

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

**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis*' TEN SAFLAŞTIRILAN
EKSTRAPOLİSAKKARİT'İN (EPS) FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM ÇETİN

DENİZLİ, MAYIS – 2016

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



**TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis*'TEN SAFLAŞTIRILAN
EKSTRAPOLİSAKKARİT'İN (EPS) FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM ÇETİN

DENİZLİ, MAYIS - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Özlem Çetin tarafından hazırlanan “Termofilik *Bacillus licheniformis*’ten Saflaştırılan Ekstrapolisakkarit (EPS)’in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 06.05.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği /oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

Üye (Eş Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Gülümser ACAR DOĞANLI

Üye

Doç.Dr. Hatice ARDAĞ AKDOĞAN

Üye

Yrd.Doç.Dr. Yusuf ÖZCAN

Üye

Yrd.Doç.Dr. Miraç YILMAZ

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 25.05.2016. tarih ve ...21/09... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2014FBE037
nolu proje ile desteklenmiştir.**

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

ÖZLEM ÇETİN

İMZA



ÖZET

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis*'TEN SAFLAŞTIRILAN EKSTRAPOLİSAKKARİT'İN (EPS) FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖZLEM ÇETİN

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

(EŞ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. GÜLÜMSER ACAR DOĞANLI)
DENİZLİ, MAYIS – 2016

Bu çalışmada, Pamukkale termal kaynak izolatu olan *Bacillus licheniformis* B18'in ekzopolisakkarit üretimi optimize edilmiştir. EPS üretimine besiyeri (NB, LB, TSB), karbon kaynağı (galakturonik asit, glukuronik asit, glukoz), endüstriyel artık (melas, peynir altı suyu), sıcaklık (40, 45, 50, 55 °C) ve pH (6,5-9,0)'nın etkisi araştırılmıştır. Ticari besiyerlerine kıyasla, peynir altı suyu ve melas EPS üretimine olumlu etki göstermiştir. Maksimum EPS üretimine 2:100 melas konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Buna ilaveten, alkali ortamda (pH 8) ve 45 °C sıcaklıkta bakteriyel EPS üretiminde önemli derecede artış gözlenmiştir. Tez çalışmamızda farklı ortamlardan elde edilen saf EPS'nin şeker, protein ve üronik asit içerikleri de analiz edilmiştir. Melas besiyerinden elde edilen EPS'nin şeker oranının yüksek olduğu gözlenmiştir. XRD desenlerine göre B18'in EPS'si büyük ölçüde amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahiptir. TGA analizinde ise artan sıcaklıkla birlikte iki aşamalı bir kütle kaybı olmuştur. SEM görüntüleri incelendiğinde EPS'nin gelişme ortamına bağlı olarak ipliksi ya da lamellar yapıda olduğu, ipliksi uzantılarla bakterilerin yüzeye veya birbirlerine tutundukları görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELEER: *Bacillus licheniformis*, EPS, melas, peynir altı suyu, XRD, TGA, SEM

ABSTRACT

**DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF
EXTRAPOLYSACCARIDE (EPS) FROM THERMOPHILIC *Bacillus*
*licheniformis***

MSC THESIS

ÖZLEM ÇETİN

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

(CO-SUPERVISOR: YRD. DOÇ. DR. GÜLÜMSER ACAR DOĞANLI)

DENİZLİ, MAY 2016

In this study, the exopolysaccharide production of *Bacillus licheniformis* B18 isolated at Pamukkale thermal springs. The effect of nutrient media (NB, LB and TSB), carbon source (galacturonic acid, glucuronic acid and glucose), industrial residues (molasses and whey), temperature (40, 45, 50 and 55 ° C) and pH (6, 5-9,0) was investigated on production of EPS. While the addition of molasses and whey protein affected the EPS production positively, commercial nutrient media didn't affect the EPS production. The maximum EPS production was reached in 2: 100 molasses concentration. In addition, bacterial EPS production was observed to increase in an alkaline medium (pH 8) and at 45 °C. In our thesis study, the contents of sugar, protein and uronic acid contents of EPS obtained from different environments was also analysed. The sugar content of EPS derived from molasses medium was high. According to the XRD patterns, the EPS structure of B18 strain has largely amorphous character or a micro regulation weak (weak crystalline). Also, it was found that a two-stage mass was loss with increasing temperature in TGA analysis. As results of SEM, it was observed that EPS has filamentous or lamellar structure and B18 cells have been hold on to surface or each other with fibrils.

KEYWORDS: Molasses, Whey protein, EPS, TGA, SEM, XRD

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 EPS'nin Tanımı	4
2.2 EPS'nin Yapısı ve Özellikleri	5
2.3 EPS'nin Önemi.....	6
2.4 Melasın Tanımı.....	7
2.4.1 Melasın Yapısı ve Önemi.....	8
2.5 Peynir Altı Suyu Tozunun Genel Özellikleri.....	9
2.5.1 Peyniraltı Suyu Protein Konsantrelerinin Çeşitleri ve Özellikleri.....	10
2.5.2 Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Sağlık Üzerine Etkileri.....	11
2.6 Termofilik Mikroorganizmalar.....	11
2.6.1 <i>Bacillus</i> cinsi suşların özellikleri	12
2.6.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	14
2.7 X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi.....	14
2.8 Termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi.....	15
2.9 X-ışını Küçük Açılı Saçılma (SAXS) Yöntemi.....	16
3. YÖNTEM	18
3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri	18
3.2 EPS üretimini için optimal kültür koşullarının belirlenmesi.....	18
3.2.1 Besiyeri Belirlenmesi.....	19
3.2.2 pH'nın EPS üretimine etkisi	19
3.2.3 Sıcaklığın EPS üretimine etkisi.....	19
3.2.4 Organik asitlerin ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi.....	19
3.2.5 Peynir altı suyu tozunun EPS üretimine etkisi.....	19
3.2.6 Melas besiyerinde EPS üretimi	19
3.3 Analitik Metod.....	20
3.4 EPS Saflaştırma	20
3.5 Saf EPS'nin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	22
3.5.1 Toplam şeker tayini	22
3.5.2 Toplam protein tayini	22
3.5.3 Üronik asit miktarı belirleme	23
3.6 Saf EPS'nin Karakterizasyonu	23
3.6.1 X-ışını Kırınımı (XRD) Yöntemi ile Yapılan Analizler	23
3.6.2 Termal Analizler (TGA).....	23
3.6.3 Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntüleme.....	24
3.6.4 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler	24
4. BULGULAR.....	25
4.1 EPS üretimini etkileyen optimal koşulların belirlenmesi	25
4.1.1 Farklı besi ortamlarında EPS üretimi	25
4.1.2 pH'nın EPS üretimine etkisi	26

4.1.3	Sıcaklığın EPS üretimine etkisi.....	27
4.1.4	Organik asit ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi	28
4.1.5	Peynir altı suyu tozunun EPS üretimine etkisi.....	29
4.1.6	Melas besi ortamında EPS üretimi	31
4.2	Saf EPS'nin Kimyasal İçeriği.....	33
4.3	Saf EPS'nin Karakterizasyonu	35
4.3.1	XRD analizi	36
4.3.2	TGA analizi.....	37
4.3.3	SEM analizi.....	39
4.3.4	SAXS analizi.....	43
5.	TARTIŞMA	46
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
7.	KAYNAKLAR	54
8.	EKLER	65
	EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler.....	66
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 <i>B. licheniformis</i> B18'in Melas içeren besi ortamından elde edilen Çözünmüş EPS (Supernatant)	21
Şekil 2 Melasta geliştirilen <i>B. licheniformis</i> B18 suşunun ürettiği çözünmüş EPS'nin membran filtrasyon düzeneğindeki görünümü	34
Şekil 3 <i>B. licheniformis</i> B18 saf EPS'sinin XRD analiz sonuçları	36
Şekil 4 <i>B. licheniformis</i> B18 saf EPS'sinin TGA analiz sonuçları	38
Şekil 5 LB besi ortamında saflaştırılan EPS'nin SEM görünümü	40
Şekil 6 Melas besi ortamında saflaştırılan EPS'nin SEM görünümü	41
Şekil 7 Peyniraltı suyu besi ortamında saflaştırılan EPS'nin SEM görünümü ..	42
Şekil 8 Glukuronik asit besi ortamında saflaştırılan EPS'nin SEM görünümü ..	43
Şekil 9 LB ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum grafiği	44
Şekil 10 PAST ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	44
Şekil 11 Melaslı besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	45
Şekil 12 Melaslı besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni	45

