



**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

***Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 SUŞUNDA EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
ÜRETİM POTANSİYELİNİN VE ELDE EDİLEN EPS'NİN
BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Kübra ŞENTÜRK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

OCAK 2025

**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

***Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 SUŞUNDA EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
ÜRETİM POTANSİYELİNİN VE ELDE EDİLEN EPS'NİN
BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Kübra ŞENTÜRK
(181324815004)**

ORCID: 0000-0002-0464-1919

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı**

Danışman: Prof. Dr. Mete YILMAZ

ORCID: 0000-0002-0982-727X

İkinci Danışman: Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK

ORCID: 0000-0002-5913-8333

OCAK 2025

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 181324815004 numaralı Doktora Öğrencisi Kübra ŞENTÜRK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 SUŞUNDA EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİM POTANSİYELİNİN VE ELDE EDİLEN EPS’NİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARININ İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mete YILMAZ**
Bursa Teknik Üniversitesi

İkinci Danışman : **Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Nurhayat DALKIRAN**
Bursa Uludağ Üniversitesi

Doç. Dr. Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Bengi ÖZKAHRAMAN
Hitit Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan KAZAN
Bursa Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi :
Savunma Tarihi : 14 Ocak 2025

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 191N001 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 121M341 numaralı Tübitak 1002 projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Kübra ŞENTÜRK

Aileme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi esnasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, gelişimim için imkan sağlayıp desteklerini esirgemeyen, laboratuvarda akademik gelişimimin önemli bir kısmını tamamlamamı sağlayan deneylerimi gerçekleştirmemi sağlayacak her türlü imkanı oluşturan, akademik hayatım boyunca kendisini örnek aldığım kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mete YILMAZ’a,

Tez çalışmamın şekillenmesinde ve akademik gelişimimde önemli katkısı olan, bilgi ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaşarak bana yeni ufuklar açan, ilgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve bana güvenerek bu yolculukta daha emin adımlarla yürümeme destek olan değerli tez eş danışman hocam Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK’a,

Bilgi ve tecrübeleriyle tez çalışmama yönlendirmelerde bulunan değerli tez izleme komite üyesi hocalarım Doç. Dr. Nurhayat DALKIRAN ve Doç. Dr. Gökçe TANER’e

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, severek çalıştığım Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nde görev alan tüm hocalarım ve mesai arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca desteklerini üzerimden eksik etmeyen laboratuvar arkadaşlarım Esra ERÇETİN, Ece KESİCİ, Nazlı BAŞARAN, Kübra TUNALIER, Meryem DİNDAR, Sena Karin KOTANCILAR ve Sertan GENÇ’e,

Akademideki serüvenim boyunca manevi desteğini üzerimden eksik etmeyen kendisinden çok şey öğrendiğim çalışma arkadaşım Neriman SİNAN TATLI’ya,

Öğrenim hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini üzerimden eksik etmeyen, benimle birlikte çokça fedakarlıkta bulunan annem, abim ve canım babama,

Tübitak 121M341 numaralı Tübitak 1002 ve Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 191N001 numaralı projeleri kapsamında gerçekleştirilen tez çalışmamda finansal desteklerinden ötürü Tübitak ve Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne,

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Aralık 2024

Kübra ŞENTÜRK
(Biyomühendis)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Araştırması	2
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşunun Tek Hücre İzolasyonu, Genetik Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizleri	15
2.1.1 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 suşunun tek hücre izolasyonu.....	15
2.1.2 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 suşunun genomik DNA izolasyonu.....	15
2.1.3 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 suşunun polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve filogenetik analizleri	16
2.2 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Optimal Kültür Koşullarının Belirlenmesi	17
2.3 Fenotipik Karakterizasyon ve Morfometrik Ölçümler	17
2.4 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşunun Pigment İçeriğinin İncelenmesi.....	18
2.5 Besin Stresinin <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşunun EPS Üretimi ve Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	19
2.6 Siyanobakteriyel EPS'lerin Eldesi ve Saflaştırılması	20
2.7 <i>Eubalotehece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşundan Elde Edilen EPS'nin Karakterizasyonu	20
2.7.1 EPS'nin biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi.....	20
2.7.2 EPS'nin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi).....	22
2.7.3 EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi	22
2.7.4 EPS'nin reolojik özelliklerinin belirlenmesi	22
2.7.5 EPS'nin zeta potansiyelinin belirlenmesi	22
2.7.6 EPS'nin termal özelliklerinin belirlenmesi	22
2.7.7 EPS'nin morfolojik yapısının belirlenmesi.....	23
2.7.8 EPS'nin emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi	23
2.7.9 EPS'nin metal iyonu şelatlama kapasitesinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	24
2.7.10 EPS'nin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi	24
2.8 EPS Temelli Hidrojel Yara Örtülerinin Hazırlanması, Şişme ve İn-Vitro Degradasyon Testleri	25

2.8.1 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin yapısal ve morfolojik karakterizasyonu	26
2.8.2 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin DSC ve TGA analizleri.....	26
2.8.3 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin su buharı geçirgenlik testleri (WVTR).....	26
2.8.4 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin mekanik testleri.....	27
2.8.5 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi	27
2.8.6 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesi	27
2.8.7 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin in-vitro biyoyumluluk testleri	28
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
3.1 <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Genetik Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi	30
3.1 <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Optimal Kültür Koşullarının Tespiti	34
3.2 Fenotipik Karakterizasyon ve Morfometrik Ölçümler	37
3.3 <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşunun Pigment İçeriğinin İncelenmesi.....	39
3.4 Besin Stresinin <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşunun EPS Üretimi ve Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	41
3.5 <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 Suşundan Elde Edilen EPS'nin Karakterizasyonu	44
3.5.1 Siyanobakteriyel EPS'lerin eldesi ve biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi	44
3.5.2 EPS'nin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi).....	48
3.5.3 EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi.....	49
3.5.4 EPS'nin reolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	50
3.5.5 EPS'nin zeta potansiyelinin belirlenmesi	51
3.5.6 EPS'nin termal özelliklerinin belirlenmesi	52
3.5.7 EPS'nin morfolojik yapısının belirlenmesi.....	54
3.5.8 EPS'nin emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	55
3.5.9 EPS'nin antioksidan aktivite ve metal iyonu şelatlama (Fe^{+3}) kapasitesinin belirlenmesi.....	57
3.5.10 EPS'nin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi	58
3.6 EPS Temelli Hidrojel Yara Örtülerinin Hazırlanması, Şişme ve İn-vitro Degradasyon Testleri.....	59
3.6.1 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi) ve SEM ile görüntülenmesi	62
3.6.2 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin DSC ve TGA analizleri.....	63
3.6.3 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin su buharı geçirgenlik testleri (WVTR).....	65
3.6.4 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin mekanik testleri.....	65
3.6.5 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi	66
3.6.6 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi	67
3.6.7 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin in-vitro biyoyumluluk testleri	68
4. SONUÇLAR VE ÖNERİ.....	71
5. KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	83

KISALTMALAR

AgNP	: Gümüş Nanopartikül
ANOVA	: Varyans Analizi
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Aracı
BSA	: Sığır Serum Albümin
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
CO₂	: Karbondioksit
CuSO₄.5H₂O	: Bakır(II) sülfat
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia Coli</i>
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HDF	: İnsan Dermal Fibroblastları
J1	: Johnson's kültür ortamı
MAA	: Mikosporin Benzeri Amino Asit
MBC	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium Bromür
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
NaK	: Potasyum Sodyum
OD	: Optik Yoğunluk
PAM	: Poliakrilamid
PCC	: Polinezya Kültür Merkezi
PES	: Plymouth Erd-Schreiber
ppm	: Milyonda Bir Birim

ppt	: Binde Bir Birim
PVA	: Polivinil Alkol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus Aureus</i>
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SGR	: Özgül Büyüme Hızı
TCA	: Trikloroasetik Asit
TGA	: Termogravimetrik Analiz
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-ışını Kırınımı

SEMBOLLER

%	: Yüzde
Δt	: Zaman aralığının uzunluğu
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
μ	: Spesifik büyüme hızı
μE	: Mikro Einstein
μm	: Mikro metre
μM	: Mikro Molar
μmol	: Mikro Mol
A	: Absorbans
Au	: Altın
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
CO	: Karbonmonoksit
CO₂	: Karbondioksit
dk	: Dakika
E₂₄	: Emülsifikasyon indeksi
Fe	: Demir
g	: Gram
H₂O	: Su
h_e	: Emülsiyon tabakasının yüksekliği
h_T	: Karışımın toplam yüksekliği
kDa	: Kilo dalton
KNO₃	: Potasyum nitrat
L	: Litre
ln	: Doğal logaritma
m	: Metre
M	: Molar
Mg (NO₃)₂	: Magnezyum nitrat
mg	: Miligram
mL	: Mililitre

mM	: Mili Molar
mm	: Milimetre
mPa	: Mega paskal
N	: Azot
N₁, N₂	: t _{1,2} zamanındaki popülasyon büyüklüğü
NaNO₃	: Sodyum nitrat
NH₄Cl	: Amonyum klorür
NH₄NO₃	: Amonyum nitrat
nm	: Nanometre
O	: Oksijen
P	: Fosfor
p	: Olasılık
Pd	: Paladyum
pH	: Hidrojen potansiyeli
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S	: Sülfür
S	: Svedberg
t₁, t₂	: Zaman
V	: Hacim
W	: Ağırlık
β	: Beta

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: <i>Euhalothece</i> ve <i>Halothece</i> kümelerinin 16S rRNA gen dizisi özdeşlikleri.	33
Çizelge 3.2: <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin morfolojik özellikleri. Değerler ortalama $\pm$ SD'yi temsil etmektedir.	38
Çizelge 3.3: Besin kısıtlamasına maruz bırakılan AQUAMEB-3 hücrelerinin ve kontrol hücrelerin boy uzunluklarını göstermektedir. Ölçümler 20 adet hücre ile yapılmıştır.	44
Çizelge 3.4: Büyük hacimde çoğaltılan AQUAMEB-3 hücrelerinden farklı fazlarda elde edilen EPS'nin karbonhidrat, üronik asit, nötral şeker ve protein miktar içeriğini göstermektedir (n=3).	47
Çizelge 3.5: Besin kısıtlamasına maruz bırakılan AQUAMEB-3 hücrelerinin ve kontrol grubu hücrelerinden karbonhidrat ve üronik asit miktar içeriklerini göstermektedir (n=3).	47
Çizelge 3.6: Farklı EPS ve ksantan zatkı konsantrasyonları (%0,1, %0,5 ve %1,0) ile sıvı parafin arasındaki emülsifikasyon indeksi. Veriler ortalamalar $\pm$ standart sapmalardır (n=3).	56
Çizelge 3.7: Farklı oranlarda EPS'lerden oluşan hidrojel filmlerin TGA analizinde gerçekleşen aşamaların sıcaklık aralıklarını ve bu aşamalardaki % kütle kayıplarını göstermektedir.	64

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Faktöriyal dizayn deneyleri için oluşturulan, 96 kuyulu plakada farklı tuzluluktaki AQUAMEB-3 suşlarının yerleşim düzeni. Renksiz kuyular steril distile su ile doldurulmuştur.	18
Şekil 3.1: 16S rRNA gen dizilerine (1169 bp) dayalı, maksimum olabilirlik (ML) ağacı, <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 ve ilgili siyanobakteriyel cinsler arasındaki ilişkileri göstermektedir.	32
Şekil 3.2: <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun morfolojisi.	34
Şekil 3.3: AQUAMEB-3 hücrelerinin 120, 140 ve 160 ppt tuzluluk içeren kültür ortamında, 19, 23 ve 27 °C sıcaklık, 75, 150 ve 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde büyümelerini göstermektedir.	36
Şekil 3.4: Erlende kültürlen <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 hücreleri. a) logaritmik fazda bulunan yeşil hücreler. b) durağan fazda bulunan turuncu renkli yaşlı hücreler.	39
Şekil 3.5: a) <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 yeşil ve turuncu hücrelerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının HPLC kromatogramları. b) <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin aseton ekstraktlarının spektrumu. c) <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin sulu özütlerinin spektrumu.	40
Şekil 3.6: a) Etanol ile yıkanmadan önce çökelti halinde bulunan EPS. b) Etanol ile yıkamanın ardından çökelti halinde bulunan EPS.	41
Şekil 3.7: Besin kısıtlaması uygulanan AQUAMEB-3 hücrelerinin büyüme grafiğini göstermektedir.	42
Şekil 3.8: <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin morfolojisi. a) 60 ppt J1 kültür ortamında inkübe edilen hücreler. b) N kısıtlaması uygulanan hücreler. c) P kısıtlaması uygulanan hücreler. d) Fe kısıtlaması uygulanan hücreler	44
Şekil 3.9: Liyofilize EPS örnekler	45
Şekil 3.10: <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 EPS'nin FTIR spektrumları.	49
Şekil 3.11: Farklı konsantrasyonlarda EPS sulu çözletilerinin (%0,1, %0,5 ve %1 kayma hızı (s^{-1}) fonksiyonu olarak mPa.s cinsinden ifade edilen viskozite grafikleri.	51
Şekil 3.12: a) EPS'lerin diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) termogramı. b) EPS'lerin TGA termogramı.	54
Şekil 3.13: Liyofilize %1 EPS'nin SEM görüntüleri.	55
Şekil 3.14: Emülsiyon damlacıklarının optik mikroskop görüntüleri: (a1, a2 ve a3); %1, %0,5 ve %0,1 <i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB-3 EPS - sıvı parafin emülsiyonları, (b1, b2 ve b3); %1, %0,5 ve %0,1 (ağırlık/hacim) ksantan zımkı - sıvı parafin emülsiyonları, Ölçek çubuğu = 400 μm	56

Şekil 3.15: a) EPS'nin DPPH analizi ile konsantrasyona karşı yüzde inhibisyon değerleri. b) EPS'nin konsantrasyona bağlı demir şelatma yüzdesi.	58
Şekil 3.16: EPS temelli hidrojel film görüntüsü.....	60
Şekil 3.17: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerin a) Zamana bağlı yüzde şişme grafikleri. b) Zamana bağlı yüzde degradasyon grafiği	61
Şekil 3. 18: EPS'nin FTIR Spektrumu	62
Şekil 3.19: EPS temelli hidrojel yara örtülerinin farklı yakınlaştırmalarda kesit SEM görüntüsü a1 ve a2) %5 PVA, b1 ve b2) %1 EPS, %5 PVA, c1 ve c2) %0,5 EPS, %5 PVA, d1 ve d2) %0,25 EPS, %5 PVA.....	63
Şekil 3.20: EPS temelli hidrojellerin. a)TGA termogramı. b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) termogramı.	64
Şekil 3.21: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerin su buharı geçirgenlikleri.	65
Şekil 3.22: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerin a) Kopma uzamaları. b) Çekme dayanımı verilerini gösteren grafik.	66
Şekil 3.23: Hidrojel film ekstraktlarının antioksidan aktivitesini gösteren % inhibisyon grafiği	67
Şekil 3.24: MTT analizi sonucu EPS ve aljinik asit çözeltileri ile muamele edilen fare fibroblast hücrelerinin (L929) % canlılık grafiği.....	69
Şekil 3. 25: Bir gün süre ile hidrojel ekstraktlarına maruz bırakılan L929 fare fibroblast hücre görüntüleri a) %1 EPS b) %0,5 EPS c) Ticari aljinat yara örtüsü d) Kontrol ⁺	70
Şekil 3.26: MTT analizi sonucu hidrojel ekstraktlarıyla muamele edilen L929 fare fibroblast hücrelerinin % canlılık grafiği.	70

***Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 SUŞUNDA EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
ÜRETİM POTANSİYELİNİN VE ELDE EDİLEN EPS’NİN
BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM ALANLARININ İNCELENMESİ**

ÖZET

Bu tez çalışması İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilen AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun tür identifikasyonu, siyanobakteri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin potansiyel biyoteknolojik uygulamalar için karakterizasyonu ve yara örtüsü uygulaması olarak kullanımını içermektedir.

16S rRNA gen dizisine dayalı filogenetik analizden yola çıkarak ortam koşullarına göre farklı morfolojiler gösteren AQUAMEB-3 suşunun *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 olarak sınıflandırılması uygun görülmüştür. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşu durağan fazda $0,89 \pm 0,15$ g L⁻¹ ekzopolisakkarit üretmektedir ve ürettiği ekzopolisakkarit bileşiminde $267,8 \pm 76,0$ mg g⁻¹ karbonhidrat, $70,6 \pm 4,8$ mg g⁻¹ nötral şeker, $90,8 \pm 34,9$ mg g⁻¹ üronik asit ve $42,6 \pm 16,0$ mg g⁻¹ protein içeriği bulunmaktadır. Gözenekli yapıda bulunan EPS'nin yapısal karakterizasyon analizlerinde içeriğinde karboksil, hidroksil, amin ve sülfat gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen EPS'nin erime sıcaklığı 86,6 °C olup 243,4 °C'ye kadar termal kararlılık göstererek, 347,5 °C'ye kadar da termostabilliğini korumuştur. Psödoplastik akışkan özellikleri gösteren *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS çözeltisi, $94,2 \pm 3,2$ 'lik bir emülsifikasyon indeksi (E₂₄) ile ticari ksantan zatkına benzer şekilde yüksek emülsifikasyon kabiliyetleri göstermektedir. Ayrıca *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı 300 ppm ve 150 ppm minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleriyle antibakteriyel aktivite göstermiştir. Yaklaşık 9 mg mL⁻¹ konsantrasyonda $82,6 \pm 25,8$ radikal süpürme aktivitesi tespit edilen EPS'nin antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Ardından EPS'nin farklı oranları kullanılarak PVA ile hidrojel yara örtüleri hazırlanmıştır. Oluşturulan yara örtülerinin şişme testi sonuçlarına göre en uygun hidrojel formülasyonunun %1 EPS, %5 PVA ve %1 glutraldehit olduğu gösterilmiştir. Üretilen EPS temelli hidrojellerin şişme oranları maksimum $546,9 \pm 72,9$; dengede $325,7 \pm 55,6$ 'dır. Hidrojelin 14 gün sonunda $54,8 \pm 4,06$ hidrolitik degradasyona sahip, $2094,85 \pm 590,92$ gr/m²/gün su buharı geçirgenlik hızında, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip ve yüksek antioksidan özellikte ve L929 fare fibroblast hücrelerine karşı yüksek biyoyumluluk gösterdiği yapılan analizlerle gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, tez kapsamında üretilen *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS kullanılarak geliştirilen EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antibakteriyel,

biyoyumlu, yüksek şişme kapasitesi ve uygun su buharı geçirgenlik hızı ile yara örtüsü uygulamaları için yüksek potansiyel sundukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Euhalothece* sp., Filogenetik analiz, EPS karakterizasyonu, Antibakteriyel, Yara örtüsü.

INVESTIGATION OF EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) PRODUCTION POTENTIAL IN *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 STRAIN AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF THE OBTAINED EPS

SUMMARY

This thesis investigates the species identification of the AQUAMEB-3 cyanobacteria strain isolated from İzmir Çamaltı Saltern, characterizes the exopolysaccharides (EPS) produced by the cyanobacteria for potential biotechnological uses, and investigates their use in wound dressing applications.

Phylogenetic study of the 16S rRNA gene sequence indicated that the AQUAMEB-3 strain, exhibiting varying morphologies in response to environmental conditions, is suitably categorized as *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3. The *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 strain produced $0.89 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1}$ of exopolysaccharide during the stationary phase, with the composition containing $267.8 \pm 76.0 \text{ mg g}^{-1}$ carbohydrate, $70.6 \pm 4.8 \text{ mg g}^{-1}$ neutral sugar, $90.8 \pm 34.9 \text{ mg g}^{-1}$ uronic acid, and $42.6 \pm 16.0 \text{ mg g}^{-1}$ protein. The structural characterisations of the porous EPS revealed the presence of carboxyl, hydroxyl, amine, and sulfate groups. The melting point of the synthesized EPS was $86.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$, exhibiting thermal stability up to $243.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and keeping its thermostability up to $347.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 EPS solution exhibited significant emulsification properties comparable to commercial xanthan gum, with an emulsification index (E_{24}) of $94.2 \pm 3.2\%$. *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 EPS exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 300 ppm and 150 ppm, respectively. EPS exhibited $82.6 \pm 25.8\%$ radical scavenging activity at a dose of approximately 9 mg mL^{-1} , indicating its antioxidant capabilities.

Subsequently, hydrogel wound dressings were formulated with PVA using various ratios of EPS. The analytical results of the produced wound dressings indicated that the optimal hydrogel formulation comprised 1% EPS, 5% PVA, and 1% glutaraldehyde. The swelling ratios of the synthesized EPS-based hydrogel film were a maximum of $546.9 \pm 72.9\%$ and $325.7 \pm 55.6\%$ at equilibrium. The results indicated that the hydrogel exhibited a degradation of $54.8 \pm 4.06\%$ after 14 days, a degradation temperature of $127 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a water vapor permeability rate of $2094.85 \pm 590.92 \text{ gr m}^2/24$, and demonstrated antioxidant, biocompatible and antibacterial, properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria.

Keywords: *Euhalotheca* sp., Phylogenetic analysis, EPS characterization, Antibacterial, Wound dressing.

1. GİRİŞ

Siyanobakteriler, fosil kanıtları 2700 milyon yıl öncesine dayanan eski bir mikroorganizma grubudur (Kothari ve diğ, 2013). Siyanobakteri türleri, yüksek morfolojik, biyokimyasal ve metabolik çeşitlilikleri nedeniyle çeşitli su ve kara habitatlarında bulunabilmektedir (Nübel ve diğ, 2000). Doğada bol miktarda bulunmaları nedeniyle biyokütle üretimi, küresel oksijen temini, CO₂'in dünya atmosferinden yakalanması, uzaklaştırılması ve kalıcı olarak depolanması ve azot fiksasyonu dahil olmak üzere biyojeokimyasal döngülerde önemli roller oynarlar (Mogany ve diğ, 2018). Ekolojik önemlerinin yanı sıra pigmentler, yağ asitleri, toksinler, proteinler ve polisakkaritler vb. dahil olmak üzere çeşitli organik bileşikler sentezlerler (Pereira ve diğ, 2009). Bu bileşikler, kozmetik, beslenme ve gıda katkı maddeleri, ilaç, biyogübre ve kirlilik önlemleri dahil olmak üzere benzersiz özellikleri nedeniyle çeşitli biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadır (Li ve diğ, 2013).

Siyanobakteriler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritler (EPS), fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik işlevleriyle önemli bileşiklerdir (Uhliariková ve diğ, 2020). Siyanobakterilerin ürettiği EPS'ler, hücreleri saran, onlara sıkıca yapışan ve çevreleyen sıvıya salınan mukozal bir kütle olarak görünmektedir (Whitfield ve diğ, 2020).

Bu tez çalışmasında; İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan 2015 yılında izole edilen, Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü kültür koleksiyonunda EPS ürettiği tespit edilerek AQUAMEB-3 olarak isimlendirilen siyanobakteri suşunun filogenetik analizler yardımıyla tanımlanması ve EPS üretiminin incelenmesi, elde edilen EPS'nin olası biyoteknolojik uygulamalarda değerlendirilebilmesi amacıyla biyolojik ve kimyasal karakterizasyonu yapılarak yapısının ve özelliklerinin tanımlanması, son olarak detaylı karakterizasyonu yapılan EPS'nin yara örtüsü uygulamasında kullanılması amaçlanmıştır. Siyanobakterilerin tür tanımlanması, 16S rRNA gen dizilerinin filogenetik analizi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen suştan elde edilen EPS'nin karbonhidrat, nötral şeker, üronik asit ve protein içerikleri spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. EPS'nin kimyasal, termal ve fiziksel karakterizasyonu Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA),

diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), X-ışını kırınımı (XRD) ve jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile gerçekleştirilmiştir. Biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel kullanımını değerlendirmek amacıyla EPS'nin viskozite ve emülsifiye edici özellikleri belirlenerek, antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi gösterilmiştir. Karakterize edilerek yapısı tanımlanan EPS, PVA ile birlikte yüksek şişme özelliğine sahip, antibakteriyel, antioksidan özellikte hidrojel yara örtüleri üretiminde test edilmiştir.

1.1 Tezin Amacı

İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilen Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümüne ait mikroalg kültür koleksiyonunda bulunan AQUAMEB-3 suşunun kullanıldığı bu tez çalışmasının amacı temel olarak sırasıyla üç ana kısımdan oluşmaktadır; (i) AQUAMEB-3 suşunun genetik ve morfolojik karakterizasyon ile tür tanımlamasının yapılması, (ii) AQUAMEB-3 suşundan EPS üretimi ve üretilen EPS'nin detaylı karakterizasyonunun yapılması, (iii) AQUAMEB-3 suşundan elde edilen EPS'nin yara örtüsü uygulamasının gerçekleştirilmesidir. Literatürde, özellikle *Nostoc* ve *Anabaena* türlerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerin karakterizasyonu üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen, *Euhalothece* türlerinin ekzopolisakkaritleri hakkında çok az ayrıntılı bilgi bulunmaktadır (Tiwari ve diğ, 2015 a; Uhliariková ve diğ, 2020). Bu tez çalışması, literatürdeki bu boşluğu doldurmayı hedeflemektedir. Ayrıca siyanobakteriyel EPS'lerin yara örtüsü uygulaması ile ilgili de literatürde Alvarez ve diğ. (2021)'in yaptığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında gerçekleştirilen antibakteriyel, antioksidan gibi üstün özelliklere sahip EPS'nin yara örtüsü uygulamasının bu alandaki çalışmalara katkı saylayacağı düşünülmektedir.

1.2 Literatür Araştırması

Siyanobakteriler, enerji ve oksijen üretmek için güneş ışığından yararlanan fotosentetik bakterilerdir. Dünya'nın en eski organizmaları arasındadırlar ve gezegenin atmosferini ve ekosistemlerini şekillendirmede önemli bir rol oynarlar. Azot tutma yetenekleri ve zengin pigment bileşimleri, çeşitli ekolojik ortamlarda gelişmelerini sağlar. Siyanobakteriler, çöller, sıcak su kaynakları, kutup bölgeleri ve tuzlu yaşam alanları gibi ekstrem koşullarda hayatta kalabilirler. Bu özellikleri onları dünya

ekosistemleri için hayati hale getirir ve biyoteknolojik uygulamalar için umut verici kılar. Siyanobakteriler, fotosentetik ve mikroskobik organizmalar olarak tanımlanır ve pigmentler, proteinler ve ekzopolisakkaritler (EPS) gibi ürettikleri değerli bileşikler sayesinde umut verici doğal kaynaklardır (Morais ve diğ, 2022).

Halofilik siyanobakteriler yüksek tuzluluk şartlarında yaşamaya adaptasyon sağlayan, ürettikleri metabolitler ve değerli bileşenler sayesinde ilgi çeken siyanobakterilerdendir. Halofilik siyanobakteriler, tuz gölleri, tuz bataklıkları ve buharlaşan tuz düzlükleri gibi tuzlu veya aşırı tuzlu ortamlarda gelişen siyanobakterilerdir. Bu organizmalar, diğer çoğu yaşam formuna düşman olan yüksek tuzluluk koşullarında hayatta kalmak ve işlev görmek için benzersiz adaptasyonlar geliştirmiştir. *Aphanothece halophytica*, *Halothece/Euhalothece* gibi türler, halofilik siyanobakterilere örnektir. Bu siyanobakteri hücreleri, hücre içi ve dışı tuz konsantrasyonlarını dengelemeye yardımcı olan maddelerin (örneğin, glisin betain ve sakaroz) üretimi gibi ozmotik düzenleme mekanizmaları geliştirmişlerdir. Hücre duvarları ve zarları da ozmotik strese dayanacak şekilde yapısal olarak adapte edilmiştir.

Ekolojik olarak, halofilik siyanobakteriler tuzlu ekosistemlerde besin döngüsünde ve birincil üretimde kritik bir rol oynarlar. Genellikle besin ağının temelidirler ve bu benzersiz habitatlarda diğer mikroorganizmaları ve daha yüksek yapıdaki organizmaları desteklerler. Ayrıca, dayanıklılıkları ve metabolik yetenekleri onları biyoteknoloji için, özellikle biyoyakıt üretimi ve biyoaktif bileşiklerin sentezinde, umut vadeden adaylar haline getirir.

Farklı tuzluluk oranlarına sahip ortamlardaki siyanobakteri çeşitliliği, yüksek tuz konsantrasyonlarıyla birlikte azalmaktadır. Yüksek tuzluluk oranlarında, *Phormidium* ve *Halospirulina* gibi filamentli siyanobakteriler nadir olarak gözlenirken, *Halothece*, *Euhalothece* ve/veya *Aphanothece* olarak tanımlanan tek hücreli siyanobakteriler, NaCl doygunluğuna yaklaşan tuz konsantrasyonlarında dahi yaygın olarak bulunabilirler (Oren, 2015). Hipersalin ortamlarda yaşayan siyanobakteriler üzerine ilk inceleme, *Aphanothece halophytica*'yı yeni bir tür olarak tanımlayan Hof ve Frémy'nin (1933) çalışmasıdır. *Aphanothece* ve benzer formlar, planktonik ve bentik habitatlar da dahil olmak üzere hipersalin ortamların belirgin türleridir.

Garcia-Pichel ve arkadaşları 1998'de, *Halothece* kümesi adını verdikleri 13 halofilik tek hücreli siyanobakteri suşundan oluşan bir küme tanımlamışlardır. Bunun içinde,

genetik olarak daha benzer 12 suştan oluşan alt küme, *Euhalothece* alt kümesi olarak adlandırılmıştır. Bu 12 suştan ayrı olarak MPI 96P605 kodlu suş, filogenetik analizlerinde *Euhalothece*'den açıkça ayrılmıştır. Garcia-Pichel ve diğ. (1998) tarafından araştırılan *Halotheca* küme suşlarında, esas olarak β -Karoten, ekinenon ve ayrıca mikoksantofil, zeaksantin ve β -kriptoksantin olmak üzere birkaç karotenoidin varlığı tespit edilmiştir. Ek olarak 45 °C'ye kadar sıcaklıklarda gelişme kapasitesi gösteren *Halotheca* suşunda, mikosporin benzeri amino asitler (MAA), yaygın olarak da shinorin üretme yeteneği gözlenmiştir. Yaşlanan *Halotheca* hücrelerinde ise fikoeritrin ve pigment üretiminin azalmasından dolayı soluk renk oluşumu dikkat çekmiştir. *Halotheca* küme suşları kokoid, basiloid ve fusiform gibi farklı morfolojilerde gözlenmiştir. Hücre genişlikleri 2,6 μ m ile 10 μ m arasında değişirken, hücre uzunlukları 4 μ m ile 15,9 μ m arasında değişmiştir. PCC 8305 suşunun 82 μ m'ye kadar hücrelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Garcia-Pichel ve diğ, 1998; Margheri ve diğ, 2008). Garcia-Pichel ve ark.'na (1998) göre, hücrelerin uzunluğu ve değişken morfolojileri suşa bağlı olarak tuzlulukla değişmektedir. Suşların çoğu genellikle tek bir düzlemde bölünmektedir. Bazı suşlar koloniler oluştururken, diğerleri tek hücrelidir.

Garcia-Pichel'in ardından Margheri ve ark. (1999) 11 yeni halotolerant kokoid siyanobakterinin genetik çeşitliliğini, çoğaltılmış 16S rDNA restriksiyon analizi kullanarak analiz etmiştir. Elde ettikleri sonuçları, Garcia-Pichel ve diğ. (1998) suşlarıyla karşılaştırarak MPI 96P605 suşunun diğerlerinden ayrılmış konumunu doğrulamışlardır.

Margheri ve ark. (2008) hem Prokaryotların Uluslararası Adlandırma Kodu (ICNP) hem de Botanik Adlandırma Kodu kapsamında MPI 96P605'in resmi tanımlarını sağlamayı amaçlamışlardır ve suşu *Halotheca californica* MPI96P605 olarak yeniden adlandırmışlardır. Ancak yaklaşımları Oren (2009) tarafından sorgulanmıştır. Yapılan çalışmalardan yola çıkarak *Halotheca*/ *Euhalothece* suşlarının genetik ve morfolojik sınıflandırmasının karmaşık olduğu söylenebilmektedir.

Halofilik siyanobakteriler, genellikle onları aşırı tuzlu ortamlarda yaygın olarak bulunan yoğun güneş ışığından ve UV radyasyonundan koruyan karotenoidler ve fikobiliproteinleri üretmektedirler. Bu pigmentler ayrıca mikroorganizmanın zorlu koşullar altında fotosentetik verimliliklerine de katkıda bulunur. Ayrıca bu siyanobakterilerin yoğun miktarda polisakkarit ürettikleri de bilinmektedir.

Polisakkaritler tüm canlılarda bulunan ve 40-50 çeşit monosakkaritin farklı kompozisyonlarla glikozidik bağlar yaparak oluşturduğu moleküllerdir. Açıl gurupları, amino asitler veya sülfatlar gibi farklı gruplar bu lineer ya da dallanmış halde bulunan monosakkarit ünitelerine eklenebilirler. Bu polisakkarit yapıları reolojik özelliklerinden dolayı ilk olarak endüstride kalınlaştırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanım alanı bulmuştur (Delattre ve diğ, 2016). Yapılan son çalışmalarla polisakkaritlerin antibakteriyel, antimutajenik, antioksidatif, antikanser, immünomodülatör gibi farklı biyolojik özelliklerinin tespit edilmesiyle bu moleküllere olan ilgi artmıştır. Polisakkaritler birçok farklı hücre yapısı için karbon ve enerji rezervi sağlar. Normal fizyolojik proses ile ya da hücreler için ekstrem olan şartlarda genellikle ekzopolisakkarit olarak hücre dışına salgılanırlar (Delattre ve diğ, 2016). Ekzopolisakkaritler (EPS) hem prokaryotik (öbakteri, arkebakteriler) hem de ökaryotik (fitoplankton, alg, mantar, maya) organizmalar tarafından hücre çevresinde jel benzeri yapıda üretilirler. *Xanthomonas campestris*'den elde edilen ksantan zımkı ve *Sphingomonas paucimobilis*'dan elde edilen gellan gum gıda katkı maddesi, stabilizatör ve süspanse edici ajan olarak kullanılan ekzopolisakkaritlerdir (Khattar ve diğ, 2010). Son yıllarda özellikle yeni siyanobakteriyel EPS'lerin keşfedilmesiyle birlikte siyanobakteriyel EPS'lere olan ilgi de artmaya başlamıştır.

