu mekanizmada 200 gen rol oynar (Güven ve Zorba, 2013). Genel olarak her vejetatif hücrede bir endospor oluşmaktadır. Olgun sporlar belirli bir metabolizmaya sahip değildir ve bu durum kriptobiyotik olarak tanımlanmaktadır. Yüksek sıcaklık, irridasyon, yüksek asitlik ve dezenfektanlar gibi çevresel şartlara oldukça dirençlidirler. Çevresel şartlar uygun hale geldiğinde vejetatif formlara dönüşmektedirler (Todar, 2014). Endospor çoğalma şekli değil sadece neslin korunması sağlayan mekanizmadır (Güven ve Zorba, 2013).

### 2.1.2. Bazı önemli *Bacillus* türleri

Bazı *Bacillus* türleri insan ve hayvan için patojen olmasına rağmen genellikle saprofitik toprak mikroorganizmalarıdır. Birçok *Bacillus* türü fırsatçı patojendirler. Gıda kaynaklı hastalıklara ve gıdalarda bozulmalara neden olan birçok türü içerirler (Yılmaz, 2006; Erkmen, 2011).

*Bacillus thuringiensis*, toprakta bulunan önemli bir böcek patojenidir ve böcek kontrolü için kullanılabilir (Yılmaz, 2006). Salgıladığı  $\delta$ - endotoksinleri ile bazı böcek larvalarına ve bazı omurgasızlara karşı toksik etki gösterebilir (Yakoubou ve Côté, 2010).

*Bacillus anthracis*, antrax, şarbon veya çoban çıbanı adı verilen hastalığın etkenidir. Bu bakteri ot yiyen koyun, keçi, sığır, gibi hayvanların hastalığıdır. Et yiyen hayvanlar bu hastalığa karşı duyarlıdır. Hastalık enfekte hayvanlardan insan vücuduna alınır ve vücuda girdiği bölgeye göre farklı şekilde klinik tablolar oluşturur (URL-2, 2014). Hastalık etmeni sporlar insan vücuduna girince hızla vejetatif hücreler oluşturur ve vejetatif bakterilerin ürettiği toksinlerin etkisiyle doku hasarı

meydana gelir (Miksits ve Hahn, 2013). Kapsüllü bir bakteridir ve kapsül patojenite üzerinde etkiye sahiptir (Güven ve Zorba, 2013).

*Bacillus coagulans*, yüksek asitli gıdalarda bozulma etkeni olarak rol oynayabilir (URL-1, 2014). *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* 4,2 gibi düşük pH değerlerinde gelişim gösterebilirler ve *B. stearothermophilus*'un optimum gelişme sıcaklığı 55-60°C arasındadır. *B. stearothermophilus*'un sporları bakteri sporları içinde ısıya en dirençli sporlardır. *B. coagulans* (*B. thermoacidurans*) sıcaklığa daha az, asitliğe ise daha fazla direnç gösterir (Yılmaz, 2006; Şahin ve Başoğlu, 2011).

*Bacillus megaterium*, diğer *Bacillus* türlerine oranla daha büyüktür. Aerobik koşullarda gelişir, en büyük sporu 1,2-1,5 µm'dir. Optimum koşullara gereksinim duymadan da gelişim gösterebilirler. Sporları toprakta yaygın olarak bulunur (Yılmaz, 2006).

*Bacillus cereus*, toprak, su, süt ve doğada yaygın olarak bulunan, hareketli, kapsülsüz, çubuk şekilli, sporları terminal veya subterminal olan, Gram pozitif aerob veya fakültatif aerob, patojen bir bakteridir (Yakoubou ve Côté, 2010; URL-2, 2014). Oda sıcaklığında üreyebilir ancak 7°C veya biraz altındaki sıcaklık değerlerinde de gelişme yeteneğini sürdürürler. Soğukta saklanan ancak *Bacillus cereus* bulaşmış olan süt ve süt ürünleri, et ürünleri ve nişastalı gıdalarda bozulma ve zehirlenmelere sebep olabilirler (Şahin ve Başoğlu, 2011).

*Bacillus subtilis*, 1835 yılında Christian Gottfried Ehrenberg tarafından *Vibrio subtilis* olarak adlandırılmış, ardından 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından *Bacillus subtilis* olarak yeniden adlandırılmıştır (URL-3, 2014). *Bacillus subtilis* 'in üç alttürü belirlenmiştir. Bunlar *Bacillus subtilis* spp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii* ve *Bacillus subtilis* spp. *inaquosorum*'dur (Yi ve ark., 2014). Yaklaşık 1,5-3 µm boy ve 0,5-0,8 µm eninde, tek tek bazen zincirler oluşturabilen, Gram pozitif, katalaz pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturabilen, ekstrem çevre koşullarında yaşayabilen hareketli, kapsülsüz, subterminal, penisiline duyarlı ve nişastaya etkilidirler (Bilgehan, 2009; URL-3, 2014).

*Bacillus subtilis* sağlıklı yetişkinler için patojen değildir ancak sebep olduğu gıda kaynaklı hastalıklarda kusma en çok rastlanan belirtidir (Güven ve Zorba, 2013; Antelo ve ark., 2014). Bunun yanı sıra ishal de sıklıkla rastlanan belirtidir (Antelo ve ark., 2014). *Bacillus subtilis* ürettiği proteaz ve diğer enzimlerden dolayı çeşitli doğal substratları parçalayabilir ve böylece besin döngüsüne katkıda bulunur (EPA, 1997). Oda sıcaklığında ve zenginleşmemiş besiyerinde kolaylıkla üreyebilen, R tipi koloniler oluşturan, saprofit bir basildir (URL-2, 2014). Besiyerinde üreyerek besiyeri yüzeyini buruşuk ince bir zar gibi kaplar. Bazı suşları kırmızı ve kahverengi, zaman zaman da turuncu ve siyah pigment oluşturabilirler. Jelatine yapılan saplama kültürlerinde jelatini sütun veya kese biçiminde eritirler (Bilgehan, 2009).

*Bacillus licheniformis*, doğada yaygın, toprakta ise çoğunlukla spor formunda bulunan, çoğunlukla saprofit, fakültatif anaerob bakteridir. Bazı türleri denitrifikasyon yapabilme yeteneğindedir (EPA, 1997). *Bacillus licheniformis* basitrasin olarak adlandırılan, en az beş polisakkaritten oluşan antibiyotik üretir. Bu antibiyotik basitrasin A, B, C olmak üzere 3 ayrı bölümden oluşur. Basitrasin A yapının ana bileşenidir. Basitrasin çoğu Gram pozitif bakteriye karşı aktif olmasına rağmen Gram negatif bakterilere karşı aktiviteye sahip değildir (Al-Janabi, 2006). *Bacillus licheniformis* ile kontamine olmuş gıdanın tüketilmesinden 5-12 saat sonra mide bulantısı, kusma, ishal, mide krampı belirtileri ile gıda kaynaklı hastalıklara sebep olabilir. Hastalık kaynağı gıdalar genellikle bu bakteri ile kontamine olmuş pişmiş et ve sebzeler, dondurma, tatlı, çiğ süt ve endüstriyel üretilmiş bebek mamalarıdır (Angelo, 2014).

### **2.1.3. *Bacillus* cinsi bakterilerin kullanım alanları**

*Bacillus* cinsi endüstriyel açıdan önemli birçok enzimin üretilmesinde kullanılır. Çünkü çoğu türü patojen özellik göstermez, oldukça geniş genetik çeşitliliğe sahiptir ve kolay gelişme göstermektedir (European Commission, 2000). Fermantasyon yoluyla tipik enzim üretimi *Bacillus* cinsi ile oldukça kısa sürede ve çok daha düşük maliyetli azot ve karbon kaynaklarıyla yapılabilir (Çöleri, 2007).

Ticari enzim üretiminin yaklaşık yarısı *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir. Bu enzimler içinde proteazlar,  $\alpha$ -amilazlar, glukoz izomerazlar ve pullunazlar gibi enzimleri bulunur. *Bacillus* türleri mikrobiyal rennet üreten bakteriler arasında önemli bir grup içinde yer almaktadır. Bu türler arasında *Bacillus polymyxa* türünün salgıladığı enzim oldukça iyi özelliklere sahiptir (Karapınar ve Ünlütürk, 1982). Bira üretimi, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı *Bacillus* spp. tarafından üretilen amilaz ve  $\beta$ -glukanaz enzimleridir (Tatar, 2007). Alkaline poligalakturonaz liyaz (PGL) enzimi pektin depolimeraz enzimidir. Çay ve kahve fermantasyonu, yağ ekstraksiyonu, meyve suyu ve tekstil gibi birçok alanda kullanılan PGL *B. subtilis* tarafından üretilmektedir (Zhang ve ark., 2013).

*Bacillus*'dan izole edilen proteazlar, deterjan üretimi ve dericilik sanayinde de kullanılmaktadır (Tatar, 2007). *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerinden elde edilen proteaz enzimlerinin deri endüstrisinde kimyasal kullanımına alternatif oluşturduğu böylece çevre kirliliğinin azaltılmasında etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Balk ve Dönmez, 1992). Bazı *Bacillus* türleri nükleik asit üretiminde kullanılır. Bu bakteriler lipopeptid sürfaktanlar ve antibiyotikler üreterek bakteri ve funguslara karşı etki gösterebilmektedir (European Commission, 2000).

*Bacillus* türleri, sporları ve ürettikleri enzim, antimikrobiyal madde, vitamin gibi metabolitleri aracılığıyla probiyotik özellik gösterebilmektedir. *Bacillus* türleri probiyotik etkiyi salgıladıkları biyoaktif bileşikler aracılığıyla bağışıklık sistemini uyararak göstermektedir (Erem ve ark., 2013). Bazı türler ise domuz, kümes hayvanı ve buzağı gibi çiftlik hayvanlarının yemlerine ilave edilerek performansı arttırmak için kullanılmaktadır (European Commission, 2000).

*Bacillus megaterium* DSM 90 suşunun patuline karşı duyarlı olduğu ve biyolojik yolla kantitatif patulin ölçümünde kullanılabilecek test mikroorganizması olduğu belirlenmiştir. Test için optimum inokülüm miktarının 24 saatlik kültürden %1 oranında olduğu, optimum inkübasyon sıcaklık ve süresinin sırasıyla, 37°C ve 15 saat olduğu bulunmuştur (Özçelik, 1985).

## 2.2. Melas

### 2.2.1. Melasın genel özellikleri

Kamış ve pancar şekeri fabrikalarında, sakkarozun kristal halde elde edilmesi için yapılan kademeli işlemlerin en sonunda geriye kalan ve koyu kahve renkli, yüksek viskoziteli (kıvamlı) şurup melas olarak tanımlanır. Kısaca melas, şeker üretim prosesinde içerisinden artık daha fazla sakkaroz kristalize edilmesi masraf ve zaman ekonomisi açısından verimli olmayan bir kalıntıdır (Türkşeker, 2014).

İslamiyetin ilk yıllarından beri bilinen melasın tarihi M.S.600 yıllarında Perslerin beyaz şeker üretimini öğrenmesine kadar uzanmaktadır. Üretim teknolojisinin başlangıcı ise 300 yıl kadar eskiye dayanmaktadır (Fidan ve Cenik, 1976).

Dünyada üretilen melasın %75'i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*), geri kalan kısmın büyük bir çoğunluğu şeker pancarından (*Beta vulgaris*) üretilmektedir. İşlenen pancardan yaklaşık %4 oranında melas üretilir (Yılmaz, 2006; URL-4, 2014). Dünyadaki melas üretimi şeker üretimiyle birlikte büyük miktarda artış göstermiş, 1960'lı yıllarda melas üretimi 15 milyon ton iken 1998-1999 yıllarında 46 milyon tona ulaşmıştır (Yılmaz, 2006). Ancak Türkiye'de şeker kanunu gereği kota uygulaması sonucu melas üretimi gün geçtikçe azalmaktadır. 2000 yılında 763.000 ton olan melas üretimi, 2003 yılında 520.000 tona düşmüştür (URL-4, 2014). Dünyada en fazla melas üreten ülkeler arasında Brezilya, Çin, Hindistan, Tayland ve Pakistan öne çıkmaktadır (Yılmaz, 2006).

Birçok endüstriyel yan üründe olduğu gibi melasdaki kimyasal bileşenler de geniş oranda çeşitlilik göstermektedir. Melasın bileşimi, depolanma özelliklerinin yanı sıra toprak türü, ortam sıcaklığı, nem, üretim sezonu, iklim, çeşitlilik ve belirli bir işleme tesisinde üretim uygulamaları gibi faktörlerden de etkilenmektedir (Öner ve ark., 2010; Nakata ve ark., 2014). Dolayısıyla besin, lezzet, renk, viskozite ve toplam şeker içeriği önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Bütün melas çeşitleri önemli miktarda şeker ve karbonhidrat içerir ve bu bileşenler melasın besin değerini oluşturmaktadırlar (Öner ve ark., 2010). Melasın kuru madde miktarı yere ve



yönteme göre az çok değişmesine rağmen ortalama %77-82 dolayındadır ve içerdiği şeker miktarı da %50 civarındadır (Türkşeker, 2014).

Melasın kuru maddeye göre ortalama bileşimi; %12-15 azotlu organik maddeler, %16-18 azotsuz organik maddeler, %10-15 kül-inorganik maddeler, %0,1-0,5 invert şeker, %40-42 toplam şeker, %70-85 kuru madde, %15-30 su şeklindedir (Yılmaz, 2006; Srikanth ve ark., 2014). Şeker kamışı melasında toplam şekerin %65'i sakkaroz, %15'i früktoz, %15'i ise glukozdan oluşurken şeker pancarı melası yüksek oranda früktoz içermez. Şeker pancarı melası %65 sakkaroz, %35 glukoz içerir (Emanuele ve Sniffen, 2014). Ayrıca K, Ca, Mg, Cl gibi mineralleri ve iz element, B grubu vitamin kompleksi ve pantotenik asit de içerir ancak riboflavin ve tiamin açısından fakirdir (Cleasby, 1963; Özçelik, 1986).

Melas, aminoasitler arasından en fazla glutamin asidi içerir, çok az miktarda da protein vardır. Azotsuz organik yapısında ise, pektin ve hemiselüloz bulunmaktadır. Pektin, şeker üretimi sırasında çökerek ayrılmasına rağmen parçalama ürünleri olan galaktoz ve arabinoz melasa geçer (Yılmaz, 2006). Şeker kamışı melası pancar melasından daha yüksek viskozite ve şeker içeriğine sahiptir (Bagy ve ark., 2014).

Şeker pancarı yapısındaki azotsuz organik maddeler arasında dikarbonik asitler (okzalik, malonik, süksinik, glutorik ve adipinik asitler) ve oksikarbonik asitler de bulunmaktadır. Bunların büyük kısmı üretim sırasında ayrılmakla beraber bazıları (okzalik, oksiglutarik, laktik, sakkarik, bümik ve arabin asitler) melasta az miktarda bulunurlar. Şeker pancarının yapısında bulunan amidler, üretim esnasında amonyak ve organik asitlere parçalanırlar. Melas, çok az miktarda amonyum tuzları da içermektedir. Melasta bulunan anorganik maddelerin miktarı ve bileşimi genellikle pancarın yetiştirildiği toprağa, çevre koşullarına ve pancar çeşidine göre değişmektedir (Yılmaz, 2006).