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Melastaki Mineraller	9
Tablo 2: Melastaki Vitaminler	9
Tablo 3: Peyniraltı suyu proteinlerin bileşimi	10
Tablo 4: Farklı besiyerlerinde üretilen EPS'nin zamana bağlı değişimi.....	26
Tablo 5: LB-Miller besiyerinde EPS üretimine pH'nın etkisi.....	27
Tablo 6: LB miller besiyerinde EPS üretimine sıcaklığın etkisi	28
Tablo 7: LB besi ortamına 1g/L oranında ilave edilen organik asit ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi	29
Tablo 8: Past içeren LB ortamında EPS üretimine pH'nın etkisi	30
Tablo 9: Past içeren LB ortamında EPS üretimine sıcaklığın etkisi	30
Tablo 10: Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına melas konsantrasyonunun etkisi.....	31
Tablo 11: Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına pH'nın etkisi.....	32
Tablo 12: Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına sıcaklığın etkisi...	32
Tablo 13: <i>B. licheniformis</i> 'in optimal EPS üretim şartları	33
Tablo 14: <i>B. licheniformis</i> 'ten saflaştırılan EPS'lerin biyokimyasal içeriği.....	34

SEMBOL LİSTESİ

mm	: Milimetre
Da	: Dalton
UV	: Ultraviyole
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
g	: Gram
µg	: Mikrogram
dk	: Dakika
Ar	: Argon
N	: Azot
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
µl	: Mikrolitre
mcg	: Mikrogram
NB	: Nutrient broth
LB	: Luria-Bertani medium
TSB	: Tryptic soy broth
ml	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrolitre
M	: Molarite
mM	: Mikromolar
s	: Saniye
PAST	: Peyniraltı suyu tozu
TSA	: Tryptic soy agar
EPS	: Ekstrapolisakkarit
SAXS	: Küçük açılı X-ışını saçılması
TGA	: Termo-Gravimetrik Analiz
XRD	: X ışınları Kırınımı Analizi

SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
Å	: Angstrom
I	: Şiddet
NaCl	: Sodyum klorür
dH₂O	: Distile su
H₂SO₄	: Sülfürik asit
N	: Normalite



ÖNSÖZ

2013-2016 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'ın danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar, maddi ve manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım, titiz ve disiplinli çalışmasını örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Tez çalışmamın başından sonuna kadar her zaman bana destek olan, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım aşamamda bilgisi ve deneyimiyle bana her zaman yol gösteren, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gülümser ACAR DOĞANLI'ya,

TGA ve XRD analizlerini yapan ve tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Ömer BOZKAYA'ya

SAXS analizlerini yapan ve tez yazım aşamasında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi alışverişi yaptığım, tecrübeleri ile bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Tuğba ŞENSOY CANDOĞAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yardımını esirgemeyen iyi günümde kötü günümde hep yanımda olan, değerli zamanından bana ayırıp işlerimi kolaylaştıran ve beni her zaman motive eden, çalışma arkadaşım Kübra SOLMAZ'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi alışverişi yaptığım, tecrübeleri ile bana yardımcı olan çalışma arkadaşım N. Nur BOZBEYOĞLU'na

En yoğun çalışmalar arasında yardımını bizden esirgemeyen ve bildiği herşeyi bize öğretmeye çalışan çalışma arkadaşım Dicle ARAR'a

Herzaman yanımda olan ve her konuda tecrübeleri ile bana yol gösteren, iyi ve kötü günümde beni hiç yalnız bırakmayan İbrahim Gani ÇONA'ya

Ayrıca eğitimim süresince maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyerek beni bugünlere özenle getiren çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Bakteriyal ekstrapolisakkarit (EPS), ilginç fiziki, kimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı polimer biliminin yeni biyomateryalleri olarak önem kazanmıştır. Tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi gibi oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Deniz ekosistemleri ve tatlı suların ağır metallerle kirlenmesi biyolojik birikime neden olmaktadır. Bu problemlerin önüne geçmenin en etkili yöntemlerinden biri biyoremediyasyondur. Günümüzde EPS-metal etkileşimi araştırılan önemli konulardandır. Her EPS molekülünün yüksek affinite gösterdiği metal tipi vardır. Bu tür polimerler tespit edilerek spesifik olarak ağır metal temizliğinde kullanılabilir. Dünya'nın her ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de enerji ihtiyacı yüksek düzeydedir. Özellikle kış mevsiminde konutların ısıtılması için tükenebilen (petrol, kömür, doğal gaz) kaynaklar kullanılmaktadır. Bu kaynakları bilinçli ve tasarruflu kullandıkları için yapı malzemeleri sektöründe konutların ısı yalıtımı olması esastır. Bakterilerin EPS yapısı, son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte ısı yalıtım maddesi olarak kullanılması önerilmektedir (Yalpani ve diğ., 1987; Bar ve diğ., 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyoteknolojik uygulamalar için en ucuz maliyet içeren durumlarda EPS üretimi araştırılmıştır. EPS üretimi için, endüstriyel artık kullanılımdan önce substratlar kullanılmıştır (Muthusamy ve diğ., 2008). Melas, tekrarlanan kristalleşmeler sayesinde şeker üretimi eldesini büyük oranda etkilemiştir (Olbrich, 2006). Yapılan son çalışmalarda yeni mikrobiyal EPS'lerin araştırmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda ekstrapolisakkarit ürettikleri rapor edilmiştir (Margaritis ve diğ., 1985; Sutherland ve Kennedy, 1996; Lee ve diğ., 1997; Sutherland, 1998). *B. subtilis* tarafından glukoz, galaktoz, früktoz ve glukuronik asit içeren ortamda polisakkarit üretimi yapılmıştır. Ayrıca *Bacillus* CMG1447 cinsinde ise glukronik asit, galaktoz, mannoz ve ramnoz içeren ortamlarda yüksek moleküler ağırlığa sahip asidik heteropolisakkaritler

üretilmiştir (Küçükkaşık ve diğ., 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise *B. subtilis* tarafından üretilen EPS için uygun ve optimize şartların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca atık kaynakların ve sentetik besiyerlerinin kullanılması EPS üretimi üzerine etkisi karşılaştırılmıştır (Abdul Razack ve diğ., 2013). Günümüzde, yoğun olarak bakteriyel EPS'lerin çoğunun ilginç ve faydalı özellikler içerip içermediği de araştırılmaktadır (Van Kranenburg ve diğ., 1999).

EPS'ler toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* ve *Azotobacter* gibi daha birçok gram pozitif veya gram negatif bakteri tarafından sentezlenmektedir (Lee ve diğ., 1997). EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı da fiziksel bir koruyuculuk şeklinde gerçekleşmektedir. EPS'ler ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar. Ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir (Denny, 1995; Gugliandola ve diğ., 2003). Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS'ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler (Wolfaardt ve diğ., 1994; Krylova ve diğ., 2000). Biyofilm, bakterileri çevresel faktörlere karşı korumanın yanında genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de rol alır (Moller ve diğ., 1998).