Siyanobakteriyel EPS'ler, diğerk mikrobiyal polisakkaritlere kıyasla belirli özelliklere sahiptir: (i) genellikle 6-10 farklı monomerdan oluşurlar, (ii) peptidik kısımları, deoksi şeker ve asetil grubu içerikleri nedeniyle yüksek hidrofobik özellikler gösterirler, (iii) sülfat ve üronik asit içerikleri nedeniyle anyonik özelliklere sahiptirler (Mota ve diğ, 2013). Yapılan çalışmalar bazılarının antibakteriyel, antikoagulant, antimutajenik, antioksidatif, anti-ülser, antikanser ve anti-enflamatuar özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Diğerk taraftan EPS'lerin su kirliliğinin azaltılması ve toprağın özelliklerinin iyileştirilmesi konusunda potansiyeli ortaya konmuştur (Passow, 2002). Siyanobakteriler genellikle stres altında EPS üretimini arttırmaktadır (Markou ve diğ, 2012). Ancak bazı türler ise normal yaşamlarında sürekli EPS üretirler. Örneğın kıyısıal bölgelerde yetişen ve sık sık kuraklık tehditi altında bulunan alg ve siyanobakteriler EPS ile kendilerini korumaya alırlar. Bu tür siyanobakteriler aynı zamanda UV ışınlarını engelleyen pigmentleri hücre dışına, EPS matriksi içine salgılayarak kendilerini UV'nin zararlı etkilerinden korurlar (Markou ve diğ, 2012). Karasal siyanobakteriler de EPSleri hücre içi suyun tutulması için kullanırlar (Taylor ve diğ, 2010). Siyanobakteriyel EPS'ler hücre dışarısına salınmış halde bulunan EPS'ler ve

kapsüler (hücre zarına bağlı halde bulunan) EPS'ler olarak ikiye ayrılmaktadır (Li ve diğ, 2013). Kapsüler EPS'ler kılıf, kapsül ya da müsila yapıda olabilmektedir. Hücre dışına salınan EPS'ler hücrenin hayatta kalması açısından ekolojik öneme sahip moleküllerdir. EPS'ler, kimyasal bileşimlerine göre homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak kategorize edilebilir (Rana ve Upadhyay, 2020). Homopolisakkaritler bir monosakkarit tipinden oluşurken, heteropolisakkaritler çeşitli glikoziltransferazlar aracılığıyla sentezlenen yüksek molekül kütleli şekerlerden oluşur (Pereira ve diğ, 2009). Siyanobakteriyel EPS'ler, heteropolisakkarit yapısı bileşimindeki yüksek moleküler ağırlıklı bileşenler nedeniyle genellikle viskozdur (Gong ve diğ, 2022). Araştırmalar, bu heteropolisakkaritlerin, amino asitler, sülfatlar ve fosfatlar gibi inorganik bileşenlerin ve farklı organik grupların sık sık değiştirilmesiyle, farklı şekilde bağlanmış altı veya daha fazla monosakkarit formu içerdiğini göstermektedir (D. Kumar ve diğ, 2018; Pereira ve diğ, 2009; Rossi ve De Philippis, 2015). Siyanobakteriler, diğer prokaryotik polisakkaritlerde bulunmayan pentozlar da dahil olmak üzere 12 çeşide kadar farklı monosakkarit ile kompleks EPS yapıları üretirler. Bunlar; glikoz, mannoz, fruktoz, riboz, galaktoz, ksiloz, füköz, ramnoz, metil ramnoz, arabinoz, galakturonik ve glukuronik asittir (Cruz ve diğ, 2020; R. De Philippis ve Vincenzini, 1998; Nicolaus ve diğ, 1999; Rossi ve Philippis, 2016). Glikoz, galaktoz, ksiloz ve mannoz ise EPS yapısında yaygın olarak gözlemlenen baskın şeker bileşenleridir (R. De Philippis ve diğ, 2001; Laroche, 2022). Bu monosakkaritlere ilave olarak siyanobakteriyel EPS yapısında sülfat, metil, asetil ve piruvil grupları ile beraber protein ve DNA da bulunmaktadır. Bu kompleks yapıdan dolayı çok az siyanobakterinin hücre dışı polisakkariti karakterize edilebilmiştir. Bunlar arasında *Cyanothece* sp., *Cyanospira capsule*, *Mastigocladus laminosus*, *Nostoc commune* ve *Nostoc insulare* gibi bazı türler vardır (De Philippis ve diğ, 2011). Çevresel faktörler (sıcaklık, ışık şiddeti gibi), kültür koşulları siyanobakterilerde polimerik materyallerin üretim verimini ve üretilen EPS'nin içeriğini (monosakkarit bileşenleri, sülfat ve üronik asit içeriği gibi) etkilemektedir (Arias ve diğ, 2003; Singh ve diğ, 2019). Yapılan bir çalışma aydınlık/karanlık evre parametresinin hücre başına düşen çözünmemiş karbonhidrat miktarını etkilediğini göstermiştir (Cruz ve diğ, 2020). *Anabaena* sp.'de ise sürekli aydınlatmanın EPS üretimi için uygun olduğu gösterilmiştir (Arias ve diğ, 2003). Siyanobakteriler tarafından üretilen EPS içeriği ve miktarı mikroorganizmanın kültüre edildiği ortamın nütrient içeriğine bağlı olarak da değişmektedir (Khattar ve diğ, 2010). Örneğin bir *Anabaena* suşu farklı azot

kaynaklarında benzer oranda EPS üretirken, diğer bir suşun ürettiği miktar azot kaynağına göre değişmiştir (Pereira ve diğ, 2009; Nawaz ve diğ, 2024). Bazı türlerde ise azot kıtlığı EPS üretimini tetiklemekte, bazılarında ise ortama salınan EPS'lerin hücreye bağlı olanlara oranını artırmaktadır. Hatta besin sınırlandırması hedeflenen EPS'yi üretmek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Örneğin Tiwari ve arkadaşlarının *Nostoc* sp. ve *Anabeana* sp. ile yaptığı bir çalışmada EPS üretiminin maksimum durağan fazda, pH 8.0 de, ortamda herhangi bir azot kaynağı mevcut değil iken, nitrojenaz aktivitesinin düşük olduğu zamanda olduğu gözlenmiştir (Tiwari ve diğ, 2015 b). Elde edilen EPS'nin çözünmüş protein ve önemli miktarda üronik asit ile nötral şekerden oluştuğu belirtilmiştir (Tiwari ve diğ, 2015 a). Fakat besin sınırlandırması hücre büyümesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenlerden dolayı hücre büyümesi ve EPS üretiminin aynı anda yüksek olması amacıyla kesikli kültür sistemlerinin kullanılması önerilmektedir. Bu sistemde öncelikle besin takviyesi ile optimum hücre büyümesi sağlanacak ardından besin sınırlandırması ile maksimum EPS üretimi hedeflenecektir (Delattre ve diğ, 2016). *Cyanoteche* sp. ile yapılan bir çalışmada ortama azot eklenmesinin EPS üretimini arttırdığı görülmüştür (1.8 g L^{-1}). Benzer şekilde kültür ortamında fosfor, sülfür, kalsiyum ve magnezyum sınırlamalarının bazı suşlarda EPS üretimini tetiklediği görülmüştür (Delattre ve diğ, 2016). *Nostoc flagelliforme* ile yapılan bir çalışmada ise azot kaynağı olarak ürenin kullanılmasıyla yüksek miktarda EPS üretimi görülmüştür (Cruz ve diğ, 2020). İnorganik karbon kaynağı olarak kültürlerde genel olarak hava ile birlikte % 0.05-10 oranlarında CO_2 verilmektedir. *Arthrospira platensis* ile yapılan çalışmada ortama NaHCO_3 eklenmesinin EPS üretimini pozitif yönde etkilediği görülmüştür. Ayrıca ortama eklenen NaHCO_3 biyoflokülasyonu arttırarak hücre hasadı verimliliğini %90 oranında arttırmıştır. Yapılan çalışmalar EPS üretim veriminin mikroorganizmanın içerisinde bulunduğu büyüme fazına göre de değiştiğini göstermektedir. Siyanobakteri kültürleri ile yapılan çalışmalarda bazı suşların logaritmik fazda, bazılarının durgunluk fazında, bazılarının ise tüm kültür boyunca EPS ürettiği tespit edilmiştir (Sudo ve diğ, 1995). Ayrıca kültür ortamındaki besin maddelerinin miktarı ve çeşidinin de siyanobakterilerde EPS üretimini etkileyebildiği görülmüştür. Ancak siyanobakterilerin çevresel koşullara verdiği yanıtlar türe/suşa özgüdür. Besinler haricinde kültürlerin maruz bırakıldığı fiziksel koşulların da EPS üretimini etkilediği görülmüştür. Örneğin bazı siyanobakteri suşlarının yüksek veya sürekli ışık kültürlerinde daha fazla EPS ürettikleri belirlenmiştir (Trabelsi ve diğ, 2009). Bir

Anabaena suşunda ise sıcaklığın yaklaşık 10 °C artırılması EPS üretimini artırmıştır (Moreno ve diğ, 1998). Siyanobakteri kültürlerinde ortama verilen EPS'nin ayrıştırılması geleneksel olarak alkol çöktürmesi ile yapılmaktadır (Trabelsi ve diğ, 2009). Ancak deniz suyu veya daha tuzlu sularda kültürü yapılan türler için alkol çöktürmesi, deniz tuzunun da çökmesi sebebiyle, yeterli olmamaktadır. Bu durumda tuzun uzaklaştırılması için diyaliz veya ultrafiltrasyon kullanılmaktadır. Ayrıca bu basamaklar EPS'nin daha saf halde elde edilmesini de sağlamaktadır. Tek başına ultrafiltrasyonun da yeterli olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Delattre ve diğ, 2016). Bazı türlerde ortama salgılanan EPS miktarı kadar EPS hücrelere bağlı olarak bulunabilmektedir. Bunların geri kazanılması ortama salgılanan kadar kolay olmamakla beraber formaldehid, EDTA, NaOH içeren solüsyonlar ile sonikasyon ve ısıtma gibi yöntemler uygulanmaktadır (Sun ve diğ, 2012).

Ekzopolisakkaritlerin biyokimyasal içerikleri uygulama alanlarını belirlemektedir. Ekzopolisakkaritler (EPS) temel olarak; polisakkaritlerin yanında protein ve DNA gibi yapıları da içermektedir. Ayrıca polisakkaritin yapısındaki şekerlerin üronik asit veya sülfat grubu içerikleri fonksiyonlarını da etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda; EPS'nin flokülasyon kapasitesinin içeriğindeki şekerlerin üronik asit içeriğiyle pozitif korelasyon gösterdiği; üronik asit gruplarının EPS'ye anyonik karakter kazandırarak molekülün metal iyonlarını bağlamasını sağladığı ve ayrıca hidrojel oluşturma kapasitesini geliştirdiği; EPS'nin protein miktarının mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilm yapısının uzun vadeli stabilitesini sağladığı ve polisakkarite hidrofobik özellik kazandırarak polisakkaritin mikroorganizma üzerine yapışma kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir (Kawaguchi ve Decho, 2000). EPS, hidrofilik karakteri sayesinde çevre, kozmetik ve biyomedikal uygulamalarda önemli potansiyel taşımaktadır. EPS içerdiği hidroksil ve karboksil fonksiyonel gruplarından dolayı hidrojel oluşturma yeteneğine sahiptir. Bunun yanı sıra hidroksil gruplarının varlığı doğal doku yapışkanlığı ve elastikiyeti sağlamaktadır (Qiao ve diğ, 2016). EPS'lerin sık rastlanan diğer fonksiyonel grupları olan aldehit ve sülfat grupları ise polisakkarit hidrojellerin modifikasyonu için elverişli gruplardır. İçerdikleri bu fonksiyonel gruplardan dolayı hidrojel oluşturma özelliği taşıyan yüksek hidrofilisiteye sahip, antibakteriyel, antioksidan özellikleri gibi üstün özellikleri ile EPS'lerin özellikle ilaç salım sistemleri, yara örtüsü gibi biyomedikal uygulamalarda gelecekteki biyomalzemelerin alternatif bir kaynağı olacağı düşünülmektedir (Beaumont ve diğ, 2021).

Yara, bir travma sonucu deri ya da mukozanın bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanabilir. Deri çevreye karşı vücudu koruyan fiziksel bir bariyer görevi görür ve bir yaralanma sonucunda derinin koruma özelliği bozularak, yara bölgesi enflamasyona açık hale gelir. Yara bölgesinde bakteriler epitelizasyonu ve kollajen sentezini engelleyerek enfeksiyona neden olur (Homaeigohar ve Boccaccini, 2020). Diyabetik yaralar, bakteriler tarafından kolaylıkla enfekte olur. Yüksek kan şekeri nedeniyle yara bölgesinde bakteri üremesi kolaylaşır. Enfeksiyöz bir ortam yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etki gösterir, hatta bakteriyemiye bile neden olabilir. Yara iyileşmesi genellikle birbiriyle örtüşen üç aşamayı içeren karmaşık bir fizyolojik süreç olarak kabul edilir. Bu aşamalar sırasıyla; enflamasyon (1-3 gün), proliferasyon (3-21 gün) ve dokunun yeniden şekillenmesidir (21 gün-1 yıl). Yara iyileşme sürecini hızlandırmak için bir yara örtüsüne ihtiyaç duyulmaktadır. İdeal yara örtüsü, yara bölgesinde oluşan fazla eksudayı emebilmeli ve yara iyileşmesini hızlandıracak nemli bir ortam sağlayabilmelidir. Ayrıca ideal bir yara örtüsü; yeterli gaz geçirgenliğine sahip, yüksek biyouyumluluk ve antibakteriyal özellikte olmalıdır. Yara örtüsünden beklenen bir diğer özellik ise yara iyileşmesini desteklemek için reaktif oksijen bileşenlerini (ROS) temizleyecek doğal bir antioksidan aktiviteye sahip olmasıdır (Jiang ve diğ, 2021). Yara bölgelerinde özellikle ayak bilekleri, diz, bilek gibi sık hareket eden bölgelerde, dış mekanik kuvvetler nedeniyle, hidrojel yara örtüsünün üstün mekanik özelliklere ve doku yapışmasına sahip olması beklenmektedir (Jiang ve diğ, 021).

Yara örtülerinin küresel pazarı, artan ve yaşlanan nüfus ve diyabet gibi kronik hastalıkların yaygınlaşması nedeniyle 2016 yılında 17,0 milyar dolarken, bu değer 2021’de 20,4 milyar dolara ulaşmıştır. ABD’de en sık rastlanan ve travma kaynaklı oluşan akut yaralar, yaklaşık 41 milyon acil servise sevk ve 2,5 milyon hastanede yatışla sonuçlanmaktadır. Bu durum yıllık 670 milyar dolarlık fizik tedaviyi de kapsayan sağlık hizmetleri maliyetini gerektirmektedir. İstatiklere göre Avrupa’da diyabet hastası 55 milyondan fazladır ve bunların 8 milyonu ayak ülseri gelişme riskiyle karşı karşıyadır. Bu tür ülserlerin etkili bir şekilde tedavi edilememesi sonucu yılda 450.000 kişide alt ekstremité amputasyonu gerçekleşir ve bu da hastaların tedavisi için sağlık sektörüne 2-2,5 milyar avroya mal olabilmektedir. ABD istatistiklerine göre ise bu durum 6,5 milyon hasta için 25 milyar doları bulan tedavi maliyetini gerektirmektedir (Khampiang ve diğ, 2018). Böylesine maliyetli bir yükü hafifletmek için, yaraları kısa sürede ve etkili tedavi edebilen teknolojilerin

geliştirilmesine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Etkili yara örtülerinin geliştirilmesi bu yönüyle oldukça önemlidir. Cilt yara örtüleri, dünya çapında yara bakım endüstrisi ve ticaretinin çok önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Şu anda piyasada bulunan yara örtüleri hidrojel, film, sünger ve köpük formundadır (Homaeigohar ve Boccaccini, 2020). Yara örtülerinde, yapıya antibiyotik ajanların eklenerek antibakteriyel özelliğin kazandırılması temel yaklaşımlardan biridir ve literatürde pek çok kontrollü antibiyotik salımı yapan yara örtüsüne rastlanmaktadır (Özbaş ve diğ, 2021; Tamahkar 2021). Kontrollü ilaç salımı yapan yara örtülerindeki temel amaç, yara bölgesindeki bakteriyel enfeksiyonu önlemek ve kontrol altında tutmaktır. Yara iyileşme sürecinde yara bölgesini toksik etkiye neden olmadan bakteriyel ataklardan koruyacak antibiyotiklerin salımının yara iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir (Teo ve diğ, 2011). Ancak antibiyotik kullanımı toksisite riski ve antibiyotik direncine neden olmaktadır. Antibiyotik direnci günümüzde dünya çapında ciddi bir tehdit olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre antibiyotik dirençli bakteri kaynaklı enfeksiyon oranı 2020'de bir önceki yıla göre %9 oranında artmıştır. Günümüzde yara örtülerinde antibiyotiklerin yerine etkili antibakteriyel doğal ajanların kullanımı ön plana çıkmaktadır (Hao ve diğ, 2021).

Yeni nesil yara örtüsü malzemesi olarak kullanılan hidrojeller, yüksek sıvı absorplama kapasitesine sahip, üç boyutlu, çapraz bağlı, hidrofilik yapıda polimerik ağlar olarak tanımlanır. Hidrojeller; nemli ve serin bir ortam sağlama, yaraya yapışmama ve aşırı miktardaki yara eksüdasını absorblama gibi avantajlara sahiptirler. Ayrıca hidrojeller yüksek su içeriği ile fizyolojik yara koşullarını taklit etme kabiliyetine sahiptir ve biyouyumlulukları ile doku rejenerasyonunu desteklerler. Sood ve diğ. (2014) hidrojel yara örtülerinin geleneksel pansumanlara göre hızlı epitelizasyonu teşvik ettiği ve ülser hastalarının iyileşmelerini hızlandırdığını göstermişlerdir (Sood ve diğ, 2014). Hidrojel yapısı temelde çapraz bağlama yoluyla hazırlanan üç boyutlu ağı bir yapıdır. Hidrojeller, fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanabilir. Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller polimer zincirleri arasındaki ikincil bağlar vasıtasıyla oluşurken, kimyasal çapraz bağlı hidrojeller kovalent bağlar yardımıyla hazırlanır. Ayrıca hidrojeller tek bir polimer türü ile üretilmediği gibi farklı polimerlerin kompozisyonları ile harman hidrojeller şeklinde de üretilbilirler. Yapılan çalışmalarda tek bir polimer türüyle üretilen hidrojellere göre harman hidrojellerin daha yüksek mukavemete sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle günümüzde harman hidrojellere olan ilgi artmıştır (Chen ve diğ, 2018). Harman hidrojeller oluşturulurken kullanılan polimerler; polivinil alkol

(PVA), poliakrilamid (PAM) gibi sentetik polimerler ve kitosan, aljinat gibi doğal polimerler olabilir (Chen ve diğ, 2018;).

PVA sentetik polimerler içerisinde biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda en yaygın olarak kullanılandır. PVA, yüksek biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi üstün özelliklere sahiptir ve suda çözünebilir. Bu üstün özellikleri nedeniyle PVA yapay organlar, ilaç taşıyıcı sistemler ve yara örtüsü gibi çok sayıda biyomedikal uygulamada kullanılan en eski sentetik polimerlerden biridir. Bununla birlikte PVA hidrojelinin yetersiz esnekliği, yetersiz hidrofilik özellikleri ile antibakteriyel ve antioksidan aktivite gibi biyoaktivite davranışı göstermemesinden dolayı özellikle yara örtüsü uygulamalarında tek başına kullanımı kısıtlıdır (Kamoun ve diğ, 2017). Bu nedenle PVA'nın bu kısıtlarını ortadan kaldıracak ve işlevsellik kazandıracak doğal polisakkaritler ile harmanlanması yoluyla oluşturulan hidrojeller, günümüzde oldukça ilgi çekmektedir. Bu doğal polisakkaritlere örnek olarak günümüzde biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan kitosan ve aljinat verilebilir. Kitosan çok sayıda mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivite göstermesi, hastalarda enfeksiyonları önleyerek veya ortadan kaldırarak doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesini destekleyici bir malzeme olmasından dolayı biyomedikal uygulamalarda özellikle de yara örtüsü uygulamalarında oldukça ilgi çekmektedir (Bagher ve diğ,2020; Batista ve diğ, 2020; Ma ve diğ, 2022; Saberian ve diğ, 2021). Örneğin Miraftab ve diğ. (2011) yaptığı çalışmada aljinat ve kitosan ile oluşturdukları yara örtüsünün antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada aljinat yara yüzeyinde sodium/kalsiyum iyonu değiştirme ve iyi sıvı emme özellikleri nedeni ile kullanılırken; kitosan hemostatik, antimikrobiyal ve yara iyileştirici özellikleri ile yapıyı desteklemiştir (Miraftab ve diğ, 2011). Ancak biyomedikal uygulamalarda kullanılan kitosanın hidrojel formu stabil bir yapı değildir ve yapıda kontrolsüz çözünme meydana gelebilir. Gözenek boyutunu kontrol etmek zordur ve düşük mekanik dirence sahiptir. Ayrıca suda çözünmeyen kitosanın hazırlanma aşamasında organik çözücüye gereksinim duyulması bir diğer olumsuz özelliğidir (Croisier ve Jérôme, 2013).

Aljinat, iyonik kompleks oluşturma yoluyla kolayca jelleşebilmesi, yüksek su tutma kapasitesi ve yüksek biyouyumluluğu ile yara örtülerinde sıklıkla çalışılan doğal bir polisakkarittir (Li ve diğ, 2017). Aljinnattan üretilen hidrojeller, insan ekstrasellüler matriksine (ECM) yapısal olarak benzerlik gösterir. Bu benzerlik, doğal türevli aljinatların canlı dokulara dahil edilmesine ve genellikle sentetik olarak üretilmiş

hidrojellerin neden olduğu enflamatuar ve immünolojik reaksiyonları azaltmasına olanak tanımaktadır (Kumar, 2022). Aljinatın herhangi bir toksik ya da alerjik etki göstermemesi; yüksek biyouyumluluğa sahip ve biyobozunur bir biyopolimer olması, onu insan vücudunda doğrudan kullanılabilir uygulamalar için ideal hale getirir (Batista ve diğ, 2020). Günümüzde aljinat temelli birçok ticari yara örtüsü bulunmaktadır. Aljinat, yara  rt lerinde yapıya optimum jelleşme özelliği kazandırır ve yara örtüsünün yara yatağına yapışmaması veya lifli kalıntı bırakmamasını sağlar. Bu yara örtüleri kuru ve nekrotik yaralar, bacak ve ayak ülserleri, yanık yaraları gibi farklı derecelerdeki eksudalı yaralar için kullanılabilir. Bahsedilen ticarileştirilmiş aljinat temelli yara  rt lerinden bazıları Purilon® Jel (Coloplast), Kaltostat (ConvaTec), Biatain® Aljinat (Coloplast), Algiderm (Bard), Algisite (Smith ve Nephew), Algosteril (Johnson ve Johnson Medical), Curasorb ® Zn (The Kendall Co), Sorbsan (Dow Hickam) ve Kalginate (DeRoyal) olarak sayılabilir. Bu yara örtülerine herhangi bir antibakteriyel ajan katılmamıştır ancak aljinat temelli ticari yara  rt lerinden bazılarında ise yapıya antibakteriyel özellik kazandırmak amacıyla gümüş ilave edilmiştir. Bu yara örtülerine ALGICELL® Ag (Derma Sciences), Luofucon (Foryou Medical), Sorbalgon (Hartman N), Melgisorb®Ag (M lnlycke) ve SeaSorb- Ag (Coloplast)  rnek verilebilir. Ancak yapılan çalışmalar gümüş içeriğinin insan sağlığına toksik etkisi olduğunu göstermiştir. Örneğin Burd ve ark., 2006 gümüş içerikli Acticoat™, Aquacel® Ag ve Contreet® yara  rt lerinden salınan gümüş iyonlarından kaynaklı, bu yara örtülerinin keratinositler ve fibroblastlar üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamışlardır (Burd ve diğ,2007). Ayrıca bahsedilen çalışmada epidermal hücre proliferasyonunun değerlendirildiği doku eksplant kültür modelinde, tüm gümüş içerikli yara örtülerinin yeniden epitelizasyonda önemli bir gecikmeye neden olduğu görülmüştür (Burd ve diğ,2007). Ferdous ve Nemmar (2020)  alışmalarında, Ag nanopartiküllere maruziyetin ardından organlarda Ag birikimi ve toksik etki gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (Ferdous ve Nemmar 2020). Liao ve ark. (2019) ise in vitro hücre testlerinde Ag nanopartiküllerin (AgNP), insan bronşiyal epitel hücreleri, göbek damarı endotel hücreleri, kırmızı kan hücreleri, periferik kan mononükleer hücreleri, keratinositler, karaciğer hücreleri vb. dahil olmak üzere birçok insan hücre hattına karşı toksik olduğunu bildirmiştir. Ayrıca AgNP'lerin, dolaşım sistemi yoluyla farelerin beyin kan bariyerini geçebildiği in vivo testlerle gösterilmiştir. AgNP'ler intravenöz, intraperitoneal ve intratrakeal uygulama yollarını takiben karaciğer, dalak, böbrek ve beyin gibi fare organlarında birikme eğilimindedir.

Bu açıdan AgNP'ler, mikroorganizmaları ortadan kaldıracak ancak memeli hücrelerinde sitotoksikiteye neden olan iki ucu keskin bir kılıç olarak kabul edilir (Liao ve diğ,2019). Bu nedenle yara örtülerine antibakteriyel özellik kazandırmak için, canlıda toksik etki oluşmasına neden olacak herhangi bir ajan ilave etmek yerine antibakteriyel özelliğe sahip malzemelerin kullanılması oldukça önemli bir konudur. Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve antibakteriyel özellik taşıyan mikrobiyal polisakkaritler bu malzemelere önemli alternatif sunmaktadırlar (Jiang ve diğ, 2021; Moscovici 2015; Shen ve diğ, 2021).

Mikrobiyal polisakkaritlerden oluşturulan hidrojeller vücudun makromoleküler bileşenlerine morfolojik ve kimyasal benzer yapıları, yüksek sıvı tutma kapasitesi, biyouyumluluk, yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktivite gibi üstün özellikleri sayesinde ideal bir yara örtüsü malzemesi olarak kullanılabilir (Mahmoud ve diğ, 2021). Ayrıca bu polisakkaritlerin yapılarındaki hidrofilik gruplar (karboksilik asit, amino, hidroksil ve sülfat grupları), biyolojik yapıyı desteklemek için büyüme faktörleri ile kovalent olmayan bağlar oluşturabilir ve bu sayede yüksek doku uyumluluğu sağlar (Asgher ve diğ, 2021). Mikrobiyal polisakkaritler düşük maliyetli, kolay hazırlanabilir ve kolay erişilebilir olan yara pansuman malzemeleri gereksinimlerini karşılar.

Mikrobiyal polisakkaritlerin bu özelliklerinden dolayı polisakkarit üreten mikroorganizmaların araştırılması oldukça popülerdir. Örneğin Mei-Ling Sun ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada *Polaribacter* sp. SM1127 Arktik deniz bakterisinin yüksek EPS üretme kapasitesine sahip olduğunu göstermiş ve EPS'yi karakterize etmişlerdir. Bir diğer çalışmalarında ise *Polaribacter* sp. SM1127 Arktik deniz bakterisinden salgılanan EPS'nin iyi antioksidan aktiviteye (10 mg mL^{-1} konsantrasyonda EPS $\%55,40 \pm 3$ radikal süpürme kapasitesine sahip, bu yüzde aynı konsantrasyonda hiyalüronik asitten yüksektir), yüksek nem tutma kabiliyetine ($\%75,79 \pm 2,5$ -kitosan ve hiyalüronik asit gibi ticari ajanlardan yüksek olduğu gösterildi) ve düşük sıcaklıkta insan dermal fibroblastları (HDF'ler) üzerinde önemli ölçüde koruyucu özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada EPS'nin cilt yara iyileşmesini desteklediği bildirilmiştir (Sun ve diğ, 2020). Literatürde siyanobakterilerden elde edilen EPS'nin özellikle metal uzaklaştırıcı ve biyoflokülant uygulamaları ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Khangembam ve diğ, 2016; Mota ve diğ, 2016; Santos ve diğ, 1999,2014; Shah ve diğ, 2000). Ancak yara örtüsü olarak kullanıldığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Alvarez ve diğ. (2020), *Nostoc* sp. PCC7936

ve PCC7413 siyanobakteri suşlarından elde ettikleri EPS ile FeCl₃ varlığında hidrojel oluşturmuş ve bu hidrojellerin yeni bir yara örtüsü materyali olarak kullanılma potansiyelini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, EPS'nin anyonik karakterinden dolayı özellikle biyomedikal uygulamalar için belirleyici olan iyi jelleşme özelliği gösterdiği belirtilmiştir. En iyi şişme özelliği 1% EPS içeriğine sahip hidrojelde görülmüştür. Çizik testi ile EPS hidrojellerin, fibroblast göçünü kolaylaştırarak, rejenerasyon sürecinin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı ve hasarlı cildin yeniden şekillenmesi ve yapılandırılmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Alvarez ve diğ, 2021).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 *Euhalotehece* sp. AQUAMEB-3 Suşunun Tek Hücre İzolasyonu, Genetik Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizleri

2.1.1 *Euhalotehece* sp. AQUAMEB-3 suşunun tek hücre izolasyonu

İzmir Çamaltı Tuzlası, değişen tuzluluk oranlarına sahip tuz üretim havuzlarıyla Türkiye'nin en büyük deniz suyu bazlı tuzlasıdır. Bu tuzladan 2015 yılında 37 ile 350 ppt tuzluluklarda değişen havuzlardan şişme bot yardımıyla 1 L'lik şişelerde örnekler toplanmıştır. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşu 163 ppt tuzluluğa sahip İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan toplanan numune içerisinde faz kontrast mikroskobu altında (Olympus, CKX41-PH, Tokyo, Japonya) 10x ve 20x büyütmelemlerde mikropipet kullanılarak tek hücre olarak izole edilmiştir. Tek hücre izolasyonlarından sonra hücreler, 96 kuyucuklu plakalarda steril kültür ortamına aktarılmış ve 60 ppt tuzluluğa sahip Plymouth Erd-Schreiber (PES) ortamında (Tompkins ve ark. 1995) büyüyen siyanobakteri suşu kültür koleksiyonuna dahil edilerek 23 °C'de 100 µmol foton/ m².s⁻¹ ile 12 saat:12 saat ışık:karanlık döngüsünde inkübe edilmiştir.

2.1.2 *Euhalotehece* sp. AQUAMEB-3 suşunun genomik DNA izolasyonu

Euhalotehece sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin genomik DNA'sı, Promega'nın Wizard Genomic DNA Purification Kit'i kullanılarak izole edilmiştir. Kitin talimatlarına uygun şekilde bir protokol uygulanmıştır. 2 ml ependorf tüpüne alınan hücreler, 16000×g'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Hücrelere 600 µl Nuclei Lysis Solution eklenmiş ve karışım 1-3 saniye vortekslenmiştir. Ardından, örnek 65 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemten sonra, numune üzerine 3 µl RNase solüsyonu eklenmiş ve numune karıştırılarak 37 °C'de 15 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örneğin oda sıcaklığına gelmesi için 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra 200 µl Protein Precipitation Solution eklenmiş numune, 20 saniye yüksek hızda vorteksin ardından 16000×g'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, pelete dokunmadan dikkatlice alınarak, oda sıcaklığındaki 600 µL izopropanol içeren bir tüpe aktarılmış ve karıştırılmıştır. Bu karışım, oda sıcaklığında 16000×g'de 1 dakika

santrifüjlenmiş ve süpernatant çıkarılmıştır. Ardından, 600 µL %70 etanol eklenmiş ve DNA yıkaması için tüp birkaç kez çalkalanmıştır. Örnekler tekrar 16000xg'de 1 dakika santrifüjlenmiş, etanol pipetle uzaklaştırılmış ve etanolün uzaklaşması için 15 dakika beklenmiştir. Son olarak, DNA çözündürme işlemi için 100 µl steril ultra saf su eklenmiş ve 65 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan DNA, -20 °C'de saklanmıştır.