### 2.2.2. Melasın kullanım alanları

Melas geniş bir endüstriyel kullanım alanına sahiptir. Gıda ve içecek üretiminde, yakıt, lastik, baskı ve kimya endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca tarımsal alanda da geniş oranda kullanılmaktadır (Yılmaz, 2006).

Melas, yüksek oranda fermente edilebilir şeker içerdiğinden fermantasyonla üretilen birçok endüstriyel ürünün üretilmesinde hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır (Cleasby, 1963; Srikanth ve ark., 2014). Etanol, bütanol, biyopolimer, biyohidrojen, enzim, pigment, aminoasit, polihidroksialkonatlar ve organik asit üretiminde düşük maliyetli substrat olarak kullanılmaktadır (Hsu ve ark., 2014; Nakata ve ark., 2014; Srikanth ve ark., 2014; Shen ve ark., 2015). Ayrıca melas, meşrubat üretiminde, doğrudan doğruya hayvan yemi olarak ve maya fabrikalarında kullanılmaktadır (Türkşeker, 2014).

Melasın hayvan yemi olarak optimum kullanım oranı yaklaşık olarak %10'dur. Daha fazla oranda kullanılması besleyici değerini düşürmektedir. Hayvan beslenmesinde yaygın olarak kullanılmasının sebepleri besleyici olması, içeriğindeki şekerden dolayı lezzetli olması, pelet üretimine katkı sağlaması, yemdeki kirlilikleri azaltıcı olması sayılabilir (Cleasby, 1963). Melas ilave edilmiş silajlarda melas içeriğindeki karbonhidratlar rumende kolaylıkla fermente olabilir, rumen mikroorganizmaları silaj içindeki parçalanabilir azottan daha fazla fayda sağlar ve mikrobiyal protein sentezi artar. Böylece süt proteinleri için iyi bir aminoasit kaynağı oluşmaktadır (Murphy, 1999). Yapılan çalışmalar tropik çim silajına %2-3 oranında melas ilavesinin önemli oranda koruma sağladığını göstermiştir (Sath, 2012).

Şeker pancarı melası yüksek miktarda antioksidan madde içerir. Şeker pancarı melasından çeşitli ekstraksiyon metotlarıyla fenolik madde, antioksidan ve antosiyanin elde edilebilir (Chen ve ark., 2015). Şeker kamışı melası da flavanoid türevleri gibi antioksidanları yüksek oranda içerir. İçeriğindeki antioksidan süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu metodu ile etkili bir şekilde ekstrakte edilebilir (Guan ve ark., 2014).

Şeker kamışı melası, yüksek şeker ve gelişim için gerekli metalleri içerir. Bu özelliği ile ksantan, pullulan, welan gibi mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin üretilmesinde düşük maliyetli karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Ai ve ark., 2015). Bagy ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarında mikrobiyal fermantasyonla biodizel ve hidrojen üretiminde melasın hammadde kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

### **2.3. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler**

#### **2.3.1. Genel özellikleri**

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, suda çözünebilen, iyonik veya iyonik olmayan biyopolimer özelliklerine sahiptir (Gürleyendağ, 2006). EPS, düz veya dallanmış monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan, yüksek molekül ağırlığına sahip polimerlerdir. EPS'yi oluşturan monosakkaritler çoğunlukla heksozlardır ancak pentozlar da EPS yapısında bulunabilir (Ruijssenaars, 2001; Bhaskar ve Bhosle, 2005; Bragadeeswaran ve ark., 2011).

EPS, yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritler, DNA, protein, lipid, humik asit, nükleik asit, fosfolipid ve diğer polimerik bileşiklerden oluşur (Singh ve ark., 2011; Chen ve ark., 2013). Bu nedenle asetil, süksinil veya pürivil gibi organik fonksiyonel gruplar ve sülfat gibi bazı inorganik bileşenlerden oluşur (Singh ve ark., 2011). EPS normalde düşük miktarda DNA içerir ve bu DNA da ölü hücrelerden lizis sonrası gelen DNA'dır. Ancak yüksek miktardaki DNA zorlu ekstraksiyon prosesinden dolayı hücrelerin lize olduğunun göstergesi olabilir (Liu ve Fang, 2002).

Birçok bakteri ve maya türleri mikrobiyal ekzopolisakkarit üretmektedir (Çelik ve ark., 2008). EPS üreten mikroorganizmalar katı yüzeylerde kolonilerin mukoid görünüşü ile belirlenebilir, sıvı besiyerlerinde ise oldukça viskoz bir ortam oluştururlar (Gürleyendağ, 2006).

Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ve fonksiyonları baz alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritler üç ana sınıfa ayrılabilir. Hücre için karbon ve enerji kaynağı görevi gören sitozolik polisakkaritler, hücre duvarının bileşeni olan

lipopolisakkaritler, kapsül veya slim formunda dış ortama salgılanan ekzopolisakkaritler olarak ayrılır. Bunlardan ilk ikisi hücrenin bir parçasıdır (Mishra ve Jha, 2013).

EPS, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak sınıflandırılır. Homopolisakkaritler, üç veya daha fazla aynı monosakkaritten oluşur, ancak heteropolisakkaritler farklı monosakkaritlerin birleşmesiyle oluşur (Minervini ve ark., 2010). Dekstran ve levan gibi homopolisakkaritler tek tip monosakkaritten oluşur. Ksantan veya jellan gibi heteropolisakkaritler ise birkaç çeşit monosakkaritten oluşur ve kompleks yapıya sahiptirler. Heteropolisakkaritler çoğunlukla hücre içinde sentezlenirler ve bakteriyel EPS grubunun önemli kısmını oluştururlar (Donot ve ark., 2012).

Homopolisakkaritler üç farklı türe ayrılır. Bunlardan ilki tek tip bağlardan oluşan, düz nötral homopolisakkaritlerdir. Bu gruptan farklı olarak açıl grupları içeren polianyonik homopolimerler mevcuttur (Gürleyendağ, 2006). Üçüncü tür homopolisakkaritler ise daha kompleks yapıdaki nadir rastlanan sikleroglukan tipindeki türlerdir. Bu tür homopolisakkaritler, tekrarlayan 1,6- $\alpha$ -D-glikozil yan zincirlerinden dolayı tetrasakkarit ünitelerine sahiptirler (Öner ve ark., 2010). Homopolisakkaritlerin çoğu tek tip bağ içeren, düz, nötral glukanlardır ancak heteropolisakkaritlerin tamamı yapısındaki üronik asitten dolayı polianyonik özellik göstermektedirler (Singh ve ark., 2008).

Heteropolisakkaritler, genellikle birden dörde kadar farklı uzunluklardaki şekerlere sahip kısa yan zincirlerden meydana gelir (Gürleyendağ, 2006). Heteropolisakkaritler D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz, N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması ile meydana gelen yapılardır (Milci ve Yaygın, 2005).

Kapsüler polisakkaritler (CPS), patojenite, spesifik direnç, spesifik olmayan konakçı immün sistem ve adhezyon ile doğrudan ilgilidir (Öner, 2013). CPS ve LPS

genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen unsurlar olduğundan dolayı, tıbbi açıdan büyük öneme sahiptir (Onbaşılı, 2006).

EPS enerji kaynağı olarak katabolize edilmez, ancak EPS sentezi önemli ölçüde enerji gerektirir, birçok bakteri enerjisinin %70'den fazlasını EPS üretiminde harcar (Aslım ve ark., 2005; Staudt, 2009). EPS'nin başlıca rolü hücreyi çevreden korumaktır (Donot ve ark., 2012). EPS, genetik bilginin korunması, protein, fosfat ve silikon gibi makromoleküllerin depolanması, enerji üretimi ya da enerji indirgenmesi, ağır metal ve antibakteriyel etkenler vb. tehlikeli çevresel faktörlere karşı savunma gibi önemli roller üstlenirler (Fazio ve ark., 1982; Öner, 2013). Hücrenin EPS tabakası ile çevrelenmesi hücreyi kuruma ve protozon istilasına karşı korur. Ayrıca dış polisakkarit tabakasının anyonik yapısı esansiyel mineral ve bileşenlerin korunmasına yardımcı olur. EPS bazı metalleri indirger, bu nedenle metal ve iyonları şelatlama gücüne sahiptir (Donot ve ark., 2012).

EPS üretimi sıcaklık, basınç ve ışık yoğunluğu gibi çevresel baskılara direkt cevaptır. EPS üretimi dış çevrede etkileşimde olunan mikroorganizma ile çevrenin sıvı veya katı olmasından etkilenir. Asidofilik, termofilik türler ve arkeler dahil EPS ekstrem koşullara adapte olmaya yardım eder (Donot ve ark., 2012). Doğal ortamında EPS farklı işlevler görmektedir. Örneğin virülans faktörü ile bağlantılı olabilir, bitki veya hayvan patojenitesinde etki gösterir, bitki-mikroorganizma interaksyonu, kurumaya karşı ya da bakteriyofaj ve protozoa saldırılarına karşı korur. Hem doğal hem de yapay ortamlarda EPS biyofilm yapısında önemli yapısal rol oynamaktadır. Çoğu mikrobiyal koloninin doğal ortamında çeşitli sayılarda prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalar katı-sıvı fazlara bağlanarak birlikte gelişmektedir (Sutherland, 1998).

Biyofilm oluşumu ilk olarak hücrelerin taşıyıcı yüzey üzerine adhezyonuna yardımcı olur. Hidrofobik ve güçlü mutant bakteriyel hücreler taşıyıcı yüzeyler üzerine kolaylıkla adhere olabilmektedir. Yüzey pürüzlülüğü ve taşıyıcı yüzey enerjisi biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında ve organizmanın tutunmasında gereklidir (Chen ve ark., 2013). Adhezyon ve korucuyu etkisinin yanı sıra biyofilm yapısı

diğer mikrobiyal türler ile olan ilişkiyi düzenler. Biyofilm içinde ilişki kurulduğu zaman bir türün metabolik ürünleri başka bir tür için metabolik prosese substrat olabilir. Dahası bir türün biyofilme adhezyonu başka bir tür için tutunma noktaları oluşturabilmektedir (Donot ve ark., 2012).

### 2.3.2. EPS biyosentezi

Ekzopolisakkaritler, bakteri şuşlarının çoğalma evresinde suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine bağlı olarak değişen koşullarda sentezlenir. Sentez olayı hücre dışında veya hücre membranında gerçekleşebilir (Yılmaz, 2006). Çoğu EPS biosentezi bakteriyel hücre duvarı polimerleri, peptidoglukan ve lipopolisakkarit sentezine benzemektedir (Kumar ve ark., 2007).

Ekzopolisakkarit salgılanması ‘Quorum sensing’ olarak adlandırılan, bakteri yoğunluğuna bağlı olarak spesifik feromonların salgılanması ile başlamaktadır. Salgılanan feromonlar antibiyotik üretimi, biyofilm oluşumu, sporulasyon gibi biyokimyasal olayları başlatmaktadır (Okada ve ark., 2015).

Ekzopolisakkaritlerin biyosentezi, birçok bakteri suşu için önemli bir özelliktir. Sentez için farklı enzimlerin varlığına gereksinim vardır. Ekzopolisakkarit biyosentezinde rol oynayan enzimlerden bazıları lipopolisakkaritlerin sentezinde de yer almaktadır (Onbaşılı, 2006). Çoğu bakteriyel EPS hücre içinde sentezlenir ve hücre dışına makro molekül halinde salgılanır. Ancak bunun dışında levan ve dekstran gibi birkaç istisna mevcuttur. Bu istisna EPS sentezi ve polimerizasyonu ise hücre dışında meydana gelir. Salgılanan enzimler hücre dışında substratı polimere dönüştürür (Freitas ve ark., 2011). EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS’lerin oluşumunda UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2 ve polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır (Sutherland, 1977).

Bakteriyel biosentetik yolu substrat alımı, merkezi metabolit yolu ve polisakkarit sentezinden oluşur. Substrat tipine bağlı olarak pasif ve aktif taşıma sistemiyle

hücreye alınır. Ardından substrat hücre içi fosforilasyonla katabolize edilir veya substrat taşınır ve oksidatif periplazmik yol boyunca okside edilebilir (Freitas ve ark., 2011). Periplazmik oksidatif yol sadece bazı bakterilerde olmasına rağmen hücre içi fosforilasyon yolu çoğu bakteride bulunur. İki sisteme de sahip olan EPS üreten birkaç tür rapor edilmiştir. Bu türler substrata erişilebilirliğe göre aynı anda fonksiyon gösterebilir (Freitas ve ark., 2011).

EPS sentezi nükleozid difosfat şekerlerini içeren intraselüler bir procestir (Kumar ve ark., 2007). Genellikle kromozomlara lokalize olmuş gen ya da genler tarafından kontrol edilir, ama bazı bakteri türlerinde megaplazmid ve kromozom olmak üzere iki farklı yolla kontrol edilir (Mishra ve Jha, 2013). Üretilen polimerin yapısına göre 12-17 kb büyüklüğünde gen sekansına ihtiyaç duyulur. Farklı polisakkarit sentez sistemleri arasında oldukça benzerlik olduğu bulunmuştur. Ancak polimerizasyon ve ekstraksiyon mekanizması hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (Kumar ve ark., 2007).

Çoğu EPS için temel karbonhidrat yapısı gelişme koşullarıyla önemli bir değişim göstermez, ancak ikame gruplar geniş ölçüde değişebilir. Bu nedenle de polimer özellikleri değişebilir. Birçok EPS üreten mikroorganizma değişen miktarlarda hücre içi depo ürünleri biriktirebilir, bu nedenle EPS üretim potansiyeli düşer. EPS sentezi üretimin ilk aşamalarında, üreme aşamasında ya da durgun fazda olabilir (Freitas ve ark., 2011).

Birçok EPS üretimi boyunca fermantasyon sıvısının reolojisi önemli ölçüde değişir. Viskozitedeki bu artış ortam homojenitesinde azalmaya sebep olur, bu durum da karıştırmayı, havalandırmayı ve bioreaktör parametrelerinin kontrolünü zorlaştırır. Fermantasyon sıvısının hidrodinamiğini arttırmak için farklı pedal konfigürasyonunda mekanik karıştırıcı kullanılabilir ya da karıştırma oranı artırılabilir. Ancak bu aletlerin kullanımı mekanik stresin artmasına ya da polimer özelliklerinin değişmesinden dolayı hücre kopmasına neden olabilir (Freitas ve ark., 2011).

Bakteriyel EPS üretimini arttırmak amacıyla en ilgi çekici ve umut verici alan metabolik mühendisliğidir. Bu alanda üretim reaksiyonu katalizleyen enzim genlerinin geliştirilmesi ile ya da enzim aktivitesi veya gen ekspresyonunu düzenleyen genlerin değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. Biyosentetik proses üç farklı seviyede kontrol edilebilir: şeker nükleotid öncülerinin sentezi, tekrarlayan birimlerin birleştirilmesi, polimerizasyon ve dışa salım (Freitas ve ark., 2011).