Biayomedikal malzemeler başta olmak üzere, evsel/endüstriyel su sistemleri, inşaat sektörü gibi yaşamımızın her alanında kullandığımız ve yüzeylerde biriken bazı ağır metaller hem sağlık sektöründe ciddi ve hayati sorunlara neden olmakta hem de endüstriyel alanlarda ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca, EPS-ağır metal etkileşimlerinin tespit edilmesi, EPS ve/veya biyofilm matriks oluşum mekanizmalarının öğrenilmesi, ortamda biriken ağır metallerin temizlenmesinden birçok enfeksiyonun önlenmesine kadar çok yönlü problemlerin giderilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tür çalışmaların yapılabilmesi, hiç kuşkusuz bakteriden saflaştırılan EPS molekülünün yapısal, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin tespitiyle mümkün olacaktır. Bu çalışmada da Pamukkale Termal Bölge izolatu olan *Bacillus licheniformis* B18 suşundan elde edilen ve günümüzde nano bilim veya nanoteknolojinin önemli çalışma materyallerinden birini oluşturan bakteriyel EPS'nin karakterizasyonu ve ultrastrüktürel yapısı hakkında bilgi edinilmiştir. Bu amaçla sunulan bu çalışmanın başlıca hedefleri şöyledir:

- i. Maksimum toplam şeker üretimi için optimal kültür koşullarını belirlemek,
- ii. pH'nın toplam şeker üretimine etkisini belirlemek,
- iii. Sıcaklığın toplam şeker üretimine etkisini belirlemek,
- iv. Endüstriyel artık olan melas ve peynir altı suyu tozunun toplam EPS üretimine etkisini belirlemek,
- v. Organik asit ve karbon kaynaklarının toplam EPS üretimine etkisini belirlemek,
- vi. Belirlenen optimal koşullarda bakteriden EPS saflaştırmak,
- vii. Bakteriyal EPS'nin XRD, TGA ve SEM analizleri ile karakterizasyonunu yapmak.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ekstrapolisakkarit'nin (EPS) Tanımı

EPS (ekstrapolisakkaritler) formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Becker ve diğ., 1998; Bar ve diğ., 2007). Bakteriyel EPS'ler genellikle immunojeniktirler. İn vitro çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Calazans ve diğ., 1997).

Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slime (yapışkan) formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Costerton ve diğ., 1994; Denny, 1995). EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (Gugliandola ve diğ., 2003). EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (Lee ve diğ., 1997; Moller ve diğ., 1998). EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir (Margaritis ve diğ., 1985; Calazans ve diğ., 1997). Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (Ramesh ve Tharanathan, 2003). Polisakkaritler, bakteri suşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Sentez olayı hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir (Bar ve diğ., 2007). EPS'lerin oluşumunda; UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil – transferaz 1 ve polimeraz gibi polisakkarit sentezi

DNA kaynaklı olabildiği gibi bazı bakteriler içinde kromozomal DNA kaynaklıdır (Sutherland, 1990; Lamothe, 2000).

2.2. Ekstrapolisakkarit (EPS)'nin Yapısı ve Özellikleri

EPS'ler suda çözünen büyük moleküllerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (Calazans ve diğ., 1997). EPS birbirine glikozid bağlarla bağlanan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriye EPS'lerin çoğunluğu oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşan heteropolisakkarid yapıda olmalarına rağmen bazı bakteriye EPS'ler ise tek tip şekerden oluşan homopolisakkarid yapıdadırlar. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğu nötr olmasına rağmen bazı bakteriye EPS'ler negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptirler (Kenne ve Lindberg., 1983). EPS hidrofilik özellik taşımasıyla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir. EPS'de bulunan yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça karışıktır ve hem pozitif hem negatif düzenleyiciler içerir. Bu düzenleyicilerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının üretimini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların EPS üretimi üzerine etkisi olmaktadır (Shankar ve diğ., 1995).

EPS'ler bakterinin ekstrem şartlardan korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Mikroorganizmayı ve ortamı kurumaya karşı korur, zararlıları ortamdan uzaklaştırır (Ophir ve Gutnick, 1994). EPS'ler üretici suşun azalan su aktivitesine, faj atıklarına, fagositoza, toksik bileşiklere, antibiyotiklere ve ozmotik basınca karşı korumasının yanında metal iyonların hücreye alınmasında da görevlidirler. EPS'nin bir diğer özelliği de hücrelerin tanınmasını, yüzey ortamına tutunmasında yapıştırıcı görevi görür. Bunun yanında çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da görev alır (Ruas-Madiedo ve diğ., 2002). Bütün bu özellikler EPS üreten bakteriye bulunduğu ortamda sabit

olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

EPS üretimi bakteri gelişim fazı, besiyeri bileşimi, pH ve sıcaklık gibi değişken durumlardan etkilenmektedir. Farklı EPS'ler tek bir suş tarafından farklı ortamlarda üretilmektedir (Duboc ve Mollet, 2001; Jolly ve diğ., 2002). Gelişme fazları EPS üretimini etkilemektedir. Logaritmik fazda EPS üretimi artmaktayken durağan fazda üretim olmamaktadır. Kültür koşulları, karbon kaynakları ve düşük inkübasyon sıcaklıkları da EPS sentezinde etkili olmaktadır (Tallon ve diğ., 2003).

Lactobacillus plantarum gibi suşlar tarafından üretilen EPS'lerin teknolojik özellikleri yanında sağlık üzerine etkileri de bulunmaktadır. EPS'ler sindirim sisteminde daha uzun süre kalmakta ve böylece probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu artırmaktadır. Bunun yanında immün sistemi düzenleyici, kolesterol düşürücü ve antitümör etkileri bulunmaktadır (Welman ve Maddox, 2003). Bazı EPS'ler kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bunlar epiteliyal hücrelere enerji sağlamanın yanında kolon kanserinin oluşumunu da önlemektedir (Jolly ve diğ., 2002). Sindirilemeyen karbonhidratlardan olan fruktooligosakkaritler prebiyotik olarak görev yapmaktadır (Ruas-Madiedo ve diğ., 2002).

2.3 Ekstrapolisakkarit (EPS)'nin Önemi

Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar da EPS üreten bazı bakteri suşlarının insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Degeest ve diğ., 2001). Bazı bakteriler asit gelişiminden dolayı mikrobiyal bozulmalara karşı gıdaları koruduğu gibi, gıdalarda aroma, görünüş, tat ve viskozite gibi birçok faydalarından dolayı gıda endüstrisinde kullanımı yaygınlaşmaktadır.

EPS üretimi ve karakteri, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi ortam koşullarından etkilenmekte, ortamdaki substrat miktarı ve kompozisyonuna göre de değişiklik gösterebilmektedir (Fajardo-Lira ve diğ., 1997). EPS'lerin

bileşiminde galaktoz ve glukoz fazla bulunmaktayken çoğu kez de ramnoz bu yapıda yer almaktadır (Cerning, 1990).

Genellikle EPS'ler monosakkarit kompozisyonu, elektrik yükü, üniteler arası bağlar ve tekrarlanan yan zincirlerin varlığına bağlı olarak farklılık göstermektedirler. Bunun yanında, zincir uzunluğu ve zincir dallanmasının sıklığı EPS'nin kompakt yapısına etkisi olduğundan reolojik özellikleri de güçlü şekilde etkilemektedir (Perry ve diğ., 1997; Duboc ve Mollet 2001; Broadbent ve diğ., 2001). Ayrıca jel içinde bulunan eksopolisakkaritlerin yeri de viskoziteyi etkileyen önemli bir faktördür (Sodini ve diğ., 2004).

Antitümör, antiülser, bağışıklık sistemini düzenleyici veya kolesterol düşürücü aktivite gösteren EPS insan sağlığına da olumlu katkıda bulunabilmektedir (Ruas-Madiedo ve diğ., 2002).

2.4 Endüstriyel Artık Olan Melas'ın Tanımı

Yüksek miktarda şeker içeren Melas, herhangi bir bitkinin özsuyundan, bazı teknolojik işlemler kullanılarak sakkarozun kristalize edilmesi sonucu, şeker, şeker harici maddeler ve sudan oluşan bir yan üründür (Güngen, 1991). Endüstriyel olarak şeker, şeker pancarı ve şeker kamışından elde edildiğinden ülkemizde de bu amaçla şeker pancarından yararlanılmaktadır. Ülkemizde yıllara göre değişiklik göstermekte olup yılda ortalama 2,7 - 3 milyon dekar şeker pancarı ekilerek 9 -13 milyon ton şeker pancarı üretilmekte ve nerdeyse tamamının fabrikalarda şekere işlenmesi sonucu büyük miktarlarda melas (400 000-600 000 ton) elde edilmektedir (Anonim, 1978). Elde ediliş yöntemine göre Melas, normal ya da yüksek şekerli melas olmak üzere isimler almaktadır. Kaynağına göre ise şeker kamışı melası, şeker pancarı melası veya narenciye melası gibi adlandırma yapılmaktadır (İmik ve Şeker, 1997).

