

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ**

***Bacillus pseudomycoïdes*'TEN EPS ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA BETÜL SOLMAZ

DENİZLİ, ARALIK - 2015

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ**



***Bacillus pseudomycoides* 'TEN EPS ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA BETÜL SOLMAZ

DENİZLİ, ARALIK - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kübra Betül SOLMAZ tarafından hazırlanan "*Bacillus pseudomycooides*"TEN EPS ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24.12.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN

Üye

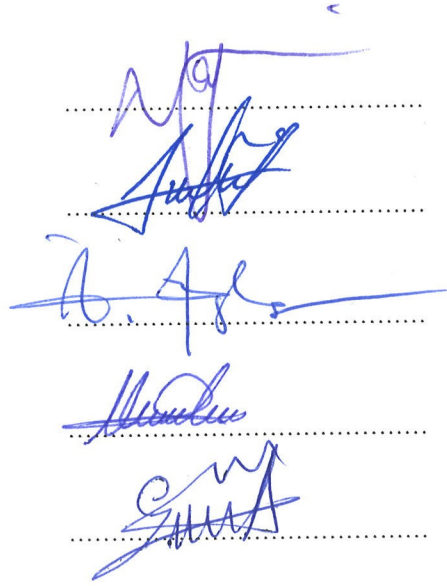
Prof. Dr. Ömer BOZKAYA

Üye

Doç. Dr. Nurdan SARAÇ

Üye

Yrd.Doç. Dr. Gülümser Acar DOĞANLI



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06.01.2016.. tarih ve ..01./13.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2014FBE036 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Kübra Betül SOLMAZ



ÖZET

Bacillus pseudomycooides'TEN EPS ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KÜBRA BETÜL SOLMAZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)
(EŞ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. YUSUF ÖZCAN)
DENİZLİ, ARALIK - 2015

Bu çalışmada, üreolitik bir bakteri olan *Bacillus pseudomycooides* U10 bakterisinin EPS üretimi; EPS'nin içerik, yapı farklılıkları ve besiyeri çeşitliliğinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla LB, TSB, NB, glukoz, melas ve peynir altı suyu kullanılmıştır. Bakteriyel EPS üretimine sıcaklık (25, 30, 37, 45 °C), pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) ve inkübasyon süresinin etkisi de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretimi besiyeri ve mineral çeşitliliğine göre değişmektedir. Genel olarak bakteri en iyi üretimi LB+PAST içeren ortamda gerçekleştirmiştir. Tüm besiyerleri dikkate alındığında pH:7'de maksimum EPS üretimi gerçekleştirilen, melas besiyerinde bakteri maksimum EPS üretimine pH:7,5'ta ulaşmıştır. Çalışmamızda ayrıca farklı ortamlarda üretilen saf EPS'nin şeker, protein ve üronik asit içerikleri de belirlenmiştir. Peynir altı suyu içeren ortamda bakteriyel EPS'nin protein içeriği yüksek bulunurken, melas ortamında karbohidrat içeriğinde artış olmuştur. Saf EPS yapısı hakkında daha ayrıntılı bilgi elde etmek üzere SAXS, XRD, SEM ve TGA analizleri yapılmıştır. Besiyeri farklılığının bakteriyel EPS kompozisyonu ve üç boyutlu yapısı üzerinde etkisinin olup olmadığı hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmiştir. Buna göre, XRD, TGA ve SEM analizleri ile farklı ortamlarda üretilen bakteriyel EPS yapısının uyumlu şekilde benzer olduğu görülmüştür. SAXS analizi ile EPS'nin hücreler arasında gömülü halde sıkı ve iki tabakalı bir kabuğa sahip olduğu anlaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: *Bacillus*, EPS, Melas, SAXS, XRD, TGA

ABSTRACT

Production and characterization of EPS from *Bacillus pseudomycooides*

MSC THESIS

KÜBRA BETÜL SOLMAZ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

MOLECULAR BIOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

(CO-SUPERVISOR:ASS. PROF. DR. YUSUF ÖZCAN)

DENİZLİ, DECEMBER 2015

In this study, the effect of different nutrients on production, composition and structure of EPS was investigated by strain of an ureolytic bacterium, which is named *Bacillus pseudomycooides* U10. For this purpose, the media of LB, TSB, NB, glucose, molasses and whey powder were used. Also, the effect of temperature (25, 30, 37, 45 °C), pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) and incubation time were examined on production of bacterial EPS. According to the results, production of EPS could be changed in each variety of minerals and medium. In general, the best yield of EPS production was observed by adding whey powder in LB. For in all media, while the maximum production of EPS was occurred at pH=7, the strain U10 reached maximum production of EPS at pH=7,5 in molasses medium. In addition to this study, the contents of total carbohydrate, protein and uronic acid of pure EPS produced in different media were also determined. While the protein rate of bacterial EPS was rich which produced by adding whey powder in LB media, in molasses medium EPS was rich in carbohydrate content. SAXS, XRD, SEM and TGA analysis were performed to obtain more detailed information about structure of pure EPS. It is intended to get information by examination the effect of media diversity for the composition and the three-dimensional structure of bacterial EPS. Accordingly, XRD, TGA and SEM analysis of bacterial EPS, which produced in different media, were found to be similar structures. It was understood by the SAXS analysis; EPS embedded between cells and have a compact bilayer shell.

KEYWORDS: *Bacillus*, EPS, Molasses, Whey powder, SAXS, XRD, TGA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 EPS'nin Tanımı	3
2.2 EPS'nin Biyosentezi	4
2.3 EPS'nin Yapısı ve Sınıflandırılması.....	4
2.4 EPS'nin Kullanım Alanları.....	5
2.5 Melasın Genel Özellikleri	6
2.6 Melasın Kullanım Alanları	6
2.7 Peynir Altı Suyu Tozunun Genel Özellikleri	7
2.8 X-Işını Küçük Açılı Saçılma (SAXS) Yöntemi.....	7
2.8.1 SAXS Eğri Analizi.....	9
2.9 X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi.....	10
2.10 Termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi	11
3. METOT	12
3.1 Mikroorganizma	12
3.2 Zamana Bağlı Olarak Üretilen EPS Miktarının Belirlenmesi	12
3.3 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimini Etkileyen Optimal Koşulların Belirlenmesi.....	12
3.3.1 Farklı Besiyerlerinin EPS Üretimine Etkisi.....	12
3.3.2 Endüstriyel Atıkların EPS Üretimine Etkisi	13
3.3.3 pH'nın EPS Üretimine Etkisi.....	13
3.3.4 Sıcaklığın EPS üretimine etkisi	14
3.3.5 Organik asitlerin ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi. 14	
3.4 EPS Saflaştırma Metodu	14
3.5 Liyofilize EPS'nin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	15
3.5.1 Toplam protein tayini.....	15
3.5.2 Üronik asit miktarı belirleme	15
3.5.3 Toplam şeker tayini	16
3.6 Bakteriyel EPS'nin Karakterizasyonu	16
3.6.1 X-Işını Kırınımı (XRD) Yöntemi ile Yapılan Analizler.....	16
3.6.2 Termal Analizler (TGA)	16
3.6.3 Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntüleme	17
3.6.4 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler.....	17
4. BULGULAR	20
4.1 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimini Etkileyen Optimal Koşulların Belirlenmesi.....	20
4.1.1 Farklı Besiyerlerinin EPS Üretimine Etkisi.....	20
4.1.2 pH'ın EPS üretimine etkisi	21

4.1.3	Sıcaklığın EPS Üretimine Etkisi.....	22
4.1.4	Organik Asit ve Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi....	23
4.1.5	Peynir Altı Suyu Tozunun EPS Üretimine Etkisi.....	24
4.1.6	Melas Besi Ortamında EPS Üretimi	25
4.2	Bakteriyel EPS'nin Kimyasal Kompozisyonu	28
4.3	Bakteriyel EPS'nin Karakterizasyonu	29
4.3.1	XRD Analizi	29
4.3.2	TGA analizi.....	31
4.3.3	SAXS analizi.....	33
4.3.4	SEM analizi.....	40
5.	TARTIŞMA	45
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	48
7.	KAYNAKLAR.....	49
8.	EKLER.....	57
	EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler.....	57
9.	ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 SAXS analiz cihazı temel görünüm.....	8
Şekil 2 SAXS eğrisinin analizi.....	9
Şekil 3 İlgili örneklerin küçük açı X-ışını saçılması eğrileri	19
Şekil 4 Farklı besiyerlerinde üretilen EPS miktarının (mg/L) zamana bağlı değişimi	20
Şekil 5 LB-Miller besiyerinde EPS üretimine (mg/L) pH'nın etkisi	21
Şekil 6 LB miller besiyerinde EPS üretimine (mg/L) sıcaklığın etkisi	22
Şekil 7 LB besi ortamına 1g/L oranında ilave edilen organik asit ve karbon kaynaklarının EPS üretimine (mg/L) etkisi.....	23
Şekil 8 Past içeren LB ortamında EPS üretimine (mg/L) pH'ın etkisi	24
Şekil 9 Past içeren LB ortamında EPS üretimine (mg/L) sıcaklık etkisi	25
Şekil 10 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) melas konsantrasyonunun etkisi	26
Şekil 11 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) pH etkisi	27
Şekil 12 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) sıcaklığın	27
Şekil 13 <i>B. pseudomycoides</i> U10 saf EPS'sinin XRD analiz sonuçları.....	30
Şekil 14 <i>B. pseudomycoides</i> U10 saf EPS'sinin TGA analiz sonuçları.....	32
Şekil 15 <i>B. pseudomycoides</i> U10 saf EPS'sinin SAXS eğrisi grafiği	34
Şekil 16 Seçilen toplam form faktör	35
Şekil 17 LB ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum grafiği	36
Şekil 18 Melaslı besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	36
Şekil 19 PAST ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	37
Şekil 20 Glikoz ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	37
Şekil 21 EPS'nin prolate çekirdek modelin şematik olarak gösterimi	39
Şekil 22 LB besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü	41
Şekil 23 Peynir altı suyu tozu ilave edilen besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü.	42
Şekil 24 Melaslı besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü	43
Şekil 25 Glukoz ilave edilen besi ortamında geliştirilen U10 bakteri çözünmüş EPS'sinin SEM görünümü	44

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1 Deney sistemi ile ilgili teknik özellikler	18
Tablo 2 <i>B. pseudomycoides</i> U10'dan saflaştırılan EPS'lerin biyokimyasal kompozisyonu (mg/g EPS)	28
Tablo 3 Parçacık EPS için yapısal bilgiler A ve B.....	38
Tablo 4 <i>B.pseudomycoides</i> için farklı besi ortamında hücre yoğunluğu	58
Tablo 5 LB besi ortamında pH etkisi hücre yoğunluğu	59
Tablo 6 LB ortamında sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu	59
Tablo 7 Past ilaveli ortamda pH etkisi hücre yoğunluğu	59
Tablo 8 Past ilaveli ortamda sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu.....	60
Tablo 9 Melaslı ortamda EPS üretimi pH etkisi hücre yoğunluğu	60
Tablo 10 Melaslı ortamda EPS üretimine sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu.....	61

SEMBOL LİSTESİ

SEMBOL LİSTESİ

mm	: Milimetre
Da	: Dalton
UV	: Ultraviyole
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
g	: Gram
µg	: Mikrogram
dk	: Dakika
Ar	: Argon
N	: Azot
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
µl	: Mikrolitre
mcg	: Mikrogram
TSB	: Tryptic soy broth
ml	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrolitre
M	: Molarite
mM	: Mikromolar
s	: Saniye
TSA	: Tryptic soy agar
EPS	: Ekstrapolisakkarit
SAXS	: Küçük açılı X-ışını saçılması
TGA	: Termo-Gravimetrik Analiz
XRD	: X ışınları Kırınımı Analizi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
Å	: Angstrom
q	: Saçıcı Vektör
I	: Şiddet
NaCl	: Sodyumklorür
dH₂O	: Distile su
H₂SO₄	: Sülfirik asit
N	: Normalite

ÖNSÖZ

2013-2015 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümünde, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'ın Danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tanıştığım günden bugüne her anlamda her zaman yanımda olan, bu yolda karşılaştığım sorunları ve sevincimi paylaştığım, geniş bakış açısı ve bilgilerini aktarma yoluna hayran kaldığım, çalışma disiplini ve düzeniyle örnek aldığım çok değerli hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

En yoğun zamanlarında bile vakit ayırıp, tez yazımı ve deneylerimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, içinden çıkamadığım durumlarda alternatif çözümler üreten ve her zaman yanımda güç bulduğum çok değerli hocam Yard. Doç. Dr. Gülümser ACAR DOĞANLI'ya,

SAXS analizlerini yapan ve tez yazım sırasında branşlarımızın farklı olması sebebiyle anlamam için ekstra uğraşan ve pozitif enerji veren çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN'a,

XRD ve TGA analizlerini yapan ve multidisipliner çalışmanın faydasını ve önemini teorinin yanında uygulamalı olarak da anlamamı sağlayan hocam Prof. Dr. Ömer BOZKAYA'ya

Laboratuvara ilk girdiğim günden beri en basit laboratuvar uygulamalarından en karmaşığına kadar, sayısız kere sabırla öğreten (öğretme konusunda özel bir yeteneğe sahip), mantığını anladığımdan emin olana kadar tekrarlayan, zorlandığım zamanlardaki ilk yardım ve acil destekçim, laboratuvar çalışmalarında örnek aldığım aynı zamanda canım dostum Dicle ARAR'a,

Şaşırtıcı şekilde kuvvetli hafızasına, çalışmalarını sırasındaki titizlik ve hızına hayran kaldığım, pratik zekası ve farklı bakış açısıyla da beni her zaman rahatlatan, en mutlu anda birden duygusallaşıp tekrar gülebildiğim, ince düşünceli ve en büyük destekçilerimden, her anımda yanımda olan özel dostum Tuğba ŞENSOY CANDOĞAN'a,

Laboratuvar çalışmalarını sırasındaki sabrı ve pratik buluşlarıyla işleri her zaman kolaylaştıran, tecrübesini esirgemeyen ve daima yanımda olduğunu hissettiren, beni her şartta motive eden, pozitif enerjisiyle güç bulduğum canım arkadaşım N. Nur BOZBEYOĞLU'na

Varlığıyla bir tek ben değil bütün laboratuvarımıza ekstra enerji veren, yanımdayken en stresli anlarımda bile beni neşelendirmeyi başaran, elinden gelen her konuda her ihtiyacım olduğunda tüm içtenliğiyle yardımlarını sunan tez yoldaşım Özlem ÇETİN'e,

Sadece bedenen uzağımda olsalar da, bir sorunum yoktur ki sayelerinde aşamayacağım dediğim, varlıkları kalbimde ve hayatımda en özel olan Esra PEKMEZ YETİM, Nihal YILDIRIM ve Tolga YETİMOĞLU'na,

Yetiştirmem gereken konularda işlerini askıya alıp bizzat yardım ederek, bana olmaz dediğim şeyleri yapma gücü veren, her bir üyesi ayrı bir meleğim olan canım aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

1. GİRİŞ

Hücre dışı polimerik madde anlamına gelen EPS, hücresel lizis veya makromolekül hidrolizinin bir ürünü olan, yüksek molekül ağırlıklı bir mikroorganizma salgısıdır. Mikrobiyal toplulukları bir arada tutan bu üç boyutlu matriks; karbohidrat, protein ve humik maddeler içerir. Mikrobiyal toplulukların; yapısı, yüzey yükü, flokülasyonu, yerleşmesi, su alma ve absorpsiyon özellikleri gibi fizikokimyasal karakterlerinde EPS'nin önemli bir etkisi vardır. (Sheng ve diğ. 2010). EPS üretimi kromozomal DNA tarafından kontrol edilir ve üretiminin düzenlenmesi oldukça karmaşıktır, hem pozitif hem de negatif regülatörler içerir. Geniş bir ağ benzeri yapı oluşturarak karmaşık etkileşimler yoluyla hücelere bağlanan EPS; mikroorganizmaları su kaybına (Wingender ve diğ. 1999) ve toksik maddelerin zararlarına karşı korur (Sutherland, 2001).

EPS aynı zamanda “mikroplar şehri” olarak tanımlanan, birçok mikroorganizmanın cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş halde bir araya gelmesiyle oluşan biyofilm yapısını oluşturur (Watnick ve Kolter 2000; Lindsay ve Von Holy 2006; Kumar ve diğ. 2011). Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de büyüyüp genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin kütlelerinin % 75–90'ını EPS oluşturmaktadır (Kives ve diğ. 2006). Tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık % 65'i biyofilm gelişimi ile ilişkilidir (Potera ve diğ. 1999). Biyofilmler çeşitli ekolojik ortamlarda koruyucu ve fonksiyonel olarak rol oynarlar. Örneğin, endüstriyel alanlarda, farklı bakteri türlerinin oluşturduğu biyofilmler, insan ve fabrika atıklarının biyoremediasyonunda kullanılmaktadır (Vu ve diğ. 2009). Bunların yanı sıra bazı biyofilmler gıdaların bozulmasına, patojenik bakterilerin gıdaların yüzey ile etkileşip kontaminasyonuna neden olur. Bu durum, gıdaların raf ömrünün kısalmasına, gıda kaynaklı hastalıklara ve bunların sonucunda ekonomik kayıpların artmasına neden olmaktadır (De Beer ve diğ. 1994).

EPS'nin sağlık, gıda ve endüstri gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır. İçeriğindeki nükleik asit, protein ve karbohidratların tüm ağır metallere kompleks yeteneği vardır. Buna dayanarak atık su kaynaklı bazı organik maddeler EPS matrisine absorbe ettirilebilir. (Nielsen ve Jahn, 1999; Liu ve Fang, 2003). Ayrıca EPS fiziksel, kimyasal ve sıvı haldeki özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket eder ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme süreci, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (Yılmaz ve Yuvalı Çelik, 2007).

Bu yüksek lisans tezinin amacı, Denizli ilinde kalsiyumca zengin bir bölgeden izole edilen *Bacillus pseudomycoides* U10 bakterisinin, LB (Luria bertani) miller, LB miller içerisine ayrı ayrı ilave olarak glukoz ve peynir altı suyu tozu (PAST) eklenen besi ortamlarında, bunlara ek olarak endüstriyel bir atık olan melasın belli oranda suyla seyreltilerek bir besiyeri olarak kullanılmasıyla elde edilen ortamlarda ürettiği EPS'nin; miktar, içerik ve yapı farklılıklarının araştırılmasıdır. Farklı ortamlarda üretilen EPS içeriklerinin belirlenmesi için toplam şeker, protein ve üronik asit miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca EPS yapısı hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmek üzere SAXS, XRD, SEM ve TGA analizleri yapılmış, besiyeri farklılığının bakteriyel EPS kompozisyonu ve üç boyutlu yapısı üzerinde etkisinin olup olmadığı hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 EPS'nin Tanımı

EPS; bazı bakterilerin ürettiği, hücre yüzeyinde birikmiş olan metabolik bir ürün olup (Morgan ve diğ. 1990), dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkarittir (Karaca ve diğ. 2010). EPS formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen; kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Sutherland, 1998a; Ramesh, 2003). Dış etkilere karşı hücreyi korur ve besin tükendiğinde karbon kaynağı görevi görerek enerji rezervi olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel EPS çeşitli organik maddelerden oluşmakla birlikte saf kültürlerden elde edilen EPS'de karbonhidratlar baskın karakterdir. Buna ilaveten EPS içeriğinde protein de çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır, ek olarak hüyük maddeler, üronik asit, DNA (deoksiribonükleik asit) da EPS içeriğinde mevcuttur (Frolund ve diğ. 1996).

Bakteriyel EPS genellikle immunojeniktir. İn vitro çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Gugliandola ve diğ. 2003). EPS üretimindeki yapısal ve düzenleyici genler, kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça komplekstir ve pozitif ve negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğerk hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir (Shankar ve diğ. 1995).

EPS bakterinin yüzeye tutunmasında yapıştırıcı özelliğe sahip ve mikroorganizmaların biyofilm oluşturmasında etkilidir. Bu sebeple, EPS üreten bakteri baskın şekilde kolonize olarak bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilir. Bununla birlikte; mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri, faj ataklarına, organizmadan sitokinin salgılanmasına ve antibiyotiklere karşı koruyucudur (Aslım ve diğ. 2005a).

2.2 EPS'nin Biyosentezi

EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşünülmektedir. EPS oluşumunda; UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi birçok enzim görev alır (Sutherland ve diğ. 1997). Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenir ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sarar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur.

EPS üretiminde görev alan yapısal genlerin keşfi, EPS üretiminin plasmid kısmı için delil olmuştur (Kranenburg ve diğ. 1997). Fakat termofilik yoğurt bakterilerinde EPS üretiminin kromozomlar ile kodlandığı bulunmuştur (Stingele ve diğ. 1996; Lamothe ve diğ. 2000).

2.3 EPS'nin Yapısı ve Sınıflandırılması

EPS'ler, hücre içinde bulunduğu konuma göre; intraselüler (depo) polisakkaritler, yapısal formdaki polisakkaritler ve ekstraselüler (EPS) polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı tipte sınıflandırılır (Cerning 1990; Ruas-Madiedo ve diğ. 2002). İntraselüler polisakkaritler; karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Yapısal formdaki polisakkaritler; peptidoglikanlar ve teikoik asitler gibi çeperlerde yer alırlar. Ekstraselüler polisakkaritler ise hücre içinde sentezlenip hücre duvarı ile birleşerek kapsüle veya hücre duvarı dışında birikerek kültür ortamına bağımsız olarak salgılanırlar (Mc Groarty 1994).

EPS'ler dallanmış tekrarlı şeker birimlerinden ve şeker türevlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir (Karaca ve diğ. 2010). Bakteriyel EPS'ler çoğunlukla düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşan heteropolisakkarit yapıda, bazıları ise tek tip şekerden oluşan homopolisakkarit yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaritlerin çoğu nötr iken bazı bakteriyel EPS'ler negatif yük taşır ve yüksek kütleli sahiptirler (Kenne ve Lindberg 1983). Ayrıca polisakkaritler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu lipofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Calazans ve diğ. 1997; Gugliandola ve diğ. 2003).