### 2.3.3. EPS üreten mikroorganizmalar

Son yıllarda farklı mikrobiyal EPS'lerin araştırmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit ürettikleri belirlenmiştir. Tespit edilen EPS'lerin özellikleri araştırılmıştır ve elde edilen bulgular sonucunda mikrobiyal EPS'lerin, karbon kaynakları için yarışan metabolitler oldukları belirlenmiştir (Yılmaz, 2006).

EPS üreten mikroorganizmalar kompleks besiyeri veya kimyasal olarak hazırlanmış sentetik besiyerleri kullanılarak izole edilebilir. Bu mikroorganizmalar koloniler halinde mukoid veya sulu yüzey üretebilirler ve böylece makroskopik olarak belirlenebilmektedir. Bazı polisakkaritler anilin mavisi gibi suda çözünür boyalar ile stabil yapılar oluşturur ve bu yapılar EPS tarama aracı olarak kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2007).

EPS üreten birçok farklı tür izole edilmiştir. Arkeler, bakteriler, funguslar, algler ve çoğunlukla mezofilik, termofilik ve halofilik gruplardan izole edilmiştir. Mezofilik cinsler arasında *Bacillus* spp., *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, ve *Streptococcus* spp. türleri iyi derecede EPS üretirler (Kumar, 2012). *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas* spp., *Acetobacter chorococcum*, *Acetobacter xylinum*, *Streptococcus equii* gibi türlerin ve diğer birçok bitki patojeni türün EPS ürettiği bildirilmiştir (Yılmaz, 2006). Diğer potansiyel EPS üreticileri arasında *Acetobacter* spp., *Aureobasidium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Escherichia* spp., türleri sayılabilir. Termofilik mikroorganizma



türleri arke ve bakteri filumlarında bulunabilir ve çeşitli çevrelerden izole edilen termofilik türler EPS üretme yeteneğindedir. Termofilik arke türleri arasında *Thermococcus* ve *Sulfolobus* EPS üretir, ayrıca *Archaeoglobus fulgidus* ve *Thermococcus litoralis*'in biyofilm yapısında önemli miktarda EPS ürettiği bildirilmiştir (Kumar, 2012).

Çoğu halofilik arkenin EPS ürettiği tanımlanmıştır. Bu türler arasında *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* ve *Halobacterium* türleri bulunur. En yaygın EPS üreten halofilik bakteri türü *Halomonas* türüdür. EPS üreten *Halomonas* türleri alışılmadık biçimde yüksek sülfat ve önemli miktarda üronik asit üretir ve bu da jelleşme özelliğini belirler (Kumar, 2012).

Ekstremofilik mikroorganizmalar grubundan ekzopolisakarit üreticisi ekstremofiller izole edilmiş ve optimize edilmiş koşullarda üretilmiş, ekzopolisakaritlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu mikroorganizmalara *Alteromonas macleodii* spp. *fijiensis*, *Vibrio diabolicus*, *Alteromonas infernus* ve *Thermotoga maritima* gibi bakteriler ve *Thermococcus litoralis* gibi arkeler örnek olarak gösterilebilir (Öner ve ark., 2010).

Rhizobium türlerinin iki farklı fonksiyonel EPS ürettiği bilinir. Bunlar süksinoglukan (EPS I) ve galaktoglukandır (EPS II). Normal gelişim koşulları altında EPS I üretilir ancak EPS II fosfat limitasyonu altında üretilir. EPS üretiminin çevresel değişimlere cevap olarak gerçekleştiği bulunmuştur (Nandal ve ark., 2005).

#### **2.3.4. EPS üretiminde kullanılan hammaddeler**

Bakteriyel EPS kompozisyonu ve bileşimi genetik özellik olmasına rağmen karbon kaynağı, sınırlı azot ve oksijen gibi besi ortamı bileşenlerinden ve gelişim koşullarından oldukça etkilenir (Freitas ve ark., 2011). Fermantasyon ortamı, EPS üretim maliyetinin %50'sini oluşturmaktadır. Ancak bazı ucuz atık substratlarını kullanarak, fermantasyon sürecini optimize ederek biyopolimerleri ekonomik olarak üretmeye yönelik bazı çabalar gösterilmiştir (Öner ve ark., 2010).

EPS üretiminde karbon kaynağı olarak sakkaroz, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol, sorbitol, peynir altı suyu, nişasta, fruktoz, riboz, arabinoz, rafinoz , şeker konsantreleri, methanol, C<sub>9</sub> 'dan C<sub>16</sub>'ya kadar n-alkanlar gibi çeşitli karbon kaynakları mikrobiyal EPS üretiminde kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2007; Öner ve ark., 2010). Karbon kaynağı EPS verimini etkiler ve EPS boyutu karbon kaynağına göre değişir. Örneğin aljinat fruktoz ve glukozdan 48 saatlik inkübasyon sonunda sırasıyla 500 kDa ve 276 kDa'luk molekül ağırlığında üretilir (Kumar ve ark., 2007).

EPS üretiminde kullanılan besiyeri içeriğinde azot kaynağı olarak pepton, maya ekstraktı, potasyum nitrat, asparjin, glutamik asit gibi kimyasallar geniş oranda kullanılmaktadır (Öner ve ark., 2010). Ayrıca amonyum sülfat, sodyum nitrat, üre ve maya ekstraktı da kullanılabilir. Organik azot kaynağı kullanımı çoğu zaman yüksek EPS ve spesifik gelişim oranı ile sonuçlanır. Ayrıca azot kaynağının içerdiği bazı karbonlar EPS üretimi için subsrat kaynağı olarak görev yapabilmektedir (Kumar ve ark., 2007).

Azot içeren düşük miktardaki katkıların EPS verimini arttırdığı rapor edilmesine rağmen çoğunlukla EPS üretimi düşük seviyedeki azot konsantrasyonunda daha yüksektir. Gorret ve ark. besiyerine maya ekstraktı ilavesinin *Propionibacterium acidi-propoinici*'nin hem gelişimini hem de EPS üretimini arttırdığını kanıtlamışlardır (Kumar ve ark., 2007).

### **2.3.5. EPS üretimi**

Başarılı bir fermantasyon prosesi spesifik ürün üretiminin yanı sıra başarılı ürün konsantrasyonu, verim ve ekonomik hedef doğrultusunda üretimi içerir. Bu hedeflere ulaşılabilmesi minimum risk ile mümkün olmaktadır. Bu da mikroorganizma performansı, çevresi ve ekipman dizaynı kontrol edilerek mümkün olabilmektedir (Kumar ve ark., 2007).

Yüksek EPS verimini tek başına sağlayacak kültür şartları mevcut değildir, çünkü mikroorganizmaların karbon ve azot kaynaklarının kullanımı, mineral gereksinimi, optimum pH ve sıcaklık gereksinimleri farklıdır. Bu gereksinimler maksimum EPS üretimi için kritik faktörlerdir (Kumar ve ark., 2007).

EPS üretimi ve kompozisyonu inkübasyon şartlarından etkilenmektedir (Kojic ve ark., 1992). Ayrıca EPS'nin fizikokimyasal özellikleri de mikrobiyal kaynak ve inkübasyon şartlarından etkilenmektedir (Junf ve ark., 2007). Bu nedenle büyümenin ve EPS üretiminin en yüksek olduğu optimum inkübasyon şartları belirlenmelidir (Öner ve ark., 2010). EPS üretimi için optimum sıcaklık derecesi hakkında farklı görüşler ileri sürülmüştür. Bazı araştırmacılar optimum gelişme sıcaklığında optimum EPS üretimi gerçekleştiğini ileri sürmüş, bazıları ise optimum gelişme sıcaklığından daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştiğini ileri sürmüştür. Ancak optimum gelişme sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği görüşleri de mevcuttur (Kimmel ve ark., 1998).

EPS üreten mikroorganizmalar genellikle optimal gelişime inkübasyonun ilk 24 saatinde ulaşır, ancak maksimum EPS üretimi durgun faz gibi gelişimin geç evrelerinde gerçekleşir. Bazı polisakkaritler gelişimin geç evrelerinde enzim hidrolizine uğrar. Bu reaksiyon besiyeri viskozitesinde azalmaya neden olur (Kumar ve ark., 2007). Düşük hücre kütlesi, fazla miktarda EPS üretimi ile ilgili olabilir, çünkü hücreler yavaş büyüdüğünde hücre duvarı polimerlerinin sentezi de yavaş gerçekleşir ve ortamda EPS sentezi için daha fazla isoprenoid fosfat mevcut olur (Öner ve ark., 2010). Büyüme ile maksimum EPS üretiminin optimum sıcaklıklarının farklı olmasının bir diğer sebebi ise EPS sentezinde rol oynayan enzim aktivitelerinin düşük sıcaklıklarda artmasıdır (Kumar ve ark., 2007).

Çok sayıda mikroorganizma tamponlanmış besiyerinde nötral pH'da EPS üretir. Çoğu EPS üreticisi mikroorganizma maksimum EPS üretimi için sabit pH'ya gereksinim duyar. *Neisseria meningitidis* gibi bazı bakteriler daha fazla EPS üretimi için asidik pH değerlerine ihtiyaç duyar. EPS üreten ve et ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar gelişim için tamponlanmış, pH'sı 5,2-6,5

aralığında olan ve %2-4 sodyum klorür içeren besiyerine gereksinim duymaktadır (Kumar ve ark., 2007).

Lee ve ark. (2001) *Hahella chejuensis* yüksek havalandırma oranının daha fazla EPS üretimi sağladığını ve kültür ortamının viskozitesini yükselttiğini bildirmişlerdir. Yang ve Liao (1998) yüksek çalkalama ve havalandırmanın polisakkarit oluşumunu olumlu yönde desteklediğini açıklamıştır. Deterjan kullanımı EPS içeren sıvıda oksijen konsantrasyonunu düzenleyebilir (Kumar ve ark., 2007).

### 2.3.6. EPS'nin endüstriyel önemi

Yeni bir biyomateryal olarak kabul edilen EPS, farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı petrol, gıda, tekstil, deterjan, kozmetik, akarsu işleme sürecinde, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, madencilik ve metalurji endüstrisi, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde bir çok uygulama alanı edinmiştir (Onbaşılı, 2006; Vu ve ark., 2009; Kazak ve ark., 2010).

EPS' nin endüstriyel alandaki önemi, spesifik kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır (Onbaşılı, 2006). Bazı polimerlerin kullanım alanları oldukça geniştir, çünkü eşsiz ve üstün fiziksel özellikleri geleneksel bitki polisakkaritlerinin yerine kullanımlarını sağlamaktadır (Sutherland, 1998). Bazı polisakkaritlerin yüksek çözelti viskozitesi veya jel oluşturma yeteneği onların ticari boyut kazanmasını sağlamıştır, ancak diğer özellikleri de fayda sağlayabilir. Bu özellikler fiziksel veya biyolojik özelliklere bağlı olabilmektedir (Sutherland, 1999).

Bazı mikrobiyal polisakkaritler çeşitli gelişim aşamasında olmasına rağmen birkaç mikrobiyal polisakkarit biyoteknolojik ürün olarak geniş ölçüde kabul görmüştür. Bazı polimerlerin geleneksel bitki polimerlerine kıyasla benzersiz ve üstün özelliklerinden dolayı çok geniş kullanım alanı vardır. Bu kategoride ksantan ve jellan önemli mikrobiyal polisakkaritlerdir (Sutherland, 1998).

Ticari mikrobiyal üretim için sadece birkaç polisakkarit yoğun olarak çalışılmıştır: *Leuconostoc* spp. tarafından üretilen dekstran, *Xanthomonas compestris*'den elde edilen ksantan gum (Papagianni ve ark., 2001), *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* spp. bakterileri tarafından üretilen alginik asit'tir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen mukoid ekzopolisakkarit, tekrarlı mannuronik ve glukuronik asit polimerleridir ve alginat olarak isimlendirilmektedir (Onbaşılı, 2006). *Sphingomonas paucimobilis* tarafından sentezlenen jellan (Sutherland, 2001), *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyal selülozlar (Sutherland, 1998), *Aureobasidium pullulans* tarafından sentezlenen pullulan (Duan ve ark., 2008), *Streptococcus equii* tarafından sentezlenen hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen süksinoglikan (Nandal ve ark., 2005) gibi ürünler yaygın bir kullanım alanına sahiptir.

Gıdalarda kullanılan polisakkaritlerin çoğu bitki kaynaklıdır ve birçoğunun reolojik özelliklerini geliştirmek için kimyasal veya enzimatik olarak modifiye edilmesi gerekmektedir (Kumar, 2012). Mikrobiyal ekzopolisakkaritler sayıca oldukça fazla olmalarına rağmen dekstran, ksantan, jellan, pullulan, kurdlan ve levan gibi ekzopolisakkaritler endüstriyel açıdan önemli olanlardır (Onbaşılı, 2006). Geniş fizikokimyasal özelliklerine rağmen ABD ve Avrupa'da sadece ksantan ve jellanın gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilmiştir (Donot ve ark., 2012).

EPS'ler gıdalarda jelleştirici, stabilize edici, emülgatör, ağır metal uzaklaştırma, gelişmiş yağ geri kazanımı, monosakkarit kaynağı ve yoğunlaştırıcı olarak kullanılır (Kumar ve ark., 2007; Kumar, 2012). EPS üreten laktik asit bakterileri (LAB) gıda ürünleri ve fermente süt ürünlerinde reolojik karakteristik sağlaması ve tekstür özelliğini geliştirmesi için kullanılmaktadır. Gıda ürünlerinde kullanılan bu bakteriler geniş çeşitlilikte yapısal EPS üretirler ve bu ürünler gıda ürünlerinde biokoyulaştırıcı olarak kullanımına karşı ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Boels ve ark., 2001).

EPS, endüstriyel alanda kullanımı dışında klinik açıdan da öneme sahiptir. Bu açıdan son yıllarda tıp ve farmakoloji alanında kullanımı söz konusudur (Onbaşılı, 2006). Antitümör, antivirüs, ve ateş düşürücü, ilaç sanayisinde kaplama materyali gibi pek

çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunmasının yanı sıra ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için induker olarak kullanılmaktadır. 40 000-70 000 Da gibi düşük mol ağırlığına sahip olanlar tıp alanında en çok kullanılanlardır (Yılmaz, 2006).

EPS üreten bakterilerin biyoremidasyon için kullanımı giderek artmaktadır. Biyofilm değişken çevre koşullarına adaptasyon için yardımcı olur ve böylece biyoremidasyon için daha etkili ve güvenli bir alternatif oluşturur (Kumar, 2012).

## **BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **3.1. Materyal**

#### **3.1.1. Kullanılan melas**

Araştırmada kullanılan şeker pancarı melası Adapazarı Şeker Fabrikasından tedarik edilmiştir.