Melas şilempeleri, sindirilebilirlikleri ve kimyasal bileşimleri birinden diğerine değişebildiğinden berraklaştırma ve santrifüjleme gibi fiziksel, ya da kimyasal bir arındırma işlemine de tabi tutulabilmektedirler (Troccon ve Demarquilly, 1989; Ak, 1997). Uygulanan bu kimyasal işlemde, ortama amonyum

sülfat gibi amonyumlu bileşikler eklenerek potasyum iyonlarının bir kısmının potasyum sülfat halinde çökmesi sağlanmaktadır. Bunun sonucunda ortamdaki amonyak ve buna bağlı olarak organik maddeler ve ham protein miktarı artarken potasyum miktarı da istenilen düzeye indirilebilmektedir (Ak, 1997).

Ülkemizde ekmek mayası ve alkol üretim teknolojileri yan ürünü olan konsantre melas bulunmaktadır.

2.4.1 Endüstriyel Artık Olan Melas'ın Yapısı ve Önemi

Melas, hayvancılık sektöründe lezzetsiz yemlerin tüketilmesinde, proteince zengin yemlerin dengelenmesinde kullanılmaktadır (Karabulut, 1995). Bunun yanında, silaj yapımında laktik asit üretimini arttıran iyi bir silaj katkı maddesi olarak tüketilmektedir (McDonald ve diğ., 1991).

Fermantasyon sanayisinde ekmek mayası, etil alkol, sitrik asit, lisin ve antibiyotikler gibi çeşitli ürünlere işlenen melasın, işlem sonrası elde edilen yan ürüne melas şilempesi (Ak, 1997) veya vinas (Sarıçiçek ve diğ., 1998) denilmektedir. Fermantasyon olayı sonucunda elde edilen melas şilempesi, içindeki su miktarı çok fazla olduğundan, depolama ve taşınabilme özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla % 55-75 seviyelerine kadar yoğunlaştırılmaktadır. Bu şekilde ürünün yoğunluğu yaklaşık olarak 1,3; pH'sı ise 5-7 arasında değişmekte olup hafif asidik özellik göstermektedir.

Şeker pancarı veya şeker kamışından şeker üretme sürecinde bir yan ürün olarak Melas açığa çıkmaktadır. Melasın kalitesi, şeker pancarı veya kamışının olgunluğuna ve elde edilen şeker miktarına göre değişmektedir (Karaalp, 2007).

Şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilen melasın mineral ve vitamin içerikleri Tablo 1 ve Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 1 Melasta bulunan mineraller (Curtin, 1983)

Mineral	Şeker kamışı	Şeker pancarı
Bakır(mg/kg)	36	13
Demir(mg/kg)	249	117
Manganez(mg/kg)	35	10
Çinko(mg/kg)	13	40

Tablo 2 Melasta bulunan vitaminler (Curtin, 1983)

Mineral	Şeker kamışı	Şeker pancarı
Biotin (mg/kg)	0. 36	0.46
Kolin (mg/kg)	745	716
Pantotenik Asit(mg/kg)	21.0	7.0
Riboflavin (mg/kg)	1.8	1.4
Tiamin (mg/kg)	0.9	-

2.5 Endüstriyel Artık Olan Peyniraltı Suyu

Peynir yapımında yan ürün olarak ortaya çıkan peyniraltı suyu; laktoz, mineral maddeler, vitaminler, protein ve az miktarda da süt yağını içermektedir. Oluşan ürünler içinde peyniraltı suyu proteinleri en önemli kısmı oluşturmaktadır. Peyniraltı suyu proteinlerinin diğer proteinlere göre üstün olan tarafı biyolojik değerinin yanında, antioksidan fonksiyonları destekleyen sülfür içeren aminoasitlerinin de yüksek oranda bulunmasıdır (Smithers ve diğ., 1996; Anonymous, 1998). Aminoasitler içinde bulunan sülfürler vücuttaki antioksidan peptitlerin düzeyini korumaya yardımcı olmaktadır. Sistein glutatyon'nun sentezi için gerekli bir aminoasit, antioksidan, antikarsinojen ve sülfür içeren tripeptitleri stimule eden bir immundur. Diğer protein kaynaklarına göre, peyniraltı suyu proteinleri kısa zincirli aminoasitleri, L-isolösin, L-lösin ve L-valin'i yüksek konsantrasyonlarda içermektedir (Harper, 2000; German ve diğ., 2001). Tablo 3'de peyniraltı suyu proteinlerinin bileşimi verilmiştir.

Tablo 3 Peyniraltı suyu proteinlerinin bileşimi (De Witt, 1998)

Protein	Konsantrasyon (g/l süt)
β – Laktoglobulin	3.2
α – Laktalbumin	1.2
Imminoglobulin	0.8
Serum Albumin	0.4
Laktoferrin	0.2
Laktoperoksidaz	0.03
Proteaz – pepton	≥ 1

2.5.1 Peyniraltı Suyu Protein Konsantrelerinin Çeşitleri ve Özellikleri

Peyniraltı suyu protein konsantrelerinin eldesinde değişik yöntemler uygulanmasıyla (püskürtmeli kurutma, tersosmoz, ultrafiltrasyon, iyon değişimi gibi) farklı özelliklerde ticari ürünler elde edilmektedir. Bunların başlıcaları;

- Peyniraltı suyu tozu (% 13 protein içerir).
- Peyniraltı suyu proteini konsantratu (% 35 protein içerir).
- % 50lik Peyniraltı suyu protein konsantratu.
- % 80lik Peyniraltı suyu protein konsantratu.
- Laktoalbumin (% 85 – 90 oranında protein içeren özel Peyniraltı suyu proteini konsantratu).
- Peyniraltı suyu proteini izolatu (% 90 oranında) (Renyad ve Whitehead 1991; De la Fuente ve diğ., 2002).

Peyniraltı suyu proteinlerinin teknolojik özelliklerini protein – su, protein – protein, protein – yağ ve protein – gaz fazı etkileşimleri şeklinde belirtilmiştir. Peyniraltı suyu proteinlerinin su absorbe ederek şişme, çözünübilirlik, tam karışmayan iki farklı maddeyi bir arada tutmada emülsiyon yapma özelliği, jel oluşturma, viskoelastikiyet, tat ve aroma koruma, lipid bağlama gibi özellikleri vardır. Peyniraltı suyu proteinlerinin sıcaklık etkisiyle şeffaf bir yapı kazanması ve protein agregasyonunun oluşmasının ardından viskozite artışı sağlandığı ve dalgalar halinde jel meydana geldiği bildirilmiştir (Britten ve Giroux, 2001). Peyniraltı suyu protein izolatları ve hidrolizatları lesitinle birlikte kullanıldığında

ürünün emülsiyon özelliği artmaktadır. Peynirsuyu proteinlerinin modifikasyonu sonucu, daha büyük polimerleri ve daha küçük moleküllü doymuş hidrolazları yanında, gelişen soğuk jelatinizasyonla ürünün bilinen özellikleri ile karıştırılıp yeni modifiye gıda ürünleri ortaya çıkartılmaya çalışılmaktadır (Foegeding ve diğ., 2002; Tarakçı ve Küçüköner, 2003).

2.5.2 Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Sağlık Üzerine Etkileri

Süt fabrikalarının artık maddesi olan Peyniraltı suyu, sütün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılmasından ve peynirin esasını oluşturan kazeinin çöktürülmesinden sonra geri kalan yeşilimsi sarı renkte bir sıvıdır. Zengin bir içeriğe sahip olan peyniraltı suyu gelişmiş ülkelerde ilaç, yem ve laktoz üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Ancak ülkemizde hemen hemen hiç değerlendirilmeden toprak ve su ortamına verilmektedir (Gül ve Güven, 2004).