2.4 EPS'nin Kullanım Alanları

EPS'ler işlevsellikleri bakımından fiziksel, kimyasal ve reolojik (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket ettikleri için; tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (Yalpani ve diğ. 1987; Sutherland 1998b; Becker ve diğ. 1998) Yapılarındaki bu çeşitlilik sebebiyle farmasötik ve diğer endüstri uygulama alanlarında kalınlaştırıcı, stabilize edici, emülsüfiye edici, tekstür ve jelleşme ajanı olarak da kullanım alanına sahiptir (Demirci ve diğ. 2008). Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ve farmokolojinin bir çok alanında da EPS'den yararlanılmaktadır (Lee ve diğ. 1997). EPS'ler; süt ürünlerinin yapısını olumlu şekilde etkiledikleri için en başta yoğurt olmak üzere bir çok fermente süt ürününde ve düşük yağlı peynirlerde istenen yapının oluşması için EPS üreten suşlardan yararlanılmaktadır (Milci ve diğ. 2005).

EPS'ler aynı zamanda insanlar üzerinde anti-tümör, antivirüs, ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktiviteye katkıda bulunurlar ve ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılırlar. 40-70 kDa gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede ve hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sefadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler (Kitawaza ve diğ. 1991; Calazans ve diğ. 1997). Yapılan çalışmalar; EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediğini, kolesterolü düşürdüğünü ve antiülser aktivitesine sahip olduğunu da göstermiştir (Sutherland,1990; Nakajima ve diğ,1992).

2.5 Melasın Genel Özellikleri

Kamış ve şeker pancarı fabrikalarında, sakkarozun kristal halde elde edilmesi için yapılan kademeli işlemlerin en sonunda geride kalan ve koyu kahve renkli, ortalama % 50 şeker ihtiva eden, yüksek viskoziteli (kıvamlı) şuruba Melas denir. Melas, önemli miktarda şeker içerir. Bu yan ürün şeker dışı maddeler bakımından da oldukça zengindir. Melasın şekerinin esas içeriği glikoz ve fruktoz monosakkaritlerinin bir araya gelmesi ile oluşan sükroz disakkaritidir. Pancarın işlenmesi sonucunda yaklaşık 100 ton şeker üretimi sonunda ortalama 4-6 ton melas açığa çıkmaktadır. Dünyada en fazla melas üreten ülkeler arasında Brezilya, Hindistan, Çin, Tayland ve Pakistan başı çekmektedir (Drennan, 1985).

2.6 Melasın Kullanım Alanları

Koyu renkli ve kıvamlı bir madde olan melasın kuru madde miktarı yere ve yöntemine göre az çok değişmesine rağmen ortalama % 77-82 dolayında ve içerdiği şeker miktarı da % 50 dir.

Kapsadığı yüksek orandaki şeker nedeniyle melas çok aranan ve tüketilen değerli bir hammaddedir, ayrıca çok çeşitli maddeler içerdiğinden, pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Genel olarak; %50 şeker kapsadığından şeker üretilebilir, meşrubat üretiminde kullanılır, tam bir fermantasyon hammaddesi olarak değerlendirilebilir ve etil alkol üretiminde kullanılır, doğrudan doğruya hayvan yemi olarak kullanılabilir, maya fabrikalarında kullanılır. Etil alkol olarak; içilebilir kalitede direk damıtılan içkiler, içilemeyen kalitede endüstriyel tüketim ve ilaç sanayi için kullanılır (turkseker [online], 2015). Dünyada üretilen melasın yaklaşık % 51'i küçük ve büyük baş hayvanlarda besin olarak kullanılmaktadır (Moloney ve diğ., 1994). Melas, çimentoya belirli bir oranda eklenildiğinde donma 12-24 saat kadar gecikir ve bu sebeple beton makinelerinde donmayı geciktirme amacıyla kullanılmaktadır. Aynı sebeple otoyolların yapımında dahi kullanılmaktadır. Melas yapıştırıcı olarak da kullanım alanına sahiptir (Murphy, 1999; Chamberlain ve diğ. 1995).

2.7 Peynir Altı Suyu Tozunun Genel Özellikleri

Peynir altı suyu tozu, peynir oluşumu sırasında, çökeltiden süzülerek elde edilen sıvının ısıtma işlemleriyle toz haline getirilmesinden elde edilir. Peynir altı suyunun önemi, gıda sektöründe geç fark edilmiştir, eskiden bir atık olarak görülen peynir altı suyu, besin ve fonksiyonel değeri keşfedildikten sonra gıda sektöründe çeşitli alanlarda kullanılmıştır.

Peynir yapımında bir yan ürün olan peynir altı suyu; laktoz, mineral maddeler, vitaminler, proteinler ve az miktarda süt yağını içermektedir. Bunların içinde peynir altı suyu proteinleri, en önemli kısmı oluşturmaktadır. Peynir altı suyu proteinlerinin diğer proteinlere göre üstün tarafı, sadece biyolojik değeri değil, aynı zamanda sülfür içeren aminoasitleri yüksek oranda içermesidir.

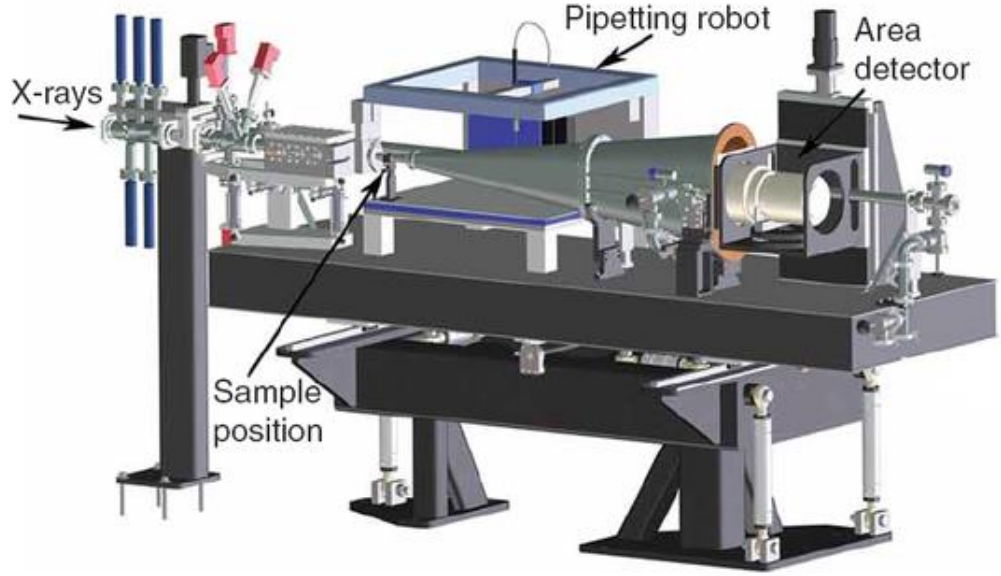
Gıdalardaki peynir altı suyu proteinlerinin (alfa laktalbumin, beta laktobumin, immunoglobulin, laktoferrin ve albümin) temel fonksiyonu, besleyici azotu ve aminoasitleri sağlamasıdır (hammaddeler.com [online], 2015).

2.8 X-Işını Küçük Açılı Saçılma (SAXS) Yöntemi

X-ışını küçük saçılma analizleri maddelerin moleküler boyut ile mikro boyut arasında kalan yapısal farklılıkları ayrıntısı ile inceleme olanağı sağlamıştır. Akısı yüksek x-ışını kaynakları ile verimi ve duyarlılığı yüksek detektörler sayesinde, incelenecek örnek içeriğinde bulunan nano boyutlu oluşumlardan saçılan yüksek şiddetli x-ışını verileri (küçük saçılma açısı bölgesinde) etkin bir biçimde, ölçülebilir hale gelmiştir. Böylece X-ışınları, katı (kristal, kristalin, film, toz, sıkıştırılmış toz vb) formlara sahip örnekleri incelemede kullanılırken, artık sıvı, jel, yoğun gaz gibi farklı formlara sahip örnekler ile biyolojik dokuları da incelemede kolayca kullanılabilir hale gelmiştir.

X-ışını saçılma deneylerinin en önemli üstünlüğü küçük ve geniş açılı bölgelerine ait saçılma verilerinin aynı anda kaydedilebilmesi ile moleküler ve nano boyuta ait yapısal bilgilere ulaşılabilmesidir. Böylece incelenecek örneğe ait faz

diyagramları ve yapısal dinamikler de ayrıntısı ile araştırılabilmektedir (<http://www.swaxs.hacettepe.edu.tr/>)



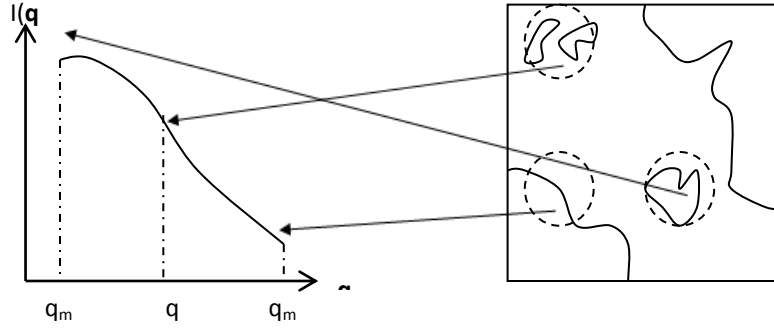
Şekil 1 SAXS analiz cihazı temel görünüm

Parçacıklardan belirli doğrultularda saçılan dalgaların girişimiyle kırınım gerçekleşir. İncelenecek örnek üzerine düşen X-ışını, maddedeki elektronlarla etkileşerek elektronlardan saçılan dalga genliklerinin toplanmasıyla; saçılan ışının şiddetine ulaşılır.

Yapı analizinde kullanılan X-ışını yöntemlerinden biri olan, X-ışını küçük açı saçılma (SAXS) yöntemi ile incelenen örnekten küçük açıda saçılan X-ışını şiddetleri, saçılma açısının bir fonksiyonu olan, saçılma vektörünün büyüklüğüne göre elde edilerek bu verilerden yapı ile ilgili bilgiye ulaşılır. Küçük açı saçılmalarında da, tıpkı X-ışınları kırınımında olduğu gibi, saçılma yapıdaki elektronlar tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle yöntem elektron yoğunluğu farkının algılanması temeline dayanır.

2.8.1 SAXS Eğri Analizi

Bir SAXS eğrisi Şekil 2'deki gibidir. Örneğin yapısı bu eğri ile belirlenir. Farklı q_0 değerleri uzunluk ölçüsüne sahip hayali bir pencereden bakılarak örneğin iç yapısı incelenir. q_0 değeri küçüldükçe örneği incelemeye olanak tanıyan pencere büyüyeceğinden örnek içindeki saçıcıların birbirleriyle etkileşmesi hakkında da bilgi sahibi olunur. q_0 değeri büyüdükçe pencere küçülecektir. Böylece saçıcıların kendi büyüklükleri ve şekilleri hakkında bilgiye ulaşılabilir. Daha da büyük q_0 değerleri, saçıcılar ile içinde buldukları ortam arasındaki ara yüzey hakkında bilgi verir (Batat, 2008)



Şekil 2 SAXS eğrisinin analizi

Saçılma eğrisi 3 bölgede incelenir. Bu üç bölge sırası ile aşağıda açıklanmıştır.

Büyük q bölgesi

Önceden bahsedildiği gibi bu bölgenin penceresi oldukça küçüktür. Bu yüzden sadece iki ortamı birleştiren ara yüzeyi incelemeye imkân verir. Bu bölgeye “Porod bölgesi” denir. İki farklı fazdan oluşan bir sistem hacmin ifadesidir.

Sonuç olarak, en küçük q değerinde elde edilen veri $I(0)$ değerini gösterir, bu değer büyük, örnek içindeki saçıcı elektron yoğunluğunun büyüklüğünü gösterir.

Orta bölge

Heterojen karışımlarda parçacık boyutlarının belirlenmesi ve şekillerinin tespiti önemlidir. Parçacık boyutu $1\mu\text{m}$ civarındaysa görünür ışık saçılmasıyla bütün bilgilere ulaşılabilir. Ama nano boyutta parçacıklar içeren sistemlerde küçük açı x-ışını saçılması daha ayrıntılı bilgiye ulaşmada oldukça etkindir. Küçük açı saçılması yöntemiyle boyut ve şekil analizi yapılırken yine saçıcı malzeme içindeki elektron yoğunluklarının farkından yararlanır. Bu bölge nano maddenin boyutu, şekli ve iç yapısı bilgilerine ulaşılabilir.

Küçük q bölgesi

Buradaki örneklerin yapısının incelendiği yapay pencere oldukça büyür. Bu şekilde saçıcıların birbirlerine göre konumları ve uzaklıklarının dağılımları da bulunabilir. Deneysel saçılma eğrisine uygun kuramsal eğri belirlenerek örnek için $S(q)$ yapı faktörü bulunur. $S(q)$, saçıcı oluşumların yapı içinde birbirlerine göre nasıl dağıldıklarının gösteren matematiksel bir ifadedir.

2.9 X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi

XRD (X-ışını kırınımı) yöntemi ile maddenin yapısı (kristalin, yarı-kristalin, amorf), atom ya da atom düzlemleri arasındaki mesafeler (dhkl, Å) ve kristalin maddenin kristallik derecesi belirlenebilir. Bu yöntem inorganik kristalin maddelerin dışında birçok biyolojik molekül, ilaç, protein, nükleik asit ve vitaminlerin yapısının incelenebilmesi için de kullanılmaktadır.

Kristal yapıyı oluşturan atomlar, değişen θ açısı ile gelen X-ışını demetini bütün yönlerde saçar. Saçılma sırasında belli yönlerdeki ışıklardan bazıları birbirini yok ederken (negatif veya yıkıcı girişim), bazı ışınlar birbirini kuvvetlendirerek yapıcı veya pozitif girişim oluşturur ve bu kırınım (difraksiyon) neden olur. Kristalin maddenin X-ışınları kırınımı deseni (patern) her kristal türü için özel olup, kristallerin tanımlanmasında kullanılır.

2.10 Termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi

Termal analizlerle, sıcaklığın fonksiyonu olarak maddenin kütle kaybı ölçümü yapılır. Termogravimetrik ölçümler polimerler maddeler, ilaç, kil, mineral, metal ve alaşımlarda kalite kontrol ve araştırma uygulamalarında kullanılmaktadır. TGA (termogravimetrik analiz) işlemlerinde bir örneğin kütlesi, kontrollü atmosfer altında; örneğin sıcaklığı sürekli artırırken (genellikle zamana karşı doğrusal artış) sıcaklığın veya zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Zamana karşı kütle veya kütle yüzdesi grafiği termogram ya da termal bozunma eğrisi olarak adlandırılır.

TGA cihazı termobalans adında hassas mikrobalans, fırın, bazen inert bazen de reaktif gaz atmosferi sağlayan temiz gaz sistemi, cihazın kontrolü, veri alma ve veri işleme işlemleri için bilgisayar sisteminden oluşur. 1 mg'dan 100 g'a kadar değişen örnek tutucu hazneli termobalansı mevcuttur. Genelde 1-100 mg arası madde kullanılır. Balanslar kütledeki 0,1µg değişimleri kaydedebilir. TGA fırını 1000°C sıcaklığa kadar çıkabilir. Isıtma seçenekleri 0,1°C/dk'dan 100 °C/dk aralığında değişebilir. İzolasyon ve soğutma iç bölgesinin balansla ısı alışverişinin olmasını engeller. Ar ve N₂ gazları incelenen örneğin oksidasyonunu önlemek için kullanılan temizleme gazlarıdır.

İncelenecek örnekler genellikle alüminyum, alümine veya platin kaplara konur. Platin kolay temizlenebilmesinden dolayı yaygın olarak kullanılır. Kap hacmi değişik boyutlarda olabilir. TGA sıcaklıkla değişen madde kütlesi hesaplanabildiğinden kantitatifdir fakat buharlaşma, süblimleşme, dekompozisyon, oksidasyon, ve desorpsiyon verileri sınırlıdır. TGA'nın en önemli uygulamaları çok bileşimli sistemlerin bileşimsel analiz bozunma örnekleridir.

3. METOT

3.1 Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan bakteri (*Bacillus pseudomycoides* U10) Denizli-Karcı Dağı, İsrafil Deresi çevresinden alınan topraklardan izole edilmiş olup, Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. Bakteriyel izolat 37 °C’de geliştirilerek deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere steril Tryptic Soy Agar içeren tüplerde +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2 Zamana Bağlı Olarak Üretilen EPS Miktarının Belirlenmesi

Bakteri kültürü belirlenen besiyerinde ve koşullarda inkübasyon sonrasında 100 °C’de 10 dakika bekletilir. Örneklerden 1 ml alınır, üzerine TCA ilave edilerek 14 000x g’de 20 dakika santrifüjlenir. Süpernatant, eşit hacimde etanol ile karıştırılır tekrar 20 dakika 14000 xg’de santrifüj edilir. Süpernatant dökülerek elde edilen pellet 1 ml etanol ile çözünür. Santrifüj aşaması tekrar edilir. Pelletin üzerine 1ml dH₂O eklenerek çözülür, fenol sülfürik asit metodu (Dubois ve diğ. 1956) uygulanarak 10 dakika 30 °C’de bekletildikten sonra 490 nm UV spektrofotometrede okuma yapılır.

3.3 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimini Etkileyen Optimal Koşulların Belirlenmesi

3.3.1 Farklı Besiyerlerinin EPS Üretimine Etkisi

B. pseudomycoides bakterisinin zamana bağlı olarak ürettiği toplam şeker miktarları Tryptic Soy Broth (TSB), Nutrient Broth (NB) ve Luria Bartani-Miller (LB) besi ortamlarında pH 7,0’de ölçülmüştür. Hazırlanan erlenlere % 2’lik ekim yapılarak 37 °C’de 125 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültür

örneklerindeki EPS miktarı, 6 saat ve/veya 12 saat aralıklarla fenol-sülfürik asit metoduna göre belirlenmiştir (Dubois ve diğ. 1956).

3.3.2 Endüstriyel Atıkların EPS Üretimine Etkisi

Çalışmada endüstriyel atık olarak melas ve peynir altı suyu kullanılmıştır. Melas Ankara Şeker Fabrikasından temin edilmiş, peynir altı suyu ise ticari olarak satın alınmıştır. Ön çalışmalarımız sonucunda melas gelişme ortamı olarak kullanılmış peynir altı suyu ise besiyerine 1 g/L oranında ilave karbon kaynağı olarak eklenmiştir.

Toplam şeker üretimi için gelişme ortamı olarak kullanılan melas besi ortamının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda melas içeren besi ortamları hazırlanmıştır (melas: dH₂O; 0,5:100, 1,0:100, 1,5:100, 2:100 v/v). Melas içeren bu çözeltilere 1 g/l (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/l KH₂PO₄ ilave edilerek gelişme ortamı hazırlanmış ve pH'ı 7,0'ye ayarlanmıştır (Gönen ve Aksu, 2008). Hazırlanan gelişme ortamları 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve %2 bakteri ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir. Belirlenen optimal melas konsantrasyonunda ayrıca pH ve sıcaklığın etkisi çalışılmıştır.

3.3.3 pH'nın EPS Üretimine Etkisi

B. pseudomycoides U10 bakterisinin toplam şeker üretim özelliği üzerine pH'ın etkisini araştırmak amacıyla pH 6,5, pH 7,0 pH 7,5, pH 8,0 ve pH 9,0'da LB ve melas besi ortamlarında 37 °C'de inkübe edilmiş ve zamana bağlı olarak toplam şeker ölçümü yapılmıştır.

3.3.4 Sıcaklığın EPS üretimine etkisi

B. pseudomycooides U10 bakterisinin EPS üretim potansiyelleri üzerine sıcaklığın etkisi 25, 30, 37 ve 45 °C'lerde inkübasyon yapılarak belirlenen optimal pH ile araştırılmıştır. İnokülasyon oranı %2'dir. LB ve melas gelişme ortamlarında inkübasyon zamanına bağlı olarak toplam şeker miktarı ölçülmüştür.

3.3.5 Organik asitlerin ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi

B. pseudomycooides U10 bakterisinin EPS üretim potansiyelleri üzerine organik asit ve karbon kaynaklarının etkilerini belirlemek amacıyla galaktronik asit, glukuronik asit ve glikoz 1 g/L oranında LB besi ortamına ilave edilerek zamana bağlı olarak toplam şeker ölçümü yapılmıştır.

3.4 EPS Saflaştırma Metodu

Çalışmada EPS saflaştırması etanol ile çöktürme-saflaştırma yöntemi ile yapılmıştır (Hung ve diğ. 2005). Bakteri kültürü inkübasyon sonrasında santrifüj edilir, süpernatant ve pellet ayrılır. Süpernatanttan elde edilen EPS "çözülmüş EPS", hücre pelletinden elde edilen EPS "membrana bağlı EPS" olarak adlandırılır.

Süpernatanta, besiyerinden gelen proteinleri yok etmek için proteinaz K ilave edilir. Solüsyon 37 °C'de 12 saat 70 rpm'de inkübe edilir. İnokülasyon sonrasında 4 hacim etanol ve metanol ilave edilerek buzdolabında 12 saat çökelti oluşması için bekletilir. Çökelti 0,22µm gözenek çaplı membran ile filtrasyon yapılarak toplanır. Son konsantrasyon 30g/l olacak şekilde NaCl ilave edilerek presipitat tekrar çözülür ve bu işlem üç kez tekrarlanır. Üçüncü tuz aşamasından sonra membran filtreden geçirilen örnekler 10-20 ml dH₂O ile çözülür ve 6-8 kDa membranda dH₂O'ya karşı 3-5 gün boyunca dializ edilir. Daha sonra dializden alınan örnekler liyofilizatörde kurutulur.

Pellet ise, 100 ml dH₂O'da çözülür ve 3 g NaCl ilave edilir, 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak pelletten membrana bağlı EPS ekstrakte edilir.

Daha sonra solüsyon santrifüj edilerek süpernatant alınır. Süpernatant üzerine yukarıda anlatıldığı şekilde alkol karışımı ilave edilerek EPS saflaştırılır.

Elde edilen toz-kuru EPS'lerin bir kısmı toplam şeker tayini, protein ve üronik asit tayini ile monomer kompozisyon analizlerinde, bir kısmı karakterizasyon çalışmalarında bir kısmı ise SAXS ile üç boyutlu yapı belirlemede kullanılmıştır.

3.5 Liyofilize EPS'nin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

3.5.1 Toplam protein tayini

EPS'deki toplam protein miktarı modifiye Lowry (Lowry ve diğ., 1951, Hartree, 2004) metoduna göre 650 nm spektrofotometrede kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Standart olarak sığır serum albumini (Sigma, P0834) kullanılmıştır.