2.1.3 *E. coli* sp. AQUAMEB-3 suşunun polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve filogenetik analizleri

İzole edilen AQUAMEB-3 suşunun tür tanımlamasının yapılması için 16S rRNA gen dizisi belirlenmiştir. Bu amaçla elde edilen genomik DNA bu gen bölgesini çoğaltacak 27F1 ve 1516R primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu BioRad T100 thermal cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2008). PZR reaksiyonuna; 2,5 µl 10X Taq solüsyonu, 2,5 µl 2,5 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTP karışımı, 0,2 µl 10 µM ileri primer, 0,2 µl 10 µM geri primer, 0,25 µl Taq polimeraz (1 U), 17,85 µl steril ultra saf su ve 1 µl genomik DNA eklenmiştir. PZR döngüsü 95 °C'de 3 dk, 30 döngü; 95 °C'de 30 s, 60 °C'de 30 s, 72 °C'de 1 dk, son çoğaltma 72 °C'de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünü agaroz jelde (%1,5) yürütülmüş, üreticinin talimatlarına göre GeneJET jel çıkarma kiti (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, ABD) kullanılarak jelden çıkarılmıştır. Yılmaz ve ark. (2008) tarafından kullanılan dahili primerler, 16S rRNA gen dizilemeleri için de kullanılmıştır. Siyanobakteri suşunun 16S rRNA geninden elde edilen ham dizileri manuel olarak düzeltmek için MEGA 11 programı kullanılmıştır (Tamura ve diğ., 2021). Yeni izolatanın düzeltilmiş 16S rRNA genine (1255 bp) homolog diziler, Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile toplanmıştır. Filogenetik analiz için GenBank'tan elde edilen otuz dokuz 16S rRNA gen dizisinden oluşan bir dizi koleksiyonu kullanılmıştır. Gen dizilerinin hizalaması, Mega 11 (Tamura ve ark. 2021) MUSCLE (Edgar 2004) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fazla dizi bölgeleri, hizalamanın eşit uzunlukta olması için dizilerin başından ve sonundan kesilerek Mega 11'de en iyi model hesaplanmış ve verilere uyan en uygun model, maksimum olabilirlik ağaçları oluşturmak için 1000 önyükleme tekrarıyla kullanılmıştır (Edgar, 2004; Tamura ve diğ., 2018). 16S rRNA gen dizilerinin çiftler halinde nükleotid benzerlikleri, p-mesafeleri için mesafe tahmin

menüsü kullanılarak Mega 11'de hesaplanmıştır. P-mesafeleri daha sonra çiftler halinde karşılaştırmalarda yüzde benzerliklere dönüştürülmüştür.

2.2 *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Optimal Kültür Koşullarının Belirlenmesi

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun optimal büyüme ortamının belirlenmesi amacıyla ışık, sıcaklık ve kültür ortamının tuzluluk değerlerinin değiştirildiği faktöriyal dizayn deneyleri tasarlanmıştır. Faktöriyal dizayn deneylerinde hücrelerin büyümeleri üç farklı sıcaklık (19 °C, 23 °C ve 27 °C), üç farklı ışık yoğunluğu (75, 150 ve 300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve sekiz farklı tuzluluk değerinde (37, 60, 80, 100, 120, 140, 160 ve 180 ppt) takip edilmiştir. Faktöriyal dizayn deneylerinin ilk aşamasında 60 ppt tuzlulukta bulunan stok kültürdeki suşların farklı tuzluluklara aklimasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tuzluluk aklimasyon deneylerinde 60 ppt PES ortamında bulunan kültürlerin tuzlulukları 24 saatte bir 247,7 ppt ve 0 ppt PES stokları kullanılarak 37, 80, 100, 120, 140, 160 ve 180 ppt'ye getirilmiştir (Tompkins ve ark. 1995). Belirtilen tuzluluk değerlerine getirilen kültürlerin OD değerleri eşit hale getirilerek hücreler 96 kuyucuklu plakalara Random Sequence Generator (<https://www.random.org/sequences/>) programı yardımıyla oluşturulan düzene göre (Şekil 2.1) yerleştirilmiş ve 3 günde bir 750 nm'de OD değerleri ölçülerek büyüme grafikleri oluşturulmuştur.

2.3 Fenotipik Karakterizasyon ve Morfometrik Ölçümler

Değişen tuzluluk seviyelerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkisini araştırmak için, 23 °C'de 60 ppt'lik stok kültürden alınan hücreler, 2.2 başlığında açıklandığı gibi 5 gün boyunca kademeli olarak 37 ppt ila 160 ppt tuzluluğa aklime edilmiştir. Hücreler, 1 hafta boyunca iklim dolabında büyümeye bırakılmış ve 200 μL hacimde hücreler 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. Hücreler, 15 günlük büyümeden sonra 40x büyütmede ters mikroskop (Olympus, CKX41-PH, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin morfometrik ölçümleri ImageJ yazılımı (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>) kullanılarak alınan görüntülerden elde edilmiştir. Hücre ölçümleri farklı tuzluluklarda kültürlenene rastgele seçilen 30 hücrenin genişlikleri ve uzunlukları ölçülerek analiz edilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C				37 PPT 1.TEKRAR	120 PPT 3. TEKRAR	100 PPT 3.TEKRAR	80 PPT 1.TEKRAR	120 PPT 2.TEKRAR	140 PPT 3.TEKRAR			
D				160 PPT 2.TEKRAR	180 PPT 2.TEKRAR	80 PPT 2.TEKRAR	60 PPT 3.TEKRAR	140 PPT 2.TEKRAR	160 PPT 3.TEKRAR			
E				37 PPT 2.TEKRAR	100 PPT 1.TEKRAR	37 PPT 3.TEKRAR	140 PPT 1.TEKRAR	180 PPT 1.TEKRAR	80 PPT 3.TEKRAR			
F				120 PPT 1.TEKRAR	100 PPT 2.TEKRAR	180 PPT 3.TEKRAR	60 PPT 2.TEKRAR	160 PPT 1.TEKRAR	60 PPT 1.TEKRAR			
G												
H												

Şekil 2.1: Faktöriyal dizayn deneyleri için oluşturulan, 96 kuyulu plakada farklı tuzluluktaki AQUAMEB-3 suşlarının yerleşim düzeni. Renksiz kuyular steril distile su ile doldurulmuştur.

2.4 *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 Suşunun Pigment İçeriğinin İncelenmesi

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 siyanobakterisinin kültür rengi, hücreler yaşlandıkça yeşilden turuncuya değişmektedir. Bu nedenle, turuncu ve yeşil kültürlerin liyofilize hücreleri, spektral tarama kullanılarak karotenoidlerin varlığı açısından test edilmiştir. Bu amaçla, hücreler %80 aseton ile cam boncuk kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra 200-700 nm aralığında, 2 nm aralıklarla, Biotek mikro plaka okuyucusunda (Agilent, CA, ABD) absorbans ölçümü yapılmıştır.

Beta karoten kantifikasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liyofilize hücrelerin pigment ekstraksiyonu için kloroform kullanılmıştır. Ekstraktlar 0,22 µm filtrelerden geçirilmiştir. Kalibrasyon için ticari olarak satın alınan β-karoten standardı (Sigma-Aldrich, 22040) kullanılmıştır. Standart, kloroformda çözülerek 0,5 mg mL⁻¹ derişiminde hazırlanmıştır. Stok β-karoten standardı ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kloroform ile çözülerek çeşitli derişimlerde standart solüsyonları hazırlanmıştır. Ayırma, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm parçacık boyutlu bir ACE C18 kolonu ile gerçekleştirilmiştir. DAD dedektörü, karotenoidlerin tespiti için 460 nm'ye ayarlanmış ve hareketli faz olarak 95:5 oranında kloroform:metanol kullanılmıştır. Analiz, 1,5 ml/min akış hızında izokratik koşullarda

gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 25 µL olarak ayarlanmıştır (Mangunsong ve diğ, 2020).

Klorofil-a izolasyonu metanol kullanılarak gerçekleştirilmiş ve klorofil konsantrasyonu, Ritchie (2006)'ye göre Biotek mikro plaka okuyucusunda (Agilent, CA, ABD) 665 ve 750 nm'deki absorbanslar okunarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12,9447 (A_{665} - A_{720}) \quad (2.1)$$

Burada, Chl_a , klorofil a değeridir, A_{665} , 665 nm'deki absorbans değeridir ve A_{720} , 720 nm'deki absorbans değeridir.

Fikosiyanin konsantrasyonunun belirlenmesinde, Moraes ve ark. (2011) tarafından özetlenen metodoloji izlenmiştir. Bu amaçla, 4 mg liyofilize hücre, 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 1 mL pH 7 fosfat tamponuyla karıştırılmıştır. Daha sonra hücreler vortekslenerek cam boncuk yardımıyla parçalanmıştır. Karışım, fikobiliproteinler içeren süpernatant elde etmek için 10 dakika boyunca 5000×g'de santrifüj edilmiştir. C-fikosiyanin miktarı aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Moraes ve diğ, 2011):

$$\text{C-Fikosiyanin (g mL}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{620} - 0.474 \times A_{652})}{5.34} \quad (2.2)$$

Burada, A_{620} , 620 nm'deki absorbans değeridir, A_{652} , 652 nm'deki absorbans değeridir.

2.5 Besin Stresinin *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 Suşunun EPS Üretimi ve Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Besin stresinin *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşunda EPS üretimi üzerine etkisini incelemek üzere Johnson's (J1) kültür ortamı modifiye edilerek azot (N) kısıtlaması, demir (Fe) kısıtlaması ve fosfor (P) kısıtlaması uygulanan kültür ortamlarına 3 tekrarlı şekilde 60 ppt tuzlulukta hücreler ekilmiştir (Borowitzka ve diğ, 1989). Nutrient kısıtlaması deneyleri 250 ml'lik erlenlerde toplam 100 ml hacimdeki kültürlerle gerçekleştirilmiştir. J1 kültür ortamında çoğaltılarak belirli yoğunluğa erişen hücreler hasat edilerek eski kültür ortamı hücrelerden uzaklaştırılmış ve kısıtlama içeren kültür ortamları hücreler üzerine eklenmiştir. Tüm nutrientleri içeren J1 kültür ortamında çoğaltılan kontrol grubu ile birlikte kısıtlama uygulanan kültür ortamlarında çoğaltılan

hücrelerden iki ay süren deneyler boyunca 2 günde bir 750 nm’de OD ölçümü alınarak büyüme grafikleri oluşturulmuş; bu sayede nütrient kısıtlamasının hücre büyümesine etkisi de incelenmiştir.

Besin stresi uygulanan hücreler hasat edilmeden önce ters faz kontrast mikroskopta (Olympus, CKX41-PH, Tokyo, Japonya) hücrelerin morfolojileri incelenerek ImageJ programı yardımıyla en-boy ölçümleri yapılmıştır. İki ay sonunda hasat edilen hücrelerden (4500 x g’ de 15 dk) elde edilen süpernatanttan etanol ile çöktürme yöntemi ile EPS eldesi sağlanmıştır. Elde edilen EPS, liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak karbonhidrat miktar tayini ve üronik asit miktar tayini deneylerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

2.6 Siyanobakteriyel EPS’lerin Eldesi ve Saflaştırılması

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 suşundan EPS eldesi için hücreler geç durgun fazda santrifüj yöntemi (3000 rpm, 15 dk) ile hasat edilmiştir. Ayrılan süpernatant üzerine süpernatantın 2 katı hacimde soğuk etanol eklenerek karışım vorteks ile hızlıca karıştırılmış ve EPS’lerin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen çamur kıvamında toplanan EPS’ler bir metal filtre kullanılarak toplanmış ve 14 kDa’lık moleküler kesme değerine sahip diyaliz membranına (Sigma Aldrich, ABD) aktarılmıştır. EPS, sürekli karıştırma altında, 24 saat boyunca, en az 10 hacim 0,5 M EDTA çözeltisine karşı ve ardından 48 saat boyunca distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz ile tuzu uzaklaştırılan EPS numunesi liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak ileriki analizler için saklanmıştır (Tiwari ve diğ, 2015 b).

2.7 *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 Suşundan Elde Edilen EPS’nin Karakterizasyonu

2.7.1 EPS’nin biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi

EPS’nin içerdiği karbonhidrat miktarını belirlemek için Fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır (Dubois ve diğ, 1956). Bu yöntemde örnekler, derişik sülfirik asit ve %5’lik fenol çözeltisi ile 90 °C’de 5 dakika süreyle etkileştirilmiştir. Karbonhidrat miktar tayininde kalibrasyon eğrisi oluşturmak için D-glukoz kullanılmıştır. 490 nm’de ölçülen absorbans değerleriyle oluşturulan standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin içerdikleri karbonhidrat miktarları hesaplanmıştır.

EPS'nin protein miktar tayini analizleri modifiye edilmiş Lowry Metot kullanılarak yapılmıştır. İlk aşamada kurutulmuş örneklerden protein ekstraksiyonu yapılmıştır. İkinci aşamada ise elde edilen protein özütünden protein miktar tayini yapılmıştır. Protein ekstraksiyonu aşamasında 1 mg liyofilize EPS üzerine %24 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 40 µl eklenerek ısıtıcı blokta 95 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından numune üzerine 120 µl saf su eklenerek TCA seyreltilmiştir. Ardından numune 15000xg'de +4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pelete 0,1 mL Lowry reaktif D ilave edilmiştir. Lowry reaktif D içeriğinde 48:1:1 oranında reaktif A: reaktif B: reaktif C bulunmaktadır ve günlük olarak hazırlanması gerekmektedir. Reaktif A içeriğinde 0.1 N NaOH içinde %2 Na₂CO₃; Reaktif B içeriğinde %1 NaK tartrat tetrahidrat ve Reaktif C içeriğinde % 0.5 CuSO₄.5H₂O bulunmaktadır. Lowry reaktif D eklenmiş numuneler, 55 °C'de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüpler, oda sıcaklığında 15000xg'de 20 dakika santrifüjlenmiş (Microfuge, Beckman Coulter, CA, USA) ve süpernatant dikkatlice ayrılmıştır. Elde edilen protein özütü (süpernatant), ölçümler yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Barbarino ve diğ, 2005). Ektrakte edilen proteinin miktar tayini için 10 µl protein özütüne 190 µl Lowry reaktif D eklenmiş, karıştırılmış ve örnek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örnek üzerine 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş 20 µl Folin-ciocalteu solüsyonu eklenerek 30 dakika inkübasyonun ardından 600 nm'ki örneklerin optik yoğunlukları ölçülmüştür. Protein miktar tayini için kalibrasyon eğrisi BSA (sığır serum albumini) ile 600 nm'de absorbans ölçümü yapılarak oluşturulmuştur. BSA standardı ile oluşturulan grafik yardımıyla örnekler içerisindeki protein miktarları hesaplanmıştır (Barbarino ve diğ, 2005).

EPS örneklerinin üronik asit miktar içerikleri Blumenkrantz ve Asboe-Hansen (1973)'e göre hesaplanmıştır (Filisetti-Cozzi ve diğ, 1991). Bu yöntemde örnekler konsantre sülfürik asit içerisinde çözülen 0,0125 M sodyum tetraborat çözeltisi ve 3-fenil fenol ile muamele edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken standart olarak galakturonik asit kullanılmış ve 520 nm'de absorbans ölçülerek elde edilen formülden örneklerin içerdikleri üronik asit miktarları hesaplanmıştır.

EPS örneklerinin içerdikleri nötral şeker miktarları resorkinol solüsyonu ve sülfirik asit kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemde 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan EPS örnekleri 5 kat seyreltilerek reaksiyona eklenmiştir. 200 µL EPS örneği üzerine 200

μL resorkinol solüsyonu ve 1 mL %75'lik sülfürik asit eklenmiş ve 430 nm'de optik yoğunluklar belirlenmiştir (Monsigny ve diğ, 1988). Standart eğri D-galaktoz ile oluşturulmuştur.

2.7.2 EPS'nin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi)

EPS'nin aktif fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. Kuru EPS örneklerinin FTIR spektrumları $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında alınmıştır. Analizlerde EPS karakterizasyonundan sorumlu özellikle beş bölge incelenmiştir. a) $3600-2800\text{ cm}^{-1}$, b) $1500-1200\text{ cm}^{-1}$, c) $1200-950\text{ cm}^{-1}$, d) $950-700\text{ cm}^{-1}$ ve e) 700 cm^{-1} altı (Delattre ve diğ, 2016).

2.7.3 EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi

EPS'nin molekül ağırlığı jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılarak belirlenmiştir. Analiz, %0,5 EPS örnekleriyle $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

2.7.4 EPS'nin reolojik özelliklerinin belirlenmesi

EPS'nin viskozite ölçümü, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de Rotasyonel Reometre C-PTD 180/AIR/QC (Anton Paar) ile kayma hızlarının ($0,01-1000\text{ s}^{-1}$) değiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. EPS çözeltileri %0,1, %0,5, %1 konsantrasyonda, deiyonize su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Aynı derişimlerde hazırlanan ksantan zmkı (moleküler ağırlık $>2000\text{ g.mol}^{-1}$, MP Biomedicals, LLC., CA, ABD) içeren çözeltiler standart olarak kullanılmış ve tüm çözeltilerin viskoziteleri ölçülmüştür (Mota ve diğ, 2020).

2.7.5 EPS'nin zeta potansiyelinin belirlenmesi

EPS'nin zeta potansiyeli, Zetasizer Nano ZS cihazı ile (Malvern Instruments, CO., İngiltere) dinamik ışık saçılımı (DLS) yoluyla belirlenmiştir. EPS örneğinin (%0,5) zeta potansiyel analizi $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel verileri, üç bağımsız ölçümün ortalaması olarak hesaplanmıştır (Alvarez ve diğ, 2021).

2.7.6 EPS'nin termal özelliklerinin belirlenmesi

Liyofilize EPS'nin termal stabilitesi Ta/SDT650 Termal Gravimetrik Analiz cihazı (TGA) (New Castle, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Termogravimetrik analiz (TGA), $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ akış hızına sahip azot atmosferi kullanılarak $25-800\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık

aralığında gerçekleştirilmiştir. Veriler, sıcaklığa karşı ağırlık kaybı yüzdesinin grafiksel olarak gösterilmesiyle verilmiştir.

DSC analizi TA Instruments/DSC250 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (New Castle, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liyofilize EPS kullanılarak gerçekleştirilen analizde sıcaklık aralığı 0-200 °C olarak belirlenmiş ve analizler 5 mL dak⁻¹ akış hızıyla azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Veriler, ısı akışının sıcaklığa karşı grafiği şeklinde gösterilmiştir. DSC analizi için üst sıcaklık sınırı, EPS'nin bozunmaya başladığı sıcaklık olarak belirlenmiştir.

2.7.7 EPS'nin morfolojik yapısının belirlenmesi

EPS'nin morfolojik yapısı, Bursa Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Carl Zeiss marka, Gemini 300 model taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Deiyonize suda %1 konsantrasyonda hazırlanan EPS örnekleri, üç boyutlu gözenekli yapılarını korumak için liyofilize edilmiş, ardından 10 nm Au-Pd tabakasıyla kaplanarak farklı büyütme ölçeklerinde SEM ile görüntülenmiştir.

2.7.8 EPS'nin emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 EPS'nin emülsifiye etme kapasitesi, Cooper ve Goldenberg tarafından 1987'de açıklanan yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde düz tabanlı cam tüplerde, 3 mL sıvı parafin (Merck, Germany) üzerine 2 mL %0,1, %0,5, %1,0 EPS'nin sulu çözeltisi eklenerek 2 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır (Cooper ve diğ., 1987). Kontrol grubu olarak %0,1, %0,5, %1,0 konsantrasyonlarda hazırlanan ksantan zatkı kullanılmış ve aynı işlemler sıvı parafin ile karıştırılan ksantan zatkına da uygulanmıştır. Yirmi dört saat boyunca oda sıcaklığında bekletilen numunelerin emülsiyon indeksleri (E_{24}) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

$$E_{24} = \frac{h_e}{h_T} \times 100 \quad (2.3)$$

Burada, h_e , emülsiyon tabakasının yüksekliği (mm); h_T karışımın toplam yüksekliğini (mm) temsil etmektedir (Mota ve diğ., 2020). Emülsiyonların mikroskopik gözlemleri, 50X objektif lens kullanılarak Leica BM2500 polarize ışık mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.

2.7.9 EPS'nin metal iyonu şelatlama kapasitesinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

EPS'nin demir iyonlarını şelatlama kapasitesinin incelenmesi, Dinis ve diğ, (1994) yönteminin mikro ölçeğe uyarlaması ile 96 kuyucuklu mikrolakada gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde 200 µL suda çözünerek hazırlanan EPS numunesi, 2 mM konsantrasyonda 10 µL demir klorür çözeltisi ile karıştırılmıştır. Reaksiyon, 40 µL ferrozin (5 mM) eklenerek ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek başlatılmıştır. On dakika bekleme süresinin ardından numunelerin absorbensları 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu deneyde EDTA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Dinis ve diğ, 1994). Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

Ferrozin-Fe kompleks oluşumunun inhibisyon yüzdesinin hesaplanması aşağıdaki denklem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Parwani ve diğ, 2014).

$$\% \text{Metal şelatlama} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (2.4)$$

Burada, A_{blank} , blank solüsyonunun 562 nm'deki absorbens değeri, $A_{\text{örnek}}$ örneğin 562 nm'deki absorbens değerini göstermektedir.

EPS'nin antioksidan aktivitesi 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme yöntemi (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir (Kazan ve diğ, 2014). Deiyonize su içerisinde çözülerek hazırlanan EPS'nin farklı konsantrasyonlarından (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 ve 8 mg mL⁻¹) alınan 133 µl numune üzerine 17 µl 0,1 mM metanolik DPPH çözeltisi eklenerek numune ile DPPH çözeltisinin karıştırılması sağlanmıştır. Numuneler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra, ölçümler mikrolaka okuyucuda (Epoch, Biotek) 517 nm'de belirlenmiştir. EPS'lerin radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad (2.5)$$

Burada, A_{DPPH} , DPPH çözeltisinin 517 nm'deki absorbens değeri, $A_{\text{örnek}}$, analiz edilen örneğin 517 nm'deki absorbens değerini göstermektedir.

2.7.10 EPS'nin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi

EPS'nin MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerinin tespit edilebilmesi amacıyla *S. aureus* (Gram-pozitif bakteri) ve *E. coli* (Gram-negatif bakteri) bakteri suşları süspansiyonu 10⁵ CFU/ml yoğunlukta ayarlanarak farklı konsantrasyonlarda

hazırlanan EPS numunesi (0,5, 0,25, 0,125 mg mL⁻¹) varlığında 37°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiş ve kuyucuklara 150 µL besiyeri, 30 µL bakteri, 20 µL EPS çözeltisi eklenmiştir. Bakteri suşu, besiyeri ve antibiyotik içeren kuyucuklar pozitif kontrol olarak kullanılırken, besiyeri ve bakteri içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ölçümler 595 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda (Epoch, Biotek), 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu test yardımıyla bakteri hücre büyümesinin inhibe edildiği EPS konsantrasyonu belirlenmiştir (Gargouch ve diğ, 2021).

2.8 EPS Temelli Hidrojel Yara Örtülerinin Hazırlanması, Şişme ve İn-Vitro Degredasyon Testleri

EPS temelli yara örtülerinin hazırlanmasında EPS ve PVA çözeltileri hacimce 1:1 oranında birleştirilmiştir. Hidrojeli oluşturan çözeltilerin toplam hacimdeki derişimleri %0,25, %0,5 ve %1 EPS ile %5 PVA şeklinde ayarlanmıştır. EPS ve PVA sulu çözeltileri ile çapraz bağlayıcı olarak seçilen gluteralehit çözeltisi (%1) oda sıcaklığında sürekli karışma altında birleştirilmiştir. Ardından karışım 12 kuyucuklu plakalara dökülerek 1 gün boyunca 40 °C’de kurutulmuştur. Hidrojeller (çap: 2,5 cm) bileşimleri, şişme dereceleri ve in vitro degradasyon özelliklerine göre optimize edilmiştir. Kontrol grubu olarak PVA hidrojelleri kullanılmıştır. PVA hidrojeller EPS çözeltisi olmadan gluteralehit varlığında hazırlanmıştır.

Hazırlanan EPS hidrojellerin şişme davranışları pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde incelenmiştir. Bu amaçla farklı oranlarda EPS içeren hidrojeller ve kontrol olarak yalnızca PVA içeren hidrojellerin kuru ağırlıkları tartılarak not edilmiştir. Ardından hidrojeller tampon çözeltisine daldırılmış ve belirli zaman aralıklarıyla tampondan çıkarılarak ıslak ağırlıkları kaydedilmiştir. Aşağıda verilen denklik yardımıyla hidrojellerin yüzde şişme dereceleri hesaplanarak grafik oluşturulmuştur (Tamahkar, 2021). Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

$$\%Şişme = \frac{(\text{Hidrojel son ağırlık} - \text{Hidrojel ilk ağırlık})}{\text{Hidrojel ilk ağırlık}} \times 100 \quad (2.6)$$

Hazırlanan hidrojellerin hidrolitik degradasyon davranışları 37 °C’de 20 ml fosfat tamponunda (pH: 7,4) incelenmiştir. Hidrojeller (çap:2,5 cm) belirli zaman aralıklarında (1, 3, 5, 7, 14 gün) konuldukları tampon içerisinden alınarak, su ile yıkanmış ve kurutularak tartılmıştır. Hidrolitik degradasyon özellikleri tampon içine

konmadan önceki ve konduktan sonraki kuru ağırlık kaybı ile hesaplanmıştır (Tamahkar, 2021). Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

$$\%Ağırlık\ kaybı = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (2.7)$$

Burada, W_0 , hidrojel filmlerin tampon içerisine konmadan önceki ağırlığı (g), W_t , t süre sonunda tampon içerisinden çıkarılarak kurutulan hidrojel filmlerin ağırlığıdır (g).

2.8.1 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin yapısal ve morfolojik karakterizasyonu

Hazırlanan hidrojellerin kimyasal yapısı Perkin Elmer marka, Spectrum Two model FTIR ile incelenmiştir. Örneklerin FTIR spektrumu $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında incelenmiştir.

Hidrojellerin morfolojik yapıları, Carl Zeiss marka, Gemini 300 model taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile belirlenmiştir. Örnekler analiz öncesinde 10 nm kalınlığında Au-Pd tabakası ile kaplanmıştır. Örneklerin farklı bölgelerinden farklı büyüttmelerde görüntüler elde edilmiştir.

2.8.2 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin DSC ve TGA analizleri

Hidrojellerin termal özellikleri TGA ve DSC olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiştir. DSC ile hidrojellerin termal özellikleri, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülerek TA Instruments marka, Discovery DSC250 model Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Test Cihazı (DSC) ile belirlenmiştir. Ölçümler $0-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında $5\text{ }^{\circ}\text{C/dak}$ ısıtma hızıyla yapılmıştır.

Hidrojellerin TGA termogramları, TA Instruments marka SDT650 model TGA cihazı ile, $0-800\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında $10\text{ }^{\circ}\text{C/dak}$ ısıtma hızında argon atmosferinde sıcaklığa bağlı olarak analiz edilmiştir.

2.8.3 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin su buharı geçirgenlik testleri (WVTR)

Hidrojellerin su kaybını kontrol etme yeteneği ve su buharı geçirgenlikleri WVTR ile belirlenmiştir. Hidrojellerin WVTR'lerinin hesaplanması amacıyla hidrojeller E96-00 standart metodu kullanılarak $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %85 bağıl nem ortamında test edilmiştir (ASTM E 96-95). Hidrojeller daire şeklinde kesilerek 17 mm çapında ve 10 ml saf su içeren cam şişenin ağız kısmına yerleştirilmiş ve tartılmıştır. Ardından şişe doygun

amonyum sülfat çözeltisi içeren etüvde 37 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Şişe 24 saat sonra tekrar tartılarak su buharı geçirgenlik değeri (g/m²/gün) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Xu ve diğ, 2016). Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir.

$$WVTR (g m^{-2} gün^{-1}) = \frac{(\Delta m / \Delta t)}{A} \quad (2.8)$$

Burada, $\Delta m / \Delta t$, 24 saat sonunda kütle kaybı (g/gün), A, hidrojinin alanını (m²) göstermektedir.

2.8.4 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin mekanik testleri

EPS hidrojellerin mekanik özellikleri, evrensel mekanik test cihazı (SHIMADZU-AGS-X, Japonya) ile ASTM D 882-12 yöntemine göre belirlenmiştir. Mekanik özellikleri belirlemek için numune hazırlama cihazı (INSTRON-6054.000) ile 1 cm x 7 cm boyutlarında filmler hazırlanmıştır. Çeneler arası mesafe 60 mm ve çekme hızı 100 mm/dk olarak ayarlanmıştır. Testler üç tekrar halinde yapılarak ortalama sonuçlar standart sapmalar ile beraber verilmiştir. Filmlerin kopma anındaki uzama yüzdeleri ve çekme dayanımları aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplanarak veriler grafik haline getirilmiştir.

$$\% \text{ Kopma Uzama} = \frac{(\text{Kopma anındaki maksimum uzunluk (mm)} - \text{Numunenin ilk boyu (mm)})}{\text{Numunenin ilk boyu (mm)}} \times 100 \quad (2.9)$$

$$\text{Çekme dayanımı (MPa)} = \frac{\text{Filme uygulanan maksimum kuvvet (N)}}{\text{Numunenin kesit alanı (mm}^2\text{)}} \quad (2.10)$$

2.8.5 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Hidrojellerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 2,5 cm çapında kesilen daire şeklindeki hidrojeller 1 ml pH 7,4 fosfat tamponunda 1 gün süreyle bekletilmiştir (KAZAN ve diğ, 2023). Ardından ekstraktlardan alınan numunelerin antioksidan aktiviteleri başlık 2.7.9’da açıklanan DPPH yöntemi ile belirlenmiştir.

2.8.6 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi

EPS temelli hidrojellerin antibakteriyel aktivitesinin test edilmesi amacıyla 2,5 cm çapında dairesel olarak hazırlanan film numuneleri pH 7,4 fosfat tamponunda 1 gece boyunca bekletilmiş ve süpernatant antibakteriyel testlerde kullanılmıştır. Kontrol olarak PVA hidrojeller kullanılmıştır. Hidrojel filmlerin antibakteriyel aktivitesi

AATCC 100 metodunun modifiye edilmesi ile test edilmiştir. Bu amaçla petriden alınarak sıvı besi yerine ekilen *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) ve *Escherichia coli* (ATTC 25922) bakterileri gece boyunca 37 °C’de büyümeye bırakılmıştır. Ardından 0,5 Mcfarland’a ayarlanan bakteriler analiz için 100 kat seyreltilmiştir. Test için 96 kuyucuklu plakalar kullanılmış ve sırası ile kuyucuklara 100 µl film ekstraktı, 70 µl sıvı besiyeri ve 30 µl seyreltilmiş bakteriden eklenmiştir. Ardından 1 gün süreyle 37 °C’de inkübe edilen bakterilerin optik yoğunlukları 595 nm’de ölçülerek, filmlerin bakteri büyümesine etkisi incelenmiştir.