Gıdalarda bulunan peyniraltı suyu proteinlerinin temel fonksiyonu besleyici azot ve aminoasitler sağlamaktır. Peyniraltı suyu proteinlerinin biyolojik rolleri son yıllarda yapılmış birçok hayvan denemeleri ve in vitro çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Peyniraltı suyu proteinlerinin sağlık üzerine yapılan hayvan denemeleri ve in vitro çalışmalar, peyniraltı suyunun diğer yararları kadar antikarsinojenik ve hipokolestrolemik etkilerinin de var olduğunu göstermektedirler. Peyniraltı suyu proteinlerinin büyüme, kemik sağlığı ve kilo kontrolü üzerine yararları da bulunmaktadır. Hastalık, ameliyat veya kemoterapi uygulaması sonucu oluşan metabolik stresi izleyen dokulardaki iyileşme için yararlı olabilen Peyniraltı suyu, laktoferrinin içeren bazı destekleyici faktörleri kapsamaktadır. Kalsiyum, fosfor, magnezyum gibi mineraller kemik gelişimi ve korunmasını desteklemektedir. Peyniraltı suyu proteinleri kemik hastalıkları için de faydalı olabilmektedir (Takada ve diğ., 1997; Anonymous, 1998; German ve diğ., 2001).

2.6 Termofilik Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada ekstrem mikroorganizmalar ile ilgili, en çok termofilik mikroorganizmalar grubu dikkat çekmektedir. Termofilik

mikroorganizmaların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Itoh ve diğ., 1993). Termofilik mikroorganizmaların, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri gibi birçok avantajları vardır. Yüksek sıcaklıklarda (60-110°C) gelişebilen termofilik mikroorganizmalar, volkanik ve jeotermal kaynaklarda bulunurlar. Bu kaynaklara örnek olarak solfatarik alanlar (yanardağların püskürmesi sırasında başlangıcı gösteren gaz tütme bölgeleri), nötral sıcak su kaynakları, deniz dibi sıcak su kaynakları ile yüksek sıcaklığa sahip deniz ve karasal alanlar sayılabilir (Batra ve diğ., 2002) .

Termofilik mikroorganizmalar, geniş sıcaklık aralıklarında üreyebildiği için yüksek sıcaklıkta optimum fonksiyon göstermek için biyolojik membranlarında çeşitli adaptasyonlara ihtiyaç duyarlar. Bakterilerin fosfolipit kompozisyonu genelde gelişim sıcaklığı ile değişir (Kim ve Rajagopal, 2000). Termofilik mikroorganizmaların hücre membranı doymuş yağ asitlerinden yapılmıştır. Hücre membranında bulunan yağ asitleri hücreye hidrofobik bir çevre sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince sabit tutar (Griffiths ve Muir, 1978). Termofil mikroorganizmalar diğer mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında, doğaları nedeniyle hücresel komponentleri, enzimleri ve proteinleri de oldukça termostabildir. Enzimleri mezofilik homologlarına göre, termostabil değildir, bunun yanında kimyasal ajanlara da dayanıklı olduğu için endüstriyel uygulamalar da oldukça önemlidir (Haider ve Qayyum, 2007).

Son zamanlarda biyoteknolojik çalışmalarda önem kazanan bazı termofilik *Bacillus* üyelerinin varlığı bilinmektedir. Bazı *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus thermophilus*, *Bacillus clostridium* türleri 50°C ile 70°C arasında yaşayabilir (Sheridan and Brenchley, 2000).

2.6.1 *Bacillus* Cinsinin Özellikleri

Her yerde yaygın olarak bulunabilen Bacillaceae familyası içinde olan *Bacillus* cinsi bakteriler aerob veya fakültatif anaerob, gram pozitif ya da değişken gram olan spor formu çomak yapan bakterilerdir. 0,5 – 1,2 µm eninde 2,5 – 10

µm büyüklüğünde olan vejetatif formları 25-37°C arasındaki en uygun sıcaklıklarda gelişebilirler. Bazı termofilik ve psikrofilik olan üyeleri de 75 °C'nin üstündeki ve 3°C nin altındaki sıcaklıklarda çoğalabilirler. pH 2 ve pH 10 gibi ekstrem asidite ve alkalinite şartlarında gelişebilen bazı türleri de vardır. Katalaz pozitif olan çoğu ırkı, peritrişli (çevre kirpikli) flagellaya sahiptir (Nagy ve diğ., 2001; Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Bacillus cinsinin koloni morfolojisi farklılık gösterir. Ayrıca beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir ve bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilerde rastlanır (Alazzeah ve diğ., 2009). Türlerinin çoğu ısıya dayanıklı spor üretme yeteneğine sahiptir ve bu sporlar silindirik, elipsoidal, küresel olabilir. *Bacillus anthracis* dışındakilerin hepsi saprofitiktir. Çoğunluk mezofilik cinsler olsa da zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve halofil cinslerde bulunur (Fiedurek ve Szczodrak, 1994).

Güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı bu türler cazip endüstriyel organizmalardır. Bunun sebebi, gram negatif bakteriler sentezledikleri proteinleri protoplazmalarında ya da periplazmik boşluklarında biriktirirler. Bu da üretilen ürünün izalasyonunu güçleştirerek suştan birden fazla kez yararlanılmasını engeller. Ayrıca sentezlenen ürünler, organizmaya karşı toksik etki oluşturabilmektedir. Sentez ürünlerinin intrasellüler ortamda biriktirilmesi, çözünmeyen protein oluşumu, yanlış protein katlanmaları ve etkin olmayan disülfid bağ formasyonu gibi sorunları da beraberinde getirmektedir. Gram negatif bakteriler ise, insanlara toksik olan endotoksin ve intrasellüler protein üretmeleri nedeniyle, proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında ekstra maliyet oluşturmaktadırlar (Shaikh ve diğ., 1997).

Gram pozitif bakteriler, özellikle *Bacillus* türleri mantarlardaki aflatoksin gibi toksik ya da alerjen bileşik üretimi de göz önünde bulundurulduğunda, endüstriyel enzim üretiminde öncelikli olarak tercih edilmektedirler. Çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren *Bacillus* türleri çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Ayrıca, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukanaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin

üretiminde *Bacillus* cinsindeki organizmalar, yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Ramana ve diğ., 2000).

2.6.2 *Bacillus licheniformis*

Gram pozitif, fakültatif anaerob ve endospor formu saprofitik organizmalardan olan *Bacillus licheniformis*, yeryüzündeki çoğu toprak ve bitki materyallerinden izole edilmektedir. *B.licheniformis* izolatları besin döngüsünde denitrifikasyon yeteneği ile önemli bir yer tutmaktadırlar. Hayvanlar ve bitkiler için organizmanın patojen olmadığı rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2008).

Genom sekansları belirlenmiş olan *Bacillus* cinslerinden *Bacillus subtilis*'in olduğu grupta *Bacillus licheniformis* türü yer almaktadır (Chen ve diğ., 2008).

Büyük miktarlarda protein içeren ekzoenzimlerin biyoteknolojik olarak antibiyotiklerin, biyokimyasalların imalatında, endüstriyel uygulama alanları bulunmaktadır (Gote ve diğ. 2007; Chen ve diğ., 2008). Endüstride kullanılan enzimler arasında son zamanlarda farklı proteazlar, α -amilaz, penisilnaz, pentosanaz, sikloglikoziltransferaz, β -mannanaz ve farklı pektinolitik enzimler bulunmaktadır. Bazı *Bacillus licheniformis* türleri basitrasin ve protisin gibi peptid antibiyotikleri sentezinde kullanılırlar buna ek olarak çoğu türleri de sitrik asit, inozin, inozinik asit ve poli γ -glutamik asit gibi kimyasalların sentezinde kullanılırlar (Gote ve diğ., 2007).