Modifiye Lowry Metodu: Elde edilen EPS çözeltisi 10 dk. 50 °C su banyosunda bekletilir. Üzerine 0.9 ml sodyum-potasyum tartarat- NaCO_3 reaktifi eklenerek 50 °C'de su banyosunda 10 dk. bekletilir Süre sonunda çözeltiler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar karanlık bir ortamda soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra üzerine 0.1 ml sodyum-potasyum tartarat- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ reaktifi eklenerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dk. oda sıcaklığında bekletilir. Süre sonunda 3 ml Folin-Ciocolteu reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 50 °C su banyosunda 10 dk. bekletilir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar karanlık ortamda bekletilir ve 650 nm'de absorbans ölçülür.

3.5.2 Üronik asit miktarı belirleme

Liyofilize EPS numunesi içerisine sulfamik asit eklenerek iyice karıştırılır ve konsantre sülfürik asit ile hazırlanan sodyum tetraborattan 2.4 ml ilave edilip 100 °C su banyosunda 10 dk ısıtılır. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra 30 µl m-hidroksifenil eklenip 525 nm'de absorbansı okunur. Toplam üronik asit

konsantrasyonunu hesaplamada glukuronik asit ile oluşturulan standart eğri kullanılmıştır (Hung ve Santchi, 2001).

3.5.3 Toplam şeker tayini

EPS'nin toplam karbonhidrat miktarı, fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmiştir (Frengova ve diğ., 2000; Dubois ve diğ., 1956). Toplam şeker konsantrasyonunu hesaplamada glukoz ile oluşturulan standart eğri kullanılmıştır.

3.6 Bakteriyel EPS'nin Karakterizasyonu

3.6.1 X-Işını Kırınımı (XRD) Yöntemi ile Yapılan Analizler

Bu çalışmada XRD yöntemi ile bakterilerden elde edilen EPS'nin karakterizasyonu (amorf veya kristalin yapı tayini) için kullanılmıştır. XRD yöntemi kristal yapısı bilinmeyen bir maddenin atom düzlemleri (dhkl) arasındaki mesafenin ölçümünü esas almakta olup, pikler Bragg yasası olarak bilinen 2θ açılara karşılık gelen (dhkl) değerleriyle ifade edilir ($d = \lambda / 2 \sin\theta$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). XRD incelemeleri Batman Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında Rigaku Miniflex model $\text{CuK}\alpha$ ışınımlı ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) X-ışınları Difraktometresi'nde yapılmış olup, çekim koşulları 40 mA, 40 kV, tarama hızı 0.005° olarak uygulanmıştır.

3.6.2 Termal Analizler (TGA)

Termo-Gravimetrik analiz (TGA), maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin sabit ısıtma oranı ile artan sıcaklık ile kütle kaybına bağlı değişimini ölçen bir yöntemdir. Genel olarak bağlı polimer malzeme çalışmaları için ayrışma, oksidasyon ya da (örneğin, nem gibi) uçucu kaybı, kütle kaybı veya kazancı sergileyen malzemelerin seçilen özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, TGA incelemeleri Pamukkale Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü TGA-DTG termal analiz sistemi üzerinde, azot atmosferinde 20-1000 °C sıcaklık aralığında 10 °C dk-1 ısıtma hızı uygulanarak yürütülmüştür.

3.6.3 Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntüleme

SEM, polimerlerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde hızlandırılmış elektronlar örneğin yüzeyine çarptırılarak örnekten yansıyan ikincil elektronlar (SE), algılayıcı (dedektör) yardımıyla üç boyutlu görüntü elde edilmiştir. Bakterilerin ürettikleri EPS yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinmek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Altın ile kaplanan örnekler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde (İzmir, Türkiye) QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

3.6.4 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler

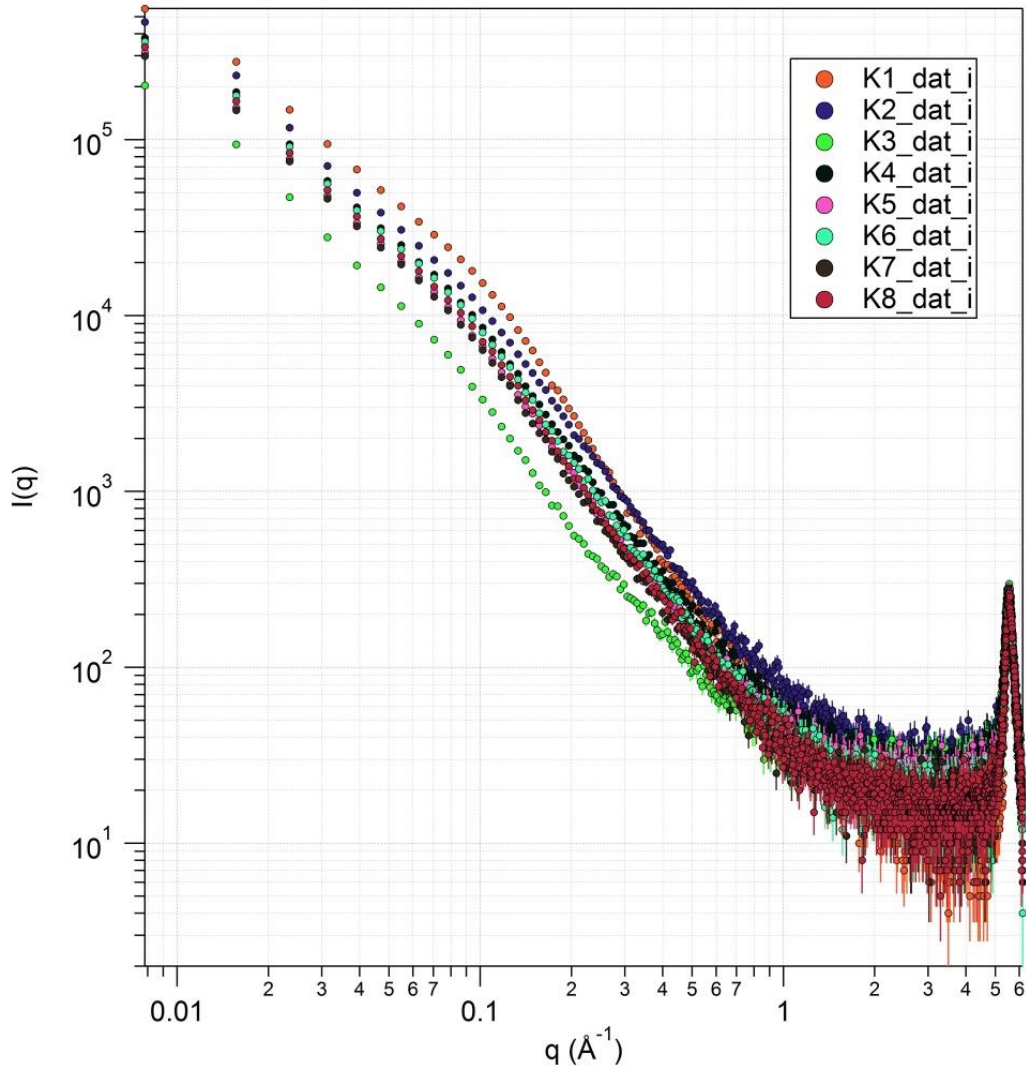
Kurutulmuş saf EPS'ler sulu çözelti formda hazırlanarak Hacettepe Üniversitesi SWAXS laboratuvarında laboratuvar tipi "HECUS SYSTEM3 SWAXS" sistemi kullanılarak deneylerimiz gerçekleştirilmiştir. SAXS ölçümlerinde,

- Işınlama süresi, her bir örnek için = 600 s
- Detektör konumu 27600
- Örnek tutucu = 2 mm quartz-kapiller tüp
- Ölçüm alınan q-aralığı = $0,002 \leq q \leq 0,7$ (Å⁻¹) olarak belirlenmiştir.

Yüksek çözünürlüklü SWAXS sistemi özellikle toz örnekler, sıvı kristaller ve polimerik nano malzemelerin aynı anda küçük ve geniş açı X-ışını saçılması ölçümlerinin yapılabilmesi için tasarlanmıştır. Deney sisteminde eş zamanlı olarak SAXS ve WAXS ölçümlerinin yapılabilmesinin yanında farklı sıcaklıklarda da ölçümlerin yapılması mümkün olmaktadır. Deney sistemi ile ilgili bazı teknik özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 Deney sistemi ile ilgili teknik özellikler

q-aralıklığı	$0,01 < q < 5 \text{ nm}^{-1}$
Geniş açđ aralığı	18-26 ° (istek üzerine diğer aralıkları)
Detektörler	Hecus Detektörleri “PSD 50M”
Yazılım	ASA-3 yazılımı; LabView® kullanıcı arayüzü



Şekil 3 İlgili örneklerin SAXS eğrileri

- K1:** LB+çözünmüş EPS; **K2:** LB+membrana bağlı EPS; **K3:** melaslı besi ortamı+çözünmüş EPS; **K4:** melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS;
K5: Past ilaveli LB+çözünmüş EPS; **K6:** Past ilaveli LB+membrana bağlı EPS;
K7: Glukoz ilaveli LB+çözünmüş EPS; **K8:** Glukoz ilaveli LB+membrana bağlı EPS

Örneklerin sulu çözeltileri (0,5 g/L) ölçümler için hazırlanma aşamasında kapiller tüplere enjekte edilerek, örneklerin sulu çözeltileriyle doldurulan ince kapiller tüpler Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) sisteminin örnek tutucu haznesine yerleştirilerek sistem yazılımı (ASA3 Programı) çalıştırılmıştır.

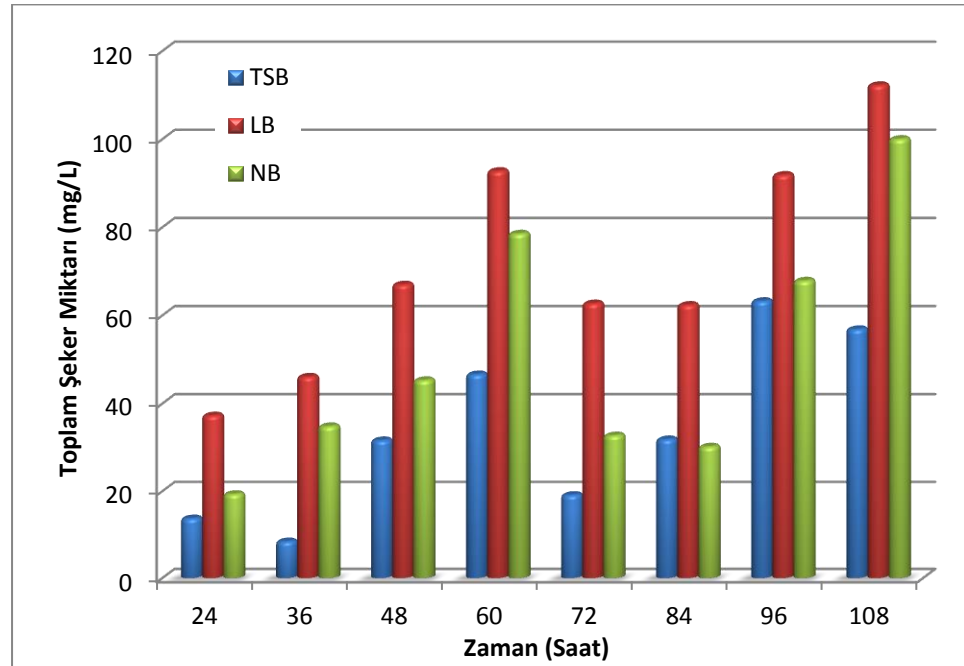
Oda sıcaklığında her bir örnek için 600 s ölçüm süresi sabit tutulmuştur. Ölçümler sonucunda, yapısal farklılıkları daha kolay gözlemlemek için SAXS datalarının $\log(I)$ - $\log(q)$ grafiği (Şekil 3.) çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimini Etkileyen Optimal Koşulların Belirlenmesi

4.1.1 Farklı Besiyerlerinin EPS Üretimine Etkisi

Bacillus pseudomycooides U10 bakterisinin zamana bağlı olarak ürettiği toplam EPS miktarına; farklı besiyerlerinin etkisini belirlemek amacıyla; Tryptic Soy Broth (TSB), Nutrient Broth (NB) ve Luria Bertani-Miller (LB) besi ortamlarında, pH 7,0 ve 37 °C’de inkübe edilen kültür örneklerindeki EPS miktarı, 12 saat ve/veya 24 saat aralıklarla ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4’te verilmiştir.



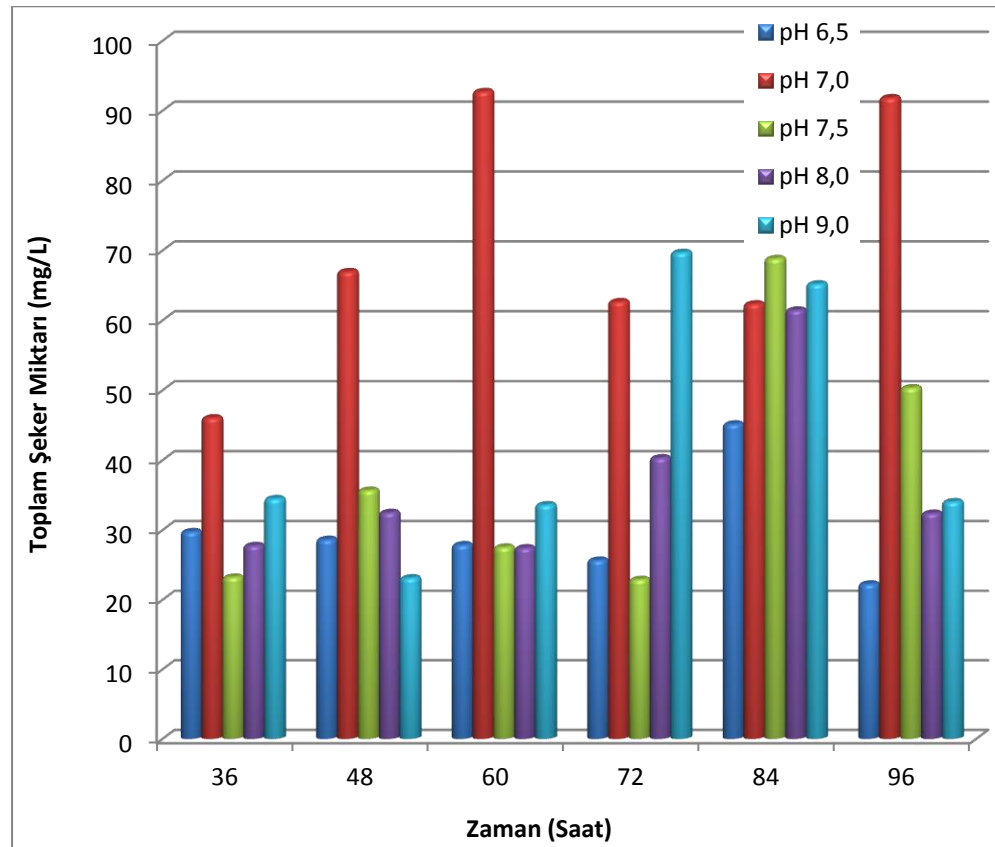
Şekil 4 Farklı besiyerlerinde üretilen EPS miktarının (mg/L) zamana bağlı değişimi (pH: 7; 37°C)

Şekil 4’te görüldüğü üzere genel olarak en fazla toplam şeker üretimi *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin LB besi ortamında geliştirilmesi sonucu elde edilmiştir. 108. saatteki değerlere bakıldığında TSB ortamında 56,85 mg/L, NB

ortamında 100,01 mg/L, LB ortamında ise 112,23 mg/L şeker üretimi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ölçüm yapılan tüm saatlerde en fazla şeker üretimi LB besi ortamında gözleendiği için sonraki çalışmalarımızda bu besi ortamı kullanılmıştır.

4.1.2 pH'ın EPS üretimine etkisi

LB ortamında 37 °C'de geliştirilen bakterilerin farklı pH derecelerinde (6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) zamana bağlı olarak ürettikleri toplam şeker miktarları ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir.



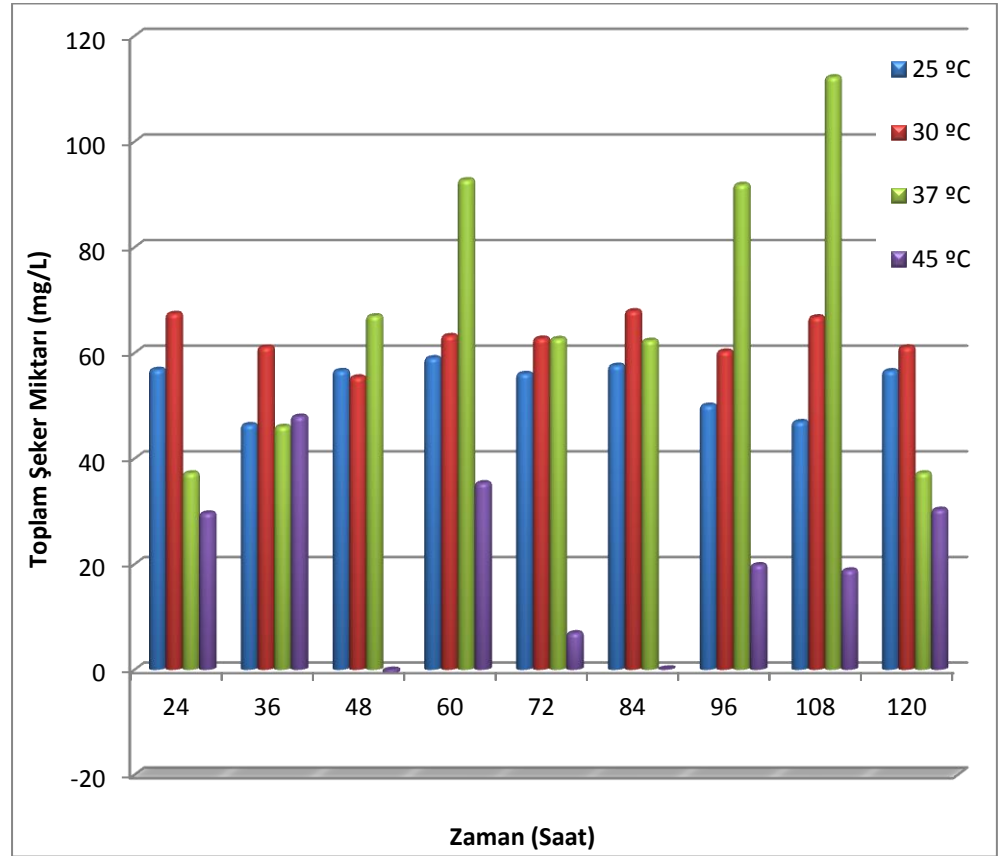
Şekil 5 LB-Miller besiyerinde EPS üretimine (mg/L) pH'nın etkisi (37°C)

Sonuçlar incelendiğinde, *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin LB besi ortamında EPS üretimi için en uygun pH değerinin 7,0 olduğuna karar verilmiştir.

60. saatteki değerlere bakıldığında toplam şeker miktarı pH 6,5'ta 27,9 mg/L, pH 7,5'ta 27,57 mg/L, pH 8,0'de 27,46 mg/L ve pH 9,0'da 33,62 mg/L iken pH 7,0'de 92,74 mg/L'dir. Yapılan hemen her ölçümde pH 7,0 değerinde daha yüksek EPS üretimi gözlenmiştir.

4.1.3 Sıcaklığın EPS Üretimine Etkisi

Sıcaklığın EPS üretimine etkisini belirlemek amacıyla belirlenen optimal pH derecesinde (pH 7,0) LB besi ortamında 25, 30, 37 ve 45 °C'lerde inkübe edilerek inkübasyon sırasında zamana bağlı olarak ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 6'da verilmiştir.

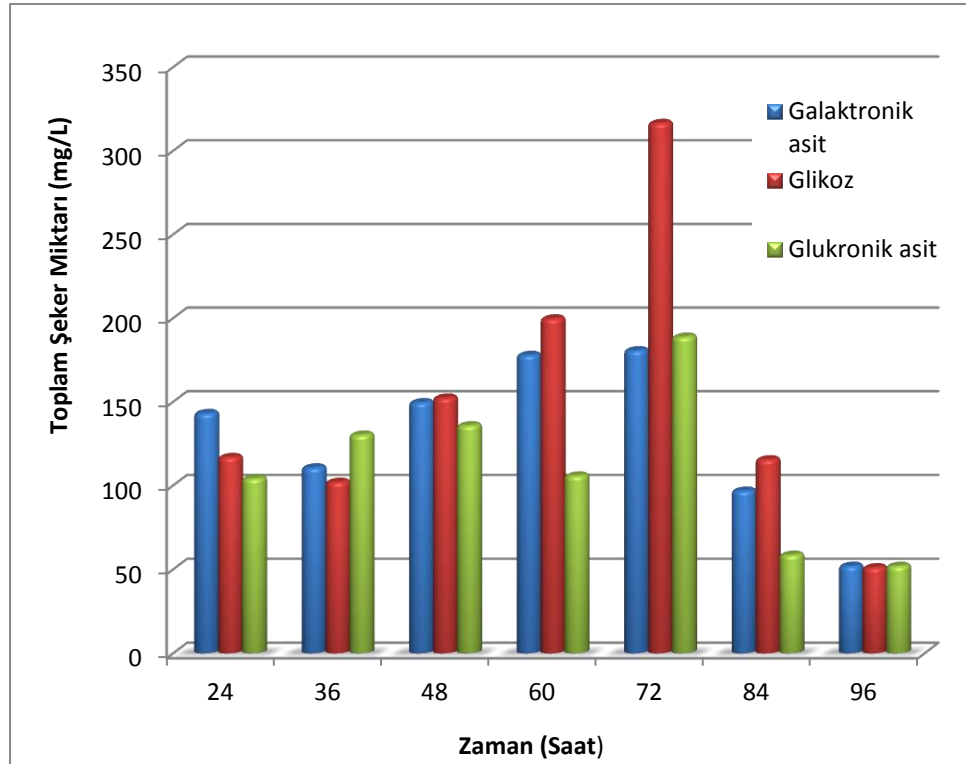


Şekil 6 LB miller besiyerinde EPS üretimine (mg/L)sıcaklığın etkisi (pH:7; 37°C)

Şekilde görüldüğü gibi diğer sıcaklık değerlerine göre, LB miller besi ortamında bakterinin kendi optimal gelişme sıcaklığı olan 37 °C’de EPS üretiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir. 108. saatteki değerlere bakıldığında 25 °C’de 46,96 mg/L, 30 °C’de 66,78 mg/L, 45°C’de 18,88 mg/L iken 37 °C’de 112,23 mg/L toplam şeker miktarı tespit edilmiştir.