2.8.7 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin in-vitro biyouyumluluk testleri

EPS temelli hidrojel yara örtülerinin in-vitro biyouyumluluk analizleri MTT testleri ile yapılmıştır. Bunun için öncelikle, örneklerin tüm yüzeyleri UV ışık altında 1 saat bekletilerek steril edilmiştir. Tüm örnekler ISO 10093-12 protokolü önerileri doğrultusunda hazırlanarak steril falkon tüpler içine konularak ve %10 fetal bovin serum, %1 penisilin- streptomisin içeren DMEM (yüksek glikoz) besiyeri ortamında 37°C etüv içerisinde 72 saat süreyle bekletilmiştir. Sitotoksikite çalışmalarında ISO 10993-5 standardı protokollerinde de önerilen ve referans hücre hattı olarak kabul edilen L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 24 saat steril şartlarda çoğaltılıp 96 kuyucuklu plakalara 200 µL 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, 24 saat inkübasyona bırakılarak, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklenmiştir. 24 saat sonra yine steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmış ve daha önceden hazırlanan malzeme ekstraktlarını içeren besiyeri ortamları (%100, %75, %50, %25 oranlarında), negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %1 triton X-100 içeren besiyeri 200 µL/kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Plakalara ekilen hücrelerin 24 saat inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri ve hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. Hücreler, 37°C’de % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve oluşması beklenen formazan kristalleri 100 µL/kuyucuk olacak şekilde DMSO ile çözülmüştür. Kültür kabı 10 dakika yatay çalkalayıcıya konduktan sonra oluşan renk değişim miktarı spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Weyermann ve diğ,

2005). Veriler 3 tekrarlı olacak şekilde, ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

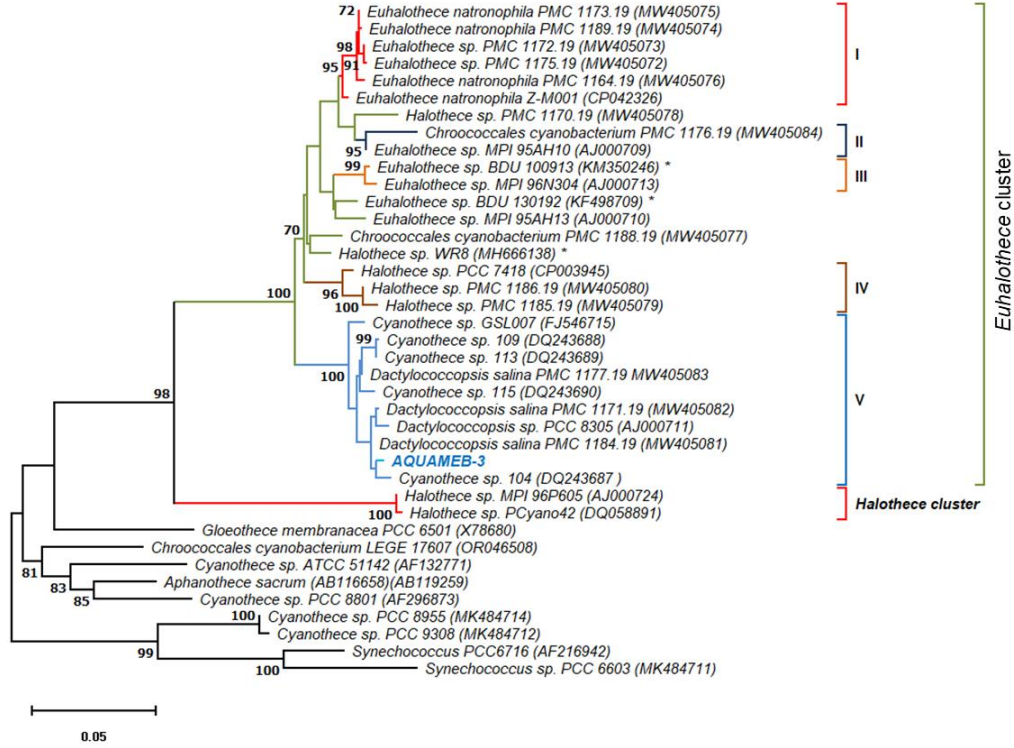
3.1 *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Genetik Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

Filogenetik bir belirteç olan 16S rRNA geni, korunan bölümleri ve yüksek bilgi içeriği nedeniyle siyanobakteriler de dahil olmak üzere prokaryotlarda tür tanımlamada yaygın olarak kullanılmaktadır. BLASTn kullanılarak yakın ve uzak 16S rRNA gen dizilerinden oluşan bir hizalama elde edilmiştir ve bu diziler, bir dergide yayımlanmış veya tanınmış bir kültür koleksiyonundan elde edilmiş olmaları durumunda seçilmiştir. Nihai hizalama, 1169 nükleotid pozisyonunu kapsayan otuz dokuz 16S rRNA gen dizisinden oluşmuştur ve tüm diziler arasındaki ortalama benzerlik %93'tür. Hizalanan gen dizileri %93 ortalama benzerliğe sahip toplam 1169 nükleotid pozisyonundan oluşmaktadır. Gen dizilerinden oluşturulan ML ağacında, *Euhalothece* sp., *Halothece* sp., *Cyanoteche* sp., *Chroococcales cyanobacterium* ve bazı *Dactylococcopsis* suşları gibi halotolerant suşlar yüksek önyükleme oranıyla kümelenmiştir. Bu küme önceki çalışmalara benzer şekilde; 28 suştan oluşan *Euhalothece* kümesi (*Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 dahil) ve *Halothece* sp. MPI 96P605 ile *Halothece* sp. PCyano42 dahil iki suş içeren *Halothece* kümesi olmak üzere belirgin iki kümeden oluşmuştur. *Euhalothece* ve *Halothece* kümeleri ortalama nükleotid özdeşliği %96,2 olup, dizi özdeşlikleri %89,8 ile %99,9 arasında değişmektedir (Çizelge 3.1). *Euhalothece* kümesi içindeki ortalama nükleotid özdeşliği %97 olup, dizi özdeşlikleri %94,6 ile %99,9 arasında değişmiştir. Yarza ve ark., (2014) cins için benzerlik oranının >%94,5 olarak, Barco ve ark., (2020) ise türler için benzerlik oranının >%98,7 olması gerektiğini belirtmişlerdir (Yarza ve diğ., 2014; Barco ve diğ., 2020). Bu taksonomik sınırlar kullanıldığında *Halothece* sp. MPI 96P605 ve *Halothece* sp. PCyano42'nin, *Euhalothece* küme suşlarından farklı bir cinse ait olduğu belirgindir. *Euhalothece* kümesi içinde, yüksek önyükleme oranıyla kümelenen 6 suşun (PMC 1173.19, PMC1189.19, PMC 1172.19, PMC 1175.19, PMC1164.19, Z-M001) nükleotid özdeşliklerinin %99'un üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu benzerlik oranı 6 suşun aynı tür içinde yer aldıklarını göstermektedir

(Şekil 3.1, alt küme I). *Chroococcales cyanobacterium* PMC 1176.19 ve *Euhalothece* sp. MPI 95AH10, yüksek benzerlik oranıyla (%98,3) kümelenmiştir (alt küme II) ancak bu suşların 16S rRNA gen dizisi özdeşliği, Barco ve ark.,(2020)'nin tür kesme değerinin altında kalmaktadır. ML ağacında *Euhalothece* sp. BDU 100913 ve *Euhalothece* sp. MPI 96N304 suşları yüksek benzerlik oranıyla (%99,3) kümelenmiştir (alt küme III) ve bu benzerlik oranı aynı tür olabileceklerini göstermektedir. *Euhalothece* kümesi içindeki *Halothece* suşları PCC 7418, PMC 1186.19 ve PMC 1185.19'u içeren alt küme IV yüksek benzerlik oranıyla kümelenmiştir. PCC 7418 ile PMC 1185.19 arasındaki nükleotit benzerliği %98,4 iken, diğerleri için %98,7'lik tür kesme değerinin üzerindedir. Son olarak, *Euhalothece* kümesi içindeki bir diğer alt-küme %99'luk ortalama nükleotit benzerlik değeriyle gruplanmıştır (alt küme V). Bu alt küme AQUAMEB-3 suşunu da içermektedir ve suşların birbirlerine olan özdeşlikleri %98,1 ile %99,9 arasında değişmektedir (Çizelge 3.1). Literatürde alt küme V'de bulunan tüm suşların ayrıntılı morfolojik analizleri eksik olsa da, *Cyanothece* sp. 109, 113, 115 ve 104'ün mikroskopik görüntüleri diğer *Euhalothece* tipi suşlara benzemekte ve PCC 8305 suşundan farklılık göstermektedir (Walsby ve diğ, 1983; Zhang ve diğ, 2007). İzole edilen AQUAMEB-3 suşunun 16S rRNA gen dizisi *Dactylococcopsis* spp. ile en yakın benzerlik oranına sahiptir (%99,3-%99,6 özdeşlik). *Dactylococcopsis* sp. PCC 8305 tuzlu veya aşırı tuzlu ortamlarda bulunan bir cinstir ve 80 µm'ye kadar uzunlukta hücreler oluşturabilir (Margheri ve diğ, 2008). AQUAMEB-3 morfolojik olarak PCC 8305'in uzun fusiform hücreleri gibi hücreler oluşturmaya da, 16S rRNA gen dizilerinin benzerliği oldukça yüksektir (%99,3).

Bu tez çalışmasında izole edilen yeni siyanobakteri suşuna *Euhalothece* kümesinde olan suşlara morfolojik olarak benzerliği nedeniyle *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 adının verilmesi önerilmiştir. Şekil 3.1'deki filogenetik ağaç *Euhalothece* kümesindeki tüm suşların aynı cinse ait olduğunu, ancak küme içinde birkaç farklı tür olduğunu göstermektedir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 ve *Dactylococcopsis* PCC 8305'in 16S rRNA gen benzerlikleri yüksek olsa da morfolojik olarak benzer olmamaları ilginç bir durumdur. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 uzun hücreler oluşturabilmesine rağmen (Şekil 3.2), bu hücreler hiçbir zaman *Dactylococcopsis* sp. PCC 8305 kadar uzun olmamıştır. Tür belirlemede tek başına 16S rRNA geninin kullanılması bir çok durumda belirsizliğe neden olabilir (Rudi ve diğ, 1997). Gelecekte

yapılan çalışmalarda *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 ve diğer *Euhalothece* sp. genom dizileri, morfolojik ve 16S rRNA gen tabanlı karşılaştırmalarda gözlemlenen tutarsızlıkları çözmeye yardımcı olabilir.

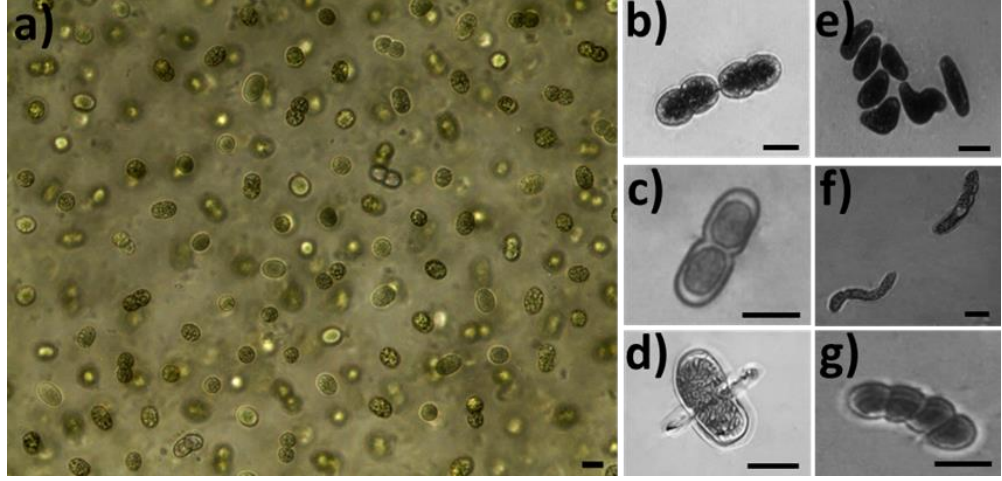


Şekil 3.1: 16S rRNA gen dizilerine (1169 bp) dayalı, maksimum olabilirlik (ML) ağacı, *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 ve ilgili siyanobakteriyel cinsler arasındaki ilişkileri göstermektedir.¹

¹ Evrimsel tarih, Maksimum Olabilirlik yaklaşımı ve Tamura 3 parametrelili modeli (Tamura 1992) kullanılarak çıkarılmıştır. Maksimum log olasılığını (-5771,32) gösteren ağaç sunulmuştur. Konumlar arasındaki evrimsel hız farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gamma dağılımı kullanılmıştır (5 kategori (+G, parametre = 0,1836). Hız varyasyon modeli, belirli konumlardaki evrimsel değişmezliği hesaba katmıştır ([+I], konumların %37,25'i). Ağaç, dal uzunluklarının konum başına ikameler açısından niceliksel olarak belirlenmesiyle doğru bir şekilde tasvir edilmiştir. %70'in altındaki önyükleme değerleri gösterilmemiştir. Siyah yıldızlar yayınlanmamış dizileri gösterir.¹

Çizelge 3.1 : *Euhalothece* ve *Halothece* kümelerinin 16S rRNA gen dizisi özdeşlikleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1.Chroococcales_cyanobacterium PMC_1176.19_(MW405084)																														
2.Chroococcales_cyanobacterium PMC_1188.19_(MW405077)	96.7																													
3. AQUAMEB-3	94.7	96.2																												
4.Cyanothece_sp._104 (DO243687)	94.6	96.0	99.2																											
5.Cyanothece_sp._109 (DO243688)	94.7	96.2	98.6	99.1																										
6.Cyanothece_sp._113 (DO243689)	94.8	96.3	98.7	99.1	99.9																									
7.Cyanothece_sp._115 (DO243690)	95.1	96.2	99.1	99.1	99.1	99.2																								
8.Cyanothece_sp.GSL007 (FJ546715)	94.8	96.7	98.7	98.1	98.4	98.5	98.6																							
9.Dactylococcopsis_salina PMC_1171.19_(MW405082)	95.1	96.6	99.5	99.2	98.6	98.7	98.9	99.0																						
10.Dactylococcopsis_salina PMC_1177.19_(MW405083)	95.1	96.7	99.1	98.8	99.4	99.5	99.4	99.1	99.1																					
11.Dactylococcopsis_salina PMC_1184.19_(MW405081)	95.1	96.4	99.6	99.4	98.8	98.9	99.1	98.9	99.8	99.3																				
12.Dactylococcopsis_sp. PCC_8305_(AJ000711)	94.7	96.3	99.3	99.0	98.3	98.4	98.9	98.6	99.5	98.7	99.4																			
13.Euhalothece_natronophila PMC_1164.19_(MW405076)	96.8	98.0	95.8	95.6	95.6	95.7	95.6	96.0	96.2	96.1	96.0	95.7																		
14.Euhalothece_natronophila PMC_1173.19_(MW405075)	97.0	98.0	95.7	95.4	95.5	95.6	95.4	95.8	96.0	95.9	95.8	95.6	99.7																	
15.Euhalothece_natronophila PMC_1189.19_(MW405074)	96.9	98.0	95.6	95.3	95.5	95.6	95.3	95.7	95.9	95.8	95.7	95.6	99.6	99.9																
16.Euhalothece_sp.BDU_100913 (KM350246)	96.7	97.7	96.7	96.4	95.7	95.7	95.9	96.3	96.9	96.0	96.8	96.5	97.8	97.8	97.7															
17.Euhalothece_sp.BDU_130192 (KF498709)	96.7	97.9	96.8	96.8	95.9	96.0	96.3	96.3	97.2	96.4	97.2	96.9	97.5	97.7	97.6	98.0														
18.Euhalothece_sp.MPI_95AH10 (AJ000709)	98.3	97.9	95.7	95.7	95.8	96.1	95.9	96.2	96.2	96.2	96.2	95.8	98.4	98.5	98.5	98.0	97.8													
19.Euhalothece_sp.MPI_95AH13 (AJ000710)	96.4	97.3	96.9	96.8	96.0	96.1	96.3	96.7	97.4	96.5	97.3	96.9	97.4	97.4	97.4	98.1	98.2	97.5												
20.Euhalothece_sp.MPI_96N304 (AJ000713)	96.8	97.9	96.7	96.4	96.1	96.2	96.3	96.4	96.7	96.2	96.5	96.2	97.5	97.5	97.6	99.3	97.6	98.0	97.7											
21.Euhalothece_sp. PMC_1172.19_(MW405073)	97.1	98.1	95.7	95.5	95.6	95.6	95.5	96.1	96.1	96.0	95.9	95.7	99.5	99.8	99.7	97.8	97.7	98.6	97.5	97.8										
22.Euhalothece_sp.PMC_1175.19 (MW405072)	97.0	98.0	95.6	95.4	95.5	95.6	95.4	96.0	96.0	95.9	95.8	95.6	99.4	99.7	99.7	97.7	97.6	98.5	97.4	97.7	99.9									
23.Halothece_sp.MPI_96P605 (AJ000724)	89.9	90.8	90.5	90.8	91.1	91.2	90.7	91.0	90.8	91.0	90.8	90.4	90.5	90.5	90.6	90.7	90.8	91.0	90.9	91.1	90.6	90.5								
24.Halothece_sp. PCyano42 (DO058891)	89.8	90.7	90.4	90.7	91.0	91.1	90.6	90.9	90.8	90.9	90.7	90.3	90.4	90.4	90.5	90.6	90.7	90.9	90.8	91.0	90.5	90.4	99.8							
25.Halothece_sp.PMC_1170.19 (MW405078)	96.7	96.8	96.3	95.9	96.2	96.2	96.5	96.7	96.7	96.6	96.5	96.2	97.2	97.4	97.3	97.4	96.9	98.1	97.4	97.4	97.5	97.4	91.2	91.1						
26.Halothece_sp. WR8_(MH666138)	96.4	98.1	96.4	96.2	96.8	96.9	96.4	96.5	96.6	97.0	96.4	96.1	97.4	97.4	97.4	97.3	97.6	97.4	97.5	97.8	97.5	97.4	91.0	90.9	96.8					
27.Halothece_sp.PCC_7418 (CP003945)	96.1	97.2	96.1	95.7	95.9	96.0	96.1	95.9	96.2	96.4	96.3	96.0	96.8	96.8	96.9	96.7	97.4	97.1	97.0	96.9	96.9	96.8	90.7	90.6	96.4	97.6				
28.Euhalothece_natronophila Z.M001(CP042326)	97.3	98.1	96.0	95.7	95.8	95.9	95.7	96.2	96.4	96.3	96.2	96.1	99.0	99.1	99.1	97.6	98.0	98.7	97.8	97.6	99.2	99.1	90.7	90.6	97.7	97.9	97.1			
29.Halothece_sp.PMC_1186.19 (MW405080)	95.9	96.8	96.9	96.5	96.8	96.8	96.9	96.7	97.1	97.3	97.2	96.8	96.4	96.4	96.5	96.8	97.2	97.0	96.9	97.0	96.5	96.4	90.8	90.8	96.8	97.4	98.9	96.8		
30.Halothece_sp.PMC_1185.19 (MW405079)	95.4	96.3	96.4	96.0	96.2	96.3	96.4	96.2	96.6	96.8	96.7	96.2	95.9	95.9	96.0	96.3	96.7	96.5	96.4	96.5	96.0	95.9	90.5	90.4	96.2	96.9	98.4	96.3	99.5	



Şekil 3.2: *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun morfolojisi.²

3.1 *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 Siyanobakteri Suşunun Optimal Kültür Koşullarının Tespiti

Euhalotheca sp. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun optimum büyüdüğü ve verimli EPS ürettiği koşulları tespit etmek amacıyla faktöriyal dizayn deneyleri tasarlanmıştır. Tasarlanan deneylerde hücrelerin dokuz farklı tuzluluk (37, 60, 80, 100, 120, 140 and 160 ppt), 3 farklı sıcaklık (19 °C, 23 °C and 27 °C) ve 3 farklı ışık şiddetinde (75, 150 and 300 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) büyümeleri gözlenmiştir. Hücre büyümeleri iki günde bir 750 nm’de optik yoğunlukları ölçülerek takip edilmiştir. Oluşturulan büyüme grafikleri Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Büyüme deneyleri 200 μl hacimli mikro plakalarda gerçekleştirildiğinden, buharlaşmadan kaynaklanan hacim kaybının etkisinden kaçınmak için deneyler kısa bir süre (14 gün) boyunca devam etmiştir.

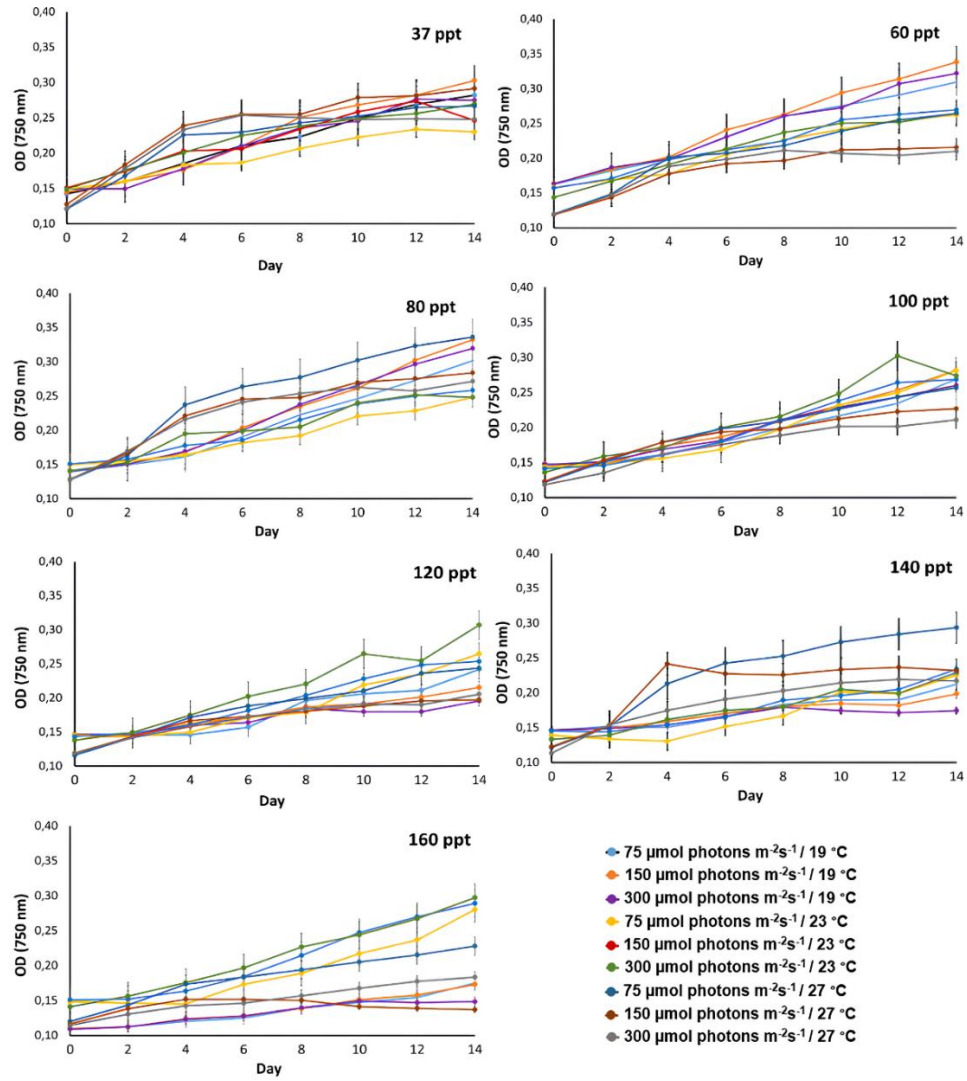
Faktöriyal dizayn deneyleri buharlaşma kaybını en aza indirmek için %85 nem oranında sıcaklık ayarı yapılabilen iklim kabininde gerçekleştirildiğinden, her sıcaklık için deneyler farklı zaman periyotlarında yapılmıştır. Hücrelerin 750 nm’deki başlangıç optik yoğunlukları 0,11 ile 0,15 arasında değişirken, 14 gün sonunda minimum ve maksimum optik yoğunluklarının 0,20 ile 0,34 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Hücrelerin büyümeleri literatüre benzer olarak yavaştır ancak ortamda

² a) 60 ppt PES ortamında logaritmik büyüme fazında sıklıkla gözlenen morfolojisi b) 80 ppt PES ortamında psödo filamentöz hücre morfolojisi. c) EPS kılıfıyla çevrilen hücrelerin bölünmesi d) Halka benzeri görünüme sahip hücre görünümü e) 60 ppt PES ortamında düzensiz yapıli hücre görüntüsü f) 60 ppt Johnson ortamında psödo filamentöz *Dactylococcopsis* benzeri hücreler g) 60 ppt PES ortamında gözlenen asimetrik hücre bölünmesi (Ölçek =10 μm).

bulunan tuz veya karıştırma sağlanamayan mikro plaka ortamındaki düşük CO₂ difüzyonu yavaş büyümeye neden olmuş olabilir (Garcia-Pichel ve diğ., 1998). Büyüme deneylerinde 2 hafta sonunda 37 ppt, 60 ppt ve 80 ppt'deki hücrelerin yüksek tuzluluktaki hücrelere kıyasla benzer veya daha hızlı büyüme gösterdiği gözlemlenmiştir. Hücre yoğunluklarının yüksek tuzluluk değerlerinde ise (140 ppt ve 160 ppt) en düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Özetle, oluşturulan büyüme grafikleri, hücre büyümesinin, büyüme ortamındaki artan tuzlulukla birlikte az miktarda da olsa azaldığını göstermiştir.

Halotheca tipi mikroorganizmalarla yapılan diğer çalışmalarda, hücrelerin geniş bir tuzluluk aralığında büyüebildiği, ancak optimum büyümenin meydana geldiği tuz konsantrasyonunun da benzer şekilde geniş bir aralıkta değiştiği gösterilmiştir. Garcia-Pichel ve diğ. (1998), *Halotheca* sp. PCC 7418 için ideal tuzluluğun yaklaşık 106 ppt olduğunu ve *Aphanotheca halophytica* için optimum tuzluluğun 65 ppt ile 160 ppt arasında değiştiğini göstermiştir. Ayrıca *Dactylococcopsis* sp. PCC8305, *Halotheca* sp. PCC7418 ve *Euhalothece* sp. MPI95AH13'te büyüme oranlarının yaklaşık 100 ppt tuzluluğa kadar ve *Euhalothece* sp. MPI95AH10'da büyüme oranının 160 ppt tuzluluğa kadar arttığını bildirmişlerdir (Garcia-Pichel ve diğ., 1998). Diğer bazı çalışmalarda *Cyanoteche* 115'in 10 ila 50 ppt tuzlulukta, *Euhalothece* sp. Z-M001'in 30 ila 100 ppt arasında, *Halotheca* sp. PCC 7418'in 30 ppt ila 60 ppt arasında optimum şekilde büyüebileceği bildirilmiştir (Mogany ve diğ., 2018 b; Tang ve diğ., 2020). Zhang ve diğ. (2018), farklı *Cyanoteche* türlerinin farklı optimum NaCl konsantrasyonlarında büyüebileceğini bildirmiştir (Zhang ve diğ., 2018). Örneğin, *Cyanoteche* 109, 10 ppt'de optimum şekilde büyüebilirken, 104 ve 113 suşlarının büyümesi, ortamdaki tuzluluk 0'dan 10 ppt'ye çıkarken tutarlı bir düşüş göstermiştir. Bu durum *Cyanoteche* türlerinin, 45 ila 125 ppt tuzluluk aralığında en iyi şekilde gelişen ve aşırı tuzlu göletlerde bulunan bir tür olan *Aphanotheca halophytica*'nın aksine halofilik olmadığını doğrulamıştır (Zhang ve diğ. 2018). Bu araştırmada tartışılan *Cyanoteche* 109 suşu, *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşuna %98,6'lık bir 16S rRNA gen özdeşliği sergilemiştir. Ancak, 37 ppt ile 160 ppt arasında büyüyen ve halotolerant özellikler gösteren *Euhalothece* sp, AQUAMEB-3'e kıyasla belirgin ve daha düşük bir optimum tuzluluk seviyesine sahiptir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşunun büyüdüğü tuzluluk değerleri, *Halotheca* sp. PCC 7418, *Dactylococcopsis* sp. PCC8305, *Halotheca* sp. PCC7418, *Euhalothece* sp. MPI95AH13 ve *Euhalothece* sp.

MPI95AH10 suşlarına benzerdir. Yapılan çalışmalar, *Halotheca* ve *Euhalothece* kümesine ait benzer siyanobakteri suşları için optimum büyüme sıcaklıklarının 30 °C ile 40 °C arasında değiştiğini bildirmiştir (Garcia-Pichel ve diğ, 1998; Brauer ve diğ, 2014; Dechatiwongse ve diğ, 2014). Siyanobakteriler, aşırı tuzlu sulardaki düşük ısı kapasiteleri nedeniyle yüksek sıcaklıklara tolerans gösterebilirler; bu sayede güneş ışığıyla ısıtıldıklarında yüksek sıcaklıklara kolayca ulaşabilirler. Bu tez çalışmasında test edilen sıcaklık aralıkları, sıcaklığın hücre büyümesi üzerindeki etkilerini anlamak için çok dar olabilir.



Şekil 3.3: AQUAMEB-3 hücrelerinin 120, 140 ve 160 ppt tuzluluk içeren kültür ortamında, 19, 23 ve 27 °C sıcaklık, 75, 150 ve 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde büyümelerini göstermektedir.

3.2 Fenotipik Karakterizasyon ve Morfometrik Ölçümler

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 hücreleri genellikle silindirik-oval şekilde olmakla birlikte nadiren kokoid şeklinde de görülmüştür. Hücreler 60 ppt PES stok kültürde logaritmik büyüme sırasında 6-7 µm uzunluğunda ve 4,5-5 µm genişliğindedir (Şekil 3.2 a). Yapılan çalışmalarda *Halotheca* benzeri hücrelerin morfolojisinin değişkenlik gösterebileceği belirtildiğinden suşun morfolojisinin karmaşık olduğu söylenebilmektedir. Örneğin, Garcia-Pichel ve ark. (1998) 13 halotolerant siyanobakteriyel türün morfolojik farklılıklarını araştırmış ve tüm türlerin tek hücreli olmasına rağmen hücre şekillerinin kokoidden basiloide değiştiğini, bazı suşların ise koloniler halinde büyüdüğünü bildirmişlerdir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 izolatında koloni oluşumu gözlenmemiştir. Bununla birlikte, izole edilen suş, *Chroococcales* üyelerine fenotipik ve fiziksel benzerlikler göstermiştir (Strunecký ve diğ., 2023). *Chroococcales* siyanobakteri ailesi, ikili fisyon veya tomurcuklanma ile üreyen küresel, elipsoidal, çubuk şeklinde, tek hücreli siyanobakterileri içerir. Yeni izolatın hücreleri, uzun eksene dik veya hafifçe eğik olarak ikili fisyonla bölünmektedir (Şekil 3.2 b ve c). Bazen, hücre bölünmesi sırasında, hücrelerin bölünme noktasında gezegen halkası benzeri yapılar gözlenmiştir (Şekil 3.2 d). Hücre bölünmesi çoğu zaman simetrik olmasına rağmen, bazen asimetrik hücre bölünmesi de gözlenmiştir (Şekil 3.2 e). Yeni izolat için involüt ve uzun hücreler de nadiren gözlenmiştir (Şekil 3.2 f ve g), ancak bunlar çoğunlukla psödo filamentlerdir. Yeni izolatın hücrelerinin genişlikleri önemli ölçüde değişmezken (4-5 µm), uzunlukları genellikle 6-7 µm uzunluğundadır. *Halotheca* benzeri hücrelerin hücre genişliklerinin 2,6 ila 10 µm arasında değiştiği ve hücre uzunluklarının genellikle 4 ila 15 µm arasında değiştiği bildirilmiştir. Ancak, *Halotheca* grubuna ait bir başka tür olan *Dactylococcopsis* sp. PCC 8305, 82 µm uzunluğa ulaşabilmektedir (Margheri ve diğ., 2008; Rippka ve diğ., 2015). *Dactylococcopsis*, hücreleri 4-8 × 35-80 µm ölçülerinde olan uzun tek hücreli siyanobakteriler olarak tanımlanmıştır, ancak zaman zaman hücre uzunlukları 135 µm'ye kadar ulaşabilir. PCC 8305'in hücrelerinde kılıf yoktur ve olgun uçlarda bol miktarda gaz vakuolleri bulunur. PCC 8305 hem halofilik hem de halotolerant karakterler göstermektedir (Rippka ve diğ., 2015). Yeni izolatın genişliği ve uzunluğu literatürde bildirilen *Halotheca* suşlarına benzerken, hücre uzunluklarının çoğu zaman *Dactylococcopsis* sp. PCC 8305'ten daha kısa olduğu görülmüştür. Bununla birlikte her iki suşun da gaz vakuolleri içermesi gibi ortak

özellikleri mevcuttur. Gaz vakuollerinin varlığı, özellikle yeni suşun yaşlı hücrelerinde gözlemlenmiştir.

Yeni izolatin hücreleri çevreleyen ince bir mukus tabakası mevcuttur. Ayrıca, yaşlanmış hücrelerin jel benzeri kıvamda olduğu ve kültür ortamına büyük miktarda polisakkarit salgıladığı tespit edilmiştir. Oren (2015), halotolerant ve halofilik siyanobakterilerin hücre dışı polisakkarit ürettiğini ve bu polisakkaritlerin gölet tabanlarını kapatarak tuzlu su sızıntısını önlediğini bildirmiştir. *Aphanothece* tipi hücrelerin büyük miktarda polisakkarit mukus salgıladığı bilinmektedir (Oren, 2015). Margheri ve diğerleri (1999), PCC 7418 hariç, *Halothece* benzeri suşların çözünür ekzopolisakkaritler ürettiğini ve hücre etrafında kalın bir polisakkarit kapsülü sergilediğini bildirmişlerdir.

Siyanobakteri hücrelerinin ortamdaki çeşitli tuz konsantrasyonlarına göre morfolojisi, 37 ppt ile 160 ppt tuzluluklarında büyüyen hücre resimlerinden analiz edilmiş ve çizelge 3.2’de farklı tuzluluk içeren ortamlardaki hücre en ve boy uzunlukları gösterilmiştir. Siyanobakteri hücreleri test edilen tüm tuzluluklarda büyüme göstermiştir. Stok kültür ortamına göre (60 ppt) ortamdaki tuzluluk arttıkça ve azaldıkça hücrelerin uzadığı gözlenmiştir. Ortamdaki tuzluluğa bağlı olarak hücrelerin genişliklerinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

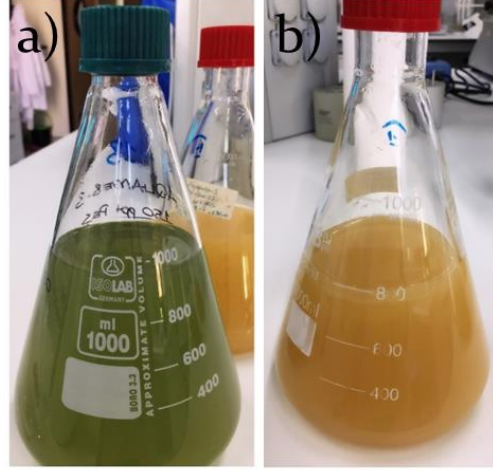
Çizelge 3.2 : *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin morfolojik özellikleri. Değerler ortalama $\pm$ SD’yi temsil etmektedir.

Tuz konsantrasyonu (ppt)	37	60	80	100	120	140	160
Uzunluk (μ m)	7.51 $\pm$ 1.72	6.18 $\pm$ 1.05	6.84 $\pm$ 1.45	6.75 $\pm$ 1.13	6.86 $\pm$ 1.27	8.06 $\pm$ 1.42	7.17 $\pm$ 1.43
Genişlik (μ m)	5.24 $\pm$ 0.69	4.52 $\pm$ 0.42	4.46 $\pm$ 0.36	4.52 $\pm$ 0.29	4.92 $\pm$ 0.35	5.66 $\pm$ 0.66	5.61 $\pm$ 0.50

Önceki çalışmalarda, tuzluluğun *Halothece* benzeri hücrelerin morfolojisini etkileyen ana faktör olduğu bildirilmiştir (Garcia-Pichel ve diğ, 1998; Margheri ve diğ, 2008). Suşlara göre tuzluluğun etkisi değişkenlik göstermiştir. Örneğin; PCC 7418, MPI 95AH10, MPI 95AH11, SYN CI P22 ve ATCC 43922 hücreleri gibi suşların, yüksek tuzluluk koşulları altında uzun ve bazen psödo filamentöz bir morfoloji sergilediği görülmüştür. Margheri ve diğ (2008), tuzluluğun hücre morfolojisini etkilediğini ve hücrelerin daha yüksek tuzluluk koşulları altında genellikle genişliklerinde artış ve uzunluklarında azalma gösterdiğini bildirmiştir. Düşük veya yüksek tuzluluklardaki daha geniş hücreler bu çalışmadaki yeni izolat için spesifiklerdir.

3.3 *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 Suşunun Pigment İçeriğinin İncelenmesi

Euhalotheca sp. AQUAMEB-3 kültürde logaritmik büyüme fazı boyunca yeşil renkte bulunmaktadır (Şekil 3.4 a). Hücreler 6-8 haftalık inkübasyonun ardından durağan faza ulaşarak renkleri turuncuya dönmektedir (Şekil 3.4 b).