2.7 X-ışını kırınımı (XRD) Yöntemi

XRD yöntemi ile genel anlamda incelenen katı maddelerin amorf, yarı-kristalin veya kristalin karakteri belirlenebilmektedir. Bu yöntemle düzenli bir atomik dizilime sahip kristalin maddelerin atom düzlemleri arasındaki mesafeler ve kristallik derecesi $[KD (\%) = \text{Kristal} / (\text{Kristal} + \text{Amorf})]$ saptanabilmektedir. Kristal yapısı bilinmeyen bir maddenin atom düzlemleri arasındaki mesafenin

ölçümü Bragg yasası olarak bilinen 2θ açılara karşılık gelen (d_{hkl} , Å) değerleriyle ifade edilir ($d = \lambda / 2 \sin\theta$, $\lambda = 1.54056$ Å).

XRD yöntemi ile elde edilen pikler, kristal yapıyı oluşturan atomların değişen θ açısı ile gelen X-ışını demetini bütün yönlerde kırınımıyla ilişkilidir. Işınlardan farklı atom düzlemlerinden kırılmaları sonucu meydana gelen gecikmeler nedeniyle bazıları birbirini yok ederken (negatif veya yıkıcı girişim), bazı ışınlar birbirini kuvvetlendirerek yapıcı veya pozitif girişim oluşturur. Yapıcı veya pozitif girişim oluşturan ışınlar kırınım (difraksiyon) ve dolayısıyla pik oluşumlarına neden olur. Kristalin maddenin X-ışınları kırınımı deseni (patern) her kristal türü için özel olup, kristallerin tanımlanmasında önemli bir yer tutmaktadır.

XRD yöntemi çoğunlukla inorganik kristalin maddeler üzerinde uygulanmakla birlikte, özellikle son 20 yıldır biyolojik molekül, ilaç, protein, nükleik asit ve vitaminlerin yapısının incelenebilmesi için de uygulanmaktadır. Bu yöntemde incelenecek örnekler toz haline getirildikten sonra yönlendirilmiş (oriented) veya yönlendirilmesiz (unoriented) olarak çekildiği gibi, metal ve alaşım örnekleri doğrudan düzleştirilmiş veya parlatılmış yüzeylerinden de incelenebilmektedir.

2.8 Termogravimetrik analiz (TGA) Yöntemi

Termogravimetrik analizler sıcaklığın fonksiyonu olarak maddelerdeki kütle kaybının ölçümünü esas almaktadır. TGA cihazı termobalans adında hassas mikrobalans, fırın, bazen inert bazen de reaktif gaz atmosferi sağlayan temiz gaz sistemi, cihazın kontrolü, veri alma ve veri işleme işlemleri için bilgisayar sisteminden oluşur. Termogravimetrik ölçümler inorganik ve organik malzemeler üzerinde uygulanmakta olup, özellikle polimer, ilaç, kil ve minerallerinin tanımlanmasında; metal ve alaşımlarda ise kalite kontrol uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. TGA yönteminde katı bir maddenin kütlesi, kontrollü atmosfer ortamında; sürekli artan (genellikle zamana karşı doğrusal artış) sıcaklığın veya zamanın fonksiyonu olarak değerlendirilir. Zamana karşı kütle veya kütle yüzdesi grafiği termogram ya da termal bozunma eğrisi olarak tanımlanır.

TGA cihazında 1 miligramdan 100 grama kadar değişen örnek tutucu hazneli termobalans bulunmaktadır. Genelde 1-100 mg arası örnek kullanılmakta olup, kütledeki 0,1µg' ulaşan hassasiyetteki değişimler kaydedebilmektedir. TGA fırını 1000°C sıcaklığa kadar çıkabilmekte, ısıtma seçenekleri 0,1°C/dk'dan 100 °C/dk aralığı için ayarlanabilmektedir. İzolasyon ve soğutma cihazın iç bölgesinin balansla ısı alışverişinin olmamasını sağlar. Örneğin oksidasyonunu önlemek için Ar ve N₂ gazları kullanılmaktadır.

İncelenecek örnekler genellikle alüminyum, alümine veya platin kaplara konur. Platin kolay temizlenebilmesinden dolayı yaygın olarak kullanılır. Kap hacmi değişik boyutlarda olabilir. TGA yöntemiyle sıcaklıkla değişen madde kütlesi hesaplanabildiği için niceldir (kantitatif), ancak buharlaşma, süblimleşme, dekompozisyon, oksidasyon, ve desorpsiyon verileri de sınırlı olarak elde edilebilmektedir. TGA'nın en önemli uygulamaları çok bileşimli sistemlerin bileşimsel analizleridir.

2.9 SAXS (X-Işını Küçük Açı Saçılma) Yöntemi

Elde edilen maddelerin karakterizasyonu yanında Nano boyutlu yapıların üretimi de çok önemlidir. Karakterizasyonda yapı analizlerinin yapılmasının yanında, maddelerin dinamik davranışlarının da analiz edilmesi gerekmektedir (Orujalipoor, 2012). Bu nedenle, çoğu alanda nano boyutlu malzemelerin analiz edilmesini sağlayan yöntemlerden bir tanesi SAXS yöntemidir. SAXS yöntemi ile toz, jel, kristalin örneklerin yanında kolloid çözeltiler, polimerler, biyolojik moleküller de incelenebilir. X-ışını, nötron ve elektron kırınımı yöntemleriyle, bir yapının analizi gerçekleştirilebilir. Yapılan bu yöntemlerin temelinde aynı kırınım prensipleri geçerlidir. Parçacıklardan belirli doğrultularda saçılan dalgaların girişimi kırınımı, oluşturur. X-ışını incelenecek örnek üzerine düşürülmesiyle maddedeki elektronlar ile etkileşimi sağlanacaktır. Saçılan ışının şiddetine elektronlardan saçılan dalgaların genlikleri toplanarak ulaşılır.

X-ışını yöntemlerinden biri olan, X-ışını küçük açı saçılma (SAXS) yöntemi ile incelenen örnekten küçük açıda saçılan X-ışını şiddetleri, saçılma vektörünün büyüklüğüne göre elde edilerek bu verilerden yapı ile ilgili bilgiye ulaşılır. X-ışınları kırınımında olduğu gibi, Küçük açı saçılmalarında da, saçılma

yapıda bulunan elektronlar tarafından gerçekleştirilir. Bu yöntem elektron yoğunluğu farkının algılanması temeline dayanır. X-ışını küçük açı saçılma yöntemi'ni diğer yöntemlerden farklı kılan en önemli özellik, angstromdan ($\text{\AA}$) nanometreye (nm) kadar uzanan büyüklükteyken homojen olmayan elektron yoğunluklarına duyarlı olmasıdır. Katı kristal, kristalin, film, toz v.b. formlara sahip örnekleri incelemede X-ışınları kırınımı yöntemi kullanılırken bunun yanında sıvı, jel, yoğun gaz gibi farklı formlara sahip örnekler ile biyolojik dokularında ayrıntılı bir biçimde incelenebilmesi de X-ışını saçılma yöntemi ile mümkün hale gelmiştir.



3. YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen *Bacillus licheniformis* B18 bakterisi Pamukkale termal kaynaklarından izole edilmiştir. Bakteriyel izolat 40°C'de geliştirilerek deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere steril Tryptic Soy Agar içeren tüplerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 EPS Üretimi İçin Optimal Kültür Koşullarının Belirlenmesi

3.2.1 Besiyeri Belirlenmesi

B. licheniformis B18 bakterisinin maksimum ekstrapolisakkarit (EPS) ürettiği besi ortamını belirlemek için Nutrient Broth (NB: Beef extract; 1g/L, pepton; 5g/L, yeast extract; 2g/L, NaCl; 5g/L), Luria Bartani-Miller Broth (LB-Miller: Tripton; 10g/L, yeast extract; 5g/L, NaCl; 10g/L) ve Tryptic Soy Broth (TSB: Pepton from kazein; 17g/L, pepton from soymeal; 3g/L, D(+) glukoz; 2,5 g/L, NaCl; 5g/L, K₂HPO₄; 2,5g/L) besi ortamları kullanılmıştır. Besi ortamlarının pH'sı 7,0 'ye ayarlanarak %2'lik bakteri ekimi yapılmış ve 40°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben 12 ve/veya 24 saat aralıklarla örnek alınmış ve örneklerdeki toplam şeker miktarı fenol-sülfürik asit metodu ile ölçülmüştür (Dubois ve diğ., 1956). Kalibrasyon eğrisi glukoz kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.2 pH'nın EPS Üretimine Etkisi

pH'nın ekstrapolisakkarit üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla gelişme ortamlarının pH'sı 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 9,0'a ayarlanarak 40°C'de inkübe edilmiş ve zamana bağlı olarak ölçümleri yapılmıştır.