4.1.4 Organik Asit ve Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

B. pseudomycoides U10’un EPS üretimine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için glukoz, glukuronik asit ve galaktronik asit kullanılmıştır. Karbon kaynağı ilave edilerek hazırlanan LB besi ortamlarında pH 7,0’da ve 37 °C’de geliştirilen bakterilerden örnekler alınarak toplam şeker ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 7’de verilmiştir.

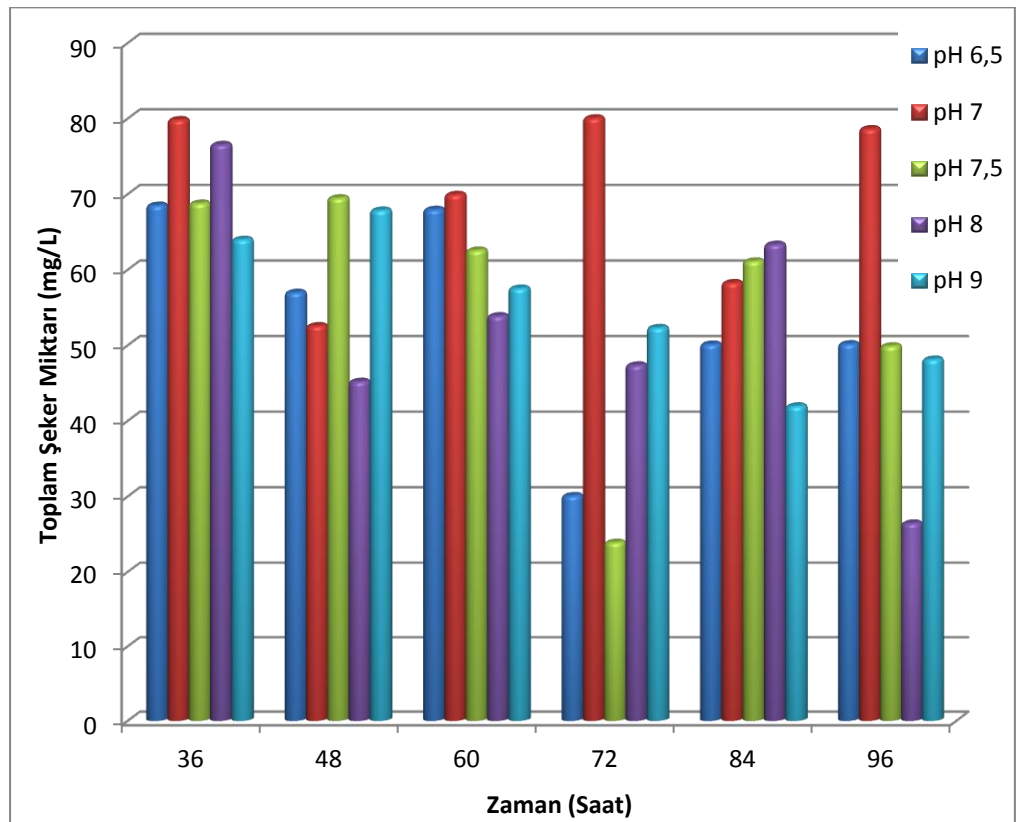


Şekil 7 LB besi ortamına 1g/L oranında ilave edilen organik asit ve karbon kaynaklarının EPS üretimine (mg/L) etkisi (pH: 7; 37 °C)

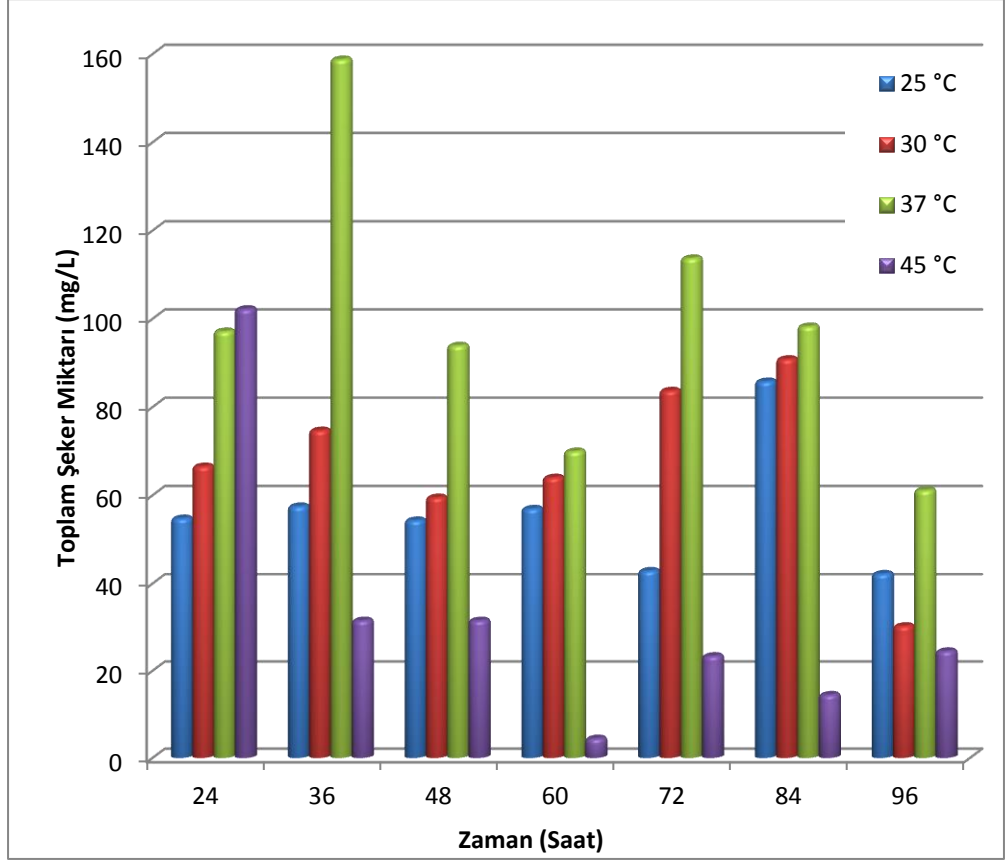
Şekil incelendiğinde galaktronik asit ve glukronik asite oranla, LB besi ortamına glikoz eklendiğinde EPS üretimini artırmaktadır. 72. saatte yapılan ölçümler incelendiğinde galaktronik asit ilaveli ortamda 180,6 mg/L, glukronik asit ilaveli ortamda 188,75 mg/L iken glukoz ilaveli ortamda üretilen EPS miktarı 316,46 mg/L olarak görülmektedir.

4.1.5 Peynir Altı Suyu Tozunun EPS Üretimine Etkisi

Endüstriyel bir atık olan peynir altı suyu tozunun (Past) *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin EPS üretimine etkisini belirlemek için LB besi ortamına 1 g/L oranında toz halde ilave edilmiştir. Hazırlanan bu gelişme ortamında öncelikle farklı pH değerleri (6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) ayarlanarak optimal pH'ı belirlenmiş, daha sonra belirlenen optimal pH'ta sıcaklığın etkisi (25, 30, 37 ve 45 °C) çalışılmıştır. Past içeren gelişme ortamında bakterinin EPS üretimine pH'ın etkisi Şekil 8'de, sıcaklığın etkisi Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 8 Past içeren LB ortamında EPS üretimine (mg/L) pH'ın etkisi (37°C)

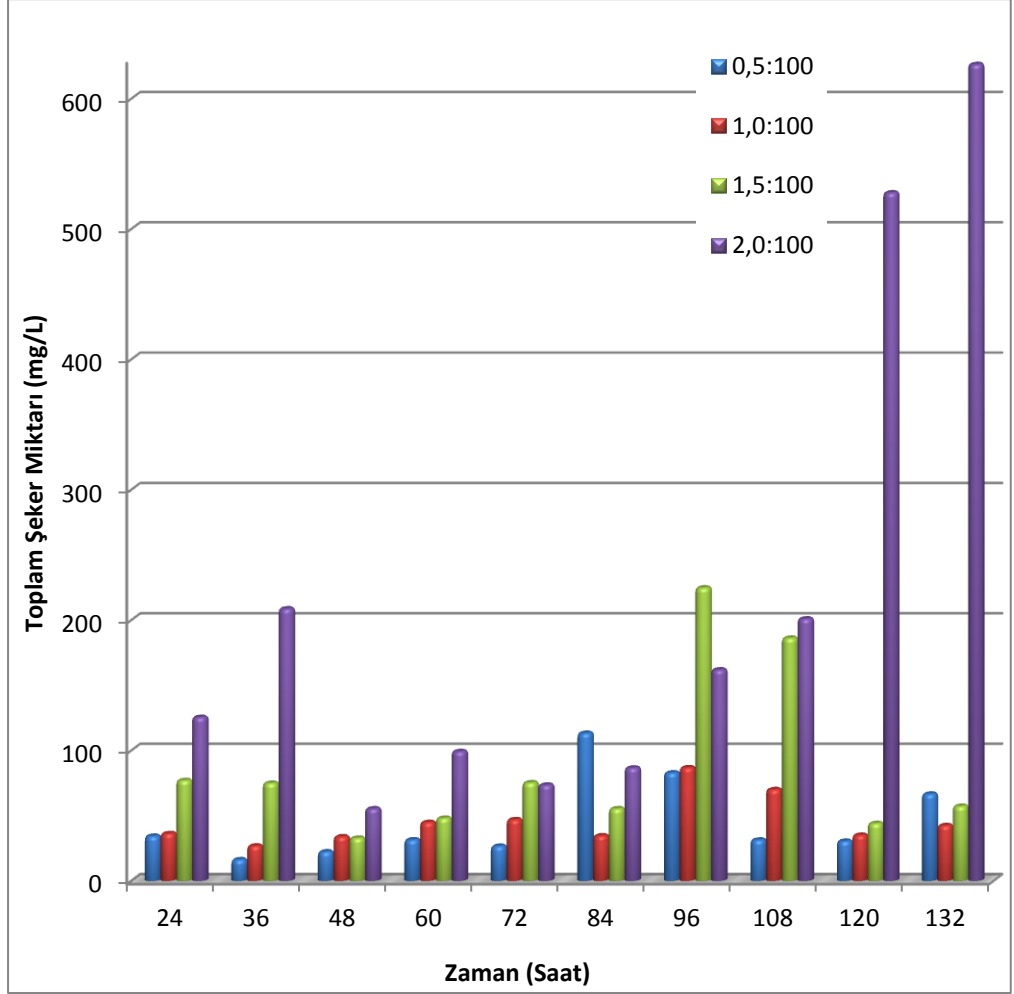


Şekil 9 Past içeren LB ortamında EPS üretimine (mg/L) sıcaklığın etkisi (pH:7)

Şekil 8 ve 9 incelendiğinde pH 7,0 ve 37 °C’de *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin EPS üretimi diğer değerlere göre oldukça kararlı ve yüksektir. 72. saatte yapılan ölçümlere bakıldığında pH 7,5’te üretilen toplam EPS miktarı 23,93 mg/L iken pH 7,0’de 80,08 mg/L olarak görülmüştür.

4.1.6 Melas Besi Ortamında EPS Üretimi

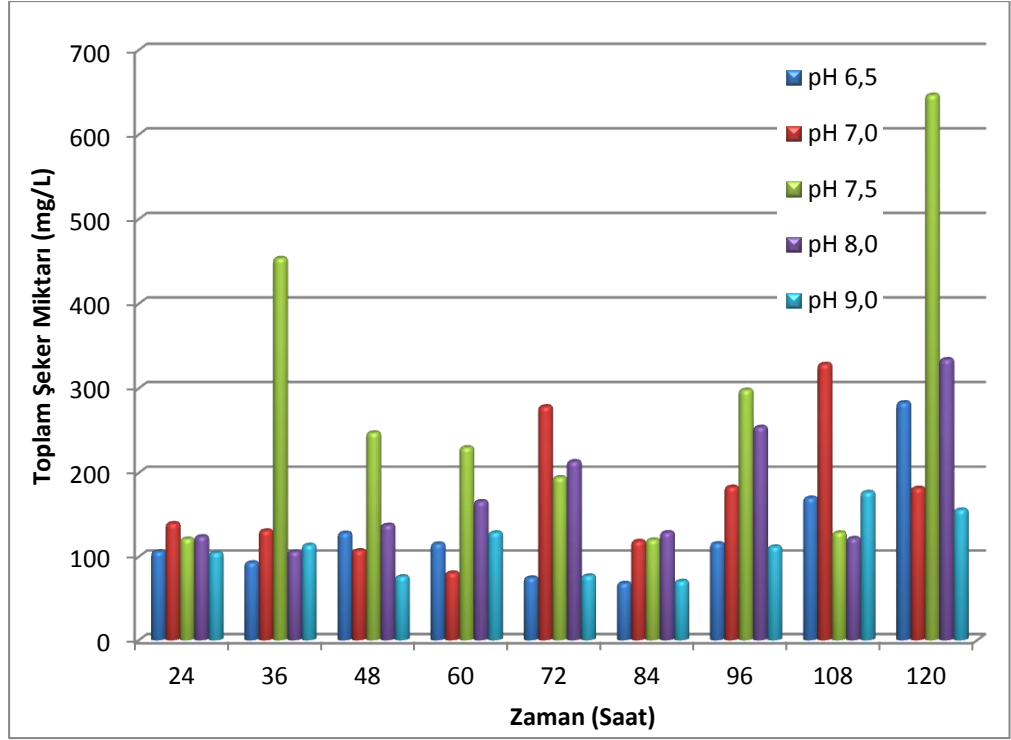
Diğer bir endüstriyel atık olan melas çalışmamızda gelişme ortamı olarak kullanılmıştır. Öncelikle gelişme ortamı olarak hazırlayacağımız melas besi ortamının konsantrasyonunu belirlemek için farklı oranlarda melas içeren çözeltiler hazırlanmıştır (melas:dH₂O; 0,5:100, 1:100, 1,5:100, 2:100 v/v) ve bu ortamlarda geliştirilen bakterinin ürettiği toplam şeker miktarı zamana bağlı olarak ölçülmüştür (Şekil 10).



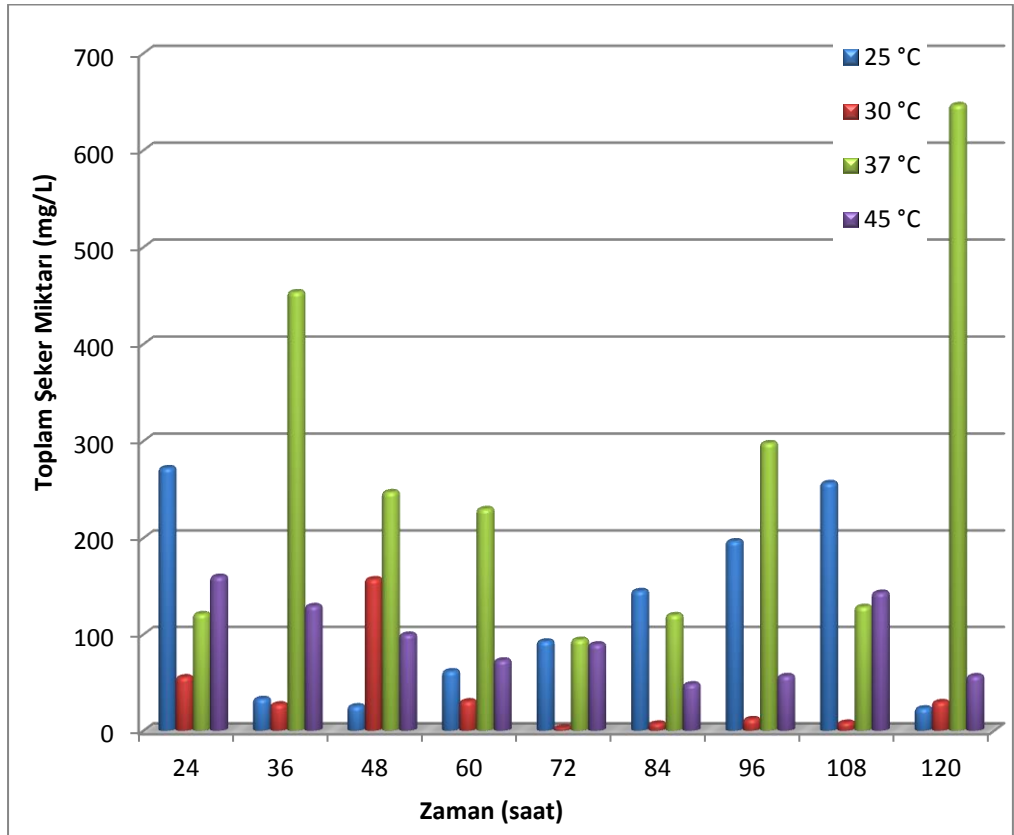
Şekil 10 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) melas konsantrasyonunun etkisi (37 °C)

Şekilde görüldüğü gibi en fazla şeker üretimi 2:100 v/v olan melas besi ortamında elde edilmiştir. Son ölçüm saatlerinde 2:100 v/v konsantrasyonundaki melaslı ortamda diğer ortamların yaklaşık 10 katından fazla EPS üretimi gözlenmiştir.

Melas besi ortamında bakterinin optimal EPS üretim şartlarını belirlemek için farklı pH ve sıcaklıklarda toplam şeker ölçümü yapılmıştır. pH'nın etkisi (pH; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) Şekil 11'de, sıcaklığın etkisi pH 7,5 (25, 30, 37 ve 45 °C) Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 11 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) pH'nın etkisi (37°C)



Şekil 12 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına (mg/L) sıcaklığın etkisi (pH:7,5)

Şekil 11 ve 12 incelendiğinde melaslı ortamda *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin ürettiği EPS miktarı en yüksek değerlere pH 7,5'ta 37 °C'de. pH değeri 7,5'tan uzaklaştıkça EPS üretimi ciddi oranda azalmıştır. Benzer şekilde 37 °C'nin alt ve üst sıcaklık değerlerinde bakteri gelişimine bağlı olarak EPS üretiminin de azaldığı görülmektedir.

4.2 Bakteriyel EPS'nin Kimyasal Kompozisyonu

B. pseudomycooides U10 hücrelerinden EPS saflaştırması LB besi ortamında, peynir altı suyu içeren LB besi ortamında, glukoz içeren LB besi ortamında ve Melas besi ortamında yapılmıştır. Hazırlanan besi ortamlarının pH ve sıcaklıkları önceki çalışmalarımızda elde edilen optimal değerlere ayarlanmıştır. Geliştirilen hücrelerden çözülmüş ve membrana bağlı olmak üzere iki tip EPS elde edilmiştir. Elde edilen EPS'lerin kimyasal kompozisyonunu belirlemek için toplam şeker, toplam protein ve üronik asit miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2 *B. pseudomycooides* U10'dan saflaştırılan EPS'lerin biyokimyasal kompozisyonu (mg/g EPS)

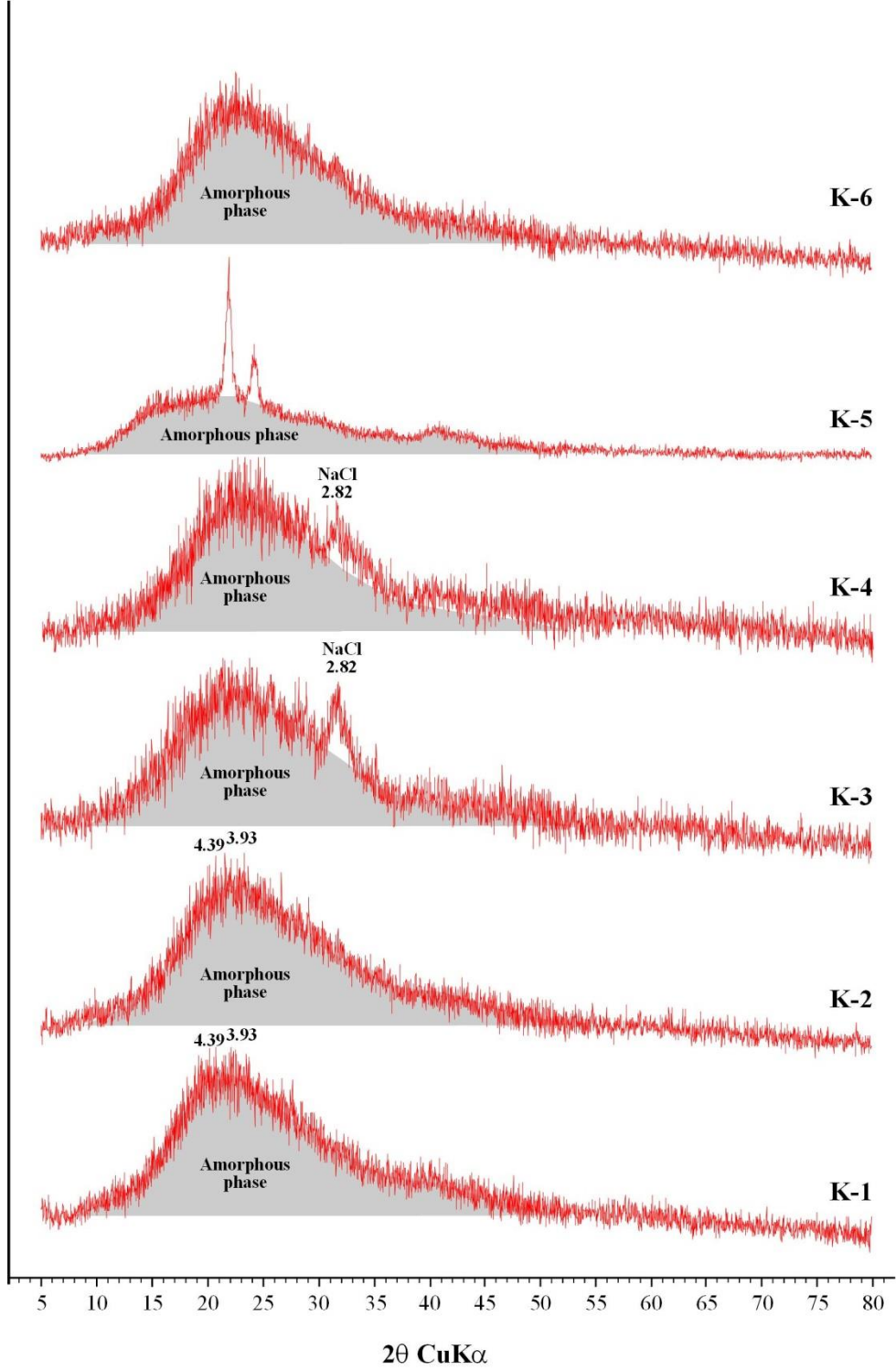
Kullanılan Besiyeri	EPS	Toplam Şeker (mg/g)	Toplam protein (mg/g)	Üronik asit (mg/g)
LB	Çözülmüş	380	211	12
	Membrana Bağlı	206	256	9
Melas	Çözülmüş	466	64	50
	Membrana Bağlı	156	186	14
LB+Past	Çözülmüş	150	182	16
	Membrana Bağlı	106	308	3
LB+glukoz	Çözülmüş	464	122	5
	Membrana Bağlı	176	340	5

Melas besi ortamında geliştirilen U10 bakterisinden ekstrakte edilen 1 g çözülmüş ve membrana bağlı kuru EPS numunesindeki toplam şeker miktarı sırasıyla 466 ve 156 mg, protein miktarları ise 64 ve 186 mg'dır. Ayrıca Tablo 2'den görüleceği üzere protein ve şeker tüm EPS'lerin temel bileşeni iken üronik asit içerikleri nisbeten düşüktür.