#### **3.1.2. Kullanılan mikroorganizmalar**

Araştırmada 12 adet farklı *Bacillus* suşu kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI tarafından topraktan izole edilmiştir. İzole edilen suşlar sırasıyla şöyledir: *Bacillus* spp. BAT3, *Bacillus* spp. GİT2, *Bacillus* spp. BAST2, *Bacillus* spp. BMZE2, *Bacillus* spp. BMZE3, *Bacillus* spp. BMZE4, *Bacillus* spp. ZGT1, *Bacillus* spp. ZGT3, *Bacillus* spp. ZGT5, *Bacillus* spp. ZGT9, *Bacillus* spp. ZBP4 ve *Bacillus* spp. ZBP10'tür.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler**

Bu çalışmada, inkübatör (Elektro-Mag M 6040 BP, Elektro-Mag M 5040, ElektroTest), çalkalamalı İnkübatör (HETTICH EBA 21), santrifüj (BENCHMARK Incu-Shaker/mini), soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320 R), spektrofotometre (SHIMADZU UVmini 1240), otoklav (HMC HIRAYAMA HV 85-L), su banyosu (Wisd WiseBath), vorteks (IKA MS3 basic, DRAGON-LAB MX-S, DAIHAN Vortex Mixer LVM-202), hassas terazi (AND GR-200) ve manyetik karıştırıcı (Wisd WiseStir MSH-20D, IKA C-MAG HS 7) kullanılmıştır.

### 3.2.2. Kullanılan besiyerleri

Mikroorganizmaların aktifleştirilmesinde Nutrient Agar (Merck, Almanya), aşı kültür hazırlanmasında Nutrient Broth (Merck, Almanya), ekzopolisakkaritlerin üretiminde ise substrat olarak glukoz ve melas kullanılarak hazırlanan besiyerleri kullanılmıştır.

Nutrient Agar: 1000 mL damıtık su için 20 g olacak şekilde dehidre formdaki besiyerinden 20 g tartılmış ve ısıtılarak eritildikten sonra 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sterilize edilen besiyeri su banyosunda 45-50°C'ye soğutulup steril petri kutularına dağıtılmıştır.

Nutrient Broth: Dehidre formdaki besiyerinden 8 g tartılarak 1000 mL damıtık su içinde çözündürülmüş, ardından 100 mL erlenlere 20'şer mL olacak şekilde dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Glukoz Besiyeri: 20 g glukoz, 5 g maya özütü, 1,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Almanya) ve 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck, Almanya) tartılarak 1000 mL damıtık su içinde çözündürülmüş ve 100 mL'lik erlenlere 30 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Melas Besiyeri: 40 g melas, 5 g maya özütü, 1,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Almanya) ve 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck, Almanya) tartılarak damıtık su ile litreye tamamlanmış, karıştırıldıktan sonra 100 mL'lik erlenlere 30 mL olacak şekilde dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

### 3.2.3. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Araştırmada kullanılan kimyasalların hepsi analitik safliktadır. Kimyasallar Merck (Almanya), Sigma-Aldrich (ABD), Tekkim (Türkiye), Gurup Deltalar (Türkiye) firmalarından temin edilmiştir.



2 N HCl: Yoğunluğu  $1,18 \text{ g/cm}^3$  olan %37'lik HCl'den (Merck, Almanya) 16,7 mL alınarak damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2 N NaCl: 8 g NaOH (Merck, Almanya) tartıldıktan sonra damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

% 5 Fenol Çözeltisi (ağ/h): 50 g fenol (Merck, Almanya) 950 mL damıtık suda çözdürülerek hazırlanmıştır.

DNS (3,5-dinitrosalisilik asit): 10 g NaOH, 10 g DNS (Sigma D-1510) damıtık suda çözüldürülüp litreye tamamlanır. Bu çözeltinin 100 mL'sine kullanılmadan önce 1 mL %10'luk sodyum sülfid ilave edilir.

Rochelle Tuzu Çözeltisi: 400 g sodyum potasyum tartarat (Merck, Almanya) 1000 mL damıtık suda çözüldürülerek hazırlanır.

Sodyum Sülfid Çözeltisi: 10 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Merck, Almanya) 100 mL damıtık suda çözüldürülerek hazırlanmıştır.

0,6 mM  $\text{FeCl}_2$  Çözeltisi: 7,6 mg  $\text{FeCl}_2$  100 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve damıtık su ile hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır.

5 mM Ferrozin Çözeltisi: 246,23 mg ferrozin 100 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve %70'lik metanol ile hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır.

1,5 mM  $\text{FeSO}_4$  Çözeltisi: 41,703 mg  $\text{FeSO}_4$  100 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve damıtık su ile hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır.

6 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  Çözeltisi: %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden 63,58  $\mu\text{L}$  alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve damıtık su ile hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır.

20 mM Sodyum Salisilat Çözeltisi: 160,1 mg sodyum salisilat 50 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve damıtık su ile hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır.

#### **3.2.4. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi**

%50'lik gliserolde  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen mikroorganizmalar Nutrient Agara çizme yöntemi ile ekildikten sonra  $35^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında bir öze yardımıyla petriden tek koloni seçilerek Nutrient Broth'a alınmış ve aynı sıcaklık ve sürede çalkalamalı inkübatörde 135 rpm'de geliştirilerek aşı kültür hazırlanmıştır.

#### **3.2.5. Melasın hazırlanması**

Melas kullanılmadan önce 1/1 (ağ/ağ) oranında saf suyla karıştırıldıktan sonra pH'sı 2 N HCl ile 4'e ayarlanmış ve ısıtıcı üzerinde karıştırılarak kaynatılmıştır. Kaynatılan melas önce kaba filtre kağıdı yardımıyla süzölmüş daha sonra filtrat 9000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek melastaki çamur vb. safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen melas  $4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilerek EPS üretiminde kullanılmıştır.

#### **3.2.6. EPS üretimi**

EPS üretimi 100 mL'lik erlenmayerler içinde aerobik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan steril besiyerleri %5 (h/h) oranında aktif kültür ile aşılandıktan sonra çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmış ve gelişmenin 24, 48 ve 72. saatlerinde örnekler alınarak şeker tayini ölçülmüştür. Fermentasyon koşullarının üretime etkisi belirlenmiştir.

#### **3.2.7. Maksimum EPS üreten mikroorganizmanın belirlenmesi**

Hazırlanan steril glukoz besiyerlerine %5 (h/h) oranında aktif kültürler aşılandıktan sonra çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmış ve gelişmenin 24, 48 ve 72.

saatlerinde örnekler alınarak EPS üretim miktarlarını belirlemek için analizler yapılmıştır.

### **3.2.8. İnkübasyon süresinin EPS üretimine etkisinin belirlenmesi**

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi için glukoz besiyerine aşıl原因an bakteri 35°C’de, çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübasyona tabi tutulmuş ve her 24 saatte örnek alınarak EPS miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir.

### **3.2.9. Optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi**

Optimum melas konsantrasyonunun belirlenebilmesi için 10, 20, 30, 40 ve 60 g/L melas konsantrasyonlarında melas besiyeri hazırlanmıştır. Bütün besiyerleri aynı miktarda bakteri kültürü ile aşıl原因arak 35°C’de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda EPS miktarı belirlenmiştir.

### **3.2.10. pH’nın EPS üretimine etkisi**

Optimum pH değerinin belirlenmesi için melas besiyerinin başlangıç pH’sı 2N HCl veya 2N NaOH ile 4, 5, 6, 7, 8, 9’a ayarlanmıştır. *Bacillus subtilis* ZBP4 bu koşullarda 24 saat inkübe edildikten sonra alınan örneklerde EPS miktarı belirlenmiştir.

### **3.2.11. Gelişme sıcaklığının EPS üretimine etkisi**

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS ürettiği optimum sıcaklık değerini belirleyebilmek için, bakteri melas besiyerinde 30, 33, 35, 37, 40, 43, 45°C sıcaklık değerlerinde 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda alınan örneklerde üretilen EPS miktarı belirlenmiştir.

### 3.2.12. Havalandırma hızının EPS üretimine etkisi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun maksimum EPS üretimi gösterdiği havalandırma değerini belirlemek için 80, 100, 120, 150, 200 rpm çalkalama hızlarında 24 saatlik inkübasyon uygulanmıştır. İnkübasyon sonucunda fenol sülfürik asit yöntemi ile üretilen EPS miktarı saptanmıştır.

### 3.2.13. Azot kaynaklarının EPS üretimine etkisi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun maksimum EPS üretimi gösterdiği azot kaynağının saptanabilmesi için melas besiyerine 5 g/L olacak şekilde amonyum sülfat (Merck, Almanya), pepton (Merck, Almanya), maya ekstraktı (Merck, Almanya), tripton water (Merck, Almanya) ilave edilmiş, ayrıca hiçbir azot kaynağı kullanılmadan melas besiyeri hazırlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda üretilen EPS miktarı saptanmıştır.

### 3.2.14. Çeşitli karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun maksimum EPS üretimi gösterdiği şeker kaynağının belirlenebilmesi için besiyerine melas yerine 30 g/L oranında inülin, glukoz, nişasta, laktoz, peyniraltı suyu, mannitol ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda şeker tayini yapılarak en yüksek EPS üretimini sağlayan şeker kaynağı tespit edilmiştir.

## 3.3. Laboratuvar analizleri

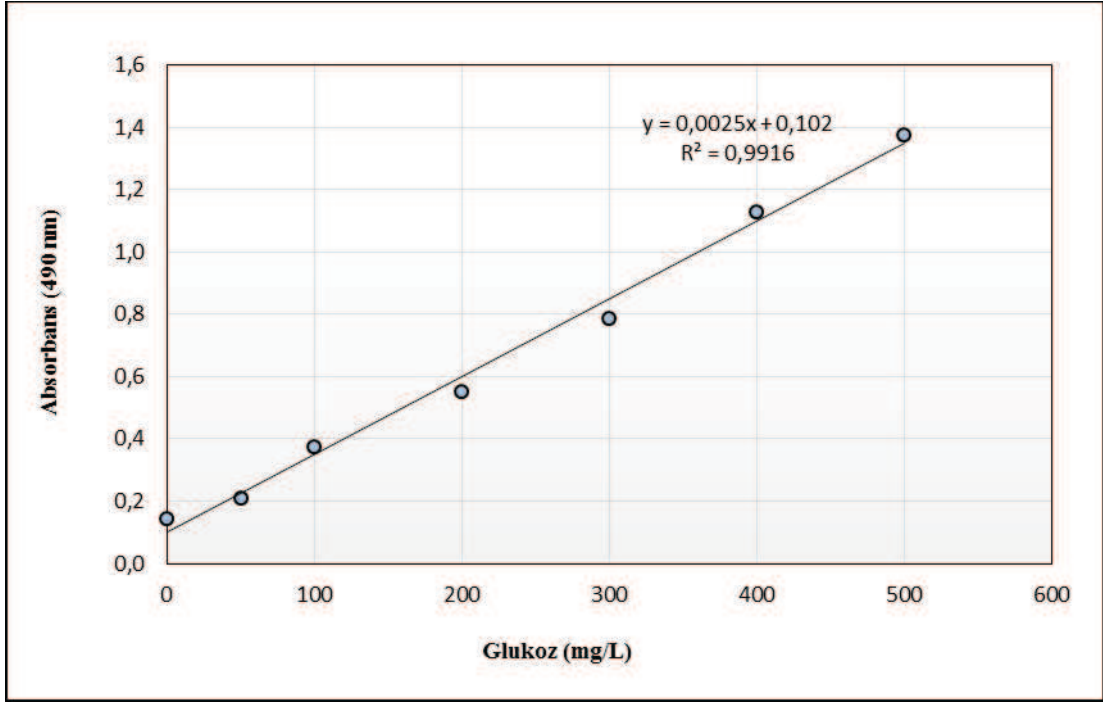
### 3.3.1. EPS miktarının belirlenmesi

İnkübasyon sonunda erlenlerden homojen bir şekilde 5'er mL örnek alınarak kapaklı santrifüj tüplerine konulduktan sonra tüpler 15 dk 100°C'de kaynatılarak bakteri ve enzimlerin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Soğutulan tüplere 0,2 g TCA (trikloro asetik asit, Sigma-Aldrich) ilave edilip vortekslenmiş, ardından 9000 rpm'de, 4°C'de, 30 dk santrifüjlenmiştir. İşlem sonrası süpernatant boş bir santrifüj tüpüne aktarılmış,

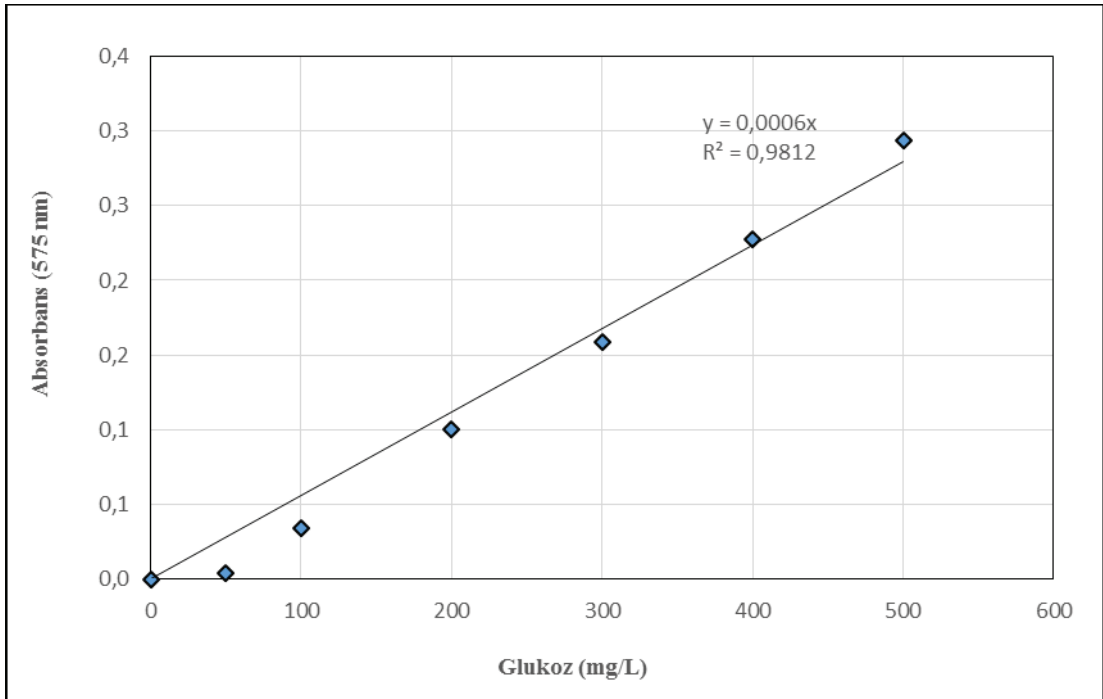
peletler ise uzaklaştırılmıştır. Süpernatant üzerine %99,5'lük soğuk etanol (h/h) (Gurup Deltalar, Türkiye) 1/1 oranında ilave edilerek bir gece 4°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler tekrar 9000 rpm'de, 4°C'de, 30 dk santrifüjlenmiş, işlem sonrası süpernatant uzaklaştırılarak peletler saf suda çözündürülüp 1'er mL'si deney tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen örnekler Dubois yöntemi (1956) diğer adıyla fenol-sülfürik asit yöntemi ile şeker tayini uygulanmıştır. Örneklerin üzerine 25 µL %5'lik fenol (ağ/h) ve 2,5 mL sülfürik asit ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiş ve spektrofotometrede dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar glukoz kullanılarak hazırlanan standart eğri yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Ayrıca besiyeri kaynaklı şeker olup olmadığını belirlemek için de DNS (3,5 Dinitro salisilik asit) yöntemi kullanılmıştır. DNS yönteminde ise suda çözündürülen peletten 1 mL deney tüpüne aktarılmış üzerine 2 mL DNS çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiş ve 90°C'deki su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneğe 1 mL Rochalle tuzu ve ardından 5 mL saf su ilave edilerek spektrofotometrede 575 nm'de absorbansı ölçülmüş ve glukoz kullanılarak hazırlanan standart eğri yardımıyla şeker miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.2.).