3.2.3 Sıcaklığın EPS Üretimine Etkisi

Bacillus licheniformis B18 bakterisi termal kaynaklardan izole edildiği için yüksek sıcaklığa karşı tolerans göstermektedir. Bu nedenle LB besi ortamının pH'sı belirlenen optimal pH'ya ayarlandıktan sonra %2 ekim yapılarak kültür 40, 45, 50 ve 55°C'lerde inkübe edilmiştir.

3.2.4 Organik Asit ve Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

B. licheniformis B18 bakterisinin EPS üretim potansiyeli üzerine organik asit ve karbon kaynaklarının etkilerini belirlemek amacıyla galaktronik asit, glukuronik asit ve glukoz 1 g/L oranında LB besi ortamına ilave edilmiştir.

3.2.5 Peynir Altı Suyu Tozu'nun EPS Üretimine Etkisi

Endüstriyel bir artık olan peynir altı suyu tozunun (PAST) *B. licheniformis* B18 bakterisinin EPS üretimine etkisini belirlemek için LB besi ortamına 1 g/L oranında toz halde ilave edilmiştir. Hazırlanan bu gelişme ortamı öncelikle farklı pH değerlerine (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) ayarlanarak optimal pH'ı belirlenmiş, daha sonra belirlenen optimal pH'ta sıcaklığın etkisi (40, 45, 50 ve 55 °C) çalışılmıştır.

3.2.6 Melas Besiyerinde EPS Üretimi

Toplam EPS üretimi için gelişme ortamı olarak kullanılan melas besi ortamının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda melas

içeren besi ortamları hazırlanmıştır (melas:dH₂O; 0,5:100, 1,0:100, 1,5:100, 2:100 v/v). Melas içeren bu çözeltilere 1 g/l (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/l KH₂PO₄ ilave edilerek gelişme ortamı hazırlanmış ve pH'ı 7,0 'ye ayarlanmıştır (Gönen ve Aksu, 2008). Hazırlanan gelişme ortamları 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve %2 bakteri ekimi yapılarak 40°C'de inkübe edilmiştir. Optimal melas konsantrasyonu belirlendikten sonra hazırlanan bu konsantrasyondaki melas besiyerinde pH ve sıcaklığın etkisi çalışılmıştır. pH'nın etkisini belirlemek amacıyla optimal melas konsantrasyonu ile hazırlanan gelişme ortamlarının pH'ları 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 9,0'a ayarlanmış, sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla ise 40, 45, 50 ve 55 °C 'de inkübasyon edilmiştir.

3.3 Analitik Metot

Bakteri kültürü inkübasyon sonrasında 100°C'de 10 dakika bekletilir. Örneklerden 1 ml alınır, üzerine TCA ilave edilerek 14 000xg'de 20 dakika santrifüjlenir. Süpernatant, eşit hacimde etanol ile karıştırılır tekrar 20 dakika 14000 xg'de santrifüj edilir. Süpernatant dökülerek elde edilen pellet 1 ml etanol ile çözünür. Santrifüj aşaması tekrar edilir. Pelletin üzerine 1ml dH₂O eklenerek çözülür, fenol sülfirik asit metodu (Dubois ve diğ., 1956) uygulanarak 10 dakika 30°C'de bekletildikten sonra 490 nm UV spektrofotometre (Hach Lange DR 5000) ile okuma yapılır.

3.4. EPS saflaştırma

EPS saflaştırması, etanol-metanol ile çöktürme-saflaştırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Hung ve diğ., 2005). Bakteri kültürleri inkübasyon sonrasında 100°C'de 15 dakika su banyosunda bekletildikten sonra santrifüj edilerek süpernatant ve pellet toplanmıştır. Bakteriyel EPS süpernatant ve pelletten ayrı saflaştırılmıştır. Süpernatanttan elde edilen EPS “çözünen EPS” ve pelletten elde edilen EPS ise “membrana bağlı EPS” olarak isimlendirilmiştir.

Toplanan süpernatant içine son konsantrasyon 0,5 mg/L olacak şekilde proteinaz K ilave edilmiş ve 37°C'de 12 saat 70 rpm'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında soğuk etanol-metanol karışımı ilave edilerek buzdolabında çökelti

oluşması için bekletilmiştir. Oluşan çökelti 0,22µm gözenek çaplı membran (millipore membran filtre HAWP04700) kullanılarak, Sartorius marka membran filtrasyon düzeneği ile toplanmıştır. Elde edilen presipitat, son konsantrasyon 30g/L olacak şekilde NaCl ilave edilerek tekrar etanol-metanol karışımı ile muamele edilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Son presipitat 10-20 ml dH₂O ile çözülerek suya karşı diyaliz edilmiştir.

Toplanan pellet üzerine ise, son hacim 100 ml olacak şekilde steril dH₂O ilave edilmiştir. 3 gr NaCl eklenip manyetik karıştırıcı da 1 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda santrifüj edilerek süpernetant toplanıp üzerine ethanol-metanol karışımı ilave edilerek yukarıda açıklanan saflaştırma yöntemi uygulanmıştır.

Elde edilen saf EPS'ler liyofilize edilerek toz halinde derin dondurucuda saklanmıştır. Toz haline getirilmeden önce elde edilen çözünmüş EPS örneklerinin görünümü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1 *B. licheniformis* B18'in Melas içeren besi ortamından elde edilen
Çözünmüş EPS (Supernatant)

3.5. Saf EPS'nin Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

3.5.1 Toplam şeker tayini

Elde edilen toz EPS'deki toplam karbohidrat miktarı fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmiştir (Dubois ve diğ., 1956; Frengova ve diğ., 2000). Standart olarak glukoz kullanılmıştır.

Fenol-Sülfürik asit metodu: 0,5 mg toz EPS tartılıp 1 ml dH₂O içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerine % 80'lik 500 µl Fenol ve 5 ml H₂SO₄ konulmuştur. 10 dk oda sıcaklığında ve 20 dk 30°C'de etüvde bekletilerek 490 nm'de UV spektrofotometre ile okunmuştur.

3.5.2 Toplam protein tayini

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

Modifiye Lowry Metodu: 1 ml toz EPS çözeltisi 10 dakika 50°C su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 0,9 ml sodyum-potasyum tartarat-NaCO₃ reaktifi eklenmiş ve 50°C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda, oda sıcaklığına gelene kadar karanlık bir ortamda soğumaya bırakılan EPS çözeltisi üzerine 0,1 ml sodyum-potasyum tartarat-CuSO₄.5H₂O reaktifi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 3 ml Folin-Ciocolteu reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 50°C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar karanlık ortamda bekletilerek 650 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okunmuştur.

3.5.3 Üronik asit miktarı belirleme

Yaklaşık 0,5 mg toz EPS üzerine 0,4 ml dH₂O ilave edilmiştir. Üzerine 2M 40 µl sulfamik asit eklenerek iyice karıştırılmış daha sonra konsantre sülfürik asit ile hazırlanan 75 mM sodyum tetra borattan 2,4 ml ilave edilip, 100°C su banyosunda 10 dakika ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra % 0,15'lik 30 µl m-hidroksifenil eklenip 525 nm'de UV spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Toplam üronik asit konsantrasyonunu hesaplamada glukuronik asit ile oluşturulan standart eğri kullanılmıştır (Hung ve Santchi, 2001).

3.6 Saf EPS'nin Karakterizasyonu

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

Bu çalışmada XRD yöntemi ile bakterilerden elde edilen EPS'nin karakterizasyonu (amorfsu veya kristalin yapı tayini) için kullanılmıştır. XRD incelemeleri farklı besiyeri ortamlarında üretilmiş toplam altı örnek üzerinde, Batman Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında Rigaku Miniflex model CuK α ışınımlı ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) X-ışınları Difraktometresi'nde gerçekleştirilmiştir. Aletsel çekim koşulları 40 mA, 40 kV, tarama hızı 0.005° olarak ayarlanmıştır.