4.3 Bakteriyel EPS'nin Karakterizasyonu

4.3.1 XRD Analizi

B. pseudomycooides U10'dan farklı gelişme ortamlarında elde edilen çözünmüş ve membrana bağlı EPS'lerin XRD analiz sonuçları Şekil 13'te verilmiştir. Sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (K1) ve membrana bağlı EPS'nin (K2), melaslı ortamda üretilen çözünmüş (K3) ve membrana bağlı EPS'nin (K4), PAST ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (K5) ve membrana bağlı EPS'nin (K6) XRD desenleri verilmiştir. EPS ürünlerinin büyük ölçüde amorf karakterde olduğunu, diğer bir ifadeyle çok zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) sergilediğini göstermektedir. K3 ve K4 nolu örneklerde az miktarda tuz (NaCl) belirlenmiş olup, kullanılan besiyeri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. K5 nolu örnek, diğer örneklerin XRD desenlerinden farklı biçimde kristalin bir fazı işaret eden pikler (4.05 ve 3.66 Å) sergilemektedir. Söz konusu pikler literatürde genel olarak polietilen veya özellikle yüksek-yoğunluklu polimer (High-Density Polyethylene-HDPE) olarak bilinmektedir (Kono ve diğ., 2010, Ahmad ve diğ., 2012; Methal ve diğ., 2012). HDPE genellikle petrolden elde edilen sanayi ve imalat sektöründe kullanılmakta olan bir maddedir. K5 örneğinde görülen bu pikin varlığı, XRD analizlerindeki hatalardan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmüştür. Literatür bilgilerine göre petrol kaynaklı bir yüksek yoğunluklu polimer varlığı K5 örneğinin saflaştırıldığı besiyerinde olması muhtemel değildir. Bu nedenle U10 bakterisinin gelişme ortamındaki reaksiyonları sonucu olduğu düşünülemez. Bu nedenle ilgili örneğin XRD analizi tekrar yapılarak pikin varlığının doğrulanmasına karar verilmiştir.

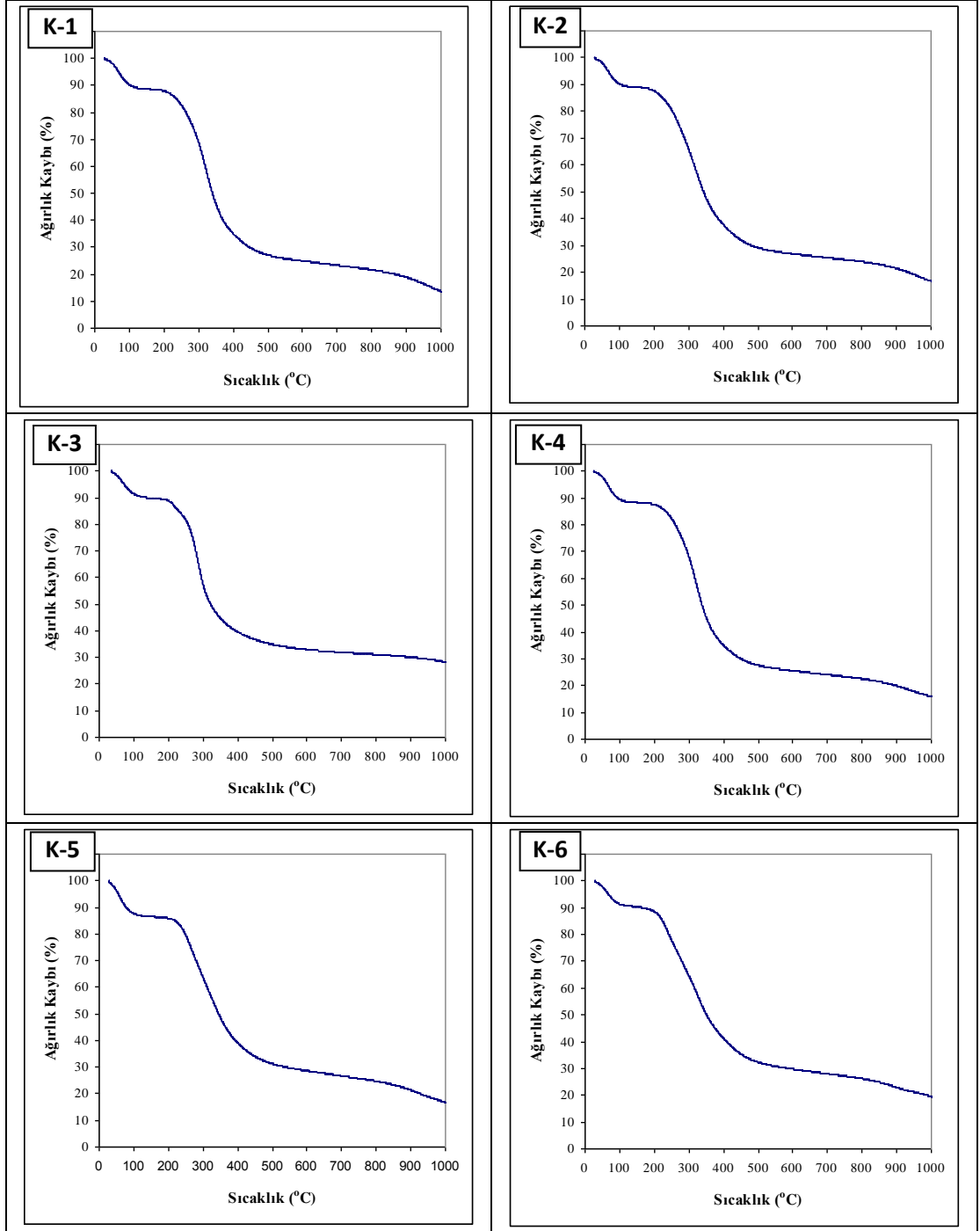


Şekil 13 *B. pseudomycooides* U10 saf EPS'sinin XRD analiz sonuçları.

K1: LB+çözünmüş EPS; **K2:** LB+membrana bağlı EPS; **K3:** melaslı besi ortamı+çözünmüş EPS; **K4:** melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS; **K5:** Past ilaveli LB+çözünmüş EPS; **K6:** Past ilaveli LB+membrana bağlı EPS

4.3.2 TGA analizi

B. pseudomycooides U10'dan farklı gelişme ortamlarında elde edilen çözünmüş ve membrana bağlı EPS'lerin TGA analiz sonuçları Şekil 14'te verilmiştir. Sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (K1) ve membrana bağlı EPS'nin (K2), melaslı ortamda üretilen çözünmüş (K3) ve membrana bağlı EPS'nin (K4), PAST ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (K5) ve membrana bağlı EPS'nin (K6) TGA eğrileri tüm örnekler için benzerlik sunmaktadır. TGA eğrilerine göre artan sıcaklıkla birlikte iki aşamalı bir kütle kaybı söz konusudur. İlk aşama 20-200 °C arasındaki yaklaşık % 10'luk bir ağırlık kaybı olup, su moleküllerinin (veya nem içeriğinin) ve karboksil grubunun kaybına karşılık gelen karşılık gelmektedir. İkinci aşama ise 200-600 °C arasındaki daha belirgin ve şiddetli ağırlık kaybı (yaklaşık % 60-70) olup, EPS'nin pirolizini yansıtmaktadır. Toplamda yaklaşık % 70-80 ağırlık kaybı sunan EPS örnekleri, K3 örneği için daha az ağırlık kaybı olduğunu göstermektedir.

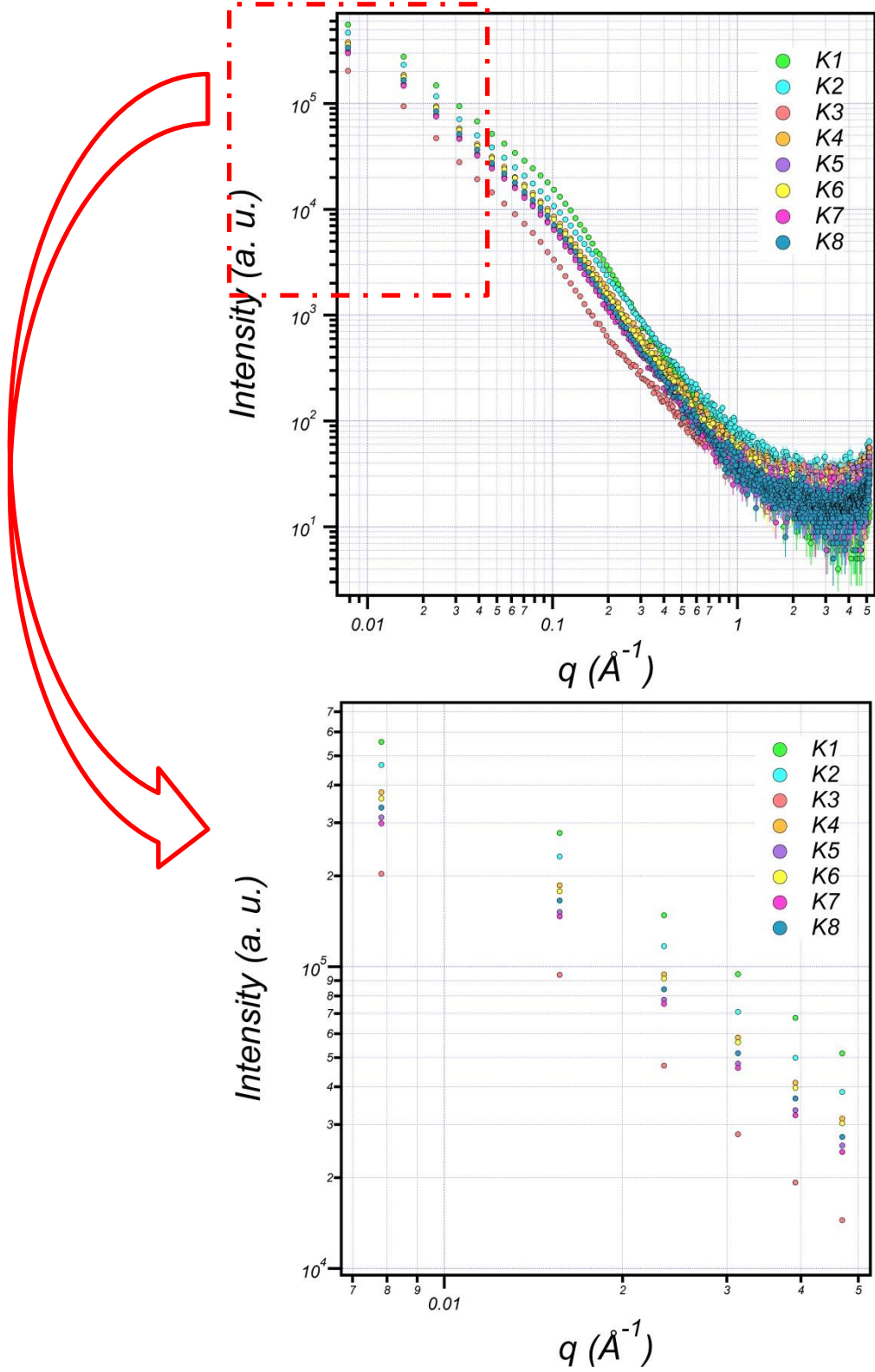


Şekil 14 *B. pseudomycooides* U10 saf EPS'sinin TGA analiz sonuçları

K1: LB çözülmüş EPS; **K2:** LB membrana bağlı EPS; **K3:** melaslı besi ortamı, çözülmüş EPS; **K4:** melaslı besi ortamı, membrana bağlı EPS; **K5:** Past ilaveli LB, çözülmüş EPS; **K6:** Past ilaveli LB, membrana bağlı EPS

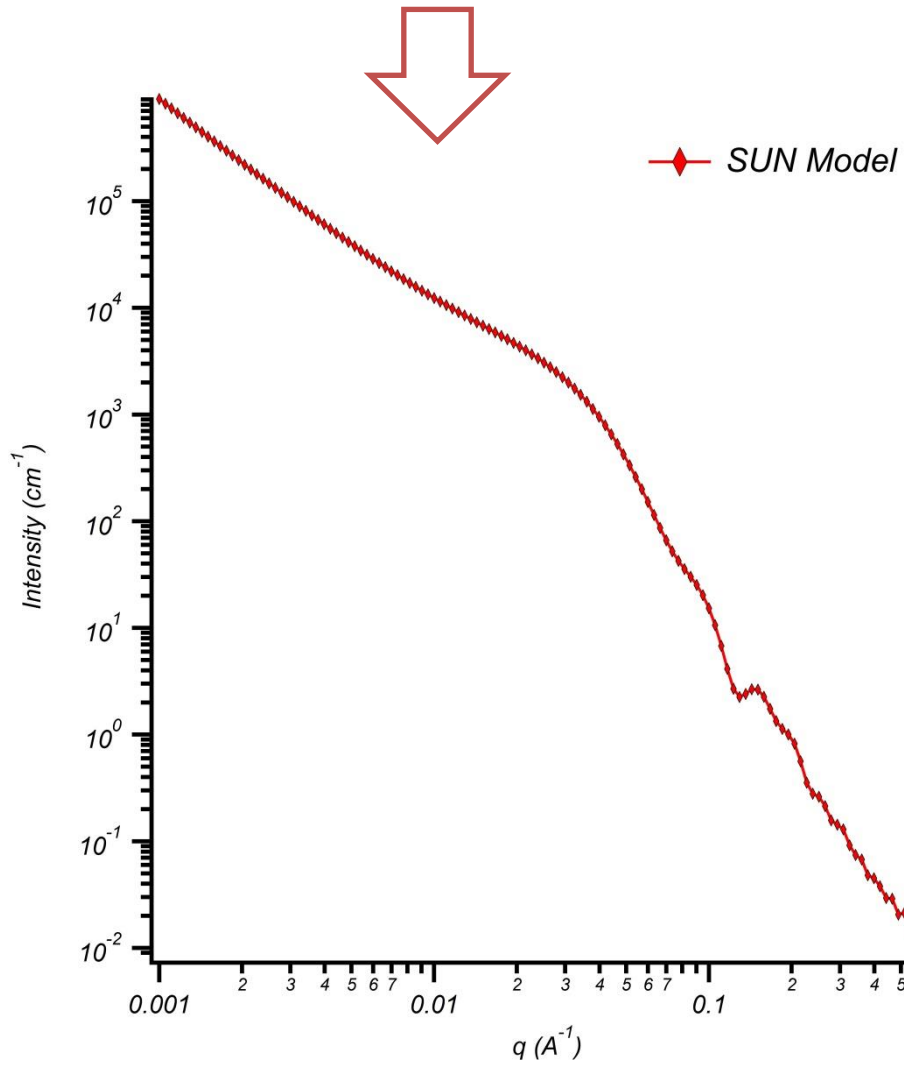
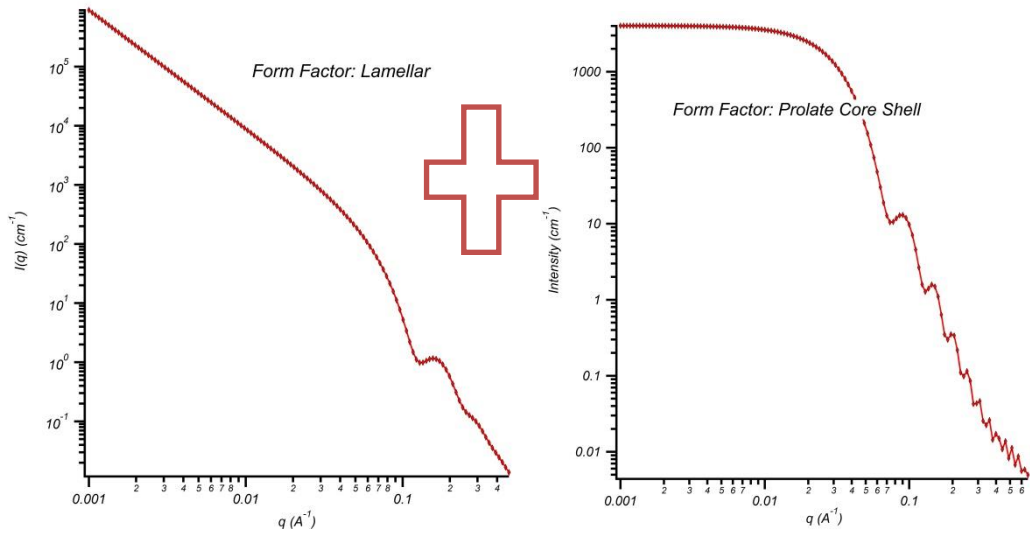
4.3.3 SAXS analizi

EPS'nin özgün yapısı; boyut, şekil ve iki katmanlı kalınlığı da dahil olmak üzere SAXS analizi ile karakterize edilmiştir. EPS'nin yapısını SAXS yöntemi ile karakterize edebilmek için EPS'lerin sulu çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 15'de sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (K1) ve membrana bağlı EPS'nin (K2), melaslı ortamda üretilen çözünmüş (K3) ve membrana bağlı EPS'nin (K4), PAST ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (K5) ve membrana bağlı EPS (K6) ile son olarak glikoz ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (K7) ve membrana bağlı EPS'nin (K8) SAXS eğrileri verilmiştir. SAXS analizi ile ilgili seçilen toplam yapı faktörü grafiği Şekil 16'da, LB ortamında, melas besi ortamında, PAST ilaveli besi ortamında ve glikoz ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş ve membrana bağlı EPS'nin SAXS uyum model grafikleri sırasıyla Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 20'de verilmiştir.



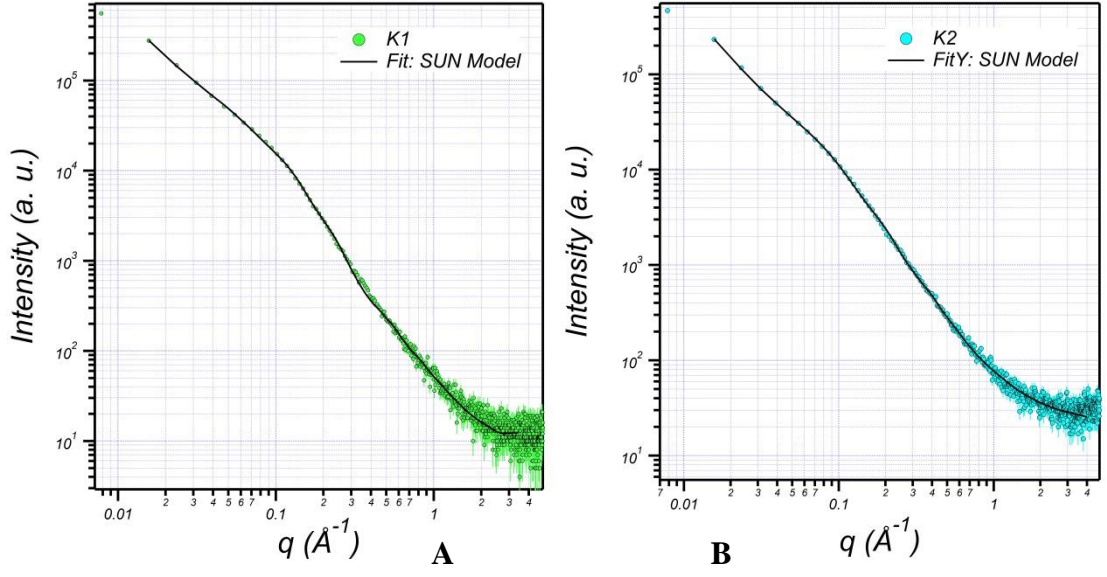
Şekil 15 *B. pseudomycoloides* U10 saf EPS'sinin SAXS eğrisi grafiği

K1: LB+çözünmüş EPS; **K2:** LB+membrana bağlı EPS; **K3:** melaslı besi ortamı+çözünmüş EPS; **K4:** melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS; **K5:** Past ilaveli LB+çözünmüş EPS; **K6:** Past ilaveli LB+membrana bağlı EPS; **K7:** Glukoz ilaveli LB+çözünmüş EPS; **K8:** Glukoz ilaveli LB+membrana bağlı EPS