### 3.3.2. Mikroorganizma gelişiminin belirlenmesi

Mikroorganizmaların gelişmesi alınan örneklerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapılarak izlenmiştir. Bunun için 0,5 mL örnek alındıktan sonra üzerine 4,5 mL saf su ilave edilip vortekslenmiş ve homojen karışımın absorbansı ölçülmüştür. İşlem sonunda seyreltme faktörü ile çarpılarak mikroorganizma gelişmesi belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Fenol-sülfürik asit ile toplam şeker tayinine kullanılan standart eğri.



Şekil 3.2. DNS yönteminde kullanılan standart eğri.

### 3.3.3. Üretilen EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşu tarafından Nutrient Agar besiyerinde ve karbon kaynağı olarak glukoz ve melasın kullanıldığı besiyerlerinde üretilen 6 farklı EPS örneği saflaştırılarak demir iyonu şelatlama aktivitesi tayini ve hidroksil radikali yakalama aktivitesi ölçülerek antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir.

### 3.3.4. Demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşu tarafından üretilen EPS'nin demir (II) iyonu şelatlama aktivitesini tespit etmek amacıyla Cheng ve ark. (1998) tarafından belirlenen analiz metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

Analiz için hazırlanan ekstraktlardan 100 µL alınmış ve deney tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 100 µL FeCl<sub>2</sub> çözeltisi ve 2,5 mL distile su eklenmiş ve hızlı bir şekilde vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımına 100 µL ferrozin eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika daha bekletilmiştir. Ardından UV-VIS spektrofotometre kullanılarak Fe<sup>+2</sup>-ferrozin kompleksinin absorbansı 562 nm'de ölçülmüştür. Cihazın sıfırlanması metanol ile yapılmış olup kontrol olarak örnek yerine %70'lik metanol çözeltisi, A<sub>2</sub> çözeltisi için ferrozin yerine aynı miktarda %70'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır.

EPS ekstraktlarının, demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesinin yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak (Denklemler 3.1.) ifade edilmiştir:

$$\% \text{Şelatlama Etkisi} = 1 - \left[ \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

A<sub>0</sub>= Kontrol absorbansı,

A<sub>1</sub>= Ekstrakt varlığında ölçülen absorbans,

A<sub>2</sub>= Ferrozin olmaksızın ölçülen absorbans değerini göstermektedir.

### 3.3.5. Hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalini yakalama aktivitesi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşu tarafından üretilen EPS'nin hidroksil radikalini yakalama aktivitesini belirlemek amacıyla, Smirnoff ve Cumbes (1989) tarafından tanımlanan analiz metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

Analiz için hazırlanan ekstraktlardan 100 µL alınmış ve deney tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 1 mL FeSO<sub>4</sub> çözeltisi; 0,7 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi; 0,3 mL sodyum salisilat çözeltisi ve 800 µL distile su eklenmiştir. Bu reaksiyon karışımı 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Ardından UV-VIS spektrofotometre kullanılarak hidroksillenmiş salisilat kompleksinin absorbanansı 562 nm'de ölçülmüştür. Cihazın sıfırlanması metanol ile yapılmış ve kontrol olarak örnek yerine %70'lik metanol çözeltisi, sodyum salisilat yerine ise distile su kullanılmıştır.

EPS ekstraktlarının, hidroksil radikalini yakalama etkisinin yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak (Denklem 3.2.) ifade edilmiştir:

$$\% \text{Yakalama Etkisi} = 1 - \left[ \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100 \quad (3.2.)$$

A<sub>0</sub>= Kontrol absorbanansı,

A<sub>1</sub>= Ekstrakt varlığında ölçülen absorbanans,

A<sub>2</sub>= Sodyum salisilat olmaksızın ölçülen absorbanans değerini göstermektedir.



## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. *Bacillus* Suşunun Seçimi

Bu çalışmada 12 farklı *Bacillus* suşu ile glukoz besiyerinde EPS üretimi gerçekleştirilerek en yüksek oranda EPS üreten mikroorganizma belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi, 10 adet bakterinin değişen miktarlarda EPS ürettiği, *Bacillus* spp. ZGT1 ve *Bacillus* spp. ZGT5'in ise EPS üretmediği belirlenmiştir. En iyi EPS üreticisi suş *Bacillus* spp. ZBP4 olup 143,1 mg/L EPS üretmiştir. *Bacillus* spp. ZBP10 ve *Bacillus* spp. BMZE3 suşları da yüksek oranda EPS üretmişlerdir. *Bacillus* spp. ZBP4 en iyi EPS üreticisi olduğu için çalışmalara sadece bu bakteri ile devam edilmiştir.

Tablo 4.1. 12 farklı *Bacillus subtilis* suşunun ürettiği EPS miktarları

Bakteri	EPS Miktarı (mg/L)
<i>Bacillus</i> spp. BAST2	13,4
<i>Bacillus</i> spp. BMZE2	43,5
<i>Bacillus</i> spp. BMZE3	81,9
<i>Bacillus</i> spp. BMZE4	39,8
<i>Bacillus</i> spp. ZGT1	0,0
<i>Bacillus</i> spp. ZGT3	40,0
<i>Bacillus</i> spp. ZGT5	0,0
<i>Bacillus</i> spp. ZGT9	48,8
<i>Bacillus</i> spp. ZBP4	143,1
<i>Bacillus</i> spp. ZBP10	99,2
<i>Bacillus</i> spp. GİT2	48,5
<i>Bacillus</i> spp. BAT3	72,2

### 4.2. İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun en yüksek EPS'yi ürettiği süreyi belirlemek için bakteri glukoz besiyerinde geliştirilmiş ve inkübasyonun 24, 48 ve 72. saatlarında

örnekler alınarak EPS miktarları belirlenmiştir (Tablo 4.2.). *Bacillus subtilis* ZBP4 suşu en yüksek EPS üretimini 24 saat, en düşük EPS üretimini ise 48 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştirmiştir.

Tablo 4.2. Farklı inkübasyon sürelerinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

Süre	EPS Miktarı (mg/L)	OD (600nm)
24	420,5±72	3,65
48	217,0±7	2,74
72	258,9±18	4,10

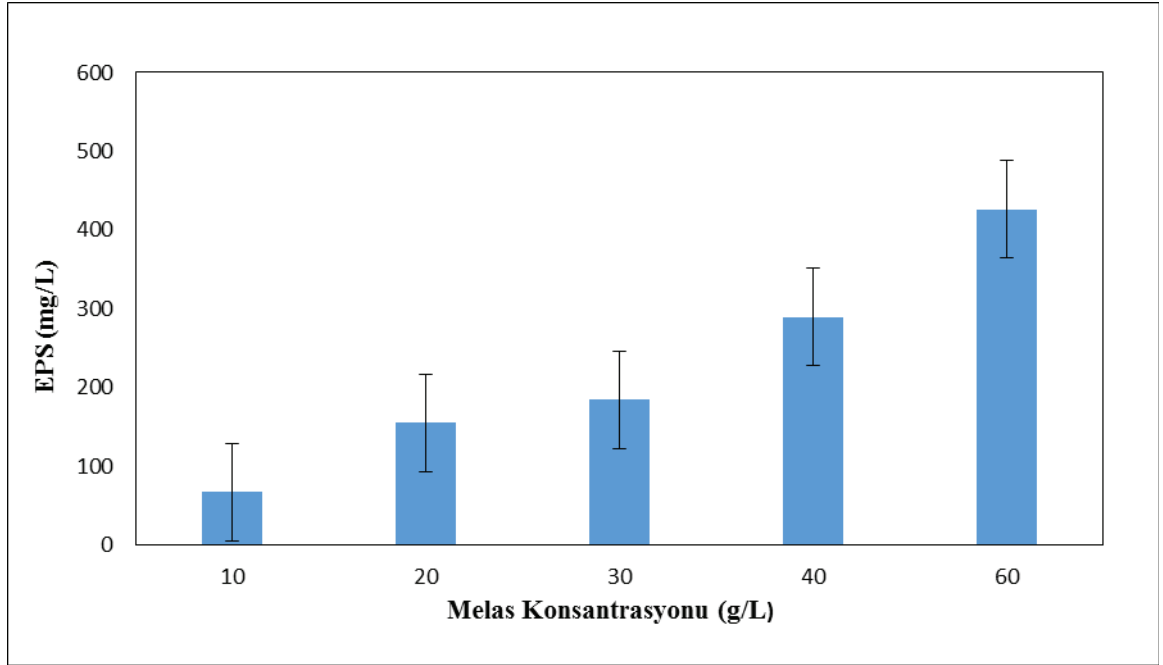
### 4.3. Melas Konsantrasyonunun EPS Üretimine Etkisi

En yüksek EPS üretimini sağlayacak melas konsantrasyonunun belirlenmesi için toplam şeker içeriği % 46,3 (ağ/ağ) olan melas kullanılarak 10, 20, 30, 40 ve 60 g/L konsantrasyonlarda melas besiyerleri hazırlanmıştır. *Bacillus subtilis* ZBP4 ile aşılana besiyerleri 35°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra alınan örneklerde EPS miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Şekilde görüldüğü gibi artan melas konsantrasyonu ile birlikte EPS üretimi de artmıştır ve en yüksek EPS miktarı 60 g/L melas konsantrasyonunda 426,2±80 mg/L olarak belirlenmiştir.

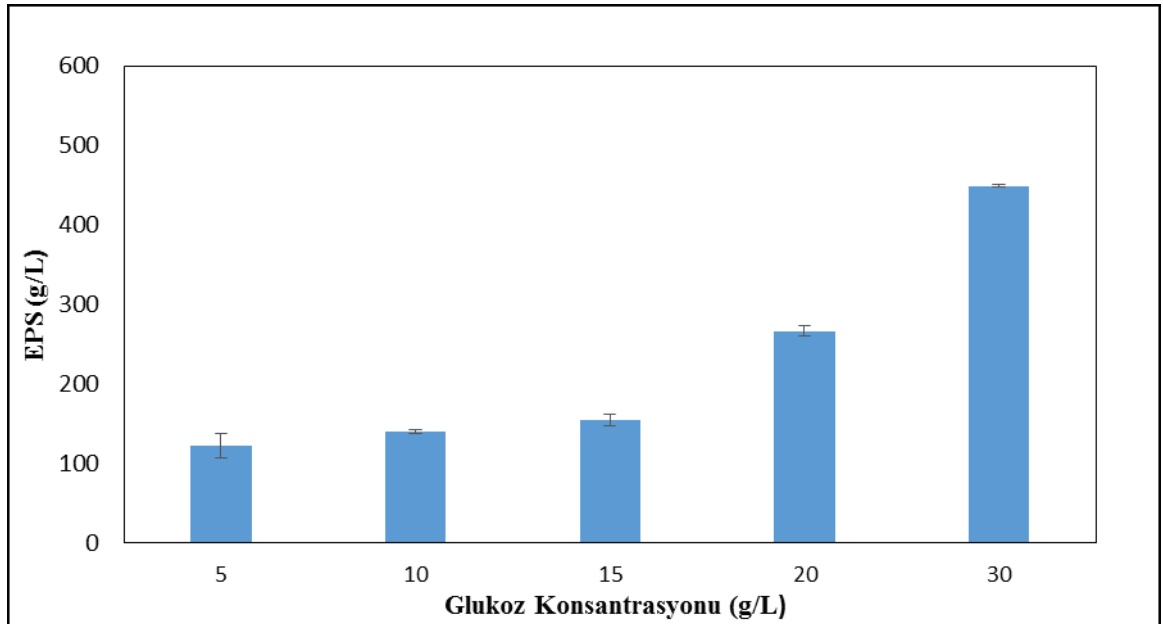
5, 10, 15, 20 ve 30 g/L konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyerlerinde *Bacillus* spp. ZBP4 suşu melaslı besiyeri ile aynı koşullarda geliştirilerek glukoz konsantrasyonunun da EPS üretimine etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.2.). Melasta olduğu gibi artan konsantrasyon ile birlikte üretilen EPS miktarı da artmış ve en yüksek EPS üretimi 30 g/L glukoz içeren ortamda 449,5±1 mg/L olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3.’de değişen konsantrasyonlarda melas ve glukoz kullanılarak elde edilen EPS’lerin verimleri belirtilmiştir. Verim hesaplamasında üretilen EPS miktarı kullanılan karbon kaynağı miktarına bölünerek hesaplanmıştır. Melas ile yapılan çalışmalarda mg EPS/g toplam şeker cinsinden verim konsantrasyonla önemli oranda değişmemiş ve verimler 13,3±1,1 mg EPS/g toplam şeker ve 15,6±4,2 mg EPS/g

toplam şeker arasında olmuştur. Glukozda ise 5 g/L glukoz konsantrasyonunda en yüksek verime ( $24,3 \pm 3,1$  mg EPS/g toplam şeker) ulaşılmıştır.