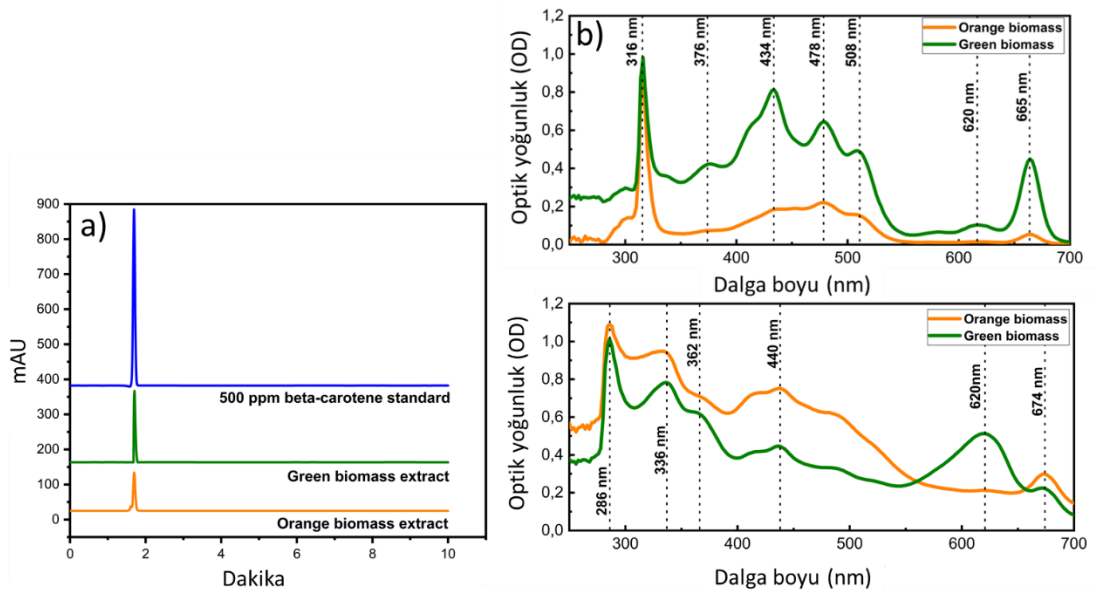
Şekil 3.4: Erlende kültürlen *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 hücreleri. a) logaritmik fazda bulunan yeşil hücreler. b) durağan fazda bulunan turuncu renkli yaşlı hücreler.

Euhalotheca sp. AQUAMEB-3 yeşil biyokütlesinin kuru ağırlığının $1,6 \pm 0,2$ 'si C-fikosiyanin, $0,56 \pm 0,009$ 'u beta karoten ve $0,32 \pm 0,015$ 'i klorofil-a içermektedir. Turuncu *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 biyokütlesinin ise kuru ağırlığının $0,06 \pm 0,02$ 'sinin C-fikosiyanin, $0,43 \pm 0,005$ 'inin beta karoten ve $0,084 \pm 0,013$ 'ünün klorofil-a olduğu bulunmuştur. Hücrelerin pigmentasyonuna göre, yaşlanan hücrelerin klorofil ve fikobiliproteinleri bozunabilirken, Garcia-Pichel ve ark. (1998) tarafından *Halothece* küme suşları için bildirildiği gibi beta karoten içeriklerinde azalma olabilmektedir. Benzer şekilde, Mogany ve ark. (2018), *Euhalotheca* sp.'nin kuru ağırlığının $1-1,5$ 'i kadar C-fikosiyanin içerdiğini bildirmiştir.

Yeşil ve turuncu *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin aseton özütlerinin UV-vis absorptans spektrumlarında (Şekil 3.5) 660 nm civarındaki ve 400 nm'nin baş kısmındaki pikler klorofil-a'dan kaynaklanırken, 478 nm ile 510 nm arasındaki pikler karotenoidlerden kaynaklanmaktadır. Yaşlı kültürlerde (turuncu) klorofil pikleri kaybının yanı sıra karotenoid piklerinin şiddetinin azaldığı da çok açıktır.

Öte yandan, yeşil *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin sulu özütünde, 620 nm'deki pik C-fikosiyaninden kaynaklanırken bu pik turuncu hücrelerde

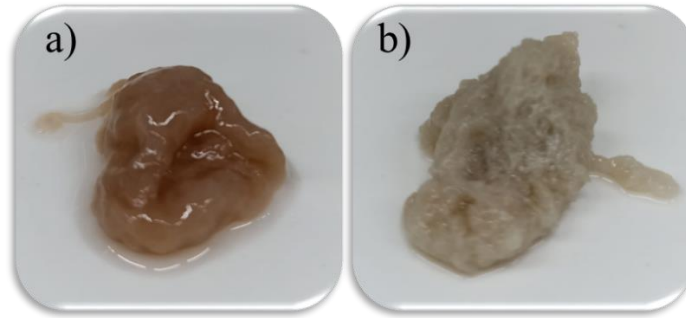
gözlenmemiştir (Mogany ve diğ, 2020) (Şekil 3.5). Karotenoidlerin suda çözünmediği bilinmektedir ancak hem yeşil hem de turuncu hücrelerin su özütlerinde yaklaşık 440 nm'de karoteniotlere ait bantlara gözlenmiştir. Santrifüjlenmiş ve filtrelenmiş (0,22 µm) turuncu hücrelerin sulu özütünün renginin de açık turuncu renkte olduğu görülmüştür. Bu durumun, sulu özüt içerisinde kalan suda çözünür ekzopolisakkaritlerin veya diğer suda çözünür hücre bileşenlerinin karotenoidleri bağlaması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Ayrıca kültür ortamında çözünür şekilde bulunan ekzopolisakkaritlerin saflaştırılması sırasında, saflaştırılmış EPS'de, tekrarlanan etanol yıkaması ile giderilen turuncu ton gözlenmiştir. Etanol yıkaması olmadan çökelti halinde bulunan EPS turuncu bir tona sahipken (şekil 3.6 a), tekrarlanan etanol yıkamalarının ardından çökelti halinde bulunan EPS'nin rengi beyaza doğru değişmektedir (Şekil 3.6 b). Etanol ile yıkamalar EPS'ye bağlı halde bulunan karotenoid pigmentlerin yapıdan uzaklaşmasını sağlamıştır.



Şekil 3.5: a) *E. aquameb-3* yeşil ve turuncu hücrelerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının HPLC kromatogramları. b) *E. aquameb-3*'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin aseton ekstraktlarının spektrumu. c) *E. aquameb-3*'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin sulu özütlerinin spektrumu.

E. aquameb-3'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin hem aseton hem de sulu özütlerinde, mikosporin benzeri amino asitlerden (MAA'lar) kaynaklandığı düşünülen 300 ila 400 nm arasında pikler gözlenmiştir (Bairwa ve diğ, 2021). Aseton özütlerinde 316 nm'de gözlenen keskin pik ile sulu özütlerdeki 336 nm ve 362 nm'de

bulunan pikler hem yeşil hem de turuncu hücrelerde görülmüştür (Şekil 3.5 b ve c). Mikosporin benzeri amino asitler (MAA'lar), bu organizmalarda UV kaynaklı zarara karşı koruma işlevi gören bir grup suda çözünen kimyasaldır (Mogany ve diğ, 2022). Garcia-Pichel ve ark. (1998) *Halotheca* benzeri suşlarda shinorin (λ_{max} 334 nm) ve 360-365 nm arasında emilim gösteren başka bir MAA olmak üzere iki ana MAA olduğunu bildirilmiştir. Benzer şekilde MAA'lar, İsrail'in Eilat kentindeki bir tuz havuzundan izole edilen *Euhalotheca* sp.'de de gözlemlenmiştir. Yüksek ışık şiddeti altında yetiştirildiğinde, bu suş biri 331 nm, diğeri 362 nm'de maksimum absorbans gösteren iki MAA'yı yüksek miktarda üretmiştir. Bu MAA'lardan 331 nm dalga boyunda emilim gösteren molekül mikosporin-2-glisin olarak tanımlanmıştır (Kedar ve diğ, 2002). *Euhalotheca* sp. suşu LK-1 ile yapılan başka bir çalışma suşun, 331 ve 362 nm'de maksimum emilim gösteren iki MAA içerdiğini doğrulamıştır. Ek olarak, bu çalışmada 362 nm'de emilen MAA, 2-(E)-3-(E)-2,3-dihidroksiprop-1-enilimino-mikosporin-alanin olarak tanımlanmıştır (Volkman ve diğ, 2006). *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3'teki MAA'ların kesin tespitleri için daha fazla karşılaştırma ve analiz gerekmektedir. *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3'ün yeşil ve turuncu hücrelerinin sulu özütlерinde gözlemlenen yaklaşık 280 nm'deki keskin pikin proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

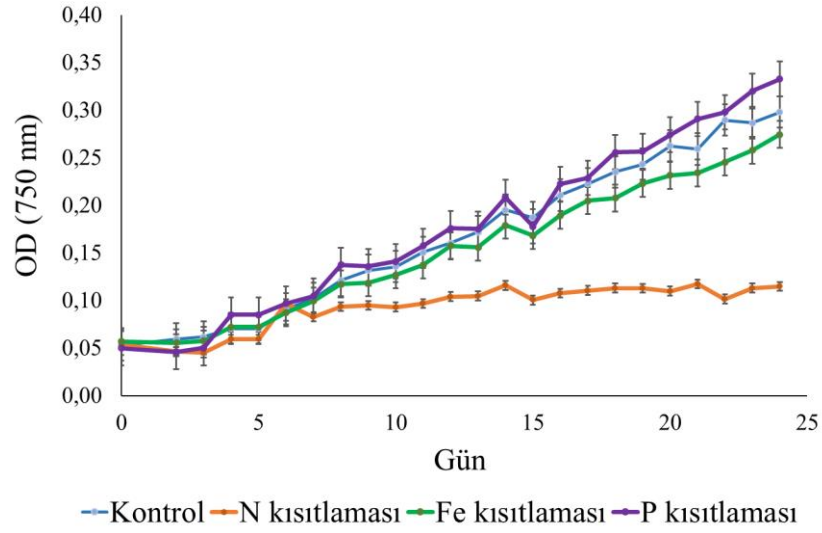


Şekil 3.6: a) Etanol ile yıkanmadan önce çökelti halinde bulunan EPS. b) Etanol ile yıkamanın ardından çökelti halinde bulunan EPS.

3.4 Besin Stresinin *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 Suşunun EPS Üretimi ve Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Besin stresinin EPS üretimine etkisini belirlemek amacıyla tasarlanan deney sisteminde azot, demir ve fosforun hücre büyümesine etkisi büyüme grafiğı oluşturularak gözlenmiştir (Şekil 3.7). Büyüme grafiğinden yola çıkarak hücre büyümesini en yüksek oranda sınırlayan besinin azot olduğu görülmüştür. Besin

kısıtlamasına maruz bırakılan hücre kültürlerinde deney sonunda renk değişimi gözlenmiştir (şekil 3.8 b). Deney sonunda azot kısıtlaması uygulanan hücre kültürü turuncu renkte iken diğer kültürlerin yeşil renkte olduğu görülmüştür. Azot kısıtlaması siyanobakterilerde fikobilizomların yıkımına neden olmaktadır (Ref). Diğer taraftan azot protein üretimi için gerekli olduğundan hücre büyümemiştir. Dolayısıyla azot kısıtlaması altındaki hücrelerin pigmentasyonu geç durağan veya ölüm fazındaki hücrelere benzer bulunmuştur.



Şekil 3.7: Besin kısıtlaması uygulanan AQUAMEB-3 hücrelerinin büyüme grafiğini göstermektedir.

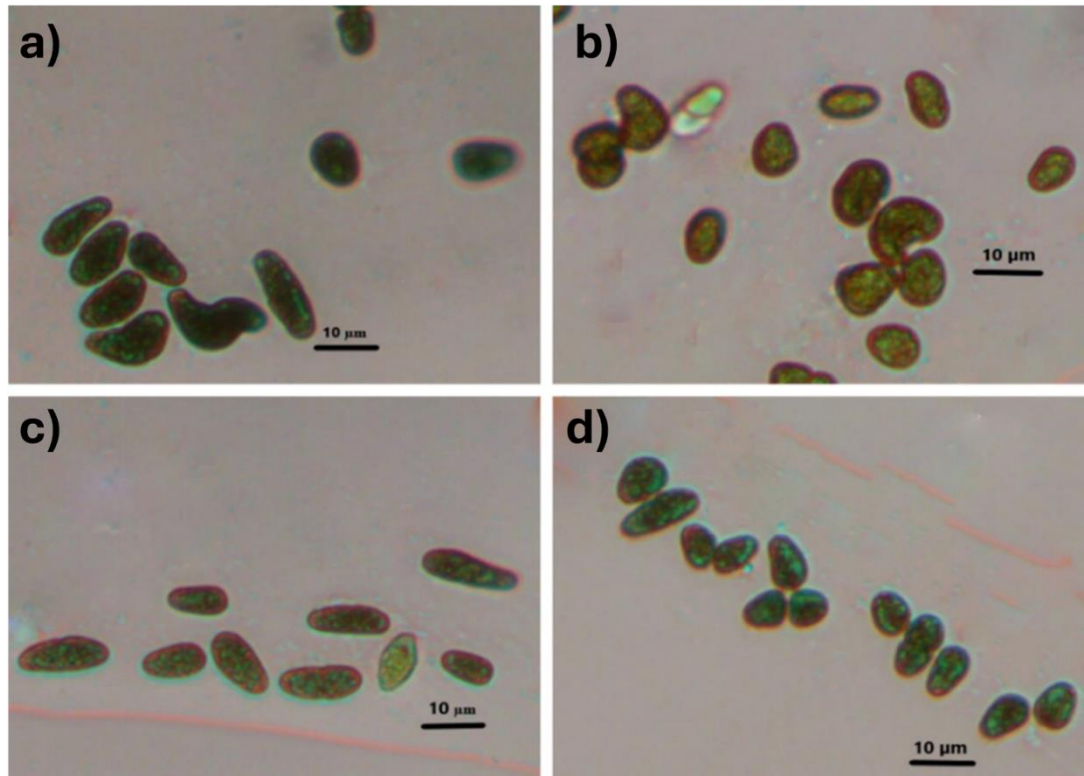
Besin kısıtlamasına maruz kalan hücrelerden, kısıtlamadan önce ve kısıtlamadan sonra elde edilen EPS içerikleri Çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Tüm nütrientleri içeren kültür ortamında çoğaltılan kontrol grubu hücrelerinden elde edilen EPS ile besin kısıtlamasına maruz bırakılan hücrelerden elde edilen EPS’nin biyokimyasal içeriği karşılaştırıldığında, besin kısıtlamasının EPS’nin karbonhidrat ve üronik asit içeriğini arttırdığı gözlenmiştir.

Siyanobakterilerin ürettikleri EPS miktarı ve bileşimi çevresel koşullara göre değişmektedir. Besin kısıtlaması, özellikle azot ve fosfor eksikliği, siyanobakterilerin metabolik aktivitelerini etkileyerek EPS üretimini etkileyebilir ve bu durum EPS içeriğindeki karbohidrat gibi içeriklerinde de değişime yol açabilir. Örneğin azot kısıtlamasına maruz bırakılan siyanobakteriler, enerji ve karbon depolama stratejisi olarak karbohidrat üretimini arttırabilir (Ref). Benzer şekilde, fosfor eksikliği hücre içi metabolik dengeleri değiştirerek EPS içeriğini ve karbohidrat içeriğini değiştirebilir

(Ref). Ancak bahsedilen tüm bu etkiler siyanobakteri türüne, çevresel koşullara (ışık şiddeti, sıcaklık gibi) ya da kısıtlanan besin türüne bağlı olarak farklılık gösterebilir.

Azot hücre materyalinin sentezi için en önemli elementlerden biridir ve siyanobakteriler ya bir azot kaynağına bağımlı ya da sınırlı sayıda olsa da bazıları atmosferik azotu sabitleme özelliğine sahiptirler. Azot kaynağı ve miktarına bağlı olarak EPS üretimi siyanobakteriler için değerlendirilmiş ve test edilen suşa göre farklı sonuçlar gözlenmiştir. Kültür ortamında bir azot kaynağının varlığı, azotun asimilasyonu için gereken enerji gereksiniminin, azot fiksasyonu için gereken enerjiye kıyasla daha düşük olması nedeniyle EPS sentezinde bir artışa neden olmuştur (Otero ve diğ, 2003). Bazı siyanobakterilerde azot kaynağı değişse de üretilen EPS miktarı değişmemiştir. Örneğin *Anabaena flosaquae* A37'nin farklı nitrojen kaynaklarına rağmen ($Mg(NO_3)_2$, KNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3 , NH_4Cl) aynı miktarda EPS ürettiği gözlenmiştir (Tischer ve Davis, 1971). *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3'nin azot kısıtlamasına maruziyetinde EPS içeriğindeki karbohidrat miktarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak fosfor kısıtlaması EPS içeriğindeki karbohidrat miktarının artmasına neden olmuştur. Bu artış hücrelerin stres koşullarına adaptasyonu olarak değerlendirilmektedir. Örneğin, bazı çalışmalar, fosfor eksikliği altında siyanobakterilerin EPS üretimini artırdığını ve bu EPS'nin karbonhidrat içeriğinin de yükseldiğini göstermektedir. Bu durum, hücrelerin stres koşullarına adaptasyon mekanizması olarak değerlendirilebilir (Reignier ve diğ, 2023). Ancak, bu konuda spesifik araştırmalar sınırlıdır ve farklı siyanobakteri türleri arasında değişkenlik gösterebilir.

Besin kısıtlamasına maruz bırakılan hücreler deney sonunda morfolojik olarak mikroskopta incelenmiştir (Şekil 3.8). Azot kısıtlaması yapılan hücrelerdeki turuncu renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.8 b). *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun, farklı koşullarda gösterdiği morfolojik değişim ilgi çekicidir ve türün tanımlanması açısından önemlidir. Yirmi adet hücre ölçümü yapılarak elde edilen veriler Çizelge 3.6' da gösterilmiştir. Özellikle azot kısıtlamasına maruz bırakılan hücrelerde boyut olarak belirgin bir küçülme gözlemlendiği söylenebilmektedir.



Şekil 3.8: *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 hücrelerinin morfolojisi. a) 60 ppt J1 kültür ortamında inkübe edilen hücreler. b) N kısıtlaması uygulanan hücreler. c) P kısıtlaması uygulanan hücreler. d) Fe kısıtlaması uygulanan hücreler

Çizelge 3.3 : Besin kısıtlamasına maruz bırakılan AQUAMEB-3 hücrelerinin ve kontrol hücrelerin boy uzunluklarını göstermektedir. Ölçümler 20 adet hücre ile yapılmıştır.

Kontrol (µm)	N (µm)	kısıtlaması (µm)	P (µm)	kısıtlaması (µm)
12,8 ± 2,6	9,7 ± 1,8		10,9 ± 2,2	

3.5 *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 Suşundan Elde Edilen EPS'nin Karakterizasyonu

3.5.1 Siyanobakteriyel EPS'lerin eldesi ve biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi

Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan EPS'nin kuru halinin pamuğa benzer bir yapıda ve beyaz renkte olduğu Şekil 3.9'de görülmektedir. EPS, viskozitesinden dolayı en fazla %2'lik sulu çözelti olarak hazırlanabilmektedir. *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 EPS'nin, 0,5 g/100 mL konsantrasyonda pH değeri $5,95 \pm 0,1$ 'dir. Logaritmik büyüme fazı sırasında izole edilen *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3, $1,04 \text{ gr L}^{-1}$ EPS üretmiştir. Mevcut literatürle karşılaştırıldığında, siyanobakteriler tarafından üretilen EPS miktarları, *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3'ün etkili bir EPS üreticisi olduğunu

göstermektedir; ancak *Cyanothece* CA 3 gibi bazı siyanobakterilerin 2,36 gr L⁻¹ ile daha fazla EPS ürettiği bildirilmiştir (De Philippis ve diğ, 1998). Siyanobakterilerde EPS üretiminin verimliliği, büyüme koşulları (sıcaklık, ışık yoğunluğu), besin bileşimi ve havalandırma dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle, *Euhalothece* sp.'den üretilen EPS'nin verimliliğinin artırılması ve böylece AQUAMEB-3'ün gelecekteki çalışmalarda değerlendirilmesi planlanmaktadır.



Şekil 3.9: Liyofilize EPS örnekler

Hücreler farklı büyüme fazlarında iken elde edilen EPS'lerin biyokimyasal içerikleri farklılık göstermiştir ve değerler çizelge 3.7'de özetlenmiştir. Hücreler log fazda iken elde edilen EPS, 221,3 ± 34,7 mg g⁻¹ karbonhidrat, 72,1 ± 6,0 mg g⁻¹ nötral şeker, 81,9 ± 31,2 9 mg g⁻¹ üronik asit ve 73,3 ± 30,2 mg g⁻¹ protein içermektedir. Hücreler durgun fazda iken elde edilen EPS, 267,8 ± 76,0 mg g⁻¹ karbonhidrat, 70,6 ± 4,8 mg g⁻¹ nötral şeker, 90,8 ± 34,9 mg g⁻¹ üronik asit ve 42,6 ± 16,0 mg g⁻¹ protein içermektedir. Hücreler geç durgun fazda iken elde edilen EPS, 205,6 ± 59,87mg g⁻¹ karbonhidrat, 45,1 ± 2,83 mg g⁻¹ nötral şeker, 62,1 ± 16,78 mg g⁻¹ üronik asit ve 43,0 ± 18,14 mg g⁻¹ protein içermektedir. Test organizmasının ekstraselüler polimerik maddelerindeki nötral şeker ve üronik asit miktarları, siyanobakteriyel EPS'nin heterojen bileşimine ilişkin literatürle benzerdir (Hu ve diğ, 2003).

Parikh ve ark. (2006), çeşitli siyanobakterilerden elde edilen EPS'nin karbonhidrat içeriğinin 550 ila 890 mg g⁻¹ arasında değiştiğini, EPS'nin protein içeriğinin ise 18 ila 40 mg g⁻¹ arasında olduğunu belirlemiştir. Başka bir çalışma, *Arthrospira platensis* EPS'sinin 130 mg g⁻¹ karbonhidrat ve 550 mg g⁻¹ protein içerdiğini ve

heteropolisakkarit bir yapı olduğunu göstermiştir (Trabelsi, M, ve diğ, 2009). *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana* ve *Botryococcus braunii*'nin karbonhidrat ve protein içerikleri sırasıyla 180-218 mg g⁻¹ ve 170-410 mg g⁻¹ aralığında bulunmuştur (Koçer ve diğ, 2021). *Anabaena* sp. PCC 7120 EPS'si , 676 mg g⁻¹ karbonhidrat içeriği ve 240 mg g⁻¹ protein içeriği göstermiştir (Roy ve diğ, 2023). Başka bir çalışmada, *Anabaena* sp. EPS'sinin karbonhidrat, protein, lipit, kül ve nem içerikleri sırasıyla 321, 365, 240, 60 ve 13 mg g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tiwari ve diğ, 2020). *Cyanothece*'deki çeşitli besin eksikliklerinin ekzopolisakkaritlerin karbonhidrat içeriği üzerindeki araştırmaları, karbonhidrat içeriğinin magnezyum eksikliği altında sınırlı olduğunu, azot kısıtlaması altında ise kontrol grubuna kıyasla iki katına çıktığını ortaya koymuştur (Philippis ve diğ, 1993). Aynı çalışma, azot kısıtlamasının ve daha az derecede fosfor kısıtlamasının ekzopolisakkaritlerin karbonhidrat içeriğinde artışa yol açtığını göstermiştir (Philippis ve diğ, 1993). Üronik asitlerin varlığı, heteropolisakkaritin asidik bir karaktere sahip olduğunu düşündürmektedir (Uhliaríková ve diğ, 2020). İki tek hücreli siyanobakteri suşu olan *Synechocystis* PCC 6803 ve 6714'ün EPS içeriğinde üronik asit miktarı 100-500 mg g⁻¹ ve protein içeriği 200-400 mg g⁻¹ aralığında bulunmuştur (Panoff ve diğ, 1988). Başka bir çalışma, *Synechocystis* sp.'nin EPS'sinde yaklaşık 160 mg g⁻¹ üronik asit içeriği olduğunu göstermiştir (Ozturk ve diğ, 2014). Sonuç olarak, literatür taraması, siyanobakterilerden üretilen EPS'nin karbonhidrat, protein, üronik asit ve nötr şeker içeriklerinin dikkate değer bir aralıkta değiştiğini ortaya koymuştur. Bu, EPS bileşiminin genetik faktörler, kültür sıcaklığı, ışık yoğunluğu ve metal iyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenerek siyanobakteri suşları arasında değişmesiyle açıklanabilir. EPS'lerin yüksek sorpsiyon özellikleri, katyonik moleküller ile güçlü bir afinite sağlayan üronik asit gruplarının varlığına atfedilebilmektedir (Mota ve diğ, 2015). Dahası, suyu emme ve tutma kapasitesine sahip üronik asit grupları, EPS'nin kozmetik endüstrisinde kullanılmasını sağlar. Peptit bileşenler tarafından sağlanan EPS yapısının hidrofobik özellikleri, polisakkaritin yapışma kapasitesini artırır. Siyanobakteriyel EPS'lerin hidrofobik ve hidrofilik grupları nedeniyle biyoflokülan olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, biyokimyasal içeriği nedeniyle ağır metallerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması için biyoadsorban olarak önerilebilir. Bunun yanı sıra bahsedilen biyokimyasal içeriği nedeniyle emülsifiye edici ajan ve biyoflokülan olarak da kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır (Mota ve diğ, 2020).

Çizelge 3.4 : Büyük hacimde çoğaltılan AQUAMEB-3 hücrelerinden farklı fazlarda elde edilen EPS'nin karbonhidrat, üronik asit, nötral şeker ve protein miktar içeriğini göstermektedir (n=3).

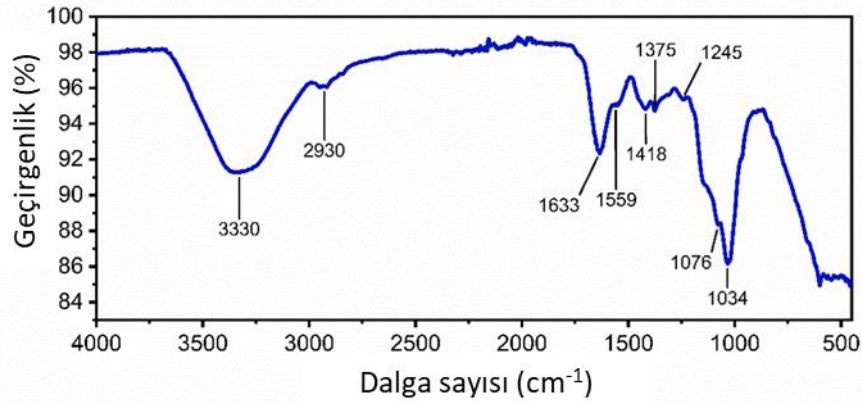
	Karbonhidrat (mg g ⁻¹)	Üronik asit (mg g ⁻¹)	Nötral şeker (mg g ⁻¹)	Protein (mg g ⁻¹)
Log faz EPS	221,3 ± 34,7	81,9 ± 31,2	72,1 ± 6,0	73,3 ± 30,2
Durgun Faz EPS	267,8 ± 76,0	90,8 ± 34,9	70,6 ± 4,8	42,6 ± 16
Geç durgun faz-EPS	205,6 ± 59,87	62,1 ± 16,78	45,1 ± 2,83	43,0 ± 18,14

Çizelge 3.5 : Besin kısıtlamasına maruz bırakılan AQUAMEB-3 hücrelerinin ve kontrol grubu hücrelerinden karbonhidrat ve üronik asit miktar içeriklerini göstermektedir (n=3).

	Karbonhidrat (mg g ⁻¹) (Başlangıç)	Karbonhidrat (mg g ⁻¹) (Besin kısıtlamasının ardından)	Üronik asit (mg g ⁻¹) (Başlangıç)	Üronik asit (mg g ⁻¹) (Besin kısıtlamasının ardından)
Kontrol	276 ± 19,7	242,4 ± 44,7	39,6 ± 6,8	86,1 ± 9,1
Azot (N) kısıtlaması	263,2 ± 21,9	297,0 ± 44,5	49,7 ± 4,1	80,3 ± 15,8
Fosfor (P) kısıtlaması	157,3 ± 12,68	397,7 ± 77,4	50,1 ± 1,30	100,0 ± 9,04

3.5.2 EPS'nin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi)

Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektrumları, karakteristik fonksiyonel grupların belirgin bantları yoluyla polisakkaritlerin tanımlanması için etkili bir araç olarak kullanılabilir (Wiercigroch ve diğ, 2017). *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'nin FTIR spektrumu, 3900 ila 500 cm^{-1} aralığında fonksiyonel grupları analiz etmek ve tanımlamak için kullanılmıştır (Şekil 3.10). 3330 cm^{-1} 'de tespit edilen belirgin bant ve 2934 cm^{-1} 'deki zayıf bant, sırasıyla O-H ve C-H gruplarının gerilme titreşimlerine aittir ve bunlar karbonhidratların hidroksil ve alkil fonksiyonelliklerine özgüdür (Saad ve diğ, 2024). 1633 cm^{-1} 'deki güçlü titreşim, karboksilik asidin varlığıyla ilgili titreşimden kaynaklanmaktadır. Üronik asit, karboksilik asit fonksiyonel gruplarının varlığıyla karakterize edilen asidik bir şekerdir. Bu gruplar, ekzopolisakkaritlerin birincil metal şelasyon bölgeleri olarak işlev görür (Borah ve diğ, 2018). 1559 cm^{-1} 'deki zayıf emilim bandı, EPS'deki protein içeriğiyle ilişkili amid gruplarının titreşimiyle ilgili olabilmektedir (Silva ve diğ, 2020). 1418 ve 1375 cm^{-1} 'deki zayıf simetrik titreşimler, ($-\text{CH}_2$) ve ($-\text{OH}$) bükülme titreşimleriyle ilişkilidir (Raghavan ve diğ, 2023). 1245 cm^{-1} 'deki zayıf tepe, sülfat grubunun ($\text{S}=\text{O}$) asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. EPS'deki sülfatlar, su moleküllerini tutarak EPS'nin jel benzeri bir kıvama sahip olmasını sağlayarak hidrofilitésine katkıda bulunur. Hidrofobik gruplar, EPS'ye endüstriyel uygulamalar için önemli bir özellik olan emülsifiye etme yetenekleri sağlar. 800 cm^{-1} ile 1200 cm^{-1} arasındaki bantlar, genellikle polisakkaritler için parmak izi bölgesi olarak anılmaktadır. Sonuç olarak, 1076 cm^{-1} 'de gözlemlenen bant, C-O-S bağlarının varlığına atfedilmiştir. Ayrıca, 1034 cm^{-1} 'deki şiddetli pik, üronik asidin C-O grubunun titreşimine karşılık gelmektedir (Hamidi ve diğ, 2019; Saad ve diğ, 2024). Sonuçlar, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin, daha önce bildirilen EPS'ler gibi sülfat grupları, üronik asit ve peptit gruplarını içerdiğini göstermiştir (Pereira ve diğ, 2009; Costa ve diğ, 2021; Concórdio-Reis ve diğ, 2023). Sülfat ve üronik asit grupları EPS'nin anyonik özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Negatif yük, makromoleküle yapışkan bir özellik kazandırır (Kumar ve diğ, 2018). EPS'nin anyonik karakteri, özellikle metal iyonları olmak üzere pozitif yüklü iyonlara karşı yüksek bir afinite sağlar. Bu işlevsellik, biyoremediasyon, adsorpsiyon gibi biyoteknolojik uygulamalar için önemlidir.



Şekil 3.10: *Euhalotheca* sp. AQUAMEB-3 EPS'nin FTIR spektrumları.

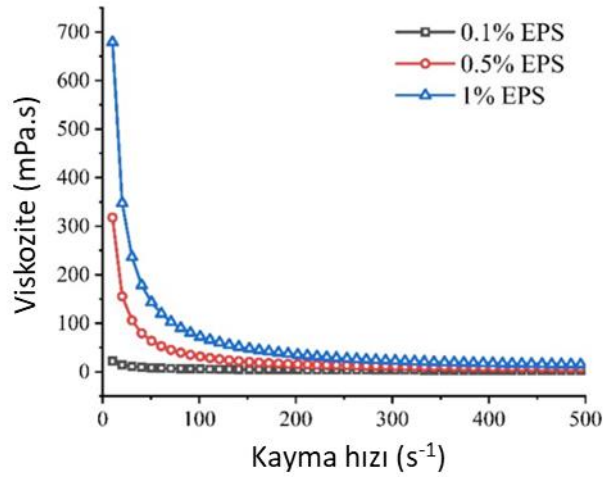
3.5.3 EPS'nin molekül ağırlığının belirlenmesi

Bir polisakkaritin yapısını anlamak, onun fizikokimyasal özelliklerini tanımlamak için çok önemlidir. GPC analizi, *Euhalotheca* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin yaklaşık 2617 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olduğunu göstermiştir. Siyanobakterilerden üretilen ekzopolisakkaritlerin moleküler ağırlıkları büyük değişkenlik göstermektedir. Literatürde en az 81 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip siyanobakteriyel ekzopolisakkarit (EPS) bildirilirken, 2000 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip olanlar da mevcuttur (Senni ve diğ, 2011). Bu verilerle karşılaştırıldığında, *Euhalotheca* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, yüksek moleküler ağırlığa sahip bir heteropolisakkarit olarak tanımlanabilmektedir. Siyanobakteriler tarafından üretilen yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritler, çözeltilerin reolojik özelliklerini doğrudan etkileyerek onları endüstriyel uygulamalar için yararlı hale getirir. Suyun reolojik özelliklerini değiştirebilir, koyulaştırıcı maddeler olarak hareket edebilir ve sulu çözeltileri stabilize edebilirler. EPS'nin biyolojik aktivitesi ile moleküler ağırlığı arasında güçlü bir korelasyon vardır. Örneğin, yüksek moleküler ağırlığa sahip EPS'nin kanser karşıtı özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Wang ve diğ, 2023). Önceki bir çalışmada, *P. cruentum*'dan üretilen yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritlerin düşük antioksidan aktivite gösterdiği, düşük moleküler ağırlıklıların ise bozunmadan sonra oksidatif hasar üzerinde inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Sun ve diğ, 2009). Başka bir çalışma, *Porphyridium cruentum*'dan üretilen EPS'nin moleküler ağırlığı azaldıkça immüno-güçlendirici aktivitenin arttığını göstermiştir (Sun ve diğ, 2009). EPS'nin moleküler ağırlığı hem kültür koşulları hem de saflaştırma işlemiyle yakından ilişkilidir (Zhao ve diğ, 2021). EPS'nin moleküler ağırlığındaki fark, mikroorganizma

türüne, büyüme ortamına ve inkübasyon süresine bağlı olan EPS bileşimindeki değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir (Kumar ve diğ, 2020). *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 tarafından üretilen EPS'nin moleküler ağırlığının değişen koşullar altında değerlendirilmesi yapılmamıştır; ancak, kültür ortamının viskozitesinin hücresel yaşlanmayla birlikte arttığı gözlenmiştir (veri sunulmamıştır). EPS'nin viskozitesinin moleküler ağırlıkla doğrusal olarak ilişkili olduğu göz önüne alındığında, daha geç büyüme evrelerinde toplanan hücrelerden daha yüksek moleküler ağırlıklı EPS'nin elde edilebileceği öngörülmektedir. Gelecekteki çalışmalar, çeşitli büyüme evrelerinden ve farklı koşullar altında yetiştirilen suşlardan elde edilen EPS'nin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonunu içerecektir. Bu çalışmalar, EPS'nin kapsadığı uygulama alanını belirlemek için çok önemlidir.