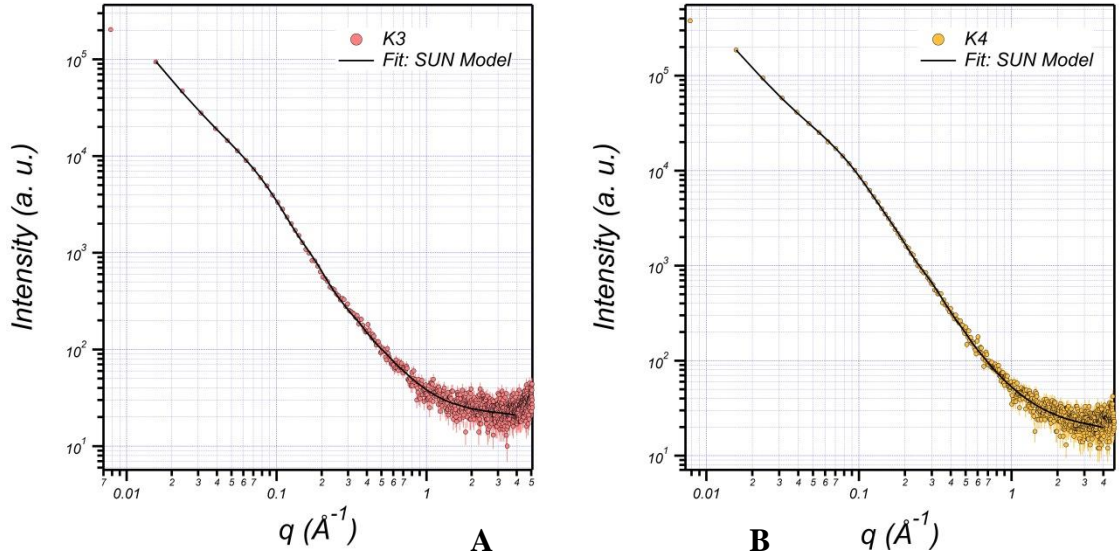


Şekil 16 Seçilen toplam yapı faktörü

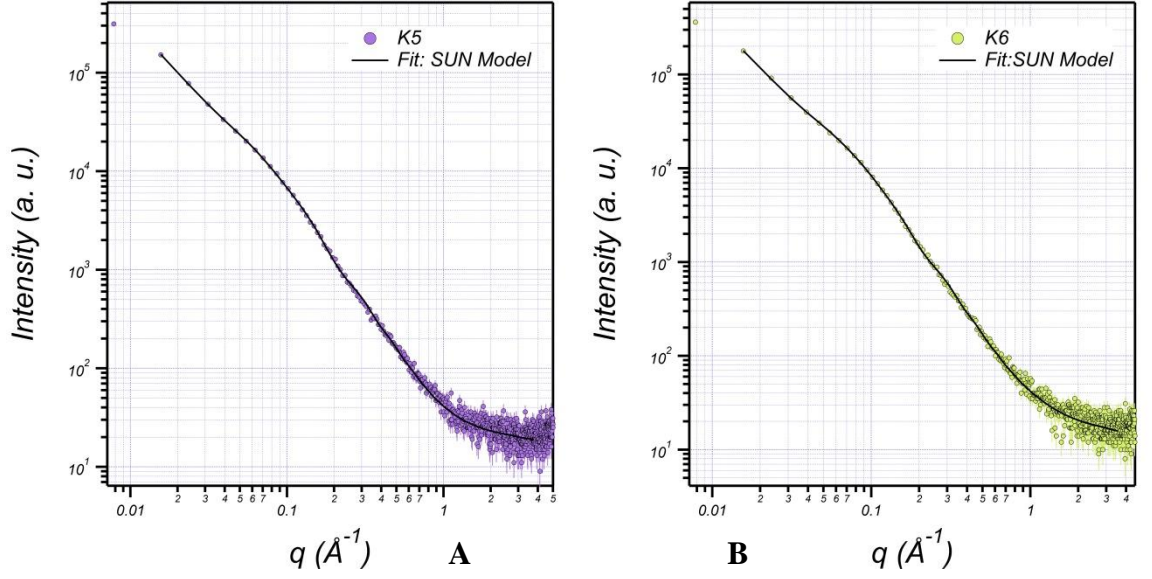
Fit yapılmış grafikleri:



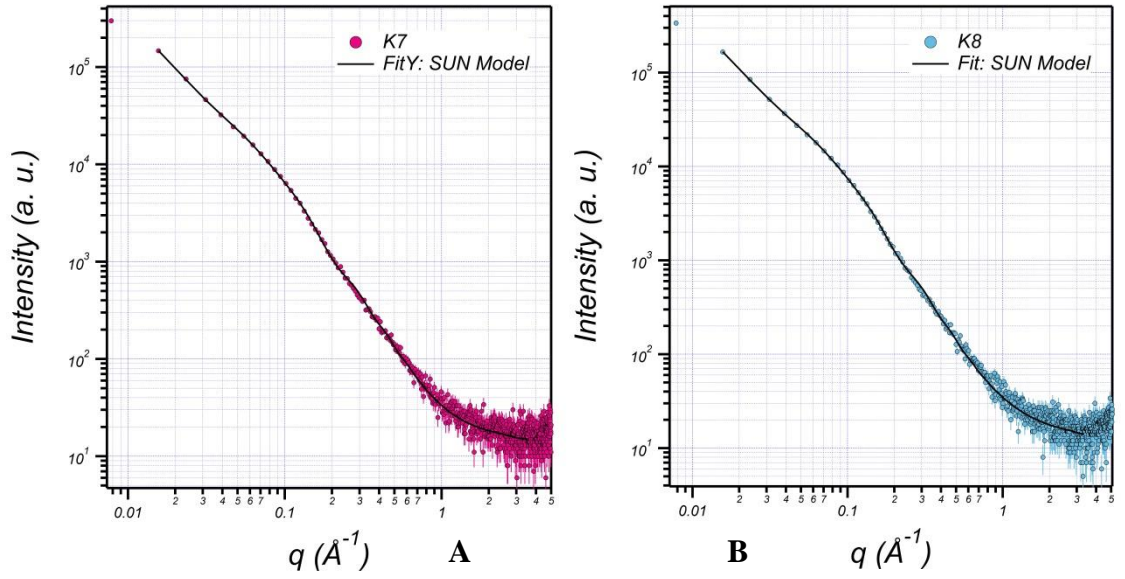
Şekil 17 LB ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum model grafiği



Şekil 18 Melashlı besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum model grafiği



Şekil 19 PAST ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum model grafiği



Şekil 20 Glikoz ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum model grafiği

SAXS eğri verileri IGOR PRO Programı kullanılarak, yapılan hesaplamalar sonunda uyum model fonksiyonlarından faydalanarak grafikleri elde edilmiştir.

U10 bakterisinin farklı ortamlarda ürettiği EPS'nin sulu çözeltisinden elde edilen SAXS verileri ile uyum fonksiyonlarından hesaplanan yapısal bilgiler Tablo 3'de verilmiştir. Ayrıca, yapılan hesaplamalardan elde edilen yapının prolate çekirdek kabuk modelli bir yapı olduğu şematik olarak Şekil 21'de gösterilmiştir. LB

ortamında geliştirilmesiyle üretilen EPS'nin bağlı ve çözülmüş kısımlarındaki iki tabaka kalınlığının aynı olduğu hesaplanmıştır (14.1 Å). Benzer şekilde U10'un LB ortamında geliştirilmesiyle üretilen EPS'nin bağlı ve çözülmüş kısımlarının majör kabukları da birbirine yakın (1001.52, 905.85 Å) değerler göstermiştir.

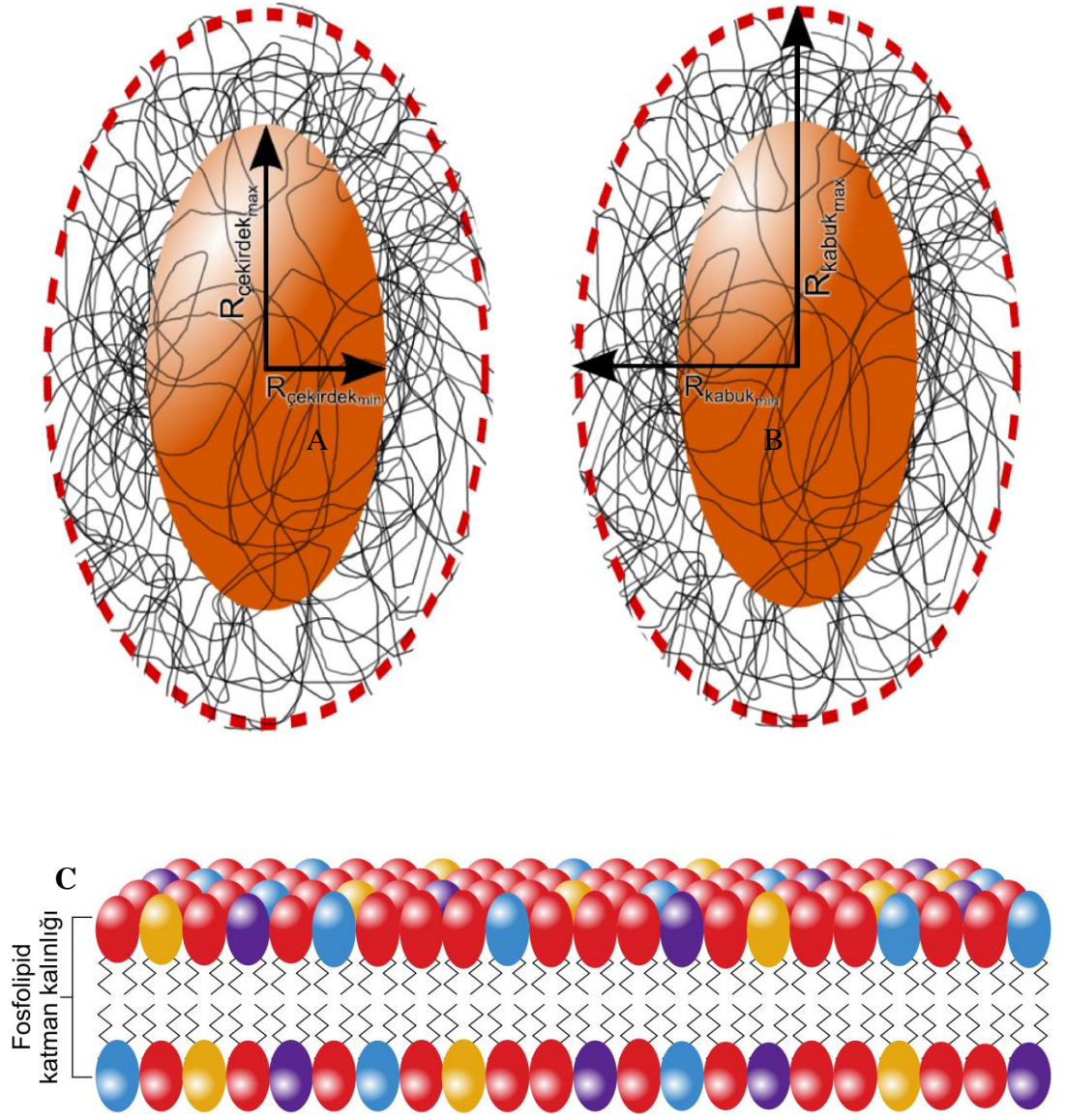
Tablo 3 Parçacık EPS için yapısal bilgiler A ve B

A= **K1**: LB+çözülmüş EPS; **K2**: LB+membrana bağlı EPS; **K3**: melaslı besi ortamı+çözülmüş EPS; **K4**: melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS

	K1	K2	K3	K4
Katman kalınlığı(Å)	14.0699	14.0699	10.9179	12.8379
Maksimum çekirdek yarıçapı (Å)	1001.52	905.85	735.65	850.85
Minimum çekirdek yarıçapı (Å)	301.888	230.423	155.103	200.423
Maksimum kabuk yarıçapı (Å)	1201.46	1100.34	802.04	1002.34
Minimum kabuki yarıçapı (Å)	405.111	301.324	230.9	249.324
SLD çekirdek (Å ⁻²)	1.65781x10 ⁻⁶	1.14876x10 ⁻⁶	1.01876x10 ⁻⁶	1.10876x10 ⁻⁶
SLD kabuk (Å ⁻²)	1.43774x10 ⁻⁶	1.20283x10 ⁻⁶	1.00583x10 ⁻⁶	5.48909
SLD çözücü (Å ⁻²)	9.55781x10 ⁻⁶	9.43674x10 ⁻⁶	9.42067x10 ⁻⁶	12.8379

B= **K5**: Past ilaveli LB+çözülmüş EPS; **K6**: Past ilaveli LB+membrana bağlı EPS; **K7**: Glukoz ilaveli LB+çözülmüş EPS; **K8**: Glukoz ilaveli LB+membrana bağlı EPS

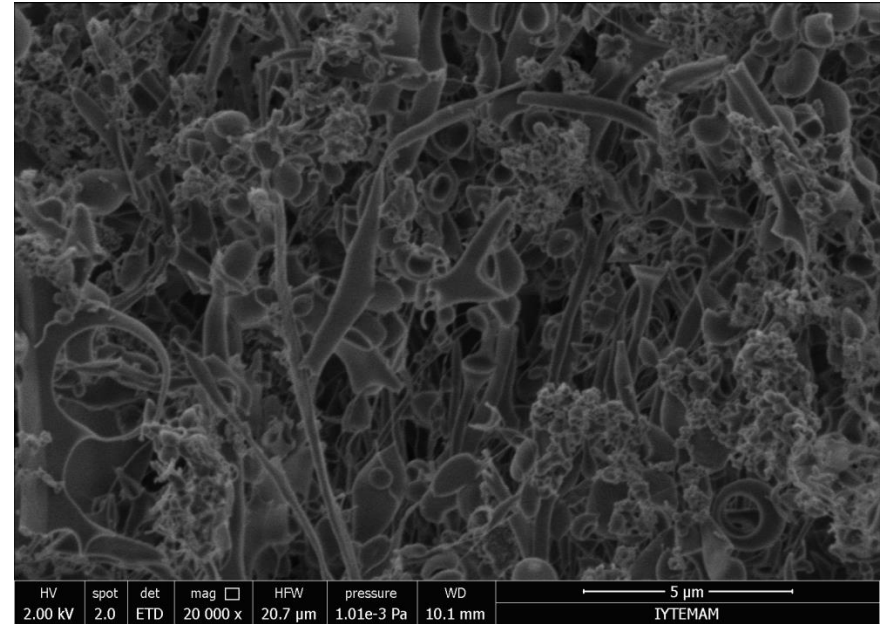
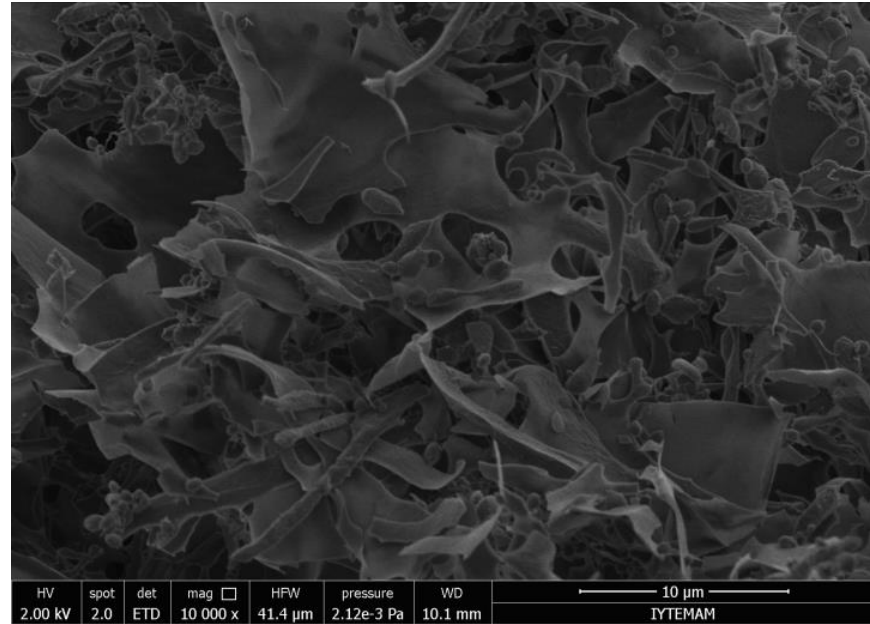
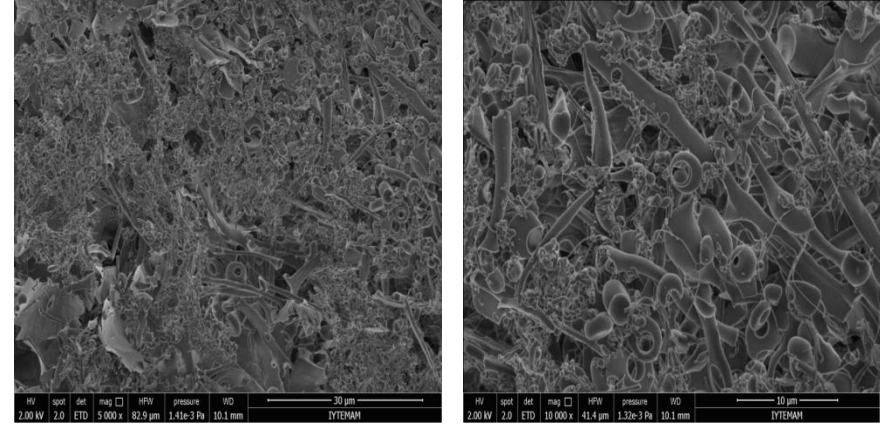
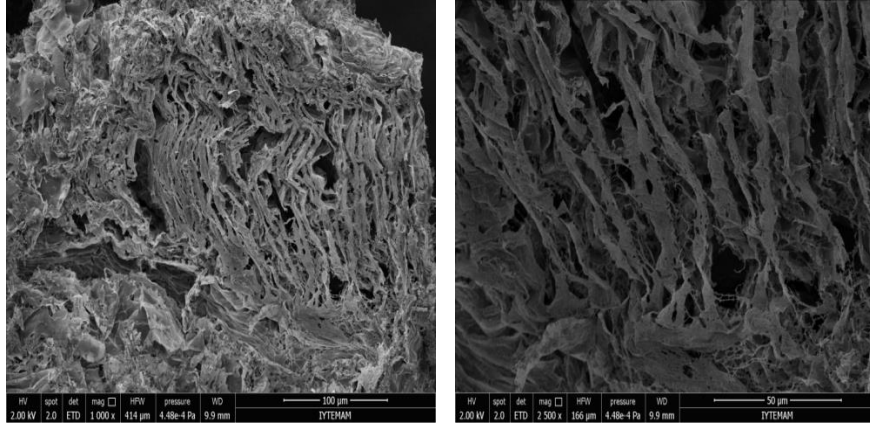
	K5	K6	K7	K8
Katman kalınlığı(Å)	12.0379	12.7379	12.0179	12.5379
Maksimum çekirdek yarıçapı (Å)	845.75	851.85	845.65	849.85
Minimum çekirdek yarıçapı (Å)	196.223	199.423	196.103	199.523
Maksimum kabuk yarıçapı (Å)	998.94	1001.34	998.04	1001.94
Minimum kabuki yarıçapı (Å)	2429	249.304	242.9	249.004
SLD çekirdek (Å ⁻²)	1.20876x10 ⁻⁶	1.10876x10 ⁻⁶	1.20876x10 ⁻⁶	1.10876x10 ⁻⁶
SLD kabuk (Å ⁻²)	1.10283x10 ⁻⁶	1.15283x10 ⁻⁶	1.10283x10 ⁻⁶	1.11283x10 ⁻⁶
SLD çözücü (Å ⁻²)	9.41067x10 ⁻⁶	9.43674x10 ⁻⁶	9.42067x10 ⁻⁶	9.43674x10 ⁻⁶



Şekil 21 EPS'nin prolate çekirdek-kabuk küre modelinin şematik olarak gösterimi
A: R_{min} -Çekirdek ve R_{max} -Çekirdek yarıçap **B:** R_{min} -Kabuk ve R_{max} -Kabuk yarıçap **C:** Yapının oluşturduğu membran modeli

4.3.4 SEM analizi

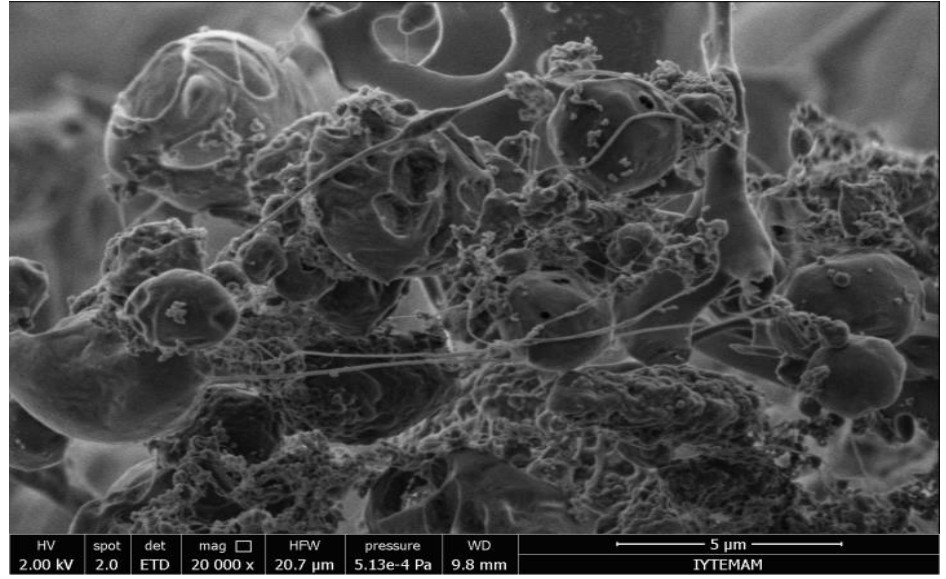
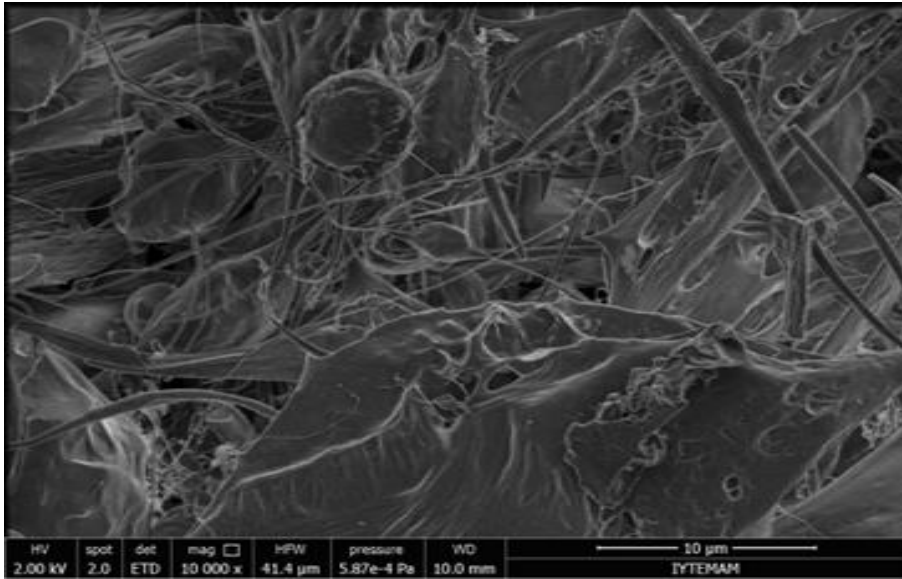
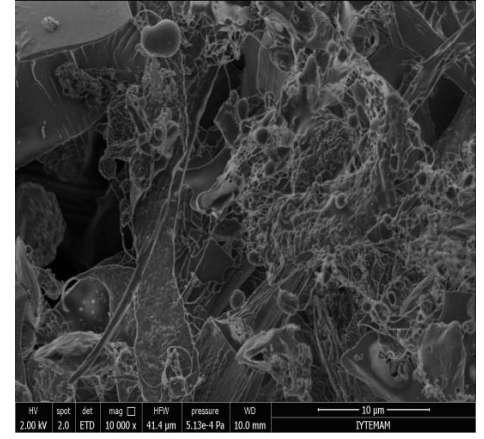
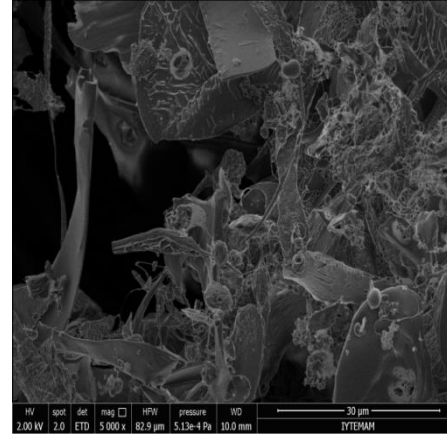
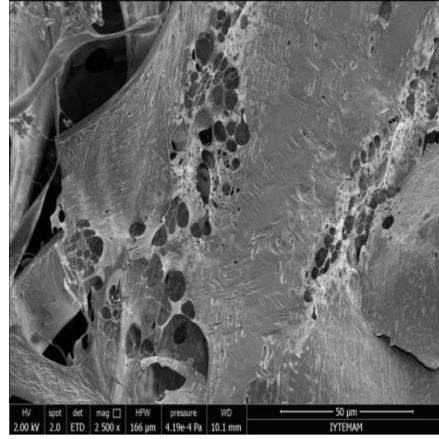
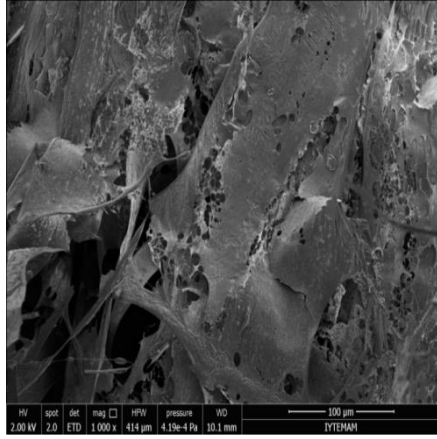
B. pseudomycoïdes U10 bakterisinin saf EPS morfolojisi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için SEM analizi yaptırılmıştır. Farklı kültür ortamlarında geliştirilen mikroorganizmanın ürettiği EPS'nin yapısındaki farklılıklar Şekil 22 – 25'te görülmektedir.