Şekil 4.1. Farklı melas konsantrasyonlarında *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi



Şekil 4.2. Farklı glukoz konsantrasyonlarında *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlarda melas ve glukoz kullanılarak üretilen EPS'lerin verimleri

Melas Konsantrasyonu (g/L)	mg EPS/ g Toplam Şeker	Glukoz Konsantrasyonu (g/L)	mg EPS/ g Glukoz
10	14,6±6,6	5	24,3±3,1
20	16,8±0,1	10	14,0±0,3
30	13,3±1,1	15	9,0±0,9
40	15,6±4,2	20	13,3±0,4
60	15,3±2,9	30	15,0±0,1

Tablo 4.4. Aynı konsantrasyondaki melas ve glukozun EPS verimleri

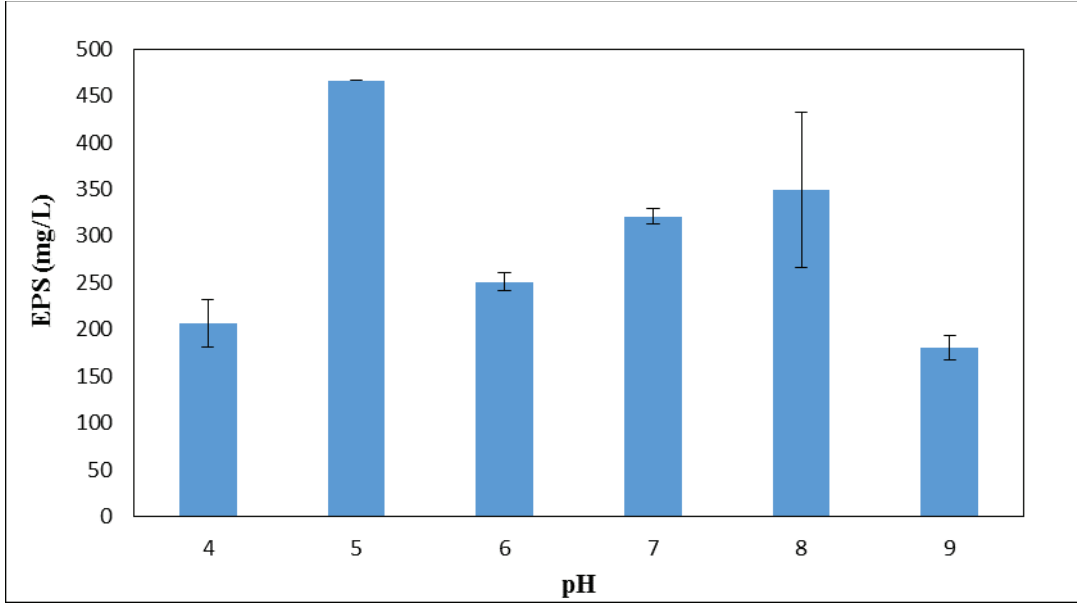
Melas Konsantrasyonu (g/L)	mg EPS/ g Toplam Şeker	Glukoz Konsantrasyonu (g/L)	mg EPS/ g Glukoz
10	14,6±6,6	10	14,0±0,3
20	16,8±0,1	20	13,3±0,4
30	13,3±1,1	30	15,0±0,1

#### 4.4. Gelişme pH'sının EPS Üretimine Etkisi

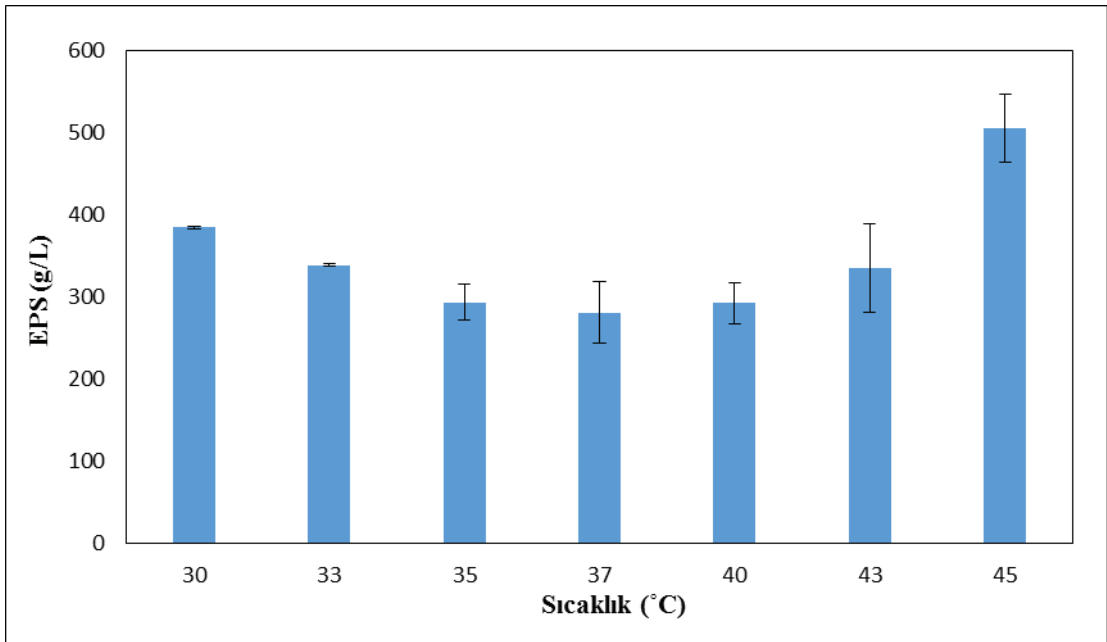
*Bacillus subtilis* ZBP4 suşu pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 değerlerinde 35°C'de, 60 g/L melas konsantrasyonunda, 24 saatlik inkübasyonuna tabi tutulmuş ve ardından EPS miktarının belirlenmesi için şeker tayini yapılmıştır (Şekil 4.3.). Bu çalışma sonucunda EPS üretimi için en uygun pH'nın 5,0 olduğu belirlenmiş ve bu pH'da 466,03±0 mg/L EPS üretilmiştir.

#### 4.5. Gelişme Sıcaklığının EPS Üretimine Etkisi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun optimum faaliyet gösterdiği, maksimum EPS üretimi sağladığı inkübasyon sıcaklığını belirlemek amacıyla 30, 33, 35, 37, 40, 43, 45°C sıcaklıklarda, 60 g/L melas konsantrasyonunda, 24 saat inkübe edildikten sonra üretilen EPS miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Şekil 4.4.'de belirtildiği gibi düşük ve yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmanın EPS üretimi de artmıştır. En yüksek EPS miktarına (505,2±42 mg/L) 45°C'de ulaşılmıştır. En düşük EPS miktarına ise (280,77±37 mg/L) 37°C'de ulaşılmıştır. Sıcaklık artışına paralel EPS üretiminde artış belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

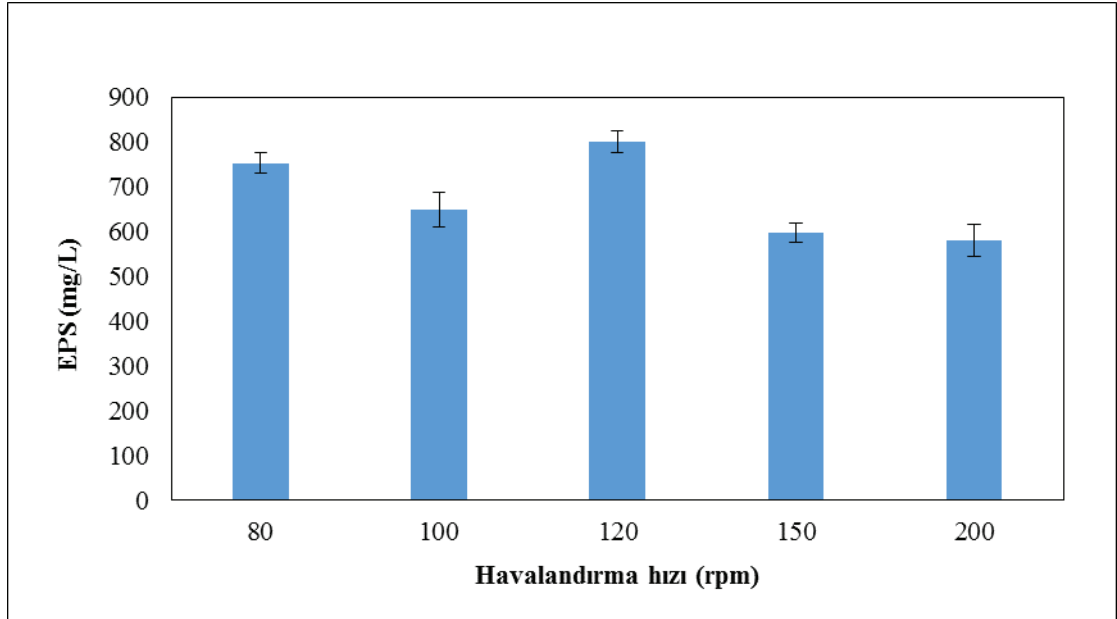


Şekil 4.4. Farklı sıcaklık değerlerinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

#### 4.6. Havalandırma Hızının EPS Üretimine Etkisi

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun maksimum EPS üretimi sağladığı havalandırma hızını belirlemek amacıyla, 80, 100, 120, 150, 200 rpm çalkalama hızlarında, 45°C’de, 60 g/L melas konsantrasyonunda, 24 saat inkübe edildikten sonra üretilen

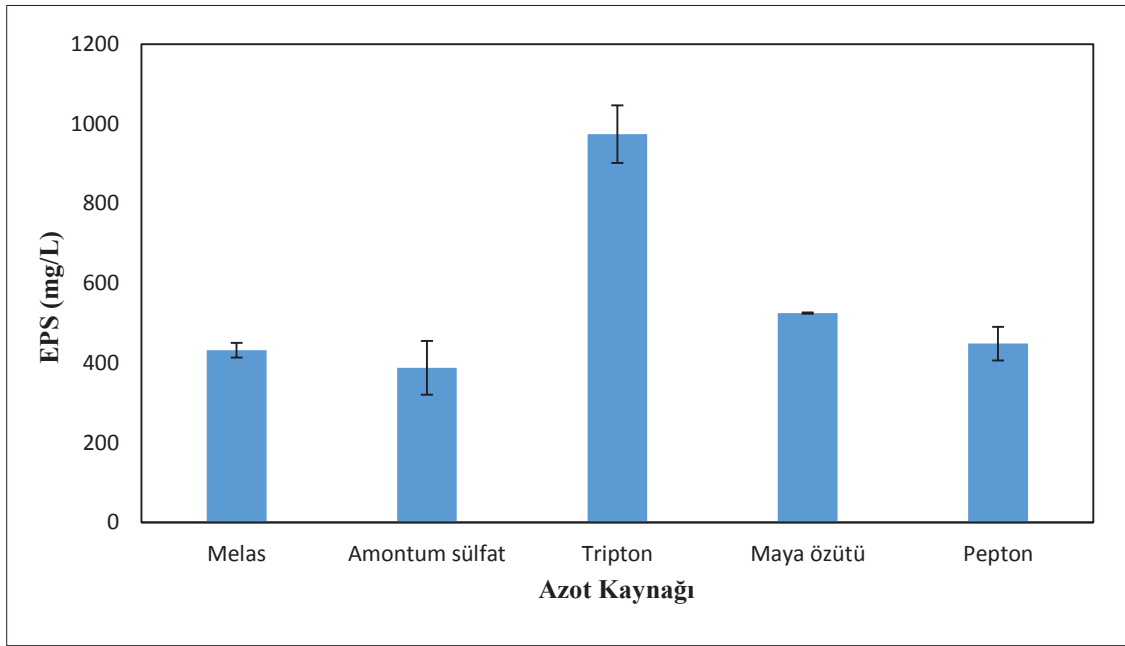
EPS miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.5.). EPS üretiminin düşük havalandırma hızında en yüksek olduğu ve havalandırma hızı arttıkça üretiminde düştüğü gözlenmiştir. 80, 100, 120, 150 ve 200 rpm havalandırma hızında elde edilen EPS miktarları sırası ile  $754\pm24$ ,  $649\pm39$ ,  $800\pm24$ ,  $598\pm22$ ,  $580\pm36$  mg/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Farklı havalandırma derecelerinde *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

#### 4.7. Azot Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

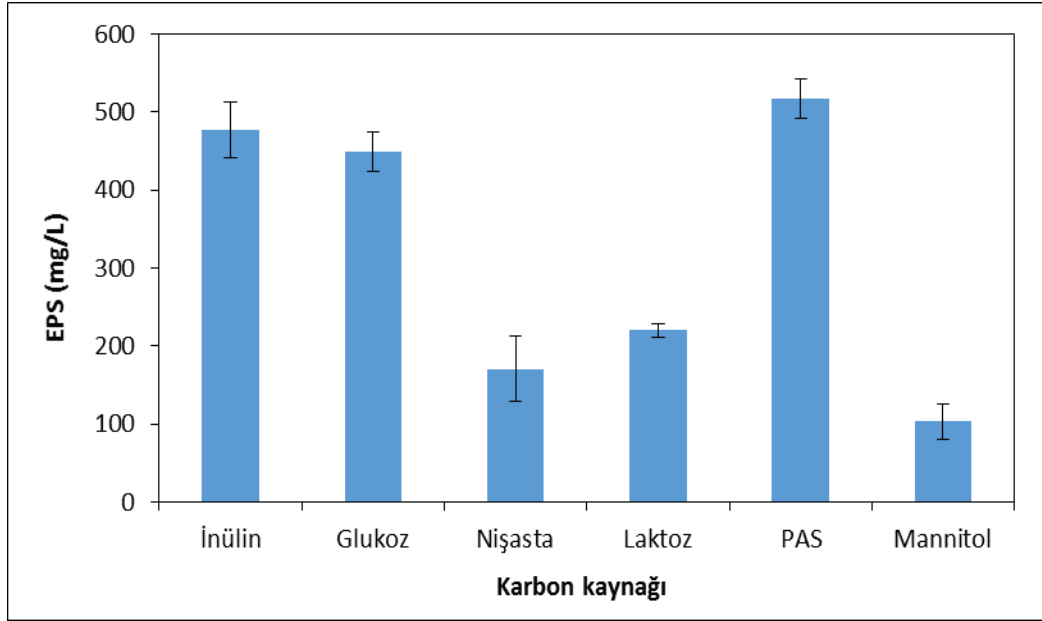
Azot kaynaklarının EPS üretimine etkisini belirlemek için melaslı besiyerine organik azot kaynaklarından tripton, maya özütü, pepton, inorganik azot kaynağı olarak da amonyum sülfat eklenerek EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, hiçbir azot kaynağı kullanmadan sadece melas kullanılarak kontrol amaçlı üretim yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda pepton ve maya özütünün *Bacillus* spp. ZBP4 suşunun EPS üretimine önemli bir katkısının olmadığı anlaşılmıştır. Pepton ve maya özütü kullanılan besiyerleri ile sadece melas kullanılan besiyerine göre EPS üretiminde artış sırası ile %3,8 ve %21,5 olmuştur. Tripton kullanılan ortamda ise üretimin %125 oranında arttığı gözlenmiştir. Amonyum sülfat ise EPS üretiminin azalmasına yol açmıştır.



Şekil 4.6. Çeşitli azot kaynaklarında *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

#### 4.8. Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

Karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisini belirlemek için besiyerlerinde melas yerine 30 g/L inülin, glukoz, nişasta, laktoz, peyniraltı suyu ve mannitol karbon kaynakları ilave edilmiş ve 45°C’de 24 saat inübasyon sonrasında EPS miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek EPS üretimi inülin (477,47 mg/L) ve peynir altı suyu (517,06 mg/L) ile gerçekleşmiştir. Mannitolun ise (103,06 mg/L) EPS üretiminde en az etkiye sahip karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir. Laktoz, nişasta ve glukoz kaynakları ile gerçekleşen EPS üretimi ise sırasıyla 219,80 mg/L, 170,60 mg/L ve 449,46 mg/L olarak belirlenmiştir.