3.5.4 EPS'nin reolojik özelliklerinin belirlenmesi

Euhalothece sp. AQUAMEB -3 EPS çözeltilerinin (0,1 %, 0,5 % ve 1,0 %) reolojik özellikleri, farklı kayma hızlarında görünür viskozitelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'sinin viskozitesi, 10 s^{-1} kayma hızında sırasıyla %0,1, %0,5 ve %1,0 EPS konsantrasyonları için 22,02, 317,91 ve 679,17 mPa.s'dır. 1000 s^{-1} kayma hızında, viskozite değerleri sırasıyla 2,41, 5,99 ve 10,09 mPa.s'ye düşmüştür. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin reolojik analizi, kayma hızındaki artışla viskozitede bir azalma gösterirken, viskozite artan EPS konsantrasyonu ile eş zamanlı olarak artmıştır (Şekil 3.11). Bu, büyük olasılıkla kesme hızı nedeniyle makromoleküler zincirlerin değişimi ve bağlantısının kopması nedeniyle sulu çözeltilerde karakteristik bir Newtonyen olmayan psödoplastik akış veya kesme incilmesi özelliğinden kaynaklanmaktadır (Fenoradosoa ve diğ, 2009). Bu reolojik davranış, çeşitli siyanobakterilerin EPS'leri tarafından da benzer şekilde gösterilmiştir (Philippis ve diğ, 1998; Hussein ve diğ, 2015). EPS'nin viskoz özellikleri, yapısına ve kütlesine bağlıdır. EPS'nin kesme incilmesi davranışı, karıştırma, dökme ve pompalama gibi çeşitli işlemlerde kullanılabilmesi için çok önemlidir (Kaur ve diğ, 2010). Psödoplastik polisakkaritler gıda endüstrisi için uygun kabul edilir; bu nedenle, *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 'ün gıda alanında uygulanabilirliği gelecekteki çalışmalarda detaylı olarak değerlendirilebilir.



Şekil 3.11: Farklı konsantrasyonlarda EPS sulu çözeltilerinin (%0,1, %0,5 ve %1 kayma hızı (s^{-1}) fonksiyonu olarak mPa.s cinsinden ifade edilen viskozite grafikleri.

3.5.5 EPS'nin zeta potansiyelinin belirlenmesi

Zeta potansiyeli, parçacıklar arasındaki itici veya çekici kuvvetleri ölçerek polisakkaritlerin kararlılığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. EPS'nin (0,5%) zeta potansiyeli, anyonik karakteriyle uyumlu olarak $-45,1 \pm 2,35$ mV'dır. Bir polisakkaritin negatif yükü, karboksil, fosfat ve/veya sülfat gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır (Joulak ve diğ, 2020). EPS'nin hidrofilikliği ve anyonik özellikleri, sülfat ve üronik asit gruplarından kaynaklanmaktadır. Sülfat grupları EPS'nin jel benzeri bir yapı oluşturmaya neden olurken, üronik asit grupları yapıya yapışkan bir özellik kazandırmaktadır. Bahsedilen anyonik özellik, pozitif yüklü iyonlara olan afinitesi nedeniyle EPS'yi, elektrostatik etkileşimlerin kullanıldığı biyoremediasyon gibi biyoteknolojik pek çok uygulama alanı için uygun hale getirmektedir. Ayrıca, siyanobakteriyel EPS'lerdeki negatif yük, Pereira ve ark. (2009) tarafından belirtildiği gibi, metal sorpsiyon kapasitelerini de önemli ölçüde geliştirmektedir.

Freire-Nordi ve ark. (2005), *Anabaena spiroides* tarafından üretilen ekstraselüler polimerik maddelerin (EPS) bakır, kurşun ve cıva iyonlarına ilişkin metal bağlama özelliklerini araştırmıştır. Okajima ve ark. (2009), *Aphanothece sacrum*'un ekstraselüler matrisinden gelen polisakkarit olan sakran'ın benzersiz jelleşme özelliklerini göstererek, metal katyonları ile negatif yüklü EPS arasındaki etkileşimleri doğrulamıştır (Okajima ve diğ, 2009). Anyonik karakteri nedeniyle, *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'si, benzer mikroorganizmalardan elde edilen ekzopolisakkaritlere benzer şekilde, metal iyonlarının ve katyonik kirleticilerin giderilmesinde kullanılma

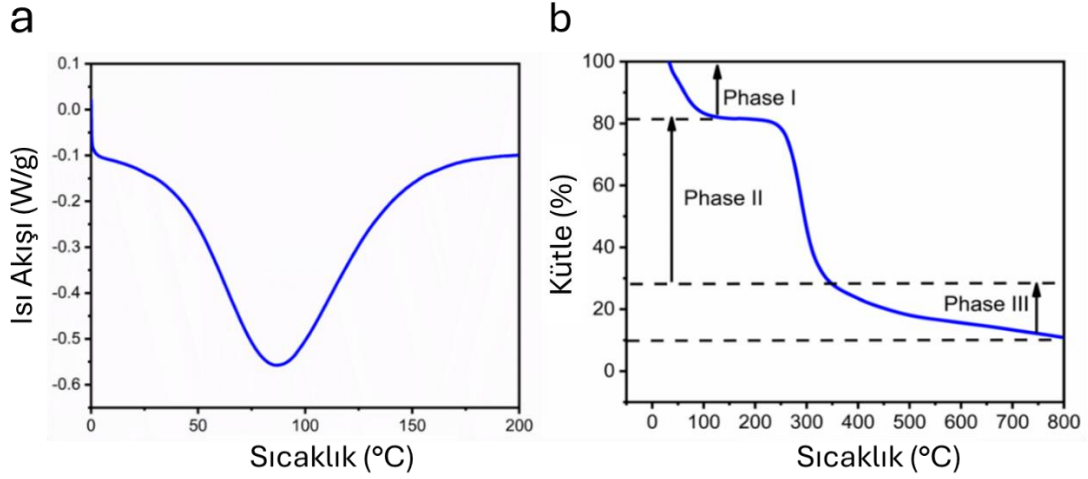
potansiyeline sahiptir (De Philippis ve diğ, 2003; Kiran ve diğ, 2008; Ozturk ve diğ, 2009; Zhou ve diğ, 2009). Siyanobakterilerin EPS'leri, özellikle yara örtülerinde anyonik gruplarının metal iyonları varlığında jelleşme kabiliyetlerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için yüksek potansiyele sahiptir. Bu durum *Nostoc* sp. suşları PCC7936 ve PCC7413'ün EPS hidrojellerini kullanan bir çalışmada gösterilmiştir (Alvarez ve diğ, 2021). Çalışmalarında üretilen siyanobakteriyel ekzopolisakkarit bazlı yara örtülerinin; biyoyoumlu özellikleri, fibroblast göçünü ve çoğalmasını artırma kapasiteleriyle birlikte, EPS'lerin bu çalışma alanında ümit verici bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

3.5.6 EPS'nin termal özelliklerinin belirlenmesi

EPS'nin termal geçişlerini araştırmak için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılmıştır. DSC analizi, EPS'nin ısı emilimi (endotermik) ve ısı salınımı (ekzotermik) davranışları ile ilgili nicel ve nitel veriler sağlamaktadır (Bhat ve diğ, 2019). DSC, termal işlem altında biyopolimer termal geçişlerinin incelenmesine yardımcı olur, kristalleşme sıcaklığına sahip bir termogram sağlar ve EPS'nin endüstriyel uygulamalardaki uygunluğunun gösterilmesine yardımcı olur (Singh ve diğ, 2011). Sıcaklık arttıkça, polimerin viskozitesi azalır ve bu durumda polimer molekülleri kendiliğinden yeniden yapılanma sürecine girerek kristal bir form alır. EPS'nin DSC kromatogramı, 86,5 °C'de (kristalleşme sıcaklığı) tek bir ekzotermik tepe göstermiştir. Bu tepe, EPS'nin bozunmasını takiben meydana gelen mikrokristalleşme süreciyle ilgilidir (Mishra ve diğ, 2011) (Şekil 3.12 a). Sıcaklık arttıkça, amorf katının viskozitesi azalır ve belirli bir sıcaklıkta parçacıklar kristalin bir yapı oluşturmak için yeterli özgürlüğü kazanırlar, buna kristalleşme sıcaklığı denir (Singh ve diğ, 2011; Hussein ve diğ, 2015). Kristalleşme sıcaklığından düşük sıcaklıklarda polimerler, amorf özellik gösterirler. Amorf polimerler, emülsiyon boya ve gıda endüstrisi uygulamaları için önerilmektedir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin emülsiyon uygulamaları için belirlenen 86,5 °C kristalleşme sıcaklığı bu alandaki uygulamalarda kullanımı adına yol gösterici olacaktır.

Euhalothece sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin 25 °C'den 800 °C'ye dinamik ağırlık kaybını ölçmek için termogravimetrik analiz (TGA) gerçekleştirilmiştir. Bu analizin sonuçları, Şekil 12 b'de gösterildiği gibi siyanobakteriyel kökenli EPS'lere benzer şekilde üç ayrı aşamada gerçekleşmiştir (Trabelsi ve diğ, 2009 b; Mishra ve diğ, 2011; Hussein ve

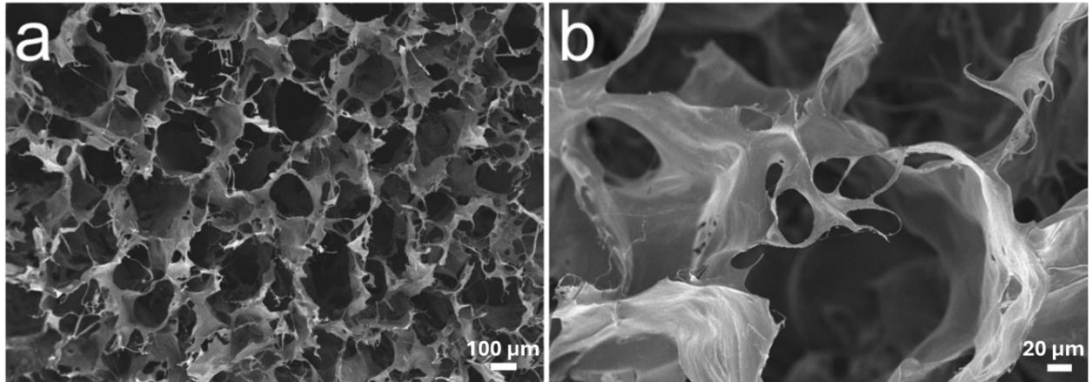
diğ, 2015). İlk aşamada, fiziksel olarak adsorbe edilen suyun desorpsiyonundan kaynaklanan 25 °C'den 90 °C'ye %17'lik bir ağırlık kaybı yaşanmıştır. EPS'nin başlangıç nem içeriği, polisakkaritlerdeki yüksek karboksil içeriği gibi hidrofilik gruplarından kaynaklanmaktadır. EPS'de 90 °C'den 243,4 °C'ye kadar kütle değişimi görülmemiştir; bu da EPS'nin 243,4 °C'nin altında stabil kaldığını göstermiştir. Sıcaklık 347,5 °C'ye çıktığında EPS hızlı bir depolimerizasyon göstermiş ve bu durum yaklaşık %51,5'lik kütle kaybı oranıyla sonuçlanmıştır. Bu fazdaki ağırlık azalması çoğunlukla termal olarak kararsız fonksiyonel grupların ayrışmasından kaynaklanmaktadır. Üçüncü faz, 800 °C'lik bir sıcaklıkta kömürleşmenin oluşması nedeniyle meydana gelmiştir ve EPS kütlesinin başlangıçtaki sadece %17,5'inin kalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu nedenle, EPS 347,5 °C'ye kadar termostabildir. EPS ağırlık kaybının üçüncü aşamasında, halka yapılarındaki C-O ve C-C bağlarının parçalanmasıyla karakterize edilen depolimerizasyon meydana gelir ve bu durum CO, CO₂ ve H₂O'nun salınmasına yol açar. Polisakkarit bozunumu dört faz içermektedir: suyun desorpsiyonu, dehidrasyon reaksiyonları yoluyla yapısal suyun uzaklaştırılması, CO, CO₂ ve H₂O salınmasıyla sonuçlanan C-O ve C-C bağ kopmasını içeren depolimerizasyon ve aromatik ve grafitli karbon yapıların oluşumudur (Parikh ve Madamwar, 2006). Siyanobakteriyel polisakkaritlerin dikkate değer termostabilitesi, yapıya dayanıklılık kazandırarak polimer bozunmasını engelleyen üronik asit içeriğinden kaynaklanıyor olabilir (Saad ve diğ, 2024). EPS'nin termostabilite özellikleri, gıda maddelerinin üretimi ve işlenmesi daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiğinden, özellikle reolojik özelliklerin iyileştirilmesinde gıda endüstrisinde çok önemlidir (Saravanan ve diğ, 2016). TGA ve DSC analizlerinin sonuçları, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin dehidrasyon ve ayrışma sürecinin yanı sıra termal stabilitesini ve fizikokimyasal değişimlerini belirlemeye yardımcı olmuştur. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 den elde edilen EPS, istenen termal davranışı sergileyerek gıda/ilaç endüstrileri için umut vadeden bir aday olarak göze çarpmaktadır.



Şekil 3.12: a) EPS'lerin diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) termogramı. b) EPS'lerin TGA termogramı.

3.5.7 EPS'nin morfolojik yapısının belirlenmesi

SEM analizi, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin üç boyutlu, gözenekli bir yapı sergilediğini ortaya koymuştur (Şekil 3.13). Gözeneklerin ortalama çapı ImageJ yazılımı ile 20 farklı noktadan ölçülerek ve $203,52 \pm 45,89 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Liyofilize EPS numunelerinin bu gözenekli yapısı, özellikle doku mühendisliği ve yara örtüsü gibi biyomedikal uygulamalar için EPS temelli hidrojellerin uygulanabilirlikleri açısından önemli bir rol oynamaktadır (Alvarez ve diğ, 2021). Gözenekli yapı, hücreler arasındaki besin alışverişini ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını teşvik ederek yara örtüsü, doku iskelesi gibi biyomedikal uygulamalarda önemli rol oynar. Ayrıca, hücre dışı matrisi içeren uygulamalarda, yüksek gözenekli yapısı nedeniyle hücrelerin kolayca yapışmasını ve yerleşmesini sağlayarak hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü kolaylaştırır (Zanotti ve diğ, 2023). Ek olarak, gözenekli yapı EPS'ye önemli su tutma kapasitesi kazandırır ve yara pansumanları gibi biyomedikal alanlarda ve farklı katkı maddeleri için gıda endüstrisinde uygulama olanağı sağlar (Purama ve diğ, 2008; Alvarez ve diğ, 2021).



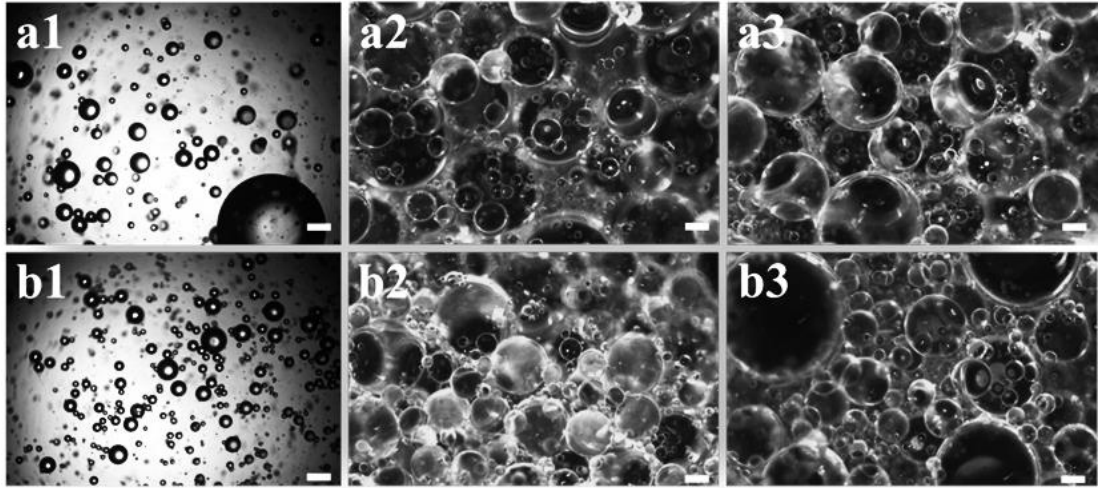
Şekil 3.13: Liyofilize %1 EPS'nin SEM görüntüleri.

3.5.8 EPS'nin emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

Emülsifikasyon İndeksi (E_{24}), *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si ve ksantan zampının (%0,1, %0,5 ve %1,0) çeşitli konsantrasyonları ile sıvı parafilm arasındaki 24 saatlik temas süresinin ardından ölçülerek hesaplanmıştır. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin tüm konsantrasyonları, test edilen çözeltilere maruz bırakıldıktan sonra tespit edilebilir emülsiyonlar üretmiş ve emülsiyon aktivitesinin yüksek EPS ve ksantan zamp konsantrasyonlarında arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.14). AQUAMEB -3 EPS ve ksantan zampı emülsiyonlarının emülsiyon indeksleri, %0,1 AQUAMEB -3 EPS içerikli emülsiyon hariç, çoğunlukla benzerdir. Bir emülgatörün emülsiyon stabilize etme kabiliyeti, oluştuktan 24 saat sonra toplam emülsiyon hacminin en az %50'sini tutabilme kabiliyetinin analiz edilmesiyle belirlenir (Willumsen ve diğ., 1996). %0,5 ve %1 AQUAMEB -3 EPS'sinin emülsifikasyon indeksleri $\geq$ %50'dir (Çizelge 3.9). Bu sonuçlar EPS'nin etkili bir emülgatör olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Mota ve diğ., 2020). Ek olarak, bu emülsiyonlar bir ay boyunca stabil kalmıştır (veri gösterilmemiştir). Ksantan zampı yüksek emülsifiye edici özellikleri ile sıklıkla kullanılan ticari bir polimerdir. Bu nedenle, AQUAMEB -3 EPS'si ile ksantan zampı emülsifiye edicileri arasındaki benzerlik, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin yüksek emülsifiye edici özelliklerini göstermiştir.

Euhalothece sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin yüksek emülsifiye edici özelliği içerdiği hidrofobik grupların, hidrofobik moleküllerle etkileşimi arttırmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliği nedeniyle, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, su ve hidrofobik bileşikler arasındaki emülsiyonları stabilize etme potansiyeline sahiptir ve bu da onu çeşitli endüstriyel uygulamalar için umut vadeden bir biyoemülgatör

yapabilir. Biyoemülgatörler biyolojik olarak parçalanabilir, toksitesi düşük maddelerdir ve bu özellikleri onları kimyasal emülgatörlere göre avantajlı hale getirir. Önceki bir çalışma, *Cyanothece* sp.'den üretilen ve siyanoflan olarak bilinen ekzopolisakkaritin, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sine benzer şekilde, psödoplastik davranışa sahip tipik bir Newtonian olmayan sıvının özelliklerini sergilediğini göstermiştir. Bu özellikler, siyanoflanın, gıda ve kozmetik endüstrilerinde emülgatör veya kıvam artırıcı olarak kullanımı da dahil olmak üzere çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için uygun çok işlevli bir biyopolimer olduğunu doğrulamıştır (Mota ve diğ, 2020). Dolayısıyla, bu tez kapsamında hazırlanan *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, literatürdeki benzer vizkozite ve emülsiyon özellikleri nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar ve endüstriler için önerilebilmektedir.



Şekil 3.14: Emülsiyon damlacıklarının optik mikroskop görüntüleri: (a1, a2 ve a3); %1, %0,5 ve %0,1 *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS - sıvı parafin emülsiyonları, (b1, b2 ve b3); %1, %0,5 ve %0,1 (ağırlık/hacim) ksantan zatkı - sıvı parafin emülsiyonları, Ölçek çubuğu = 400 μ m.

Çizelge 3.6 : Farklı EPS ve ksantan zatkı konsantrasyonları (%0,1, %0,5 ve %1,0) ile sıvı parafin arasındaki emülsifikasyon indeksi. Veriler ortalamalar $\pm$ standart sapmalardır (n=3).

	0,1	0,5	1,0
<i>Euhalothece</i> sp. AQUAMEB -3 EPS	37,9 $\pm$ 3,5	84,6 $\pm$ 3,6	94,2 $\pm$ 3,2
Ksantan zatkı	70,2 $\pm$ 8,8	95,3 $\pm$ 0,4	100

3.5.9 EPS'nin antioksidan aktivite ve metal iyonu şelatlama (Fe^{+3}) kapasitesinin belirlenmesi

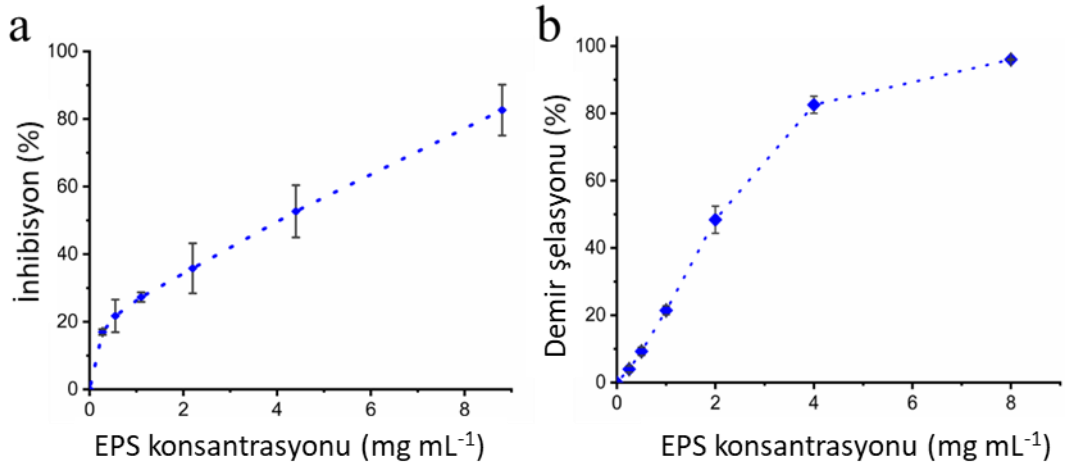
EPS'nin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için DPPH testi kullanılmıştır. Maksimum temizleme aktivitesi, $82,6 \pm 25,8$ 'i aşmayan minimum bir DPPH emilimiyle ilişkili olarak $8,8 \text{ mg mL}^{-1}$ EPS'de gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlar için sonuçlar (Şekil 3.15 a), EPS'nin orta düzeyde serbest radikal temizleme aktivitesi gösterdiğini tanımlamıştır. EPS'nin antioksidan aktivitesi, şelatlama aktivitesine benzer şekilde konsantrasyona bağlı olarak artmıştır.

Polisakkaritler, temizleme mekanizmasında hidrojen atomu donörleri olarak hareket ederek serbest radikallerin elektronu kabul etmesine ve kararlı ürünler oluşturmalarına izin vererek antioksidan molekülü gibi davranırlar. Siyanobakteriyel EPS, demiri şelatlayabilir, redoks potansiyelini azaltabilir ve oksitlenmiş metal iyonlarını stabilize edebilir. EPS'lerin antioksidan etkileri, sahip oldukları -SH, -OH, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, C=O, -S-, -COOH ve -O- gibi fonksiyonel grupların serbest radikalleri bağlama kapasiteleriyle ilişkilendirilmektedir (Shen ve diğ, 2014).

Euhalothece sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin demir şelatlama aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak değişmiştir ve Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin absorbansı konsantrasyondaki artışla doğrusal olarak azalmıştır. $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ konsantrasyonda, EPS yaklaşık %4 demir şelatlama aktivitesi göstermiştir ve bu 8 mg mL^{-1} konsantrasyonda %96'ya yükselmiştir (Şekil 3.15 b). Demir şelasyon oranının, çeşitli siyanobakterilerden/mikroalglerden elde edilen EPS ile karşılaştırıldığında, antioksidan aktiviteye benzer şekilde orta düzeyde olduğu belirlenmiştir (Trabelsi ve diğ, 2009). Bu olgunun birincil nedeni, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen EPS'nin biyokimyasal bileşimindeki farklılık olabilir.

Siyanobakterilerden elde edilen EPS'nin antioksidan aktiviteleri hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Nostoc carneum*'dan elde edilen EPS, 5 mg mL^{-1} 'de %15 radikal temizleme aktivitesi gösterirken, *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si aynı konsantrasyonda yaklaşık %60 temizleme aktivitesine sahiptir (Hussein ve diğ, 2015). Farklı siyanobakterilerden elde edilen EPS ile yapılan çalışmada, 20 mg mL^{-1} konsantrasyondaki EPS'lerin yaklaşık %20-60 radikal süpürücü aktivite ve %30-85 demir şelasyon aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Parwani ve diğ, 2014). *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3'ten üretilen EPS, önemli ölçüde daha düşük konsantrasyonlarda

aynı inhibe edici etkilere sahiptir ve daha yüksek antioksidan etki göstermiştir. Özellikle kronik yaralar için tasarlanmış yara örtüleri, yara bölgesindeki reaktif oksijen türlerini etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için antioksidan özelliklere sahip malzemeler gerektirir (Comino-Sanz ve diğ, 2021). Antioksidan özellikleri nedeniyle *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'si, yara örtüsü gibi biyomedikal uygulamalar için yüksek potansiyele sahip doğal bir polimerdir.



Şekil 3.15: a) EPS'nin DPPH analizi ile konsantrasyona karşı yüzde inhibisyon değerleri. b) EPS'nin konsantrasyona bağlı demir şelatma yüzdesi.

3.5.10 EPS'nin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi

Euhalothece sp. AQUAMEB -3'den elde edilen EPS'nin 39 ile 2500 ppm arasında değişen konsantrasyonlardaki antibakteriyel aktivitesi *Escherichia coli* (ATTC 25922) ve *Staphylococcus aureus*'a (ATTC 25923) karşı test edilmiştir. Farklı EPS konsantrasyonlarına maruz bırakılan *E. coli* ve *S. aureus*'un zamana bağlı büyüme eğrileri Şekil 3.16'da gösterilmiştir. EPS, anyonik ve katyonik grupların varlığı nedeniyle hem gram pozitif (*S. aureus*) hem de gram negatif (*E. coli*) bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. *S. aureus*'un büyümesini engelleyen MİK değeri 300 ppm EPS iken, bakteri büyümesini engelleyen MBC değeri 600 ppm EPS'dir. *E. coli* için MİK değeri 150 ppm iken, MBC değeri belirlenememiştir. EPS'nin *E. coli*'ye karşı MBC değerini belirlemek için, EPS daha yüksek bir konsantrasyonda hazırlanmış olmalıdır; ancak, aşırı viskoz yapısı nedeniyle bu mümkün olmamıştır. Literatürde siyanobakterilerden elde edilen EPS'nin antibakteriyel özellikleri üzerine araştırmalar sınırlı olmasına rağmen, mikroalglerden elde edilen EPS'nin antibakteriyel aktivitesini inceleyen daha fazla çalışma mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada *Gloeocapsa* sp., *Synechocystis* sp., *Nostoc entophyllum*, *Nostoc muscorum* ve *Rhodella reticulata*'dan elde edilen EPS'ler için MİK değerleri *S. aureus*'a karşı 125-1000 ppm arasında değiştiği görülmüştür (Saad ve diğ, 2023). Başka bir çalışmada, *Nostoc microscopicum* EPS'sinin *S. aureus* bakterilerine karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 125 ppm olarak bildirilmiştir. Kriptofitlerden elde edilen EPS'nin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı MİK değerleri 125 ila 1000 ppm arasında değişmiştir. Saad ve diğ. (2023), 2500 ila 10000 ppm arasında değişen ve *Synechocystis algini* tarafından üretilen EPS'nin, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmiştir (Saad ve diğ, 2023). Genel olarak, çeşitli siyanobakterilerden/mikroalglerden türetilen ekzopolisakkaritler, *E. coli* ile karşılaştırıldığında *S. aureus*'a karşı daha büyük bir etkinlik göstermektedir ve bu bulgular bu çalışmanın sonuçlarıyla örtüşmektedir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB -3 EPS'sinin antibakteriyel etkinliğinin, önceki literatürle karşılaştırıldığında dikkate değer olduğu görülmektedir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'si, dikkate değer antibakteriyel özellikler sergilemiştir ve bu da onu antimikrobiyal ilaçlar geliştirmek için umut verici bir kaynak haline getirmektedir. Paketleme, ilaç ve tıbbi endüstrilerdeki potansiyel uygulamaları, çeşitli endüstriyel sektörlerde kullanım potansiyelini düşündürmektedir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'sinin antimikrobiyal özellikleri nedeniyle, mevcut alternatiflere kıyasla özellikle yara örtüsü uygulamalarında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

3.6 EPS Temelli Hidrojel Yara Örtülerinin Hazırlanması, Şişme ve İn-vitro Degredasyon Testleri

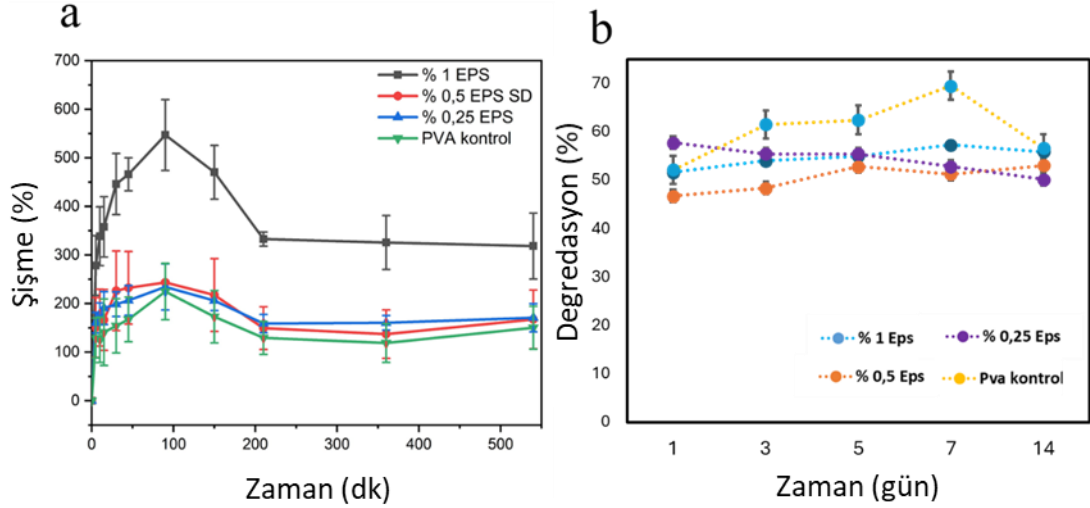
Oluşturulan EPS hidrojeller şekil 3.16'da gösterildiği üzere şeffaf renkte ortalama $0,066 \pm 0,015$ kalınlıktadır. EPS temelli hidrojellerin ve kontrol olarak kullanılan yalnızca PVA'dan oluşan hidrojellerin zamana bağlı % şişme oranları belirlenmiştir (3.17 a). %1 EPS, %5 PVA ve %1 gluteraldehit hidrojellerin, 90 dakika içerisinde $\%546,9 \pm 72,9$ maksimum şişme gösterip yaklaşık 360 dakikada $\%325,7 \pm 55,6$ ile dengeye geldiği görülmüştür. %0,5 EPS, %5 PVA ve %1 gluteraldehit içeren hidrojellerin, 90 dakika içerisinde $\%243,6 \pm 3,1$ maksimum şişme gösterip yaklaşık 210 dakikada $\%149,5 \pm 44,0$ ile dengeye geldiği görülmüştür. %0,25 EPS, %5 PVA ve %1 gluteraldehit içeren hidrojellerin, 90 dakika içerisinde $\%234,4 \pm 47,6$ maksimum şişme gösterip yaklaşık 360 dakikada $\%160,4 \pm 15,0$ ile dengeye geldiği

görülmüştür. %5 PVA ve %1 gluteraldehit içeren PVA kontrol hidrojelilerin; 90 dakika içerisinde % $224,7 \pm 58,1$ maksimum şişme gösterip yaklaşık 360 dakikada $129,5 \pm 34,0$ ile dengeye geldiği görülmüştür (Şekil 3.17 b). Hidrojeller içerisindeki EPS oranının artması hidrojellerin şişme kapasitesini olumlu yönde etkilemiştir. Bu durum EPS'nin yüksek gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Yüksek miktarda EPS (%1) içeren hidrojinin şişme değeri maksimum %550 iken dengede yaklaşık %350'ye düşmüştür. Şişmedeki bu düşüşün nedeni EPS'nin suda çözünmesi olabilir. Benzer bir durum sodyum aljinat ve PVA ile oluşturulan hidrojel yara örtüsünde de görülmüştür. Yapılan çalışmada hidrojel yapısındaki sodyum aljinat arttıkça hidrojinin şişme oranının arttığı ancak zamanla şişme oranının azaldığı görülmüştür (Kim ve diğ, 2008). Bu durumun nedeni sodyum aljinatın suda çözünmesi ve çapraz bağlanmaması olarak açıklanmıştır. Düşük çapraz bağlı hidrojel daha yüksek su alma (şişme) kabiliyeti gösterme eğilimindedir (Balakrishnan ve diğ, 2005).