A

B

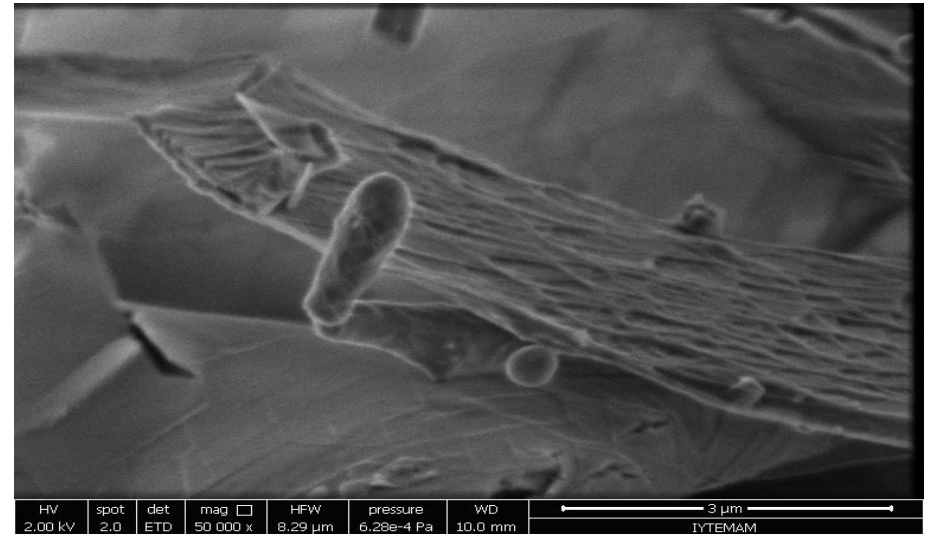
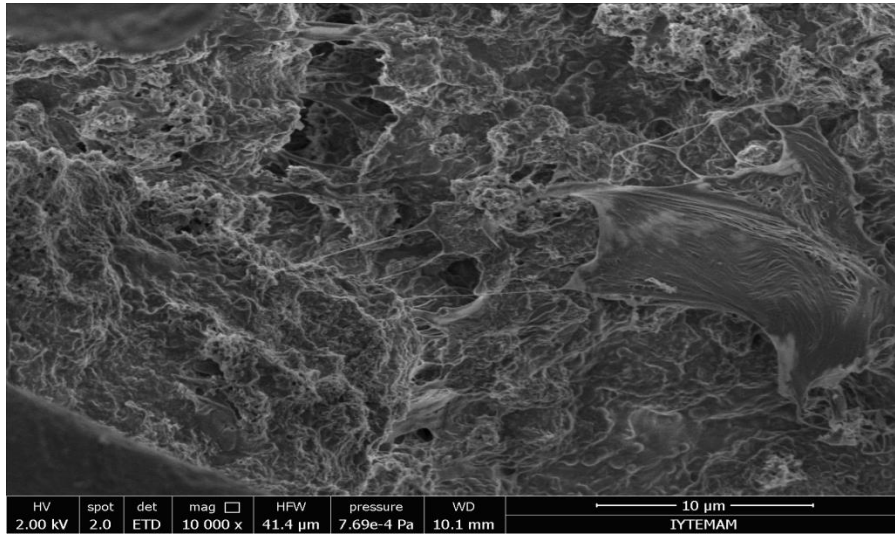
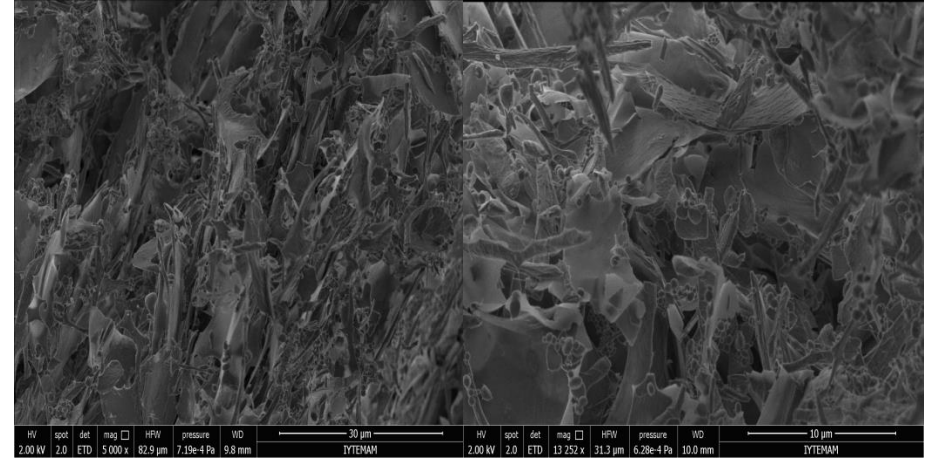
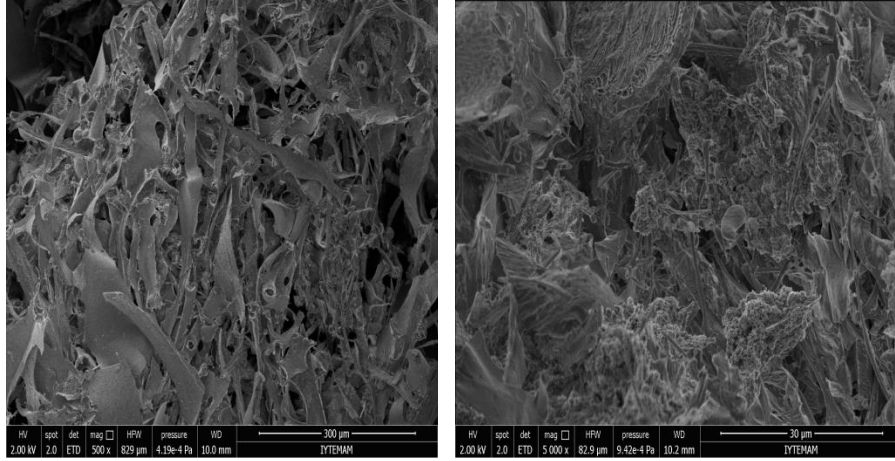
Şekil 22 LB besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü.
A-Çözünmüş EPS, B-Membrana bağlı EPS



A

B

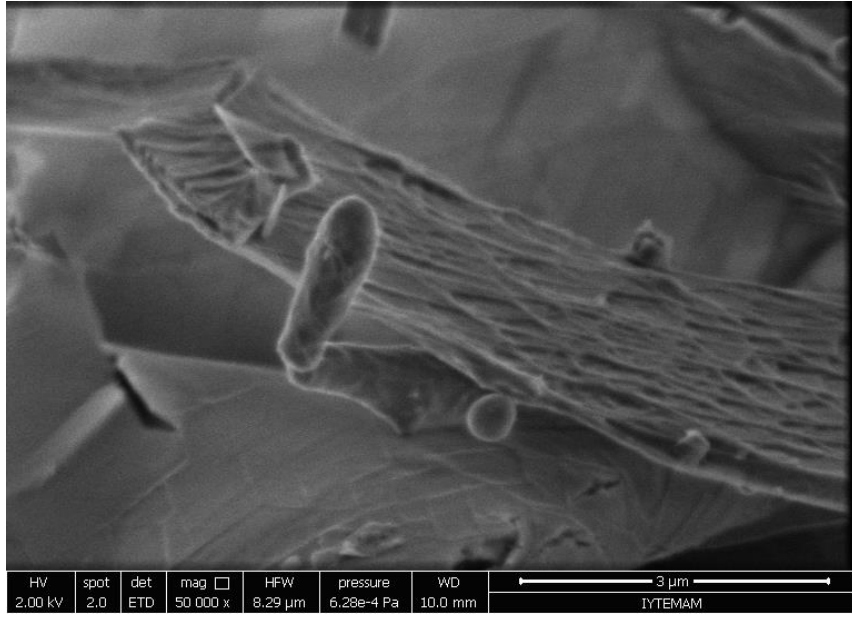
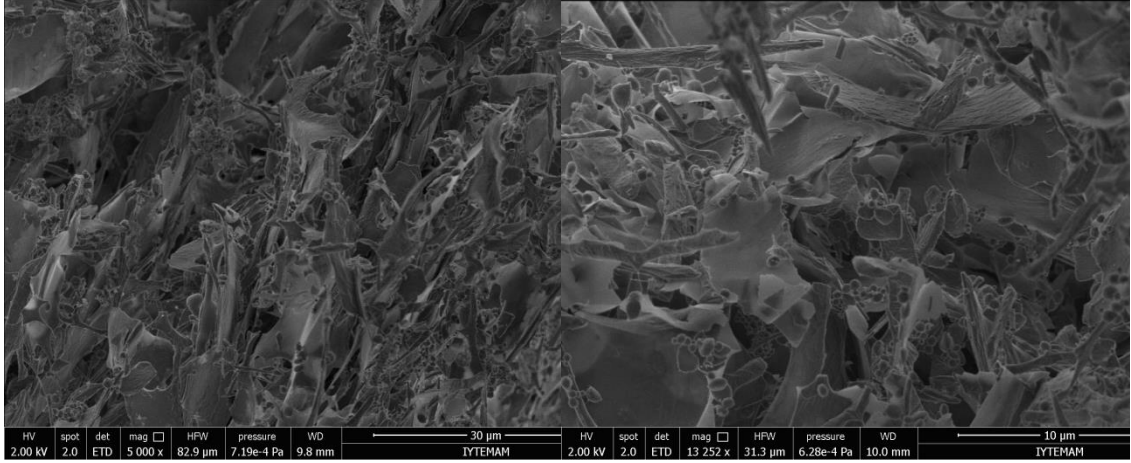
Şekil 23 Peynir altı suyu tozu ilave edilen besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü.
A-Çözülmüş EPS B-Membrana bağlı EPS



A

B

Şekil 24 Melashı besi ortamında geliştirilen U10 bakteri EPS'sinin SEM görünümü. A-Çözünmüş EPS, B-Membrana bağlı EPS



Şekil 25 Glukoz ilave edilen besi ortamında geliştirilen U10 bakteri çözünmüş EPS'sinin SEM görünümü

5. TARTIŞMA

EPS olarak bilinen yapı hücre duvarı dışında bulunan yoğun bir tabakadır. Mikroorganizmaların çoğu EPS sentezleyebilir ve bu sentezlenen EPS suda çözünebilir (Llamas ve diğ. 1999). Birçok bakteri ve maya tarafından üretilen ve mikroorganizmaların dış yüzeyini saran EPS'lerin yapısında polisakkaritlerin yanında protein ve nükleik asitler de bulunur (Lee ve diğ. 1997; Wozniak ve diğ., 2003). EPS yapısı ve miktarı; besiyeri içeriği, inkübasyon şartları gibi birçok faktörden etkilenebildiği için günümüzde, endüstriyel önemi olan sentezleyen yeni mikrobiyal suşların ve kültür şartlarının belirlenmesi için araştırmalar yapılmaktadır. Çeşitli özel uygulamalar için EPS'lerin keşfi önemlidir (Tallon ve diğ., 2003; Looisjesteijn ve diğ., 2000). Biyolojik materyal üretimi ve bakterilerdeki verimin artırılması, fermentasyon şartlarının geliştirilmesiyle doğrudan ilişkilidir. Ayrıca seçilen üretici mikroorganizmanın biyosentetik kapasitesinin araştırılması önemli bir diğer konudur. Üretici mikroorganizmalarda veriminin artırılması; EPS üreten yeni mikroorganizmaların seçilmesi ya da EPS ürettiği bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilmesi ile sağlanmaktadır. Bu amaçla, daha ucuz materyaller ve/veya optimum şartlar kullanılarak, bakterilerde polimerin metabolik düzenlenmeleri araştırılmaktadır. Üretim maliyetinin azaltılması amacıyla bakterilerin en iyi üretim gerçekleştirdiği mineral içeriklerinin doğru olarak tespit edilmesi, sanayi ölçekli üretimlerde yol gösterici olacaktır.

Günümüzde farklı karbon kaynakları ile EPS'nin sentezlendiği çok çeşitli bakteri grubunda rapor edilmiştir (Aslım ve diğ. 2005; Doğan ve diğ. 2014). Örneğin, probiyotik bakteri grubunda yer alan ve yoğurt sanayiinde sıklıkla kullanılan laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının EPS üretimleri optimal sıcaklık, pH ve inkübasyon zamanına bağlı olarak MRS ve M17 besiyerlerinde araştırılmış; EPS üretim miktarlarının bakteri tipi ve besiyerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Aslım ve diğ. 2005). EPS üreten *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* bakterisinin LB12 suşu ile yapılan bir diğer çalışmada ise 18. saatte pH 5,5 değerinde ve 36 °C'de yapılan ölçümlere göre 436 mg/L EPS üretilmiştir (Yusuf, 2009).

Sunulan yüksek lisans tezinin ilk aşamasında üreolitik bir bakteri olan *B. pseudomycooides* U10 bakterisinin EPS üretimi üzerine TSB, LB ve NB besiyerinin etkisi araştırılmıştır. Genel olarak LB besiyerinde EPS üretiminin NB ve TSB besiyerine kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. Bakterinin farklı inkübasyon süresince LB besiyerindeki EPS üretim miktarı 37,26-112,23 mg/L arasında tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4). Bakterinin EPS üretimi TSB besiyerinde 13,7-63,24 mg/L ve NB besiyerinde 19,31-100 mg/L arasında olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en iyi üretimin gerçekleştirildiği LB besiyeri, EPS optimizasyon çalışmalarında tercih edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında bakterinin farklı pH ve sıcaklıkta süreye bağlı olarak EPS içeriği incelenmiştir. Buna göre bakteri maksimum EPS üretimine pH 7 ve 37 C'de (112,23 mg/L, 108. saat) ulaşmıştır.

Çalışmamızda, en yüksek EPS veriminin elde edildiği LB besiyeri, sıcaklık ve pH'da farklı karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi de araştırılmıştır. Farklı karbon kaynakları olarak galakturonik asit, glukuronik asit ve glukoz kullanılmıştır. Genel olarak en iyi üretim glukoz içeren besiyerinde (316,46 mg/L) inkübasyonun ilk 72. saatinde elde edilmiştir. İlerleyen sürelerde EPS miktarında düşüş gözlenirken, bakteri hücre yoğunluğunda dikkate değer bir artış gözlenmiştir. Bu da bize bakterinin üretmiş olduğu EPS'yi gelişim için kullanmış olabileceğini düşündürmüştür.

Peynir altı suyu, şeker pancarı melası, şeker kamışı melası, buğday melası, mısır koçanı, meyve kabukları ve nişasta gibi endüstriyel atıklar biyolojik materyallerin ucuz ve kolay yoldan üretilmesi için önerilmektedir. Şeker pancarı melası ve peynir altı suyunun EPS üretiminde kullanımı bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Fangfang Zhou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada süt ve yeniden sulandırılmış peyniraltı suyu tozu kullanılarak *Rhizobium radiobacter* S10 suşunun bu iki ortamdaki EPS üretimi karşılaştırılmıştır. En yüksek EPS üretimi ($2834,2 \pm 226$ mg/L) bakterilerin %10 (w/w) oranındaki yeniden sulandırılmış PAST'lı ortamda geliştirilmesiyle elde edilmiştir (Zhou ve diğ., 2014). Çalışmamızda, atık materyallerin ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajlarından dolayı endüstriyel fermentasyonlarda sıklıkla kullanılan peynir altı suyu ve melasın EPS üretimine etkisi de incelenmiştir. Çalışmada kullanılan şeker pancarı melası Ankara Şeker Enstitüsü'nden ve Peynir Altı Suyu ise bir ticari firmadan temin edilmiştir.

1 g/L Peynir altı suyu tozu, LB besiyerine ilave edilmiş ve bakteri farklı pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 9,0) ve sıcaklıklarda (25, 30, 37 ve 45 °C) geliştirilmiştir. Genel olarak inkübasyonun ilerleyen saatlerinde EPS üretiminde bir artış görülürken sadece 45 C'de bakterinin ilk 24 saatte (102,21 mg/L) maksimum EPS ürettiği, daha sonraki saatlerde ise EPS miktarında düşüş olduğu dikkati çekmiştir. Ancak tüm şartlar dikkate alındığında bakteri 37 °C'de, pH 7'de 36. saatte maksimum EPS üretimine ulaşmıştır (158,8 mg/L). Bir diğer endüstriyel atık olan melasın besiyeri olarak kullanıldığı optimizasyon şartlarında ise farklı konsantrasyonlarda melas (v/v; 0,5/100; 1/100; 1,5/100 ve 2/100) hazırlanmış ve bakterinin EPS üretimi incelenmiştir. Buna göre en iyi üretime 2/100 v/v melas besiyerinde 37 °C'de ve pH 7,5'ta ulaşılmıştır. Bakteri bu şartlarda 120. saatte 646,74 mg/L miktarında EPS üretmiştir.

EPS'nin kimyasal kompozisyonu tablo 2'de verilmiştir. Genel olarak çözünmüş ve membrana bağlı EPS'deki şeker ve protein miktarları kaynağa göre değişkenlik göstermiştir. EPS'deki şeker oranı, melas besiyerinde ve glukoz içeren gelişme ortamında artarken aynı ortamdaki protein içeriğinde bir azalma gözlenmiştir (Bkz. Tablo 2). Melas besiyerinde saflaştırılan çözünmüş EPS'deki şeker miktarı 466 mg/g iken glukozlu ortamda 464 mg/g olarak tespit edilmiştir. Melasın aksine, bakteri peynir altı suyu tozu ilaveli (PAST) besiyerinde geliştirildiğinde, bakteriyel EPS'deki şeker miktarı azalırken protein miktarında artış olmuştur. Buna göre PAST içeren ortamda çözünmüş EPS'de 182 mg/g ve membrana bağlı EPS'de 308 mg/g miktarında protein tespit edilmiştir. Aynı şartlarda çözünmüş EPS'deki şeker miktarı 150 mg/g ve membrana bağlı EPS'de ise 106 mg/g olarak belirlenmiştir. Kontrol olarak düşünülen LB besiyerinde ise şeker ve protein içeriklerinin her iki tip EPS'de birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Bu da bize bakterinin EPS sentezi sırasında, melas ve glukoz içeren ortamda EPS'deki karbohidrat miktarını arttırdığını, PAST içeren ortamda ise protein miktarını arttırdığını göstermiştir. Yıllarca saf kültürlerdeki EPS'nin ana içeriğinin karbohidrat olduğu düşünülmüştür (Sutherland, 1997; Sutherland and Kennedy, 1996). Fakat farklı bakterilerle yapılan çalışmalarla EPS'de karbohidrat dışında özellikle ekzoenzim olmak üzere büyük miktarda protein varlığı da rapor edilmiştir (Dignac et al., 1998). Elde ettiğimiz sonuçların literatür bilgileri ile paralel nitelikte olması dikkat çekicidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *B. pseudomycoïdes* U10 bakterisinin farklı ortamlarda ürettiği EPS'nin; miktar, içerik ve ince yapı karakterizasyonu yapılmıştır. Bakteriyel EPS üretimine melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atık materyallerin etkisi ortaya konmuştur. Mineral ve besiyeri tipine göre EPS deki protein ve karbohidrat miktarlarının değiştiği tespit edilmiştir. XRD analizi ile EPS ürünlerinin büyük ölçüde amorf karakterde olduğunu diğer bir deyişle çok zayıf bir mikro düzenlenme sergilediği görülmüştür. Fakat K5 nolu örnek, diğer örneklerin XRD desenlerinden farklı biçimde kristalin bir fazı işaret eden pikler sergilemektedir. *B. pseudomycoïdes* U10'nun ürettiği bakteriyel EPS yapısının içi boş prolate şeklinde olduğu SAXS analizi ile belirlenmiştir. EPS örneklerinin TGA eğrileri incelendiğinde kütle iki aşamalı olarak kaybolduğu görülmektedir. Tüm örneklerde yaklaşık 0-100 °C içinde belli bir miktar kütle kaybı gözlenip bu kaybolan kütle EPS'nin içindeki nem olduğu düşünülmektedir. Asıl EPS yapısının yaklaşık 200 °C civarında bozunduğu görülmektedir. Bu da bize üretilen EPS'nin ticari kullanım alanına göre kaç derece sıcaklığa kadar dayanabildiği hakkında önemli bir bilgi vermektedir. Örneğin yine bu bilgi, ameliyat ipi üretiminde kullanılacak U10 bakterisinin EPS'si için sterilizasyon şartlarını belirlemede yardımcı olabilir. SEM görüntüleri incelendiğinde EPS'nin üretildiği ortamın EPS yapısında meydana getirdiği değişiklikler görsel olarak çok rahat görülmektedir. LB ortamında geliştirilen U10 EPS'sinin 100 µmlik görüntüsü daha çok lamelar (yapraksı) biçimde iken (bkz. Şekil 22-A) aynı ortama PAST ilave edilince elde edilen EPS'nin 100 µmlik görüntüsü daha çok bir bütün halinde gerilmiş bir yüzey şeklindedir (bkz. Şekil 23-A).