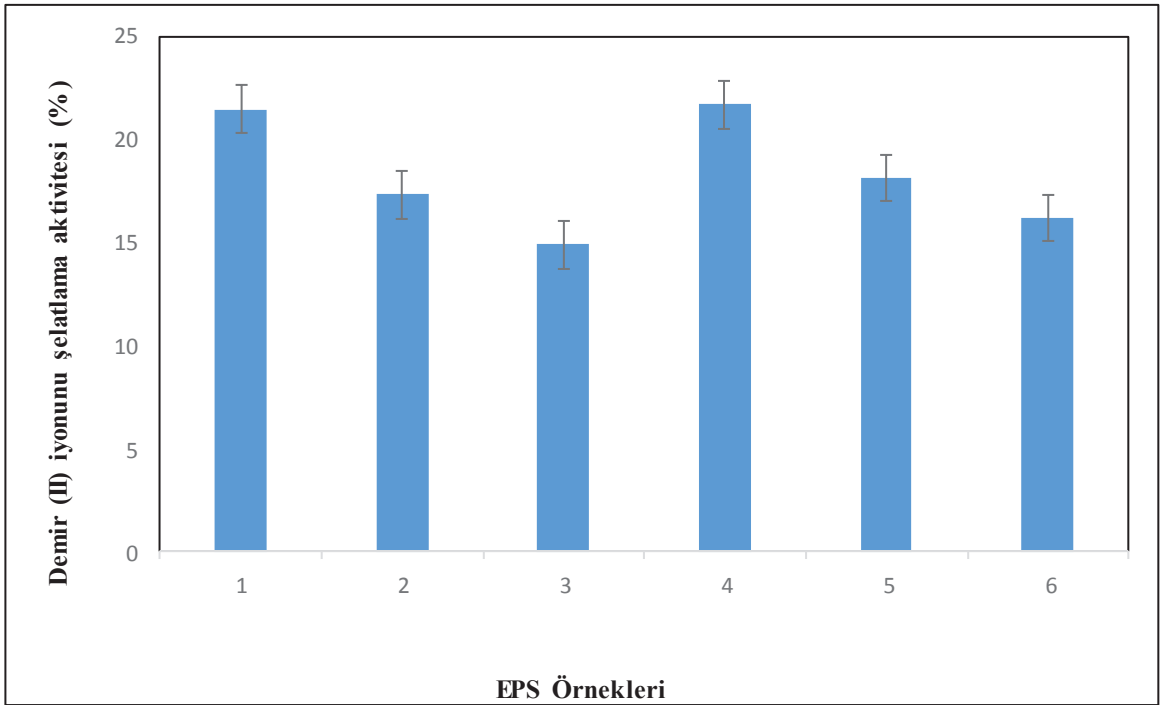


Şekil 4.7. Farklı şeker kaynaklarında *Bacillus subtilis* ZBP4 suşunun EPS üretimi

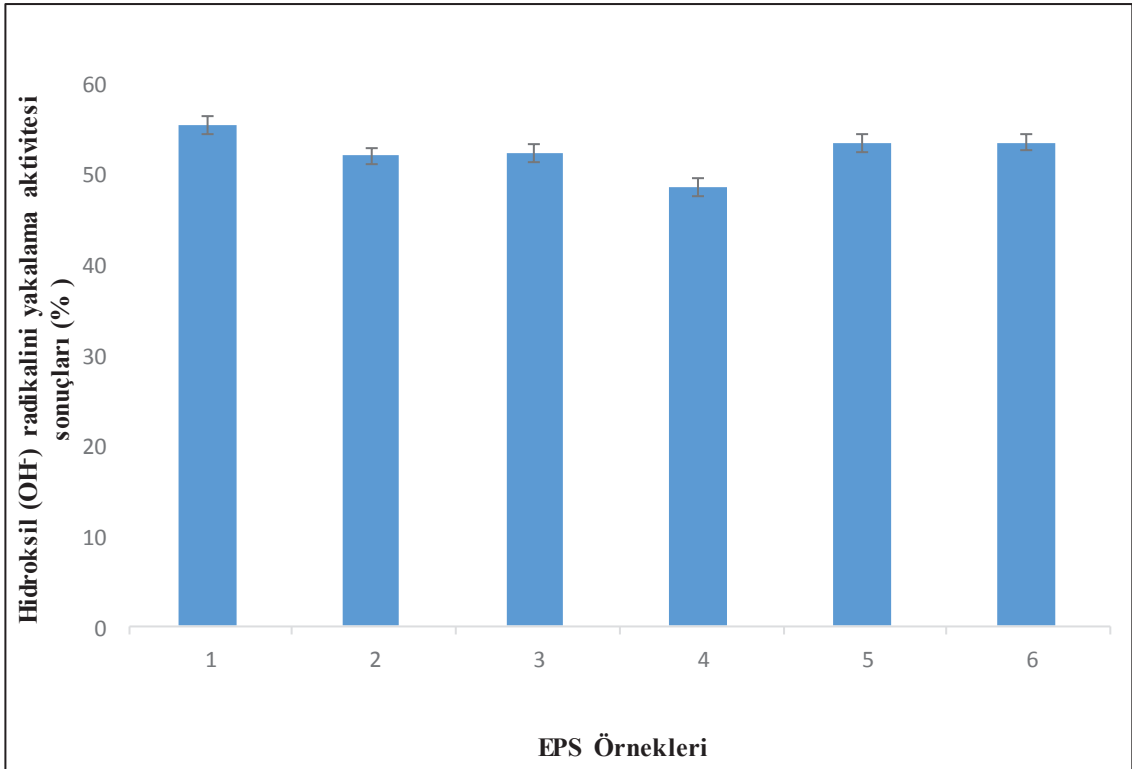
#### 4.9. Antioksidan Aktivite Değerleri

*Bacillus subtilis* ZBP4 suşundan elde edilen EPS'nin antioksidan özelliğini belirlemek için yapılan demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini ve hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalini yakalama aktivitesi sonuçlarına göre saflaştırılan 2 adet karbon kaynağı olarak melas kullanılarak üretilen EPS'lerin (Örnek 1, Örnek 2) demir iyonu şelatlama aktivitesinin diğer örneklerden daha yüksek olduğu ve ortalama değerlerinin %17,34 - 21,50 arasında değiştiği belirlenmiştir. Glukozun karbon kaynağı olarak kullanılması sonucu elde edilen EPS'lerde (Örnek 3, Örnek 4) ve Nutrient Agarda geliştirilen örneklerden elde edilen EPS'lerde (Örnek 5, Örnek 6) demir iyonu şelatlama aktivitesinin ortalama değerlerinin %14,91 - 21,70 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Hidroksil radikalini yakalama aktivitesi sonuçlarında örnekler arasında belirgin bir farklılık bulunmamış ve sonuçların % 48,66 - 55,54 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini ve hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalini yakalama aktivitesi sonuçları aşağıdaki gibidir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.).





Şekil 4.8. Demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini. 1-2 Melas besiyeri, 3-4 Glukoz besiyeri, 5-6 Nutrient Agar.



Şekil 4.9. Hidroksil (OH·) radikalini yakalama aktivitesi. 1-2 Melas besiyeri, 3-4 Glukoz besiyeri, 5-6 Nutrient Agar.

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda EPS'lerin kanıtlanmış sağlık etkileri ve biyolojik aktivitelerinden dolayı artan bir talep söz konusudur (Ahmed ve ark., 2013). Bu aktiviteler arasında antitümör, antiviral, immunostimulatör ve antiinflamatuvar aktivite örnek verilebilir (Liu ve ark., 2010). Özellikle  $\beta$ -glucan yüksek antikanser ve immün sistem düzenleyici etkisinden dolayı gıda ve ilaç endüstrisinde düzenleyici olarak değerlendirilmektedir (Jung ve ark., 2007).

Tez çalışmasında incelenen 12 farklı *Bacillus subtilis* suşundan 10 tanesinin EPS ürettiği belirlenmiştir. Bu 10 farklı suş içerisinde ise en yüksek EPS üretimini gerçekleştiren *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisinin üretim koşullarında optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Araştırmada kullanılan *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisi farklı sürelerde (24, 48, 72 saat) inkübe edilmiş ve en yüksek EPS üretimi 24 saat sonunda (420,53 mg/L), 48 saat sonunda (217 mg/L) ise en düşük EPS üretimi elde edilmiştir. İnkübasyon süresi uzadığında EPS miktarındaki azalma EPS'nin enzimatik parçalanmasından kaynaklanmaktadır. *B. licheniformis* maksimum EPS üretimini 72 saat sonra gerçekleştirmiştir (Singh ve ark., 2011). Yılmaz (2006), yaptığı çalışmada incelediği *Bacillus* suşları arasından en yüksek EPS üretimi 48 saat sonunda *B. sphaericus* 7055 (67 mg/L) ve *B. subtilis* 1404 (66 mg/L) suşları, en düşük EPS üretimi ise 48. saatte *B. subtilis* ve *B. megaterium* RSKK 17 suşlarında 6 mg/L olarak tespit etmiştir.

Maksimum EPS üretimini sağlayan melas konsantrasyonun belirlenebilmesi için incelenen farklı konsantrasyonlar için 60 g/L konsantrasyonu 426,2 mg/L EPS üretimi ile en yüksek EPS verimini sağlayan konsantrasyon olarak bulunmuştur. En düşük EPS üretimi ise 67,77 mg/L ile 10 g/L melas konsantrasyonunda

gerçekleşmiştir. Yılmaz (2006) yaptığı çalışmada şeker pancarı melasının %0,1; %0,5; %1, %1,5; %2; %2,5 ve %3'lük konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek EPS üretiminin 48 saatlik inkübasyon sonunda *B. sphaericus* 7055 suşunda %2,5' luk melas konsantrasyonunda 847 mg/L ve *B. subtilis* 1404 suşunda % 2'lik melas konsantrasyonunda 863 mg/L olduğunu saptamıştır.

Çalışmada maksimum EPS üretiminin gerçekleştiği pH derecesinin belirlenebilmesi için araştırılan 6 farklı pH derecesi arasından en yüksek verim pH 5'de (466,03 mg/L) gerçekleşmiştir. En düşük üretim ise pH 9'da (180,48 mg/L) gerçekleşmiştir. Singh ve arkadaşları (2011) endofitik bir bakteri olan *B. licheniformis* ile yaptıkları çalışmada 200 mL Nutrient Broth'a %3,5 NaCl (ağ/h) ve % 0,02 glukoz ilave etmişler ve besiyeri pH'sını 7 ayarlayarak 30±2°C'de 3 gün rotary inkübatörde inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonucunda 576 mg/L EPS elde etmişlerdir (Singh ve ark., 2011).

Araştırmada kullanılan *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisinin maksimum EPS üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığın belirlenebilmesi için 7 farklı sıcaklık derecesinde inkübe edilmiş ve en yüksek EPS üretimi 45°C'de (505,23 mg/L) gerçekleşmiştir. En düşük EPS üretimi ise 37°C'de (280,77 mg/L) olmuştur. Sıcaklığın EPS üretimine etkisinde dalgalanma gözlemlenmiştir. Bakterinin optimum gelişme sıcaklığının üstüne çıktıkça EPS üretimi artış göstermiştir. Kumar (2007) çalışmasında inkübasyon sıcaklığının optimum gelişim sıcaklığından düşük olmasının EPS üretimini arttırdığı belirtilmiştir, ancak bu çalışmada tersi bir durum söz konusudur. Mezofilik laktik asit bakteri nesilleri optimal gelişme sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda geliştiklerinde daha çok EPS üretirler. Bununla beraber, termofilik LAB için EPS üretimi optimal gelişme sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıkta olmaktadır (Aslım ve ark., 2005).

Araştırmada kullanılan *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisinin maksimum EPS üretimini gerçekleştirdiği havalandırma derecesinin belirlenebilmesi için yapılan uygulamada en yüksek EPS üretimi 120 rpm (800,47 mg/L) derecesinde gerçekleşmiştir. En düşük EPS üretimi 200 rpm'de 579,67 mg/L ile gerçekleşmiştir. Liu ve ark. (2010)

*Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 bakterisi ile yaptıkları çalışmada bakteriyi 30°C, 180 rpm'de 48 saat inkübe etmişler ve süre sonunda 9,02 g/L EPS üretimi sağlamışlardır. Araştırmada kullanılan *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisinin maksimum EPS üretimini gerçekleştirdiği azot kaynağının belirlenebilmesi için incelenen azot kaynakları içinde tripton water 973,9 mg/L EPS üretimi sağlamıştır. Yapılan bir çalışmada, beef ekstrakt, maya ekstraktı ve proteaz pepton ilave edilerek ve çıkarılarak hazırlanan MRS Broth besi ortamında *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR geliştirildiğinde, beef ekstrakt, maya ekstraktı ve proteaz pepton ilave edilerek hazırlanan MRS'de EPS üretimi 504,6 mg/L'yi bulurken, bu maddelerin azaltıldığı veya konulmadığı besi ortamlarında EPS üretiminin 28,4 mg/L'ye kadar düştüğü belirlenmiştir (Aslım ve ark., 2005). Kimmel ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR suşunu EPS üretimini farklı sıcaklık (35-45°C), pH (4-6 pH) ve Bacto-casitone (10-40 g/L) koşullarında incelemiş ve EPS üretimi için optimum sıcaklığın 38°C, pH'nın 5 ve azot kaynağı olan Bacto-casitone konsantrasyonunun 30 g/L olduğunu belirtmişlerdir (Kimmel ve ark., 1997).

Araştırmada farklı şeker kaynaklarının EPS üretimine etkisi incelenmiş ve en yüksek EPS üretimini sağlayan şeker kaynağı belirlenmeye çalışılmıştır. İncelenen 7 farklı şeker kaynağından maksimum EPS üretimi PAS (517,06 mg/L) kullanıldığında elde edilmiştir. Prebiyotik olarak bilinen inülin ise PAS'a yakın değerinde (477,47 mg/L) EPS üretimi sağlamıştır. Mannitol ise en düşük EPS (103,07 mg/L) üretimi sağlayan şeker kaynağı olarak belirlenmiştir. Van Geel-Schutten ve ark. (1998) yüksek miktarda EPS üretimi sağlayabilmek için inceledikleri toplam 182 *Lactobacillus* türünde sakkarozun yüksek miktarda EPS üretimi sağladığını bildirmişlerdir (Yang, 2000). Larpin ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* bakterisini logaritmik ve durgun fazda, glukoz, sakkaroz ve fruktoz şeker kaynaklarını, %0,2, %2 ve %10 şeker konsantrasyonlarında incelemişler ve logaritmik fazda en yüksek EPS üretimi %0,2 konsantrasyonunda fruktoz şeker kaynağı ile durgun fazda ise %2 sakkaroz şeker kaynağında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çelik ve ark. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* G1 ve *Pseudomonas putida* G12 bakterileri ile yaptıkları çalışmalarında glukoz, ksiloz, laktoz, galaktoz ve sakkarozun karbon kaynağı olarak etkilerini incelemişler ve en yüksek EPS veriminin ksiloz içeren besiyerinde

gerçekleştiğini bildirmişlerdir (sırasıyla 335 mg/L ve 262 mg/L). Ksilozdan sonra en yüksek verim früktozdan elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen EPS saflaştırılarak antioksidan olarak kullanım olanağı araştırılmıştır. Antioksidan aktiviteyi belirleyebilmek için demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini ve hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalini yakalama aktivitesi tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verilerden demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi tayini sonuçları %14,91 – 21,70 arasında bulunmuştur. Hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalini yakalama aktivitesi tayini sonuçları ise %48,66 – 55,54 arasında bulunmuştur. Fang ve ark. (2013) *Bacillus licheniformis* UD061 suşundan ürettikleri EPS'nin süperoksit anyonu ve hidroksil radikali yakalama aktivitelerini incelemiş ve analizini yaptıkları iki örneğin ortalama süperoksit anyonu yakalama aktivitesini %42,54, hidroksil radikali yakalama aktivitesini ise %50,99 olarak belirlemişlerdir (Fang ve ark., 2013). Yapılan bir başka çalışmada ise Li ve ark. (2014) *Lactobacillus helveticus* MB2-1'in ürettiği EPS ekstraktına hidroksil radikali yakalama aktivitesi ve metal iyonu şelatlama aktivitesi analizlerini uygulamışlardır. Analiz sonuçlarına göre örnek konsantrasyonunun 1 mg/mL'den 3 mg/mL'ye çıkmasıyla hidroksil radikali yakalama aktivitesinin arttığı, konsantrasyonun 4 mg/mL ulaştığında ise örneklerin hidroksil radikali yakalama aktivitesinin %33,40-92,72 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Li ve ark. (2014) EPS konsantrasyonunun 2 mg/mL'ye kadar artmasıyla metal iyonu şelatlama aktivitesinin arttığını, EPS konsantrasyonunun 4 mg/mL'ye ulaşmasıyla örneklerin metal iyonu şelatlama aktivitesinin % 38,72 – 99,34 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. İncelenen sonuçlar karşılaştırıldığında *Bacillus subtilis* ZBP4 bakterisi tarafından üretilen EPS'nin hidroksil radikali yakalama aktivitesinin diğer örneklerle benzerlik gösterdiği, ancak demir iyonu şelatlama aktivitesinin ise daha düşük değerde olduğu görülmektedir. Ayrıca üretilen EPS miktarı ile antioksidan aktivite arasında paralellik olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda topraktan izole edilen, EPS üreten farklı *Bacillus* suşlarının EPS üretimi incelenmiş ve maksimum EPS üretiminin sağlandığı koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca EPS üretiminde maliyeti düşürmek amacıyla ucuz karbon ve azot kaynağı olması yönünden melasın EPS üretimine etkisi incelenmiştir.