İdeal bir yara örtüsü, fazla sıvıyı emerek yarayı kuru bırakmaz ve aynı zamanda yeterli nemi korur. Bu nedenle yara örtüleri genelde şişme oranı %200-500 arasında olacak şekilde tasarlanır. Bu çalışmada üretilen EPS temelli yara örtülerinin şişme değerleri özellikle yüksek oranda EPS içeren yara örtüsünde, istenilen orandadır. Bu yüksek şişme oranı sayesinde özellikle aşırı eksüdalı (kronik ülser, yanık gibi) yaraların tedavisinde kullanılabilir. Literatürde %500'den daha fazla oranda şişme gösterebilen hidrojel mevcut ancak bu aşırı şişme durumu yara örtüsünü daha hızlı bir şekilde deformasyona uğratarak kullanım süresini kısaltabilir (Ngadaonye ve diğ, 2013; Tronci ve diğ, 2015). Bu nedenle bu çalışmada üretilen ve 90 dakika içerisinde % $546,9 \pm 72,9$ maksimum şişme gösterip, yaklaşık 360 dakikada % $325,7 \pm 55,6$ ile dengeye gelen, %1 EPS, %5 PVA ve %1 gluteraldehit hidrojelilerin, yara örtüsü formülasyonu için en uygun olduğu görülmüştür.



Şekil 3.16: EPS temelli hidrojel film görüntüsü



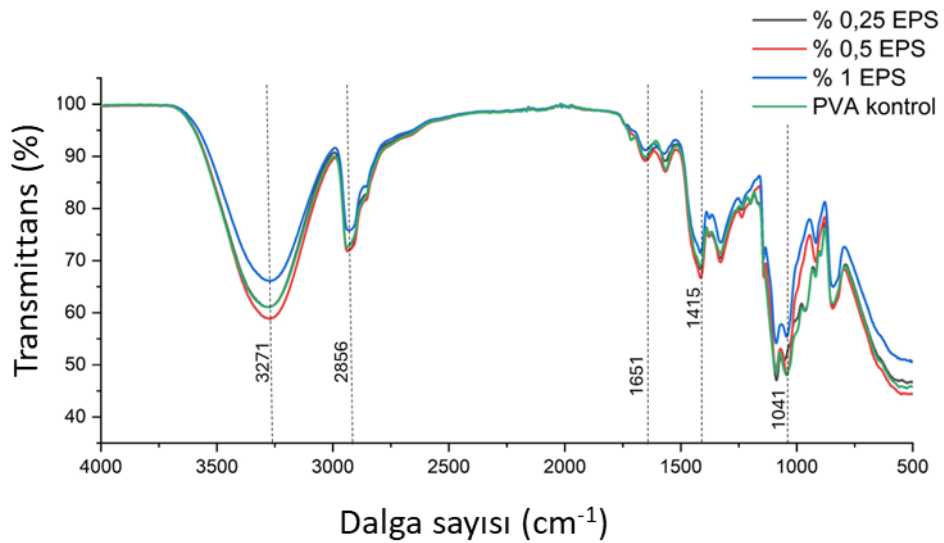
Şekil 3.17: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojenlerin a) Zamana bağlı yüzde şişme grafikleri. b) Zamana bağlı yüzde degradasyon grafiği

EPS temelli hidrojenlerin degradasyon analizleri 14 gün boyunca devam etmiştir. Analiz sonucunda %1 EPS içeren hidrojenler bir günde $51,7 \pm 1,75$, 14 günde $55,91 \pm 10,27$, 14 gün boyunca ortalama $54,8 \pm 4,06$ 'sı degrede olmuştur. %0,5 EPS içeren hidrojenler bir günde $46,77 \pm 0,22$, 14 günde $53,07 \pm 4,08$, 14 gün boyunca ortalama $50,50 \pm 2,4$ 'ü degrede olmuştur. %0,25 EPS içeren hidrojenler bir günde $57,81 \pm 3,05$, 14 günde $50,22 \pm 7,26$, 14 gün boyunca ortalama $54,36 \pm 3,34$ 'ü degrede olmuştur. PVA kontrol hidrojenler; %5 PVA ve %1 glutaraldehit, bir günde $52,19 \pm 4,97$, 14 günde $56,64 \pm 9,11$, 14 gün boyunca ortalama $60,49 \pm 5,22$ 'ü degrede olmuştur (Şekil 3.17 b).

Tüm hidrojenlerin 1 gün sonunda yaklaşık %50'lilerinin degrede olduğu ve degradasyonun 14 gün boyunca sabit olarak kaldığı görülmüştür. Bu durum yara örtülerinde istenen bir özelliktir. Yalnızca PVA'dan oluşan hidrojenlerin ise EPS içerenlere göre yaklaşık %10 daha fazla degrede olduğu görülmüştür. Bu durumda EPS içeriğinin PVA ile bağlanması yapıya desteklik sağladığını göstermiştir. Yara örtüsünün degradasyon hızı yara iyileşme hızı ile uyumlu olmalıdır. Yara örtülerinin biyobozunma hızı, hücre etkileşimleri, doku oluşumu ya da biyomoleküllerin salınımı gibi pek çok yara iyileştirme performansını etkileyecek parametreyi etkiler. Bunun için hidrojenin degradasyon hızının kontrolü yara iyileşme süreci için önemlidir. Literatürde biyobozunur yara örtülerinin 3-4 hafta içinde tamamen en az yarısının bozulduğu rapor edilmiştir (Pereira ve diğ, 2013; Qu ve diğ, 2018). Çalışmada elde edilen veriler literatürle uyumludur.

3.6.1 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin yapısal karakterizasyonu (FTIR analizi) ve SEM ile görüntülenmesi

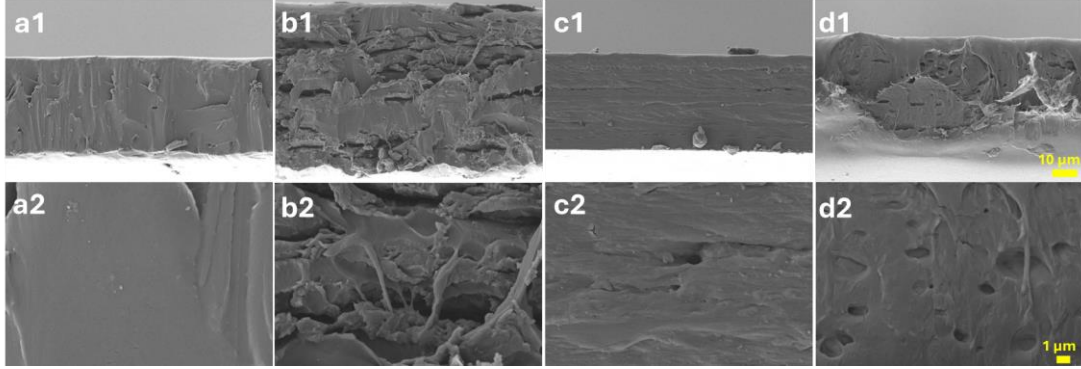
EPS temelli hidrojellerin yapısal analizi FTIR ile belirlenmiştir (Şekil 3.18). FTIR spekturumunda gözlenen 3271, 2856, 1651, 1415 ve 1041 cm^{-1} 'deki şiddetli bantlar sırasıyla $-\text{OH}$, $-\text{C}-\text{H}$, $-\text{COO}-$ (asimetrik), $-\text{COO}-$ (simetrik) ve $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 'nin gerilme titreşimiyle ilişkilidir. Özellikle EPS içeriğinin fazla olduğu hidrojel numunede (%1 EPS) $-\text{COO}-$ gerilme bant şiddetlerinde PVA kontrol hidrojel numunelerine kıyasla azalma gözlenmiştir. Bu durumun nedeni EPS ile PVA arasında oluşan iyonik bağlar olabilir. PVA kontrol hidrojellerde esas olarak 3271 ($-\text{OH}$ gerilme), 2856 cm^{-1} ($-\text{CH}$ gerilme) ve 1041 cm^{-1} ($-\text{C}-\text{O}-$ gerilme) bantları gözlenmiştir. 3271 cm^{-1} 'de $-\text{OH}$ grubuna karşılık gelen bant PVA ile en az EPS içeren hidrojel (%0,25 EPS) numunesinde çakışmış, bu bantlardan ise şiddet olarak en fazla EPS içeren (%1 EPS) numune ayrılmıştır. Bu durum PVA ile EPS'nin moleküler zincirleri arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri ile açıklanabilir. PVA-EPS hidrojelindeki bu iyonik bağların ve hidrojen bağlarının oluşumunun, hidrojin mekanik özelliklerini iyileştirmesi öngörülmektedir (Yumin ve diğ, 2022).



Şekil 3. 18: EPS'nin FTIR Spektrumu

Oluşturulan EPS temelli hidrojellerin kesitleri SEM ile görüntülenmiştir. Yalnızca PVA'dan oluşan kontrol hidrojellerde gözenekli yapı tespit edilememiştir (Şekil 3.19 a). Kontrol hidrojellerin yanı sıra EPS oranı arttıkça hidrojellerin kesitlerinde gözenekli yapı dikkat çekmektedir. Ancak EPS içeren hidrojeller esnek yapıda olduğundan bistüri ile kesim aşamasında gözeneklerin sıkışarak kapandığı kesit

görüntülerinden fark edilmektedir (Şekil 3.19 b, c, d). Hidrojel içeriğindeki EPS miktarı arttıkça gözenek yapısının arttığı gözlenmiştir. Bu durum şişme verilerini de desteklemektedir ki daha yüksek miktarda EPS içeren hidrojeller EPS'nin yapıya kazandırdığı gözeneklilik sayesinde daha iyi şişme göstermiştir. Gözenekli yapısı sayesinde EPS ile oluşturulan hidrojellerin gaz geçirgenlik hızı, şişme kapasitesi, hücre göçü gibi faktörleri etkileyerek yara iyileştirme performansını önemli derecede etkileyeceği düşünülmektedir.



Şekil 3.19: EPS temelli hidrojel yara örtülerinin farklı yakınlaştırmalarda kesit SEM görüntüsü a1 ve a2) %5 PVA, b1 ve b2) %1 EPS, %5 PVA, c1 ve c2) %0,5 EPS, %5 PVA, d1 ve d2) %0,25 EPS, %5 PVA.

3.6.2 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin DSC ve TGA analizleri

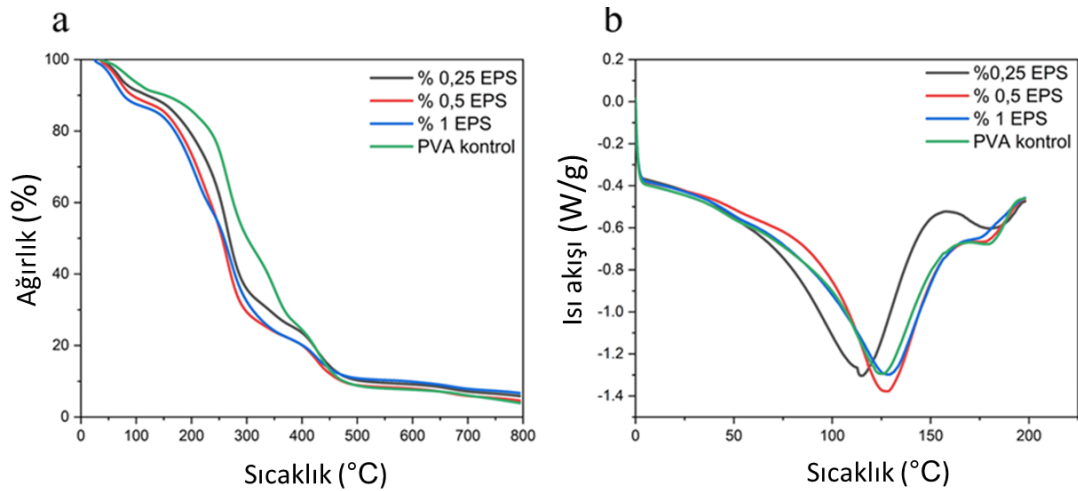
TGA analizlerinde EPS içeren hidrojellerin 3 aşamada bozunduğu, PVA kontrol hidrojellerin ise toplam 2 aşamada bozunduğu görülmüştür. Hidrojellerin bahsedilen aşamaları gerçekleştirdikleri sıcaklık aralıkları ve bu aralıklardaki % ağırlık kayıpları çizelge 3.10'da özetlenmiştir. İlk aşamadaki kütle kaybı tüm hidrojeller için benzer oranlardadır ve nedeni suyun desorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. Özellikle EPS temelli hidrojeller için en yüksek bozunmanın gerçekleştiği ikinci aşamada ise kütle kaybı EPS ve türevlerinin sakkarit halkaları ve makromolekül zincirleri de dahil olmak üzere karmaşık parçalanma süreci nedeniyle gerçekleşmiştir. Üçüncü aşamadaki bozunma dış katman polimerlerinden kaynaklanabilir (PVA). PVA kontrol hidrojellerinin ise bozunması iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşama suyun uzaklaşmasından kaynaklanırken ikinci aşama polimerin degradasyon süreçlerini kapsamaktadır (Şekil 3.20 a). EPS yapısına katılan PVA'nın hidrojellerin bozunma derecelerini azaltarak termal stabiliteyi arttırdığı bilinmektedir. EPS temelli hidrojellerde EPS oranı arttıkça özellikle ikinci aşamadaki makromolekül zincirler ve

sakkarit halkalarının degrede olması nedeniyle kütle kaybı artmıştır. TGA analizi sonucunda tüm hidrojellerin toplamda benzer oranlarının bozulduğu görülmüştür.

Çizelge 3.7 : Farklı oranlarda EPS’lerden oluşan hidrojel filmlerin TGA analizinde gerçekleşen aşamaların sıcaklık aralıklarını ve bu aşamalardaki % kütle kayıplarını göstermektedir.

	1.aşama	2.aşama	3.aşama	Kalan kütle
		142,4- 302,66 °C		
%1 EPS	25- 87 °C (%11,4)	(%56,9)	407,7- 472,9 °C (%20,5)	%11,2
% 0,5 EPS	25- 94 °C (%9,4)	94- 294,8 °C (%58,2)	407,7- 472,9 °C (%22,4)	%10,1
% 0,25 EPS	25- 98 °C (%8,5)	98- 290,4 (%53,3)	407,7- 472,9 °C (%28,1)	%10,1
PVA kontrol	25- 116,2 (%8,1)	407,7- 472,9 °C (%80,7)	-	%11,2

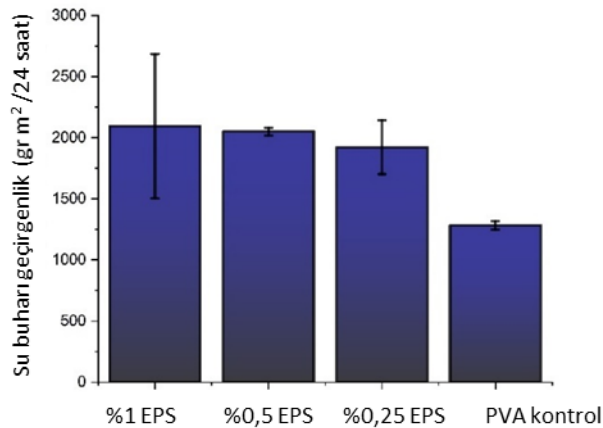
DSC ile hidrojellerin bozunma sıcaklıkları %1 EPS, %0,5 EPS, %0,25 EPS içeren ve PVA kontrol hidrojeller için sırasıyla; 127 °C, 126 °C, 115 °C ve 124 °C olarak bulunmuştur (Şekil 3.20 b). Hidrojel içerisindeki EPS oranı arttıkça hidrojellerin daha yüksek sıcaklıkta degrede olduğu görülmüştür. Dolayısıyla EPS içeriğinin PVA hidrojellere stabilite kazandırdığı söylenebilir. Ayrıca EPS, PVA’nın termal kararlılığını arttırmıştır. Bunun nedeni EPS’nin karboksil ve hidroksil gruplarının PVA’nın hidroksil gruplarıyla hidrojen bağlı çapraz bağ oluşturmamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bağlar termal işlem sırasında zincir hareketini sınırlamıştır. Bu durumun benzeri aljinat ve PVA ile oluşturulan hidrojel yapılarında da gözlenmiştir (Kim ve diğ, 2008).



Şekil 3.20: EPS temelli hidrojellerin. a)TGA termogramı. b) Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) termogramı.

3.6.3 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin su buharı geçirgenlik testleri (WVTR)

Oluşturulan hidrojel filmlerin su buharı geçirgenliklerinin %1 EPS, %0,5 EPS, %0,25 EPS içeren ve PVA kontrol hidrojeller için sırasıyla; $2094,85 \pm 590,92$, $2050,26 \pm 30,86$, $1922,4 \pm 220,39$ ve $1283,07 \pm 34,72$ gr m²/24 saat olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.21). Hidrojellerde su buharı geçirgenliği oldukça önemli bir parametredir. Aşırı yüksek bir WVTR, bir yaranın dehidrasyonuna neden olabilirken, düşük bir WVTR ise yara eksüdalarının birikmesine neden olabilir. Bu nedenle, doğal iyileşmeyi teşvik edecek en iyi ortamı oluşturmak üzere nemli bir ortam sağlamak için uygun bir WVTR'ye sahip bir yara örtüsü gereklidir. Yapılan bir çalışmada bu değerler şöyledir; $4025,8$ g.m²/24 saat aşırı yüksek geçirgenlik, $3282,0$ g.m²/24 saat yüksek geçirgenlik, $2028,3$ g.m²/24 saat normal geçirgenlik, $954,8$ g.m²/24 saat düşük geçirgenlik, $50,2$ g.m²/24 saat aşırı düşük geçirgenlik (Xu ve diğ, 2016). Bu çalışmada oluşturulan hidrojellerin WVTR değerleri incelendiğinde EPS içeren hidrojellerin WVTR değerlerinin $2094,85 \pm 590,92$ ile $1922,4 \pm 220,39$ gr m²/24 saat arasında değiştiği, PVA kontrol hidrojelinin ise WVTR değerinin $1283,07 \pm 34,72$ gr m²/24 saat olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlere bakıldığında hidrojeldeki EPS oranı arttıkça kontrol hidrojeline kıyasla WVTR değerinin de arttığı görülmüştür. Literatürle karşılaştırıldığında elde edilen WVTR değerlerinin hedeflenen değerlere uygun olarak normal geçirgenlikte olduğu gösterilmiştir.



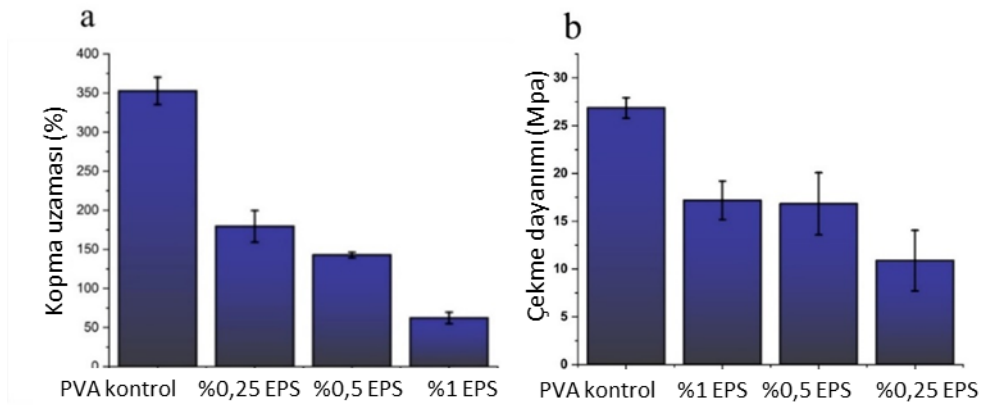
Şekil 3.21: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerin su buharı geçirgenlikleri.

3.6.4 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin mekanik testleri

EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerinin yüzde kopma uzamaları Şekil 3.22 a'da gösterilmiştir. Hidrojel filmlerin yüzde kopma uzamaları %1 EPS, %0,5 EPS, %0,25

EPS içeren ve PVA kontrol hidrojel için sırasıyla; $62,27 \pm 7,25$, $160,76 \pm 31,1$, $175,79 \pm 46,87$ ve $322,65 \pm 44,65$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.22 a).

Hidrojel filmlerin çekme dayanımları %1 EPS, %0,5 EPS, %0,25 EPS içeren ve PVA kontrol hidrojel için sırasıyla; $26,85 \pm 1,07$, $17,18 \pm 2,01$, $16,83 \pm 3,25$ ve $10,87 \pm 3,17$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.22 b). Hidrojel filmlerin çekme dayanımları karşılaştırıldığında en yüksek mekanik dayanıma sahip hidrojinin $26,85 \pm 1,06$ MPa ile en fazla EPS içeren formülasyon olduğu (%1) gösterilmiştir. PVA kontrol hidrojinin ise mekanik dayanımının $10,87 \pm 3,17$ ile EPS içerenlere göre en zayıf olduğu tespit edilmiştir. EPS, hidrojellerin kopma uzamasını zayıflatıp bunun sonucunda maksimum mukavemeti azaltmıştır. Çekme mukavemetindeki azalmanın, çapraz bağ yoğunluğunun azalmasından kaynaklandığı yorumu yapılabilir. Mekanik testler EPS'nin PVA ile bağlanarak filmin dayanıklılığını artırma özelliğini desteklemiştir. Benzer durum PVA-aljinat hidrojellerde de gözlenmiştir (Kim ve diğ, 2008). PVA ile EPS arasındaki çapraz bağ, PVA'nın kendisi arasındaki çapraz bağa kıyasla güçlü değildir. Bu nedenle PVA hidrojel sert yapıda iken, EPS içeren hidrojel daha fazla esnek ve elastik yapıdadır.

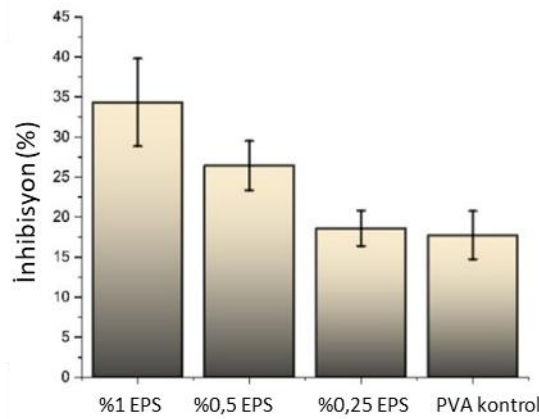


Şekil 3.22: EPS temelli ve PVA kontrol hidrojellerin a) Kopma uzamaları. b) Çekme dayanımı verilerini gösteren grafik.

3.6.5 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Hidrojellerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 1 gün süreyle pH 7,4 fosfat tamponunda bekletilen hidrojellerden elde edilen ekstraktlar DPPH ile test edilmiştir. Elde edilen veriler şekil 3.23'de gösterilmiştir. Hidrojel film içeriğindeki EPS oranı arttıkça filmlerin antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek oranda EPS (%1) içeren hidrojel filmlerin yaklaşık %35 oranında inhibisyona

sahip olduğu görülmüştür. Ancak EPS içermeyen yalnızca PVA'dan oluşan kontrol hidrojel filmlerde de yaklaşık %15 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Bu nedenle EPS'den kaynaklı yüzde inhibisyonun %15-20 oranında olduğu sonucuna varılabilir. Literatürde doğal polimerlerden elde edilen yara örtülerinin antioksidan aktivite özelliklerini geliştirmek için nanopartiküller ya da fenolik ekstraktlar gibi malzemeler yara örtüsü kompozisyonuna eklenmiştir (Tran ve diğ, 2019; Bagheri ve diğ, 2022; Shaheen ve diğ, 2022; Kamel ve diğ, 2023). Bu nedenle oluşturulan hidrojelde daha yüksek antioksidan aktivite sağlanabilmesi için literatüre benzer şekilde yapıya herhangi bir antioksidan ajan eklenmesi önerilebilir.



Şekil 3.23: Hidrojel film ekstraktlarının antioksidan aktivitesini gösteren % inhibisyon grafiğı

3.6.6 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi

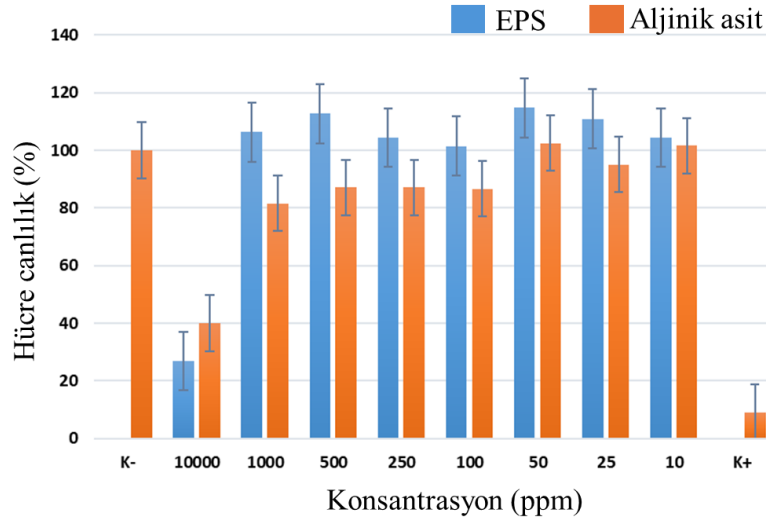
Hidrojellerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hidrojel filmlerin 1 gün süreyle pH 7,4 fosfat tamponunda bekletilmesiyle elde edilen ekstraktların 96 kuyucuklu plakalarda bakterilerle 24 saat inkübasyonunun ardından kuyucuklardan alınan 100'er µL numune agar petrilere ekilmiştir. Ardından 1 gece süreyle 37 °C'de inlube edilen petrillerdeki bakteri kolonileri sayılmıştır. Tüm EPS temelli hidrojel filmlerin ekstraktlarında, hem *Staphylococcus aureus* hem de *Escherichia coli*'de üreme gözlenmemiştir.

Kontrol PVA hidrojellerde ise beklendiğı üzere her iki petride de üreme gözlenmiş ve canlı bakteri kolonileri sayılmıştır. *Escherichia coli* ile muamele edilen PVA kontrol hidrojellerde toplam $1,54 \pm 0,39 \times 10^9$ bakteri kolonisi hesaplanmıştır. *Staphylococcus aureus* ile muamele edilen PVA kontrol hidrojellerde toplam $40,0 \pm 3,40 \times 10^6$ bakteri kolonisi hesaplanmıştır. Bu durumda EPS içeren hidrojellerin en az oranda EPS içeren

(%0,25) hidrojel de dahil olmak üzere hepsinin bakteri üremesini engellediği gözlenmiştir. Yara örtülerinin antibakteriyel özellik taşıması, yarada enfeksiyon riskini azaltarak iyileşme süresini hızlandırır. Antibakteriyel yara örtüsü sayesinde yara dış etkenlere karşı özellikle de bakterilere karşı korunur hale gelmektedir. Yara bölgesinde meydana gelen enfeksiyon yara iyileşme sürecini geciktirebilir ve sepsis, doku nekrozu gibi komplikasyonlara neden olabilir. Antibakteriyel yara örtüleri bu riskleri minimize ederek yaranın temiz kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca antibakteriyel yara örtüleri yaranın üzerine yapışan kir, mikrop ve diğer zararlı ajanların uzaklaştırılmasına yardımcı olarak yaranın enfeksiyondan korunmasını sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı hem hastaların sağlığını korumak hem de tedavi sürecini etkili bir şekilde yönetmek için antibakteriyel özellik taşıyan yara örtüleri oldukça avantajlıdır. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3'den elde edilen EPS ile oluşturulan filmlerin antibakteriyel özellik taşıması oldukça önemlidir. Örneğin *Euhalothece* sp. EPS'sine benzer bir yapıda olan ve piyasadaki birçok yara örtüsünün malzemesi olarak kullanılan aljinat yara örtülerine antibakteriyel aktivite kazandırmak için gümüş gibi metaller eklenmektedir. Ancak *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'si antibakteriyel özellikte olduğundan üretilen yara örtüsüne herhangi bir antibakteriyel ajan katmaya gerek kalmamıştır. Bu durum *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'si ile üretilen yara örtülerine üstünlük kazandırmaktadır.

3.6.7 EPS temelli hidrojel yara örtülerinin in-vitro biyouyumluluk testleri

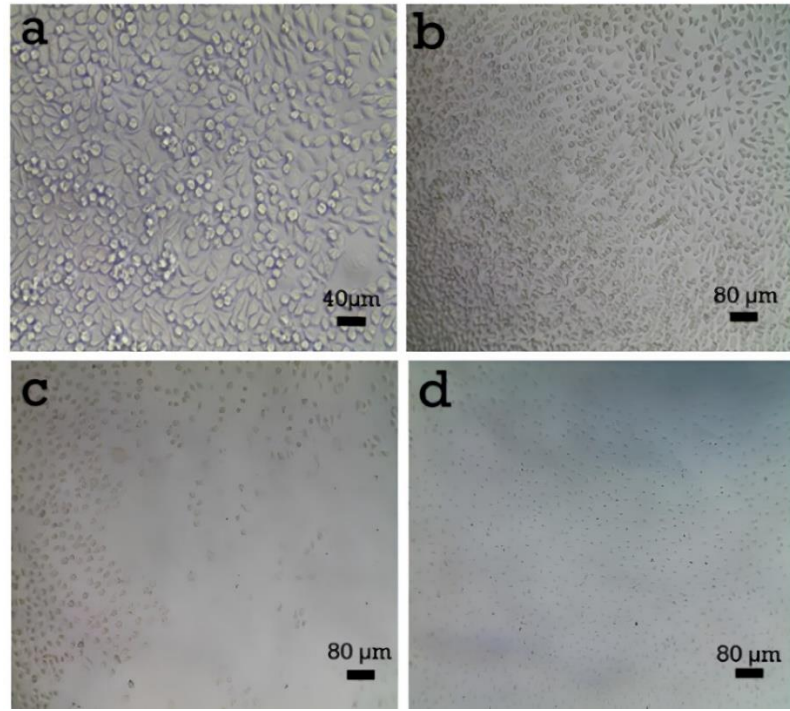
MTT ile EPS ve aljinik asitin sulu çözeltisinin ayrıca EPS temelli hidrojellerin ve aljinattan üretilen ticari bir yara örtüsünün biyouyumlulukları test edilmiştir. EPS ve aljinik asitin sitotoksik etkileri 10-10000 ppm konsantrasyon aralığında fare fibroblast hücre (L929) hattı üzerinde MTT testi ile araştırılmıştır. Buna göre 1000 ppm ile 10 ppm arasında hem EPS'nin hem de aljinik asitin sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. Hem EPS hem de aljinik asitin 10000 ppm konsantrasyonda beklenildiği üzere hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.24). Bunun nedeni 10000 ppm'de EPS ve aljinik asitin yoğun jel formunun hücrelerin üzerini kaplayarak oksijen alış-verişini engellmesi böylece hücre ölümlerinin gerçekleşmesi olarak açıklanabilmektedir.



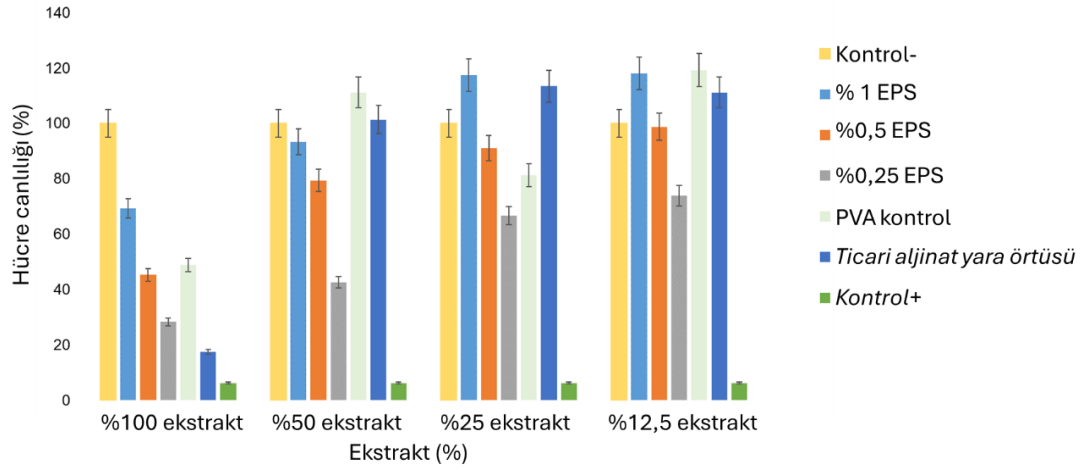
Şekil 3.24: MTT analizi sonucu EPS ve aljinik asit çözeltileri ile muamele edilen fare fibroblast hücrelerinin (L929) % canlılık grafiği

En yüksek oranda EPS içeren (%1) hidrojel dahil olmak üzere hidrojel filmlerde herhangi bir toksik etki gözlenmemiş, muamele edilen test hücrelerinin sağlıklı görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 3.25 a, b). Ticari aljinat yara örtüsü ile muamele edilen test hücrelerinin ise sağlıklı görünmediği tespit edilmiştir (Şekil 3.25 c). EPS içeren hidrojellerde EPS oranı arttıkça muamele edilen test hücrelerinin canlılığının arttığı gözlenmiştir. Buradan hareketle EPS'nin hücre canlılığını pozitif yönde etkilediği yorumu yapılabilmektedir. İçerdiği şeker yapısından dolayı hücreleri beslediği düşünülmüştür.