EPS'ler biyomateryaller olarak kullanılabilirliği için, bu çalışma sonucu *B.pseudomycoïdes* U10 suşunun dört farklı ortamda ve her bir ortamda ürettiği bağlı ve çözünmüş EPS yapısı araştırılarak ileride bu araştırmalar geliştirilip imkanlar dahilinde EPS'nin kullanılacak alana göre ticari olarak üretilmesi istenilen bir hedefdir. Örneğin, melas gibi pancarın işlenmesinden sonra ortaya çıkan doğal bir endüstriyel atık ortamda üretilen EPS, ilaç kaplama sanayiinde ya da mide barsak florasını düzenlemek üzere direkt ilaç sektöründe kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

Ahmad,M., Wahit, M.U., Abdul Kadir, M.R., Dahlan, K.Z.M., “Mechanical, Rheological, and Bioactivity Properties of Ultra High-Molecular-Weight Polyethylene Bioactive Composites Containing Polyethylene Glycol and Hydroxyapatite.” *The ScientificWorld Journal*, Volume 2012, Article ID 474851, 13 pages, doi:10.1100,474851, (2012).

Aslim, B., Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Durlu Özkaya, F., Yüksekdağ, Z. N. ve Ediz, N. Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretiminin belirlenmesi. Proje No: TBAG-2090 (101T129), 242, (2005a).

Aslim., B., Yuksekdag., Z.N., Beyatli Y., Mercan., N., “Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth condition”. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:673–677, (2005).

Becker A., F. Katzen A., Pühler and L., Ielpie. “Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152, (1998).

Calazans G. M. T., Lopes C. E., Lima R. M. O. C., de Franc FP., “Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains”, *Biotechnol Lett*, 19, 19-21,(1997).

Calazans, G.M.T., Lopes, C.E., Lima R.M.O.C., De Franc F.P., “Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains”, *Biotechnol Lett.*, 19:19-21, (1997).

Cerning, J., “Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev*, 87, 113- 130, (1990).

Chamberlain D., G. and Choung J. J., “The Importance of Rate of Ruminant Fermentation of Energy Sources in Diets for Dairy Cows, In: Recent Advances in Animal Nutrition”, *Nottingham University Press*, Chapter, 1, 3-27, (1995).

De Beer, D., Srinivasan, R. ve Stewart, P. S., “Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection”, *Appl Environ Microbiol.*, 60 (12), 4339-4344, (1994).

Demirci, A. Ş. ve Arıcı, M. “Mikrobiyal yollarla üretilen gumlar ve gıda sanayinde kullanımı”, Türkiye 10.Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum, (2008).

Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., “Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure”. *Water Sci. Tech.* 38 (8/9), 45–53, (1998).

Dogan, M.N.; Kantar, C.; Dogan. “Effect of Chromium and Organic Acids on Microbial Growth and Exopolymeric Substance Production by *Pseudomonas* Bacteria”. *Clean – Soil, Air, Water*, 42 (5), 674–681, (2014).

Drennan M. J., “valuation of Molasses and Ensiled Pressed Beet Pulp for Beef Production. In: Feeding Value of By-Products and their use by Beef Cattle, Commission of the European Communities Seminar. (Ed) Ch. V. Boucque, 171-183, (1985).

Sheng G.P., Yu Q., Li Y.X., “Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems”. *Biotechnology Advances* 28,882–894, (2010).

Frolund B, Palmigren R, Keidin GK, Nielsen PH. “Extraction of extracellular polymer from activated ludge using a cation exchange resin”. *Water Res*; 30:1749–58, (1996).

Gugliandola, C., Maugeri, T.L., Cacamo, D., Stackebrandt E., “Bacillusaeolius sp. nov a novel thermophilic, holophilic marine Bacillus species from Eolian Islands”, *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 172-176 (2003).

Gugliandola, C., Maugeri, T.L., Cacamo, D., Stackebrandt E., “Bacillusaeolius sp. nov a novel thermophilic, holophilic marine Bacillus species from Eolian Islands”, *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 172-176, (2003).

Hammaddeler, peynir altı suyu tozu, [online], (2015), www.hammaddeler.com

Karaca, H., Dinçer, E., Kıvanç, M., “Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri”, *Akademik Gıda*, 8: 32-38 (2010).

Kenne, L., ve Lindberg, B., in Aspinall, G.O., “The Polysaccharides, vol. 2, Academic Press”. New York, 287-363, (1983).

Kitazawa H., T. Toba T., Itoh N., Kumano S., Adachi and T., Yamaguchi, “Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated Lactococcus laktis subsp. cremoris Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk”, *Animal Sci. Technol.*, 62, 277-283, (1991).

Kives J, Orgaz B, SanJos'e C. “Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from Pseudomonas fluorescens B52”. *Colloids Surfaces B*, 52: 123–127,(2006).

Kono, A., Miyakawa, N., Kawadai, S., Goto, Y., Maruoka, T., Yamamoto, M., Horibe, H., “Effect of cooling rate after polymer melting on electrical properties of high-density polyethylene/Ni composites”. *Polymer Journal*, 42, 587–591, (2010).

Lamothe G. T., “Molecular Characterization of Exopolysaccharide Biosynthesis by Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus”. PhD thesis, L'Universite de Lausanne, Lausanne, Switzerland, (2000).

Lee I. Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., and Kwon G. S., "Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16, 71-75, (1997).

Liu Y, Fang HHP. "Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge". *Crit Rev Environ Sci Technol*; 33:237-73,(2003).

Llamas, I., Bejar, V., Argondona, M., Quesada, E., Moral, A., "Chemical Metagenesis of *Halomonas eurihalina* and Selection of 43 Exopolysaccharide Deficient Variants", *Biotechnology Letters*, 21: 367-370 (1999).

Looisjesteijn P. J., Boels I. C., Kleerebezem M., Hugenholtz., "Regulation of Exopolysaccharide Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the Sugar Source", *J., Appl. Environmental Microbiology*, 65, 5003-5008, (1999).

Looisjesteijn P. J., Van Casteren W. H. M., Tuinier R., Doeswijk-Voragen C. H. L., Jhugenholtz J., "Influence of Different Substrate Limitations on the Yield, Composition and Molecular Mass of Exopolysaccharides Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in Continuous Cultures", *Journal of Applied Microbiology*, 89, 116-122, (2000).

Mc Groarty, J. A., "Cel surface appandages of *Lactobacilli*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 124, 405-410, (1994).

Methal, A., Tembe, G., Parikh, P., Methal, G., "Titanasilsesquioxane-Alkylaluminum Catalyst System for Ethylene Polymerization". *Modern Research in Catalysis*. 23588,14 pages DOI: 10.4236/mrc.13005, (2012).

Milci, S. ve Yaygın, H. "Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları". *GIDA*, 30(2), 123-129, (2005).

Moloney A. P., Almiladi A. A., Drennan M. J. and Caffrey P. J.,. "Rumen and Blood Variables in Steers Fed Graas Silage and Rolled Barley or

Sugarcane Molasses-Based Supplements”, *Animal Feed Science and Technology*, 50, 37-54, (1994).

Morgan, J.W., Forster, C.F., Evison, L.A., “Comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges”, *Water Res.*,24: 743- 750 (1990).

Murat Yılmaz ve Gökşen Yuvalı Çelik.. “Bakteriyal Ekstraselüler Polissakkaritler (EPS)” , *Orlab-on-Line Mikrobiyoloji Dergisi* Cilt:05, Sayı:2, Sayfa:7-13,(2007).

Murphy J. J., “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, (1999).

Nakajima H., Y. Suzuki, H. Kaizu, and T. Hirota,. “Cholesterol Lowering Activity Of Ropy Fermented Milk”. *J. Food. Sci*, 57, 1327 1329, (1992a).

Nielsen PH, Jahn A. “Extraction of EPS Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function”. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 49–72. Chapter 3, (1999).

Potera, C., “Forging a link between biofilms and disease”. *Science*, 283(5409): 1837, 1839,(1999).

Ramesh H. P. and Tharanathan R. N., “Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value”, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173.10,(2003).

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. ve Zoon, P., “An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *Int. Dairy J.*, 12, 163- 171, (2002).

Shankar S, Ye RW., Schlichtman D., Chakrabarty AM., “Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression”, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 70, 221–255, (1995).

Stingle F., R. R. Neeser., and B. Mollet, “Identification and Characterization of the EPS (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6”. *J. Bacteriol*, 178, 1680-1690, (1996).

Sutherland I. W., “Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides”, *Tibtech.*, 38, 41-47,(1998a).

Sutherland I. W., “Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides”, *Trends Biotechnol*, 16, 41-46, (1998b).

Sutherland I. W., “Microbial Exopolysaccharide synthesis, In Extracellular Microbiya Polysaccharide”. *Chem. Soc.*, Washington., 40-57, (1977).

Sutherland I. W., “Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides”, Cambridge University Press, Cambridge, (1990).

Sutherland I. W., “Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework”. *Microbiology-SGM*;147:3–9, (2001).

Sutherland, I. W., Kennedy, L., “Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp”. *Microbiology* 142, 867–872, (1996).

Sutherland, I. W., “Microbial exopolysaccharides—structural subtleties and their consequences”. *Pure Appl. Chem.* 69, 1911–1917, (1997).

Tallon R., Bressollier P., Urdaci M. C., “Isolation and Characterization of two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56”. *Research in Microbiology*, 154, 705-712, (2003).

Tunçtürk Y., “Influence of starter culture strains, pH adjustment and incubation temperature on exopolysaccharide production and viscosity in whey”. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (17), pp. 4222-4228, 1 September, (2009).

Turkseker, ürünler: melas, [online], (2015), www.turkseker.gov.tr/urunler

Van Kranenburg R., H. R. Vos. I. I., Van Swam, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos., “Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from

Lactococcus lactis and other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity". *J. Bacteriol.*, 181, 6347-6353, (1999).

Van Kranenburg R., J. D. Marugg., I. I. Van Swam., N. J. Willem, and W. M. de Vos., "Molecular Characterization of the Plasmid-Encoded EPS gene cluster Essential for Exopolysaccharide Biosynthesis in Lactococcus lactis". *Mol. Microbiol.*, 24, 387-397, (1997).

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P., "Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation". *Molecules.*, 14, 2535-2554, (2009).

Watnick, P. ve Kolter, R., "Biofilm city of microbes. Minireview", *J Bacteriol.*, 182 (10), 2675-2679, (2000).

Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M., "Alginate is not a Significant Component of the Extracellular Polysaccharide Matrix of PA14 and PAO1 Pseudomonas aeruginosa biofilms", *PNAS*, 100: 7907-7912, (2003).

Yalpani M., Sandford P. A., "Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications". *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, 311-35, (1987).

Zhou F., Wu Z., Chen C., Han j., Ai L., Guo B., "Exopolysaccharides produced by Rhizobium radiobacter S10 in whey and their rheological properties", *Food Hydrocolloids* 36 ,362-368, (2014).

EKLER

8. EKLER

EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler

Luria Bertani Miller (LB) (Merck, Sigma, Fluka)

- Tripton 10,0 g/L
- Yeast extract 5,0 g/L
- Sodyum klorür 10,0 g/L

Nutrient Broth (NB) (Merck, Sigma, Fluka)

- Beef extract 5,0 g/L
- Pepton 5,0 g/L
- Sodyum klorür 10,0 g/L

Triptic Soy Broth(TSB) (Merck, Sigma, Fluka)

- Tripton 17,0 g/L
- Soya unu peptonu 3,0 g/L
- D(+) glukoz 2,5 g/L
- Sodyum klorür 5,0 g/L
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g/L

Triptic Soy Agar (TSA) (Merck)

- Tripton 17,0 g/L
- Soya unu peptonu 3,0 g/L
- D(+) glukoz 2,5 g/L
- Sodyum klorür 5,0 g/L
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g/L
- Agar 15,0 g/L

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. İzole edilen suşlar, TSA içeren tüplerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

EPS saflaştırma ve içerik tayininde kullanılan kimyasallar

- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich)
- Trikloraasetik asit (TCA) (Merck)
- Fenol (Merck)
- H₂SO₄ (Merck)
- Sodyum-potasyum tartarat-NaCO₃ reaktifi: 100 ml saf suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 10 g NaCO₃ çözülür.
- Sodyum-potasyum tartarat-CuSO₄.5H₂O reaktifi: 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 0,1 g CuSO₄. 5H₂O 9 ml saf suda çözülür. Üzerine 1 ml 1 N NaOH ilave edilir.
- Folin-Ciocolteu reaktifi: 1 ml'si 15 ml saf su ile seyreltilir (çalışma esnasında günlük hazırlanır).
- Sulfamik asit (Sigma-Aldrich)
- Sodyum tetraborat (Sigma-Aldrich)
- m-hidroksifenil (Sigma-Aldrich)

Peynir Altı Suyu Tozu

www.hamaddeler.com sitesinden 1 kg peynir altı suyu tozu ticari olarak satın alınmıştır.

Hücre Yoğunluğu Tabloları :

Tablo 4 *B.pseudomycoides* için farklı besi ortamında hücre yoğunluğu (37°C) (630 nm)

saat	TSB	LB	NB
24	0,39±0,01	1,13±0,25	0,64±0,23
36	1,21±0,14	1,60±0,05	1,13±0,13
48	0,59±0,09	1,04±0,98	1,03±0,03
60	1,05±0,07	1,88±0,22	1,33±0,09
72	1,14±0,10	1,34±0,05	1,29±0,13
84	1,26±0,14	1,58±0,10	1,28±0,16
96	1,39±0,04	2,03±0,37	1,47±0,03
108	1,47±0,06	1,75±0,03	1,59±0,00

Tablo 5 LB besi ortamında pH etkisi hücre yoğunluğu (37°C) (630 nm)

saat	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 9,0
36	1,12±0,09	1,60±0,06	1,54±0,30	1,45±0,45	0,61±0,02
48	0,80±0,06	1,04±0,98	1,07±0,14	1,05±0,14	0,67±0,06
60	0,90±0,02	1,88±0,22	1,00±0,03	0,94±0,01	0,87±0,02
72	0,95±0,06	1,34±0,05	0,94±0,09	0,82±0,01	0,95±0,11
84	1,09±0,03	1,58±0,10	1,25±0,19	1,04±0,01	1,25±0,21
96	1,10±0,04	2,03±0,37	1,10±0,12	0,97±0,06	1,26±0,21

Tablo 6 LB ortamında sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu (pH:7) (630 nm)

saat	25 °C	30 °C	37 °C	45 °C
24	1,24±0,71	1,82±0,15	0,29±1,19	0,90±0,38
36	1,29±0,34	1,19±0,15	0,14±0,37	1,09±0,51
48	0,94±0,12	0,93±0,06	0,03±0,01	0,80±0,02
60	1,05±0,07	0,81±0,27	0,08±0,38	1,09±0,47
72	1,30±0,17	1,13±0,28	0,19±0,23	0,72±0,03
84	1,29±0,14	1,39±0,16	0,11±0,14	0,76±0,02
96	0,84±0,11	1,03±0,23	0,20±0,21	1,04±0,02

Tablo 7 Past ilaveli ortamda pH etkisi hücre yoğunluğu (37°C) (630 nm)

saat	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8	pH 9
36	1,11±0,00	1,50±0,15	1,26±0,27	1,02±0,06	1,00±0,00
48	1,29±0,12	1,17±0,15	0,93±0,08	1,05±0,06	0,95±0,05
60	1,15±0,03	1,22±0,08	0,93±0,03	0,87±0,02	0,90±0,05
72	1,00±0,03	1,19±0,08	1,01±0,06	1,06±0,04	0,99±0,09
84	1,27±0,13	1,24±0,03	1,23±0,00	1,24±0,04	1,15±0,12
96	1,38±0,14	1,23±0,03	1,26±0,01	1,25±0,11	1,19±0,09

Tablo 8 Past ilaveli ortamda sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu (pH:7) (630 nm)

saat	25 °C	30 °C	37 °C	45 °C
24	1,37±0,78	1,30±0,18	1,35±0,13	1,72±0,19
36	0,81±0,01	1,27±0,23	1,50±0,15	0,77±0,11
48	0,84±0,03	1,47±0,11	1,17±0,15	0,97±0,11
60	0,85±0,18	1,60±0,19	1,22±0,08	1,00±0,62
72	1,17±0,41	1,68±0,17	1,19±0,08	1,77±0,46
84	1,18±0,33	1,65±0,11	1,24±0,03	1,10±0,29
96	1,18±0,28	1,66±0,43	1,23±0,03	1,41±0,11

Tablo 9 Melaslı ortamda EPS üretimi pH etkisi hücre yoğunluğu (37 °C) (630 nm)

saat	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8	pH 9
24	0,04±0,00	0,61±0,02	0,29±0,03	0,13±0,00	0,21±0,16
36	0,07±0,02	0,63±0,01	0,96±0,69	0,20±0,00	0,15±0,01
48	0,08±0,00	0,65±0,01	0,81±0,65	0,25±0,01	0,15±0,00
60	0,10±0,02	0,54±0,02	1,27±0,12	0,20±0,05	0,27±0,05
72	0,10±0,01	0,71±0,03	0,85±0,50	0,59±0,37	0,34±0,20
84	0,19±0,06	1,22±0,57	0,79±0,44	1,37±0,40	0,60±0,46
96	0,20±0,02	1,03±0,55	0,83±0,42	0,92±0,55	0,90±0,72
108	0,13±0,00	1,34±0,21	1,20±0,61	1,04±0,18	1,21±0,56
120	0,20±0,00	1,53±0,27	1,38±0,32	1,65±0,07	1,76±0,45

Tablo 10 Melaslı ortamda EPS üretimine sıcaklık etkisi hücre yoğunluğu (37 °C) (630 nm)

saat	25 °C	30 °C	37 °C	45 °C
24	1,20±0,40	1,33±0,30	0,29±0,03	0,21±0,06
36	0,12±0,10	0,84±0,12	0,96±0,69	0,19±0,04
48	0,08±0,01	0,63±0,05	0,81±0,65	0,01±0,01
60	0,25±0,14	0,78±0,01	1,27±0,12	0,20±0,05
72	0,39±0,08	0,55±0,11	0,85±0,50	0,47±0,32
84	0,63±0,13	0,41±0,02	0,79±0,44	0,44±0,29
96	0,86±0,20	0,74±0,00	0,83±0,42	0,38±0,25
108	1,13±0,09	0,47±0,00	1,20±0,61	0,38±0,24
120	1,03±0,20	0,68±0,00	1,38±0,32	0,30±0,29

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kübra Betül SOLMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri 01.03.1989

Lisans Üniversite : Gazi Üniversitesi

Elektronik posta : kubrabetulsolmazz@gmail.com

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, D blok, Zemin kat, Bakteriyoloji Laboratuvarı. Kınıklı, Denizli

Konferans listesi :

Cetin, O., Doğanlı, G., Doğan, N., Solmaz, K., Balgir, T., Coskun, E., Ulutürk, B. The Effect Of Environmental Conditions On Exopolysaccharide Production Of *Bacillus licheniformis* Strain B18 in Molasses Medium. International Conference On Engineering and Natural Sciences. 15-19 May, 2015,Skopje,Page 88.

Solmaz, K., Doganlı, G., Dogan, N., Cetin, O., Coskun, E., Balgir, T., Ulutürk, B. Exopolysaccharide Production Potential of *Bacillus pseudomycoides* Strain T1-11 in Molasses Medium. International Conference On Engineering and Natural Sciences. 15-19 May, 2015,Skopje,Page 84.

Cengiz S., Acar Doğanlı G., Solmaz K.B., Bozbeyoğlu N., Mercan Doğan N., Okudan Aslan E.Ş. (2015). Effects of the *Caulerpa* Species Ethanol Extracts on Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* Bacteria. International Conference on Pharmacology and Pharmaceutical Sciences (ICPPS 2015), 17-18.11.2015, Viyana-Avusturya.

Cengiz S., Solmaz K.B., Özay C., Mammadov R. (2015). Potansiyel Tirozinaz İnhibitörü Olarak *Convolvulus* Türleri. 5. Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 06-08 Şubat 2015, Antalya.

Cengiz S., Solmaz K.B. (2015). *Spirulina platensis* Türünün Tirozinaz İnhibisyon Etkisi. 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart 2015, Antalya.

Cengiz S., Okudan Aslan E.Ş., Aksu S., Solmaz K.B. (2015). "*Caulerpa taxifolia*" Ekosisteme Düşman Bize Dost Mu? 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart 2015, Antalya.

Cengiz S., Solmaz K.B., Doğanlı G., Bozbeyoğlu N., Doğan N. (2015). *Scenedesmus obliquus* türünün fenolik yapıdaki aktif bileşenleri ile antioksidan ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.

Doğanlı G., Cengiz S., Bozbeyoğlu N., Solmaz K., Doğan N. (2015) *Spirulina platensis* Ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* Bakterileri Üzerine Antibiyofilm Etkisi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık 2015, Konya.