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

## KAYNAKLAR

- Ahmed, Z. Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., Khan, S.T. 2013. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from tibet kefir- part II. Food Hydrocolloids, 30, 343-350.
- Ai, H. Liu, M., Yu, P., Zhang, S., Suo, Y., Luo, P., Li, S., Wang, J. 2015. Improved welan gum production by *Alcaligenes* subsp. ATCC31555 from pretreated cane molasses. Carbohydrate Polymers, 129, 35–43.
- Al-Janabi, A.A.H.S. 2006. Identification of bacitracin produced by local isolate of *Bacillus licheniformis*. African Journal of Biotechnology, 5 (18), 1600-1601.
- Antelo, S.C. No, I.C.F., Böhme, K., Alnakip, M.E., Baluja, M.Q., Velazquez, J.B., Mata, P.C. 2014. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* subsp.based on three housekeeping genes. Food Microbiology, 46, 288-298.
- Aslım, B. Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Özkaya, F.D., Yüksekdağ, Z.N., Ediz, N. 2005. Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi. TÜBİTAK Proje No: TBAG-2090 (101T129).
- Bagy, M.M.K. Alla, M.H.A., Morsy, F.M., Hassan, E.A. 2014. Two stage biodiesel and hydrogen production from molasses by oleaginous fungi and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. International Journal Of Hydrogen Energy, 39, 3185-3197.
- Balk, M. Dönmez, S. 1992. Ekstraselüler *Bacillus* proteazlarının bazı özellikleri ve enzim üretiminin optimizasyonu. Gıda, 17 (3), 175-180.
- Berber, İ. 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. Journal of Cell and Molecular Biology, 3, 33-37.
- Bhaskar, P.V. Bhosle, N.B. 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. Current Science, 88, 45-53.
- Bilgehan, H. 2009. *Bacillus subtilis*. İçinde: Klinik Mikrobiyolojik Tanı-Gram Olumlu Aerop, Anaerop ve Fakültatif Anaerob Sporlu Baciller. 5. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir, 536.
- Boels, C.I. Kranenburg, R.V., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Vos, W.M.D.2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of

- exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 723–732.
- Bragadeeswaran, S. Jeevapriya, R., Prabhu, K., Rani, S.S., Priyadharsini, S., Balasubramanian T. 2011. Exopolysaccharide production by *Bacillus cereus* GU812900, a fouling marine bacterium. *African Journal of Microbiology Research*, 5(24), 4124-4132.
- Chen, M. Zhao, Y., Yu, S. 2015. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550.
- Chen, Y.P. Zhang, P., Guo, J.S., Fang, F., Gao, X., Li, C. 2013. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. *Chemosphere*, 92, 633–638.
- Cleasby, T.G. 1963. The feeding value of molasses. *Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association*, 3, 113-117.
- Çelik, G.Y. Aslım, B., Beyaztlı, Y. 2008. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydrate Polymers*, 73, 178–182.
- Çöleri, A. 2007. Bazı termofilik *Bacillus* türlerinin termostabil  $\alpha$ -glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Donot, F. Fontana, A., Baccou, J.C., Galindo, S.S. 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962.
- Duan, X. Chi, Z., Wang, L., Wang, X. 2008. Influence of different sugars on pullulan production and activities of  $\alpha$ -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. *Carbohydrate Polymers*, 73, 587–593.
- Emanuele, S.M. Sniffen, C.J. 2014. Feeding the rumen with sugar to increase ruminal fermentation efficiency. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop, Ph. D.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1997. Attachment I-final risk assessment of *Bacillus subtilis*. Biotechnology program under the toxic substances control act.
- Erem, F. Küçükçetin, A., Certel, M. 2013. *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. *Gıda*, 38 (4), 247-254.
- Erkmen, O. 2011. *Bacillus*. İçinde: Gıda Mikrobiyolojisi - Gıda Mikrobiyolojisine Giriş, Önemli Mikroorganizmalar ve Mikroorganizma Kaynakları. 3.Baskı, Efil Yayınevi, Ankara, 14-15.



- European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. 2000. Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition.
- Fang, Y. Ahmed, S., Liu, S., Wang, S., Lu, M., Jiao, Y. 2013. Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation. Carbohydrate Polymers, 98, 1377– 1382.
- Fidan, I. Cenik, Y. 1976. Melas teknolojisinde bazı enfeksiyon etkenleri. Gıda, 1, 23-24.
- Freitas, F. Alves, V.D., Reis, M.A.M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology, 29, 388-398.
- Guan, Y. Tang, Q., Fu, X., Yu, S., Wu, S., Chen, M. 2014. Preparation of antioxidants from sugarcane molasses. Food Chemistry, 152, 552–557.
- Gürleyendağ, B. 2006. Polisakkarit üreten ekstremofillerin belirlenmesi ve ekzopolisakkarit üretimi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi.
- Güven, S. Zorba, G. 2015. Genel Mikrobiyoloji. 5. Baskı, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 1-227.
- Hsu, C.W. Li, Y.C., Chu, C.Y., Liu, C.M., Wu, S.Y. 2014. Feasibility evaluation of fermentative biomass-derived gas production from condensed molasses in a continuous two-stage system for commercialization. International Journal Of Hydrogen Energy, 39, 19389 -19393.
- Ivanova, E.P. Vysotskii, M.V., Svetashev, V.I., Nedashkovskaya, O.I., Gorshkova, N.M., Mikhailov, V.V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T., Yoshikawa, S. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. Internatl Microbiol, 2, 267–271.
- Jung, H.K. Hong, J.H., Park, S.C., Park, B.K., Nam, D.H., Kim, S.D. 2007. Production and physicochemical characterization of  $\beta$ -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12, 713-719.
- Karapınar, M. Ünlütürk, A. 1982. Peynir Yapımında Mikrobiyal Rennet Kullanımı. Gıda, 2, 73-76.
- Kazak, H. Öner, E.T., Dekker, R.F.H. 2010. Extremophiles as sources of exopolysaccharides. Nova Science Publishers Handbook of Carbohydrate Polymers, 1, 605-619.
- Kimmel, S.A. Roberts, R.F., Ziegler, G.R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a

- semidefined medium. *Applied And Environmental Microbiology*, 64(2), 659–664.
- Kojic, M. Vujcic, M., Banina, L.A., Coconcelli, P., Cerning, J., Topisirovic, L. 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied And Environmental Microbiology*, 58, 4086-4088.
- Kumar, A.S. Mody, K., Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 103–117.
- Kumar, T. 2012. Microbial extracellular polymeric substances production, isolation and applications. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (2), 276-281.
- Lardy, G. Schafer, R. 2008. Feeding sugar beet byproducts to cattle. North Dakota State University Extension Service, AS 1365.
- Larpin, S. Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M., Auffray Y. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from rosy cider. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 1 – 9.
- Li, W. Ji1, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Dong, M. 2014. Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351– 359.
- 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, 5528–5533.
- Liu, H. Fang, H.H.P. 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95, 249–256.
- Liu, Y. Zhu, Y., Li, J., Shin, H., Chen, R.R., Du, G., Liu, L., Chen, J. 2014. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetyl glucosamine production. *Metabolic Engineering*, 23, 42–52.
- Miksits, K. Hahn, H. 2013. Bacilluslar. İçinde: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İnfeksiyoloji-Bakteriler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 149-150.
- Milci, S. Yaygın, H. 2005. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *Gıda*, 30 (2), 123-129.
- Minervini, F. Angelis, M.D., Surico, R.F., Ganzle, M., Gobbetti, M. 2010. Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 130–135.
- Mishra, A. Jha, B. 2013. Microbial exopolysaccharides. *Applied Bacteriology and Biotechnology*, 5, 8-25.

- Murphy, J.J. 1999. The effects of increasing the proportion of molasses in the diet of milking dairy cows on milk production and composition. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 189-198.
- Nakata, H. Tamura, M., Shintani, T., Gomi, K. 2014. Evaluation of baker's yeast strains exhibiting significant growth on japanese beet molasses and compound analysis of the molasses types. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 715-719.
- Nandal, K. Sehrawat, A.R., Yadav, A.S., Vashishat, R.K., Boora, K.S. 2005. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* subsp. (Cajanus). *Microbiological Research*, 160, 367-373.
- Okada, M. Nakamura, Y., Hayashi, S., Ozaki, K., Usami, S., 2015. Chemical structure and biological activity of a quorum sensing pheromone from *Bacillus subtilis* subsp. *natto*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4293-4296.
- Onbaşılı, D. 2006. Çevredeki organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Öner, E.T. Akbuğa, F.J., Genç, S., Sezer, A.D. 2010. Yeni bir mikrobiyal biyopolimerin endüstriyel uygulama alanlarının araştırılması. Proje No: 108M193, İstanbul.
- Öner, E.T. 2013. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. *Green Energy and Technology*, 6, 35-56.
- Özçelik, F. 1986. *Zymomonas mobilis* bakterisiyle melastan etil alkol üretimi. *Gıda*, 6, 351-357.
- Özçelik, S. 1985. *Bacillus megaterium* kullanılarak patulin'in biyolojik yolla ölçümü. *Gıda*, 5, 281-285.
- Papagianni, M. Psomas, S.K., Batsilas, L., Paras, S.V., Kyriakidis, D.A., Kyriakides, M.L. 2001. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37, 73-80.
- Ruijssenaars, H.J. 2001. Enzymatic modification of bacterial exopolysaccharides - xanthan lyase as a tool for structural and functional modification of xanthan. Wageningen University, The Netherlands, Master Thesis.
- Sath, K. 2012. Effect of different feed sources and feed conservation techniques. Swedish University, Agricultural Sciences, PhD Thesis.
- Shen, Q. Hui Lin, H., Wanga, Q., Fan, X., Yang, Y., Zhao, Y. 2015. Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of *Trichosporon fermentans* in high-density molasses fermentation. *Bioresource Technology*, 176, 249-256.

- Singh, 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, 1019–1026.
- Sonenshein, A.L. Hoch, J.A., Losick, R. 1993. *Bacillus* And Related Genera. İçinde: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria – systematics and ecology of *Bacillus*. 1.Baskı, American Society for Microbiology, Washington, 3-11.
- Srikanth, S. Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumar, C., Jaganathan, M.K., Tamilarasan, K. 2014. Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3, 7–12.
- Staudt, A. 2009. Identification of environmental factors critical to the production of exopolysaccharides by *Rhizobium tropici*. Notre Dame University, Civil Engineering and Geological Sciences, Master Thesis.
- Sutherland, I.W. 1977. Microbial exopolysaccharide synthesis, in extracellular microbial polysaccharide. American Chemical Society, 7, 40-57.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Tietech January, 16, 41-46.
- Sutherland, I.W. 1999. Microbial polysaccharide products. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 16, 217-229.
- Sutherland, I.W. 2001. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. International Dairy Journal, 11, 663–674.
- Şahin, İ. Başoğlu, F. 2011. İçinde: Gıda Mikrobiyolojisi – Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar ve Bulaşma Kaynakları. 2. Baskı, Dora Basım, Bursa, 14-58.
- Tatar, S. 2007. Termofil moderately halofilik *Bacillus* subsp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Todar, K. 2014. The Genus *Bacillus*. <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>, Erişim Tarihi: 12.09.2014.
- Türkşeker, 2014. Melas. <http://www.turkseker.gov.tr/Urunler>. Erişim Tarihi: 21.10.2014
- URL-1, <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus>, Erişim Tarihi: 08.10.2014.
- URL-2, [www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org)-, Erişim Tarihi: 05.10.2014.
- URL-3, [http://tr.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_subtilis](http://tr.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis), Erişim Tarihi: 12.09.2014.
- URL-4, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Melas>, Erişim Tarihi: 24.10.2014

- Vos, P.D. Garrity, G.M., Jones, D., Krieg N.R., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 3. Cilt: The Firmicutes. 2. Baskı, Springer Science Business Media, New York, 1-1450.
- Vu, B. Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14, 2535-2554.
- Yakoubou, S. Côté, C.J. 2010. Assessment of a short phylogenetic marker based on comparisons of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences of the *Bacillus cereus* group. *Natural Science*, 2 (10), 1113-1118.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria structures and properties. University of Helsinki, Department of Food Technology, PhD Thesis.
- Yılmaz, M. 2006. Bazı *Bacillus* türlerinin ekzopolisakkarid (EPS) üretimi. Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yi, H. Chun, J., Cha C.J. 2014. Genomic insights into the taxonomic status of the three subspecies of *Bacillus subtilis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 95-99.
- Zhang, J. Kang, Z., Ling, Z., Cao, W., Liu, L., Wang, M., Dub, G., Chen, J. 2013. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements. *Bioresource Technology*, 146, 543-548.

## ÖZGEÇMİŞ

Erdi ERGENE, 09.05.1990 tarihinde Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2008 yılında Figen Sakallıoğlu Anadolu Lisesinden mezun oldu ve aynı yıl Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2012 yılında Gıda Mühendisliği bölümünden mezun olduktan sonra kısa süreli olarak özel sektörde çalıştı. Ardından 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisansa başladı. 2014 yılında İstanbul Esenyurt Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümünde araştırma görevlisi olarak başladığı görevini hâla sürdürmektedir.