Ticari yara örtüsünün biyoyumluluğunun isefarklı oranlarda EPS içeren hidrojellerin hepsinden daha zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 3.26). Bu sonuçlar bu tez çalışması kapsamında üretilen EPS içerikli yara örtüsü için umut vericidir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'sinden üretilen yara örtülerinin biyoyumlu özellikte olması yaranın çevresindeki hücrelerle iletişim kurarak doku yenilenmesini teşvik eder. Ayrıca deriyle uyumlu olduğu için hastalarda kaşıntı, yanma gibi rahatsızlıklar oluşturmaz. Vücudun doku ve hücre yapısıyla uyumlu oldukları için herhangi bir komplikasyona neden olmadan uzun süre vücutta kalabilir. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'si benzer moleküller olan kitosan ve aljinat gibi biyoyumludur ve elde edilen yara örtüsü uygulaması verileri umut vaadedicidir.



Şekil 3. 25: Bir gün süre ile hidrojel ekstraktlarına maruz bırakılan L929 fare fibroblast hücre görüntüleri a) %1 EPS b) %0,5 EPS c) Ticari aljinat yara örtüsü d) Kontrol⁺



Şekil 3.26: MTT analizi sonucu hidrojel ekstraktlarıyla muamele edilen L929 fare fibroblast hücrelerinin % canlılık grafiği.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİ

Bu tez çalışmasında İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan 2015 yılında izole edilen ve Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikroalg Kültür Koleksiyonuna dahil edilen AQUAMEB-3 siyanobakteri suşunun, morfolojik incelemeler ve filogenetik analizler neticesinde *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 olarak adlandırılması uygun görülmüştür. *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 hücreleri genellikle silindirik-oval şekilde, nadiren kokoid şekilde görünmektedir. Hücreler logaritmik büyüme fazında 6-7 µm uzunluğunda, 4,5-5 µm genişliğindedir.

Geniş bir tuzluluk aralığında değişen koşullarda büyüyebildiği gösterilen *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşunun 37, 60 ve 80 ppt tuzluluk içeren koşullarda yüksek tuzluluk (140 ve 260 ppt) değerlerine kıyasen daha hızlı büyüdüğü sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada hücre büyümesine etkisi test edilen sıcaklık değerlerinin (19, 23 ve 27 °C) hücre büyümeleri üzerine anlamlı bir etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Sıcaklığın hücre büyümesine etkisinin gözlemlenebilmesi için daha geniş bir sıcaklık aralığının test edilmesi önerilebilir.

Euhalothece sp. AQUAMEB-3 suşunun fikosiyanın, beta karoten ve klorofil-a içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan spektrofotometrik analizlerde mikosporin benzeri aminoasitler içerdiği tahmin edilen suşun pigment içeriği analizlerinin detaylı bir şekilde, farklı analiz teknikleri kullanılarak yapılması gerektiği önerilmektedir. Gelecekte suşun pigment içeriği analizlerinin detaylandırılması son yıllarda oldukça popüler olan biyorafineri anlayışı ile suşun biyoteknolojiye kazandırılması açısından önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında EPS içeriği ve üretim potansiyeli incelenen suşun biyoteknolojik uygulamalarda EPS üreticisi olarak kullanıldığında, aynı zamanda içerdiği pigment gibi değerli bileşiklerin eldesi ve biyoteknolojik uygulamalarda değerlendirilmesi iyi bir biyorafineri örneği olacaktır.

Bu tez çalışmasında logaritmik büyüme fazında litrede 1,04 gr EPS ürettiği tespit edilen *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşundan elde edilen EPS'nin biyolojik ve kimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. EPS içeriğinin $267,8 \pm 76,0 \text{ mg g}^{-1}$ karbonhidrat, $70,6 \pm 4,8 \text{ mg g}^{-1}$ nötral şeker, $90,8 \pm 34,9 \text{ mg g}^{-1}$ üronik asit ve $42,6 \pm 16,0 \text{ mg g}^{-1}$ proteinden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapısal analizlerinde sülfat,

hidroksil ve karbonil gruplarının varlığı gösterilen EPS, oldukça viskoz yapıda jelleşme potansiyeli yüksek bir heteropolisakarittir. Anyonik karakter gösterdiği tespit edilen EPS'nin özellikle çevre temizleme potansiyelinin yüksek olması öngörülmekte ve gelecekte bu alanda çalışmalar planlanmaktadır. Ayrıca tez çalışması kapsamında *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 suşundan elde edilen EPS'nin karakterize edilmesiyle birlikte elde edilen veriler EPS'nin farklı alanlardaki uygulamaları için yol gösterici nitelikte olacaktır.

Molekül ağırlığı 2617 kDa olan *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'sinin sulu çözeltisi newton olmayan psödoplastik davranış göstermiştir. Emülsifikasyon özellikleri incelenen EPS'nin, ticari emülgatör ksantan zatkı ile benzer derecede emülsifikasyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Reolojik ve emülsiyon özellikleri nedeniyle gıda uygulamalarında kullanılabilme potansiyeli taşıdığı düşünülen EPS'nin gıda endüstrisinde kullanım uygunluğu açısından toksite testlerinin daha detaylı yapılması gerektiği önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında *E. coli* (ATTC 25922) ve *S. aerous* (ATTC 25923) bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip, antioksidan özellikte ve gözenekli yapıda ($203,52 \pm 45,89 \mu\text{m}$ gözenek çapı) olduğu gösterilen *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3 EPS'sinin; özellikte gelecekteki biyomedikal uygulamalar için önemli bir biyomalzeme olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında yapılan analizlerle; *Euhalothece* sp. AQUAMEB-3'den elde edilen EPS'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan hidrojel yara örtüleri içerisinde en uygun hidrojel formülasyonunun %1 EPS, %5 PVA ve %1 glutaraldehit olduğu sonucuna varılmıştır. Üretilen EPS temelli hidrojel filmin şişme oranları maksimum $\%546,9 \pm 72,9$; dengede $325,7 \pm 55,6$ 'dır. Hidrojelin 14 gün sonunda $\%54,8 \pm 4,06$ degradasyona sahip, bozunma sıcaklığı 127°C , $2094,85 \pm 590,92 \text{ gr m}^2/24 \text{ saat}$ su buharı geçirgenlik hızında, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel özellikte, antioksidan ve biyoyumlu olduğu yapılan analizlerle gösterilmiştir. Bu veriler ideal bir yara örtüsü için oldukça uygundur. Yüksek şişme özelliğinde, antioksidan, antibakteriyel olarak üretilmiş bu yara örtülerinin özellikle aşırı eksüdal kronik ülser, yanık gibi yaraların tedavisinde kullanılması önerilmektedir. Ancak kronik yaralarda, yara bölgesinde üretilen reaktif oksijen türlerini etkili bir şekilde ortadan kaldırmak için antioksidan özelliği geliştirilmiş bir yara örtüsünün kullanılması yara iyileşmesi açısından daha iyi olabilir. Bu nedenle üretilen yara

örtüsünün antioksidan aktivitesinin arttırılması açısından gelecek çalışmalarda antioksidan bir molekülün yara örtüsüne eklenmesi önerilebilir. Ek olarak, bu çalışma kapsamında oluşturulan hidrojellerin yara iyileşmesi üzerine etkisi in-vivo olarak test edilememiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla bu tez çalışması kapsamında üretilen yara örtülerinin canlılar üzerinde test edilmesi hedeflenmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Alvarez, X.,Alves, A.,Ribeiro, M. P.,Lazzari, M.,Coutinho, P.,Otero, A. (2021). Biochemical characterization of *Nostoc* sp. exopolysaccharides and evaluation of potential use in wound healing, *Carbohydrate Polymers* , 254, 117303.
- Arias, S.,Ana, Æ.,Rita, M.,Richard, F. Æ.,Mauran, Æ. H. Æ. (2003). Mauran , an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura* , with a novel composition and interesting properties for biotechnology, *Extremophiles*, 7(4), 319–326.
- Bagheri, M.,Validi, M.,Gholipour, A.,Makvandi, P.,Sharifi, E. (2022). Chitosan nanofiber biocomposites for potential wound healing applications: Antioxidant activity with synergic antibacterial effect, *Bioengineering and Translational Medicine* , 7(1), 1–15.
- Bairwa, H. K.,Prajapat, G.,Jain, S.,Khan, I. A.,Ledwani, L.,Yadav, P.,Agrawal, A. (2021). Evaluation of UV-B protection efficiency of mycosporine like amino acid extracted from the cyanobacteria *Anabaenopsis* sp. SLCyA isolated from a hypersaline lake, *Bioresource Technology Reports*, 15, 100749.
- Balakrishnan, B.,Mohanty, M.,Umashankar, P. R.,Jayakrishnan, A. (2005). Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin, *Biomaterials* , 26(32), 6335–6342.
- Barbarino, E.,Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae, *Journal of Applied Phycology* , 17(5), 447–460.
- Barco, R. A.,Garrrity, G. M.,Scott, J. J.,Amend, J. P.,Nealson, K. H.,Emerson, D. (2020). A genus definition for bacteria and archaea based on a standard genome relatedness index, *mBio*, 11(1).
- Bhat, B.,Bajaj, B. K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* , 19, 100191.
- Borah, D.,Nainamalai, S.,Gopalakrishnan, S.,Rout, J.,Alharbi, N. S.,Alharbi, S. A.,Nooruddin, T. (2018). Biolubricant potential of exopolysaccharides from the cyanobacterium *Cyanothece epiphytica*, *Applied Microbiology and Biotechnology* , 102(8).
- Borowitzka, M.,Borowitzka, L. J. (1989). Beta-carotene (provitamin A) with algae, *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, (pp. 2–6). Springer Netherlands.
- Brauer, V. S.,Stomp, M.,Bouvier, T.,Fouilland, E.,Leboulanger, C.,Confurius-Guns, V.,Weissing, F. J.,Stal, L. J.,Huisman, J. (2014). Competition and facilitation between the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* and its associated bacterial community, *Frontiers in Microbiology* , 5, 1–14.
- Comino-Sanz, I. M.,López-Franco, M. D.,Castro, B.,Pancorbo-Hidalgo, P. L. (2021). The

role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence, *Journal of Clinical Medicine* , 10(16).

- Concórdio-Reis, P.,David, H.,Reis, M. A. M.,Amorim, A.,Freitas, F.** (2023). Bioprospecting for new exopolysaccharide-producing microalgae of marine origin, *International Microbiology* , 26(4), 1123–1130.
- Cooper, D. G.,Goldenberg, B. G.** (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology* , 53(2), 224–229.
- Costa, J. A. V.,Lucas, B. F.,Alvarenga, A. G. P.,Moreira, J. B.,de Moraes, M. G.** (2021). Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications, *Polysaccharides* , 2(4), 759–772.
- Cruz, D.,Vasconcelos, V.,Pierre, G.,Michaud, P.,Delattre, C.** (2020). Exopolysaccharides from cyanobacteria: Strategies for bioprocess development, *Applied Sciences*, 10(11).
- De Philippis, R.,Vincenzini, M.** (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications, *FEMS Microbiology Reviews* , 22(3), 151–175.
- De Philippis, R.,Paperi, R.,Sili, C.,Vincenzini, M.** (2003). Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc PCC7936*, *Journal of Applied Phycology* , 15(2–3), 155–161.
- De Philippis, R.,Colica, G.,Micheletti, E.** (2011). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: Molecular basis and practical applicability of the biosorption process, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(4), 697–708.
- Dechatiwongse, P.,Srisamai, S.,Maitland, G.,Hellgardt, K.** (2014). Effects of light and temperature on the photoautotrophic growth and photoinhibition of nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Algal Research* , 5(1), 103–111.
- Delattre, C.,Pierre, G.,Laroche, C.,Michaud, P.** (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides, *Biotechnology Advances* , 34(7), 1159–1179.
- Dinis, T. C. P.,Madeira, V. M. C.,Almeida, L. M.** (1994). Action of Phenolic Derivatives as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and Peroxyl Radical Scavengers, *Archives Biochemistry and Biophysics*. 315(1), 161-169.
- Dubois, M.,Gilles, K. A.,Hamilton, J. K.,Rebers, P. A.,Smith, F.** (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry* , 28(3), 350–356.
- Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* , 32(5), 1792–1797.
- Fenoradosoa, T. A.,Delattre, C.,Laroche, C.,Wadouachi, A.,Dulong, V.,Picton, L.,Andriamadio, P.,Michaud, P.** (2009). Highly sulphated galactan from *Halymenia durvillei* (Halymeniales, Rhodophyta), a red seaweed of Madagascar marine coasts, *International Journal of Biological Macromolecules* , 45(2), 140–145.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C.,Carpita, N. C.** (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Analytical Biochemistry* , 197(1), 157–162.
- Garcia-Pichel, F.,Nübel, U.,Muyzer, G.** (1998). The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria, *Archives of Microbiology* , 169(6), 469–482.

- Gargouch, N., Elleuch, F., Karkouch, I., Tabbene, O., Pichon, C., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Abdelkafi, S., Fendri, I., Laroche, C.** (2021). Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to contend with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer, *Marine Drugs* , 19(2).
- Hamidi, M., Mirzaei, R., Delattre, C., Khanaki, K., Pierre, G., Gardarin, C., Petit, E., Karimitabar, F., Faezi, S.** (2019). Characterization of a new exopolysaccharide produced by *Halorubrum* sp. TBZ112 and evaluation of its anti-proliferative effect on gastric cancer cells, *3 Biotech* , 9(1), 1–8.
- Hu, C., Liu, Y., Paulsen, B. S., Petersen, D., Klaveness, D.** (2003). Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain, *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 33–42.
- Hussein, M. H., Abou-Elwafa, G. S., Shaaban-Dessuuki, S. A., Hassan, N. I.** (2015). Characterization and antioxidant activity of exopolysaccharide secreted by *Nostoc carneum*, *International Journal of Pharmacology*, 11(5), 432–439.
- Joulak, I., Azabou, S., Finore, I., Poli, A., Nicolaus, B., Donato, P. D. I., Bkhairia, I., Dumas, E., Gharsallaoui, A., Immirzi, B., Attia, H.** (2020). Structural characterization and functional properties of novel exopolysaccharide from the extremely halotolerant *Halomonas elongata* S6, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 95–104.
- Kamel, S., Dacrory, S., Hesemann, P., Bettache, N., Ali, L. M. A., Postel, L., Akl, E. M., El-Sakhawy, M.** (2023). Wound Dressings Based on Sodium Alginate–Polyvinyl Alcohol–Moringa oleifera Extracts, *Pharmaceutics*, 15(4).
- Kaur, M., Sandhu, K. S.** (2010). Functional, thermal and pasting characteristics of flours from different lentil (*Lens culinaris*) cultivars, *Journal of Food Science and Technology* , 47(3), 273–278.
- Kazan, A., Demirci, F.** (2023). Olive Leaf Extract Incorporated Chitosan Films for Active Food Packaging, *Konya Journal of Engineering Sciences* , 11(4), 1061–1072.
- Kedar, L., Kashman, Y., Oren, A.** (2002). Mycosporine-2-glycine is the major mycosporine-like amino acid in a unicellular cyanobacterium (*Euhalothece* sp.) isolated from a gypsum crust in a hypersaline saltern pond, *FEMS Microbiology Letters* , 208(2), 233–237.
- Khattar, J. I. S., Singh, D. P., Jindal, N., Kaur, N., Singh, Y., Rahi, P., Gulati, A.** (2010). Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Limnothrix redekei* PUPCCC 116, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), 1327–1338.
- Kim, J. O., Park, J. K., Kim, J. H., Jin, S. G., Yong, C. S., Li, D. X., Choi, J. Y., Woo, J. S., Yoo, B. K., Lyoo, W. S., Kim, J. A., Choi, H. G.** (2008). Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone, *International Journal of Pharmaceutics* , 359(1–2), 79–86.
- Kiran, B., Kaushik, A.** (2008). Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides, *Biochemical Engineering Journal*, 38(1), 47–54.
- Koçer, A. T., İnan, B., Kaptan Usul, S., Özçimen, D., Yılmaz, M. T., Işıldak, İ.** (2021). Exopolysaccharides from microalgae: production, characterization, optimization and techno-economic assessment, *Brazilian Journal of Microbiology* , 52(4), 1779–1790.
- Kothari, A., Vaughn, M., Garcia-Pichel, F.** (2013). Comparative genomic analyses of the

- cyanobacterium, *Lyngbya aestuarii* BL J, a powerful hydrogen producer, *Frontiers in Microbiology* , 4, 1–14.
- Kumar, D.,Kaštánek, P.,Adhikary, S. P.** (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application,*Current Science* , 115(2), 234–241.
- Kumar, R.,Bansal, P.,Singh, J.,Dhanda, S.** (2020). Purification, partial structural characterization and health benefits of exopolysaccharides from potential probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252, *Process Biochemistry* , 99, 79–86.
- Li, P.,Harding, S. E.,Liu, Z.** (2013). Cyanobacterial Exopolysaccharides : Their Nature and Potential Biotechnological Applications Cyanobacterial Exopolysaccharides, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), 375-404.
- Mangunsong, S.,Taswin, M.,Natarajan, S. B.** (2020). Determine β -carotene in carrot (*Daucus carota* L.) by using HPLC and GC-MS,*IOSR Journal Of Pharmacy* , 10(12), 21–27.
- Margheri, M. C.,Ventura, S.,Kaštovský, J.,Komárek, J.** (2008). The taxonomic validation of the cyanobacterial genus *Halotheca*, *Phycologia* , 47(5), 477–486.
- Markou, G.,Angelidaki, I.,Georgakakis, D.** (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631–645.
- Mishra, A.,Kavita, K.,Jha, B.** (2011). Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*, *Carbohydrate Polymers* , 83(2), 852–857.
- Mogany, T.,Swalaha, F. M.,Allam, M.,Mtshali, P. S.,Ismail, A.,Kumari, S.,Bux, F.** (2018)a. Phenotypic and genotypic characterisation of an unique indigenous hypersaline unicellular cyanobacterium, *Euhalothece* sp.nov, *Microbiological Research* , 211, 47–56.
- Mogany, T.,Swalaha, F. M.,Allam, M.,Mtshali, P. S.,Ismail, A.,Kumari, S.,Bux, F.** (2018)b. Phenotypic and genotypic characterisation of an unique indigenous hypersaline unicellular cyanobacterium, *Euhalothece* sp.nov, *Microbiological Research* , 211, 47–56.
- Mogany, T.,Kumari, S.,Swalaha, F. M.,Bux, F.** (2020). An in silico structural and physiochemical analysis of C-Phycocyanin of halophile *Euhalothece* sp., *Algal Research* , 51, 102025.
- Mogany, T.,Kumari, S.,Swalaha, F. M.,Bux, F.** (2022). In silico analysis of enzymes involved in mycosporine-like amino acids biosynthesis in *Euhalothece* sp.: Structural and functional characterization, *Algal Research* , 66, 102806.
- Monsigny, M.,Petit, C.,Roche, A. C.** (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod, *Analytical Biochemistry* , 175(2), 525–530.
- Moraes, C. C.,Sala, L.,Cerveira, G. P.,Kalil, S. J.** (2011). C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* , 28(1), 45–49.
- Morais, M. G.,Santos, T. D.,Moraes, L.,Vaz, B. S.,Morais, E. G.,Costa, J. A. V.** (2022). Exopolysaccharides from microalgae: Production in a biorefinery framework and potential applications, *Bioresource Technology Reports* , 18, 101006.
- Moreno, J.,Vargas, M. A.,Olivares, H.,Rivas, J.,Guerrero, M. G.** (1998).

Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture, *Journal of Biotechnology* , 60(3), 175–182.

- Mota, R.,Guimarães, R.,Büttel, Z.,Rossi, F.,Colica, G.,Silva, C. J.,Santos, C.,Gales, L.,Zille, A.,De Philippis, R.,Pereira, S. B.,Tamagnini, P.** (2013). Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110, *Carbohydrate Polymers* , 92(2), 1408–1415.
- Mota, R.,Pereira, S. B.,Meazzini, M.,Fernandes, R.,Santos, A.,Evans, C. A.,De Philippis, R.,Wright, P. C.,Tamagnini, P.** (2015). Effects of heavy metals on *Cyanothece* sp. CCY 0110 growth, extracellular polymeric substances (EPS) production, ultrastructure and protein profiles, *Journal of Proteomics* , 120, 75–94.
- Mota, R.,Vidal, R.,Pandeirada, C.,Flores, C.,Adessi, A.,De Philippis, R.,Nunes, C.,Coimbra, M. A.,Tamagnini, P.** (2020). Cyanoflan: A cyanobacterial sulfated carbohydrate polymer with emulsifying properties, *Carbohydrate Polymers*, 229, 115525.
- Nawaz, T.,Saud, S.,Gu, L.,Khan, I.,Fahad, S.,Zhou, R.** (2024). Cyanobacteria: Harnessing the power of microorganisms for plant growth promotion, stress alleviation, and phytoremediation in the era of sustainable agriculture, *Plant Stress* , 11, 100399.
- Ngadaonye, J. I.,Geever, L. M.,Killion, J.,Higginbotham, C. L.** (2013). Development of novel chitosan-poly(N,N-diethylacrylamide) IPN films for potential wound dressing and biomedical applications, *Journal of Polymer Research* , 20(7).
- Nübel, U.,Garcia-Pichel, F.,Clavero, E.,Muyzer, G.** (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient, *Environmental Microbiology* , 2(2), 217–226.
- Okajima, M. K.,Miyazato, S.,Kaneko, T.** (2009). Cyanobacterial megamolecule sacran efficiently forms LC gels with very heavy metal ions, *Langmuir* , 25(15), 8526–8531.
- Oren, A.** (2015). Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties, *Biodiversity and Conservation* , 24(4), 781–798.
- Otero, A.,Vincenzini, M.** (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity, *Journal of Biotechnology* , 102(2), 143–152.
- Ozturk, S.,Aslim, B.,Suludere, Z.** (2009). Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition, *Bioresource Technology*, 100(23), 5588–5593.
- Ozturk, S.,Aslim, B.,Suludere, Z.,Tan, S.** (2014). Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition, *Carbohydrate Polymers* , 101(1), 265–271.
- Panoff, J. M.,Priem, B.,Morvan, H.,Joset, F.** (1988). Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714, *Archives of Microbiology* , 150(6), 558–563.
- Parwani, L.,Bhatnagar, M.,Bhatnagar, A.,Sharma, V.** (2014). Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing, *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1473–1482.
- Passow, U.** (2002). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments, *Progress in Oceanography*, 55(3–4), 287–333.
- Pereira, S.,Zille, A.,Micheletti, E.,Moradas-Ferreira, P.,De Philippis, R.,Tamagnini, P.**

- (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly, *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 917–941.
- Philippis, R. De, Margheri, M. C., Pelosi, E., Ventura, S., Alimentari, T., Applicata, S. M.** (1993). Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat, 5, 387–394.
- Philippis, R. D. E., Margheri, M. C., Materassi, R., Alimentari, T.** (1998). Potential of Unicellular Cyanobacteria from Saline Environments as Exopolysaccharide Producers, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 1130–1132.
- Purama, R. K., Goyal, A.** (2008). Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640, *Bioresource Technology*, 99(9), 3635–3642.
- Raghavan, P. S., Potnis, A. A., Gupta, S., Gadly, T., Kushwah, N., Rajaram, H.** (2023). Interlink between ExoD (Alr2882), exopolysaccharide synthesis and metal tolerance in *Nostoc* sp. strain PCC 7120: Insight into its role, paralogs and evolution, *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 125014.
- Reignier, O., Bormans, M., Marchand, L., Siquin, C., Amzil, Z., Zykwinska, A., Briand, E.** (2023). Production and composition of extracellular polymeric substances by a unicellular strain and natural colonies of *Microcystis*: Impact of salinity and nutrient stress, *Environmental Microbiology Reports*, 15(6), 783–796.
- Rippka, R., Castenholz, R. W., Herdman, M.** (2015). Form-*Dactylococcopsis*, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1888, 1–2.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F., Jakobsen, K. S.** (1997). Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2593–2599.
- Saad, M. H., Sidkey, N. M., El-Fakharany, E. M.** (2023). Identification and statistical optimization of a novel alginate polymer extracted from newly isolated *Synechocystis algin* MNE ON864447 with antibacterial activity, *Microbial Cell Factories*, 22(1), 1–25.
- Saad, M. H., Sidkey, N. M., El-Fakharany, E. M.** (2024). Characterization and optimization of exopolysaccharide extracted from a newly isolated halotolerant cyanobacterium, *Acaryochloris* Al-Azhar MNE ON864448.1 with antiviral activity, *Microbial Cell Factories*, 23(1), 1–28.
- Saravanan, C., Shetty, P. K. H.** (2016). Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter, *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 100–106.
- Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Ratiskol, J., Godeau, G., Fischer, A. M., Helley, D., Collic-Jouault, S.** (2011). Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering, *Marine Drugs*, 9(9), 1664–1681.
- Shaheen, T. I., El-Gamal, M. S., Desouky, S. E., Hassan, S. E. D., Alemam, A. M.** (2022). Benign Production of AgNPs/Bacterial Nanocellulose for Wound Healing Dress: Antioxidant, Cytotoxicity and In Vitro Studies, *Journal of Cluster Science*, 33(6), 2735–2751.

- Shen, S., Cheng, H., Li, X., Li, T., Yuan, M., Zhou, Y., Ding, C.** (2014). Effects of extraction methods on antioxidant activities of polysaccharides from camellia seed cake, *European Food Research and Technology*, 238(6), 1015–1021.
- Silva, M. B. F., Azero, E. G., Teixeira, C. M. L. L., Andrade, C. T.** (2020). Influence of culture conditions on the production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Arthrospira platensis*, *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-11.
- Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B.** (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*, *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1019–1026.
- Singh, S., Kant, C., Yadav, R. K., Reddy, Y. P., Abraham, G.** (2019). *Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Biosynthesis, and Biotechnological Applications*, *Cyanobacteria*, 347-358.
- Strunecký, O., Ivanova, A. P., Mareš, J.** (2023). An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis, *Journal of Phycology*, 59(1), 12–51.
- Sudo, H., Burgess, J. G., Takemasa, H., Nakamura, N., Matsunaga, T.** (1995). Sulfated Exopolysaccharide Production by the Halophilic Cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*, *Microbiology*, 30, 219-222.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C.** (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 42–47.
- Sun, M., Li, W. W., Mu, Z. X., Wang, H. L., Yu, H. Q., Li, Y. Y., Harada, H.** (2012). Selection of effective methods for extracting extracellular polymeric substances (EPSs) from *Bacillus megaterium* TF10, *Separation and Purification Technology*, 95, 216–221.
- Tamahkar, E.** (2021). Bacterial cellulose/poly vinyl alcohol based wound dressings with sustained antibiotic delivery, *Chemical Papers*, 75(8), 3979–3987.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.** (2018). MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 . 0 , 30, 2725–2729.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S.** (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H., Show, P. L.** (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products, *Bioresource Technology*, 304, 122997.
- Taylor, P., Potts, M.** (2010). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria, *European Journal of Phycology*, 34(4), 319-328.
- Tiwari, O. N., Khangembam, R., Shamjetshabam, M., Sharma, A. S.** (2015)a. Characterization and Optimization of Bioflocculant Exopolysaccharide Production by Cyanobacteria *Nostoc* sp . BTA97 and *Anabaena* sp. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 1950-1963.
- Tiwari, O. N., Khangembam, R., Shamjetshabam, M., Sharma, A. S., Oinam, G., Brand, J. J.** (2015)b. Characterization and Optimization of Bioflocculant Exopolysaccharide Production by Cyanobacteria *Nostoc* sp. BTA97 and *Anabaena* sp. BTA990 in Culture

Conditions, *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 176(7), 1950–1963.

- Tiwari, O. N., Muthuraj, M., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., Annapurna, K., Sahu, M., Indrama, T.** (2020). Biosynthesis, purification and structure-property relationships of new cyanobacterial exopolysaccharides, *Polymer Testing* , 89, 106592.
- Trabelsi, L., M'sakni, N. H., Ouada, H. Ben, Bacha, H., Roudesli, S.** (2009). Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , 14(1), 27–31.
- Tran, H. A., Ly, K. L., Fox, K. E., Tran, P. A., Nguyen, T. H.** (2019). Immobilization of antimicrobial silver and antioxidant flavonoid as a coating for wound dressing materials, *International Journal of Nanomedicine* , 14, 9929–9939.
- Tronci, G., Grant, C. A., Thomson, N. H., Russell, S. J., Wood, D. J.** (2015). Multi-scale mechanical characterization of highly swollen photo-activated collagen hydrogels, *Journal of the Royal Society Interface*, 12(102).
- Uhliariková, I., Šutovská, M., Barboríková, J., Molitorisová, M., Kim, H. J., Park, Y. II, Matulová, M., Lukavský, J., Hromadková, Z., Capek, P.** (2020). Structural characteristics and biological effects of exopolysaccharide produced by cyanobacterium *Nostoc* sp, *International Journal of Biological Macromolecules* , 160, 364–371.
- Volkman, M., Gorbushina, A. A., Kedar, L., Oren, A.** (2006). Structure of *Euhalothece*-362, a novel red-shifted mycosporine-like amino acid, from a halophilic cyanobacterium (*Euhalothece* sp.), *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 50–54.
- Walsby, A. E., Van Rijn, J., Cohen, Y.** (1983). The biology of a new gas-vacuolate cyanobacterium, *Dactylococcopsis salina* sp. nov., in Solar Lake, *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences* , 217(1209), 417–447.
- Wang, W., Ju, Y., Liu, N., Shi, S., Hao, L.** (2023). Structural characteristics of microbial exopolysaccharides in association with their biological activities: a review, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 1–16.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A.** (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics* , 288(2), 369–376.
- Whitfield, C., Wear, S. S., Sande, C.** (2020). Assembly of Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides, *Annual Review of Microbiology*, 74, 521–543.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Malek, K.** (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317–335.
- Willumsen, P. A., Karlson, U.** (1996). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers, *Biodegradation*, 7(5), 415–423.
- Xu, R., Xia, H., He, W., Li, Z., Zhao, J., Liu, B., Wang, Y., Lei, Q., Kong, Y., Bai, Y., Yao, Z., Yan, R., Li, H., Zhan, R., Yang, S., Luo, G., Wu, J.** (2016). Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement, *Scientific Reports* , 6, 1–12.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R.** (2014). Uniting the classification of

cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences, *Nature Reviews Microbiology* , 12(9), 635–645.

- Yilmaz, M.,Phlips, E. J.,Szabo, N. J.,Badylak, S.** (2008). A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production, *Toxicon* , 51(1), 130–139.
- Yumin, A.,Liguo, D.,Yi, Y.,Yongna, J.** (2022). Mechanical properties of an interpenetrating network poly(vinyl alcohol)/alginate hydrogel with hierarchical fibrous structures, *RSC Advances*, 12(19), 11632–11639.
- Zanotti, A.,Baldino, L.,Reverchon, E.** (2023). Production of Exopolysaccharide-Based Porous Structures for Biomedical Applications: A Review, *Nanomaterials*, 13(22).
- Zhang, X.,Yang, S.,Sun, J.,Wu, C.,Wang, J.,Zhang, G.,Ding, C.** (2018). Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Cyanothece* sp. (Cyanobacteriaceae: *Cyanophyceae*) isolated from the eastern Indian Ocean, *Acta Oceanologica Sinica* , 37(10), 4–10.
- Zhang, Y.,Chi, Z.,Lu, W.** (2007). Exopolysaccharide production by four cyanobacterial isolates and preliminary identification of these isolates, *Journal of Ocean University of China*, 6(2), 147–152.
- Zhao, D.,Jiang, J.,Liu, L.,Wang, S.,Ping, W.,Ge, J.** (2021). Characterization of exopolysaccharides produced by *Weissella confusa* XG-3 and their potential biotechnological applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 178, 306–315.
- Zhou, W.,Wang, J.,Shen, B.,Hou, W.,Zhang, Y.** (2009). Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(2), 295–302.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Kübra ŞENTÜRK

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
- **Yüksek Lisans:** 2018, Bursa Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Halotolerant Bir Siyanobakterinin Ekzopolisakkaritinın Karakterizasyonu Ve Biyosorpsiyon Potansiyelinin İncelenmesi, BAP Projesi, Araştırmacı, (01.03.2020 -01.03.2021).
- Sürdürülebilir Tarım Ürünü Üretimi için Biyo-Pestisit ve Herbisitlerin Geliştirilmesi, Tübitak Prima Projesi, Araştırmacı, (01.07.2021 -10.09.2024).
- *Halotheca* sp. Siyanobakteri Suşundan Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin Karakterizasyonu ve Hidrojel Yara Örtüsü Olarak Geliştirilmesi, Yürütücü, Tübitak 1002 Projesi, (20.06.2023 -20.06.2024).
- Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile Mikroalgal Biyokütleden Karotenoit Pigment Eldesinin Optimizasyonu ve Optimal Koşulda Elde Edilen Karotenoit Pigmentlerin Karakterizasyonu, Tübitak 2209 Projesi, Danışman, (22.03.2024-29.12.2024)

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Biological and Chemical Characterization of Exopolysaccharides from the cyanobacterium *Euhalothece* sp. AQUAMEB- 3 (hazırlık aşamasında)

- Development of a factorial design method to investigate the growth parameters of the cyanobacterium *Eubacterium* sp. AQUAMEB-3 and the statistical analysis of these parameters (hazırlık aşamasında)
- Wound dressing application of exopolysaccharide produced by *Eubacterium* sp. AQUAMEB-3 (hazırlık aşamasında)

Diğer Eserler, Sunumlar ve Patentler:

- Şentürk, Kübra, and Mete Yılmaz. "Investigation of Exopolysaccharide Production Capacities of Cyanobacterial Strains Isolated from Lake Uluabat, Turkey." *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research* 3.1 (2020): 1-9.
- Uluabat Gölünden İzole Edilen Siyanobakteri Suşlarının Ekzopolisakkarit Üretim Kapasitelerinin İncelenmesi , SUSEMP 2019, Tam metin bildirisi