3.6.2 Termal Analizler (TGA)

TGA analizi, XRD incelemeleri gerçekleştirilen altı bakteriyel EPS örneğinin sabit ısıtma oranı ile artan sıcaklık ile kütle kaybına bağlı değişiminin incelenmesi için yapılmıştır. TGA incelemeleriyle EPS örneklerinin farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birbirleriyle karşılaştırılması mümkün olmuştur.

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

3.6.3 Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntüleme

Polimerlerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biri SEM'dir. Bu yöntem ile hızlandırılmış elektronlar örnek yüzeyine çarptırılmış ve yansıyan ikincil elektronlar (SE), algılayıcı (dedektör) yardımıyla üç boyutlu görüntü elde edilmiştir. Bakterilerin EPS yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinmek için SEM analizi yapılmıştır. Altın ile kaplanan örnekler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde (İzmir, Türkiye) QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

3.6.4 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler

Ekzopolisakkaritler, (EPS) çözelti formunda laboratuvar tipi HECUS SYSTEM3 SWAXS sistemi kullanılarak incelenmiştir. Örneklerin ölçümler için hazırlanma aşamasında örneklerin sulu çözeltileri kapiler tüplere enjekte edilmiştir. Örneklerin sulu çözeltileriyle doldurulan ince kapiller tüpler Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) kamerası bölümündeki örnek tutucu haznesine yerleştirilip sistem yazılımı (ASA3 Programı) çalıştırılmıştır. Detektör gaz ayarları ve ölçüm aralıkları belirlenerek önce hızlandırma gerilimi, ardından tüp akımı artırılmıştır. Her bir örnek için 600 s ölçüm süresi sabit tutulmuştur. SAXS analizlerinin ikinci aşamasında, incelenen örnekler su ve serum albümin çözeltileri içinde çözülüp, sıvı örnekler için kullanılan kapiler tüplere enjekte edilerek ölçümler alınmıştır. Normal oda sıcaklığında ölçüm alındıktan sonra aynı ölçümler, oda sıcaklığından başlayarak, 5 °C'lik artışlarla 50 °C'ye kadar tekrarlanmıştır. Su ve Serum albümin çözücüsünün yapı üzerine etkileri incelenmiştir. Ölçümler sonucunda, yapısal farklılıkların daha rahat gözlemlemek için $\log(I) - \log(q)$ grafikleri çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 EPS Üretimini Etkileyen Optimal Koşulların Belirlenmesi

4.1.1 Farklı Besi Ortamlarında EPS Üretimi

Farklı besi ortamlarında (Tryptic Soy Broth (TSB), Nutrient Broth (NB) ve Luria Bertani-Miller (LB)) pH 7,0 ve 40°C’ de geliştirilen *B. licheniformis* B18 bakterisinin zamana bağlı olarak ürettiği toplam şeker miktarları 12 saat ve/veya 24 saat aralıklarla ölçülmüş, sonuçlar ve hücre yoğunlukları Tablo 4’de verilmiştir. Tablo 4’ e göre her 12 saatte bir yapılan ölçümlerde görülmüştür ki; LB besi ortamında genel olarak toplam şeker üretimi TSB ve NB besi ortamlarına göre daha fazladır. Maksimum EPS üretiminin görüldüğü 108. saatte LB besi ortamında 152,63 mg/L, TSB’de 48,37 mg/L, NB’da 50,24 mg/L toplam EPS üretimi ölçülmüştür. LB besi ortamındaki hücre yoğunluğuna bakıldığında diğer besi ortamlarına göre sürekli artış olduğu görülmektedir (Tablo 4).

Tablo 4 *B. licheniformis* B18 suşu'nun farklı besi ortamlarında zamana bağlı olarak ürettiği toplam EPS miktarları ve hücre yoğunlukları (pH; 7, Sıcaklık; 40 °C)

Zaman (saat)	TSB		LB		NB	
	Toplam EPS miktarı (mg/L)	Hücre yoğunluğu (OD=600nm)	Toplam EPS miktarı (mg/L)	Hücre yoğunluğu (OD=600nm)	Toplam EPS miktarı (mg/L)	Hücre yoğunluğu (OD=600nm)
24	5,98	0,44	31,97	0,45	33,07	0,54
36	1,47	0,44	25,14	0,97	24,81	0,54
48	23,27	0,83	59,38	0,86	40,99	1,24
60	31,20	1,30	106,39	1,31	30,09	1,78
72	22,72	1,58	35,82	1,51	36,15	1,83
84	34,50	1,74	83,71	1,77	79,31	1,86
96	14,90	1,90	88,78	1,96	60,26	1,83
108	48,37	1,87	152,63	1,91	50,24	1,83

4.1.2 EPS Üretimine pH'ın Etkisi

B. licheniformis B18 bakterisinin LB besi ortamında ürettiği toplam şeker miktarına pH'ın etkisi ve bu pH'lardaki hücre yoğunluğu Tablo 5'de verilmiştir. Düşük ve yüksek pH'ta toplam şeker üretiminde düşüş gözlenmektedir. 60. saatteki değerlere bakıldığında toplam şeker miktarı pH 6,5 'ta 35,38 mg/L, pH 7,5'ta 61,69 mg/L, pH 8,0'de 42,54 mg/L ve pH 9,0'da 52,11 mg/L iken pH 7,0'de 106,39 mg/L'dir. pH 7,0 değerleri incelendiğinde diğer pH değerlerine oranla toplam şeker üretim miktarı daha fazladır.

Tablo 5 *B. licheniformis* B18 suşu'nun LB besi ortamında zamana bağlı olarak ürettiği toplam EPS miktarları ve hücre yoğunlukları üzerine pH'ın etkisi (Sıcaklık; 40°C)

Zaman (saat)	Toplam EPS (mg/L)					Hücre yoğunlukları (OD=600 nm)				
	pH					pH				
	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
24	18,53	31,97	28,66	44,08	36,37	0,22	0,45	0,09	0,22	0,24
36	33,07	25,14	44,96	44,30	44,63	0,75	0,96	1,08	1,07	1,39
48	17,87	59,38	23,60	25,14	24,37	0,78	0,87	0,58	0,73	0,80
60	35,38	106,39	61,69	42,54	52,11	0,72	1,31	1,63	0,78	1,18
72	53,66	35,82	135,01	156,15	145,58	0,83	1,51	1,10	0,86	0,96
84	52,77	83,71	47,38	49,80	48,59	1,01	1,77	1,23	0,89	1,05
96	48,48	88,78	48,48	57,95	53,21	1,65	1,96	0,94	0,96	1,23
108	64,44	152,63	44,74	66,54	55,64	1,40	1,91	1,77	1,49	1,53

4.1.3 EPS Üretimine Sıcaklığın Etkisi

B. licheniformis B18 bakterisinin LB besi ortamında ürettiği toplam şeker miktarına sıcaklığın etkisi ve hücre yoğunluğu Tablo 6'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi diğer sıcaklık değerlerine göre, LB miller besi ortamında bakterinin optimal gelişme sıcaklığı olan 40°C'de EPS üretiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir. 60. saatteki değerlere bakıldığında 40 °C'de 106,9 mg/L, 45°C'de 33,95 mg/L, 50°C'de 39,01 mg/L iken 55°C'de 23,60 mg/L toplam şeker miktarı tespit edilmiştir. 108. saatteki değerlere bakıldığında ise *B. licheniformis* B18 bakterisinin diğer saatlere oranla 40°C'de 152,63 mg/L toplam EPS üretimi gerçekleştirmiştir.

Tablo 6 LB Miller besiyerinde EPS üretimine sıcaklığın etkisi (pH:7)

Toplam EPS (mg/L)				
Zaman (Saat)	40°C	45°C	50°C	55°C
24	31,97	44,08	-27,03	28,88
36	25,14	55,09	22,94	24,70
48	59,38	57,18	44,41	11,82
60	106,39	33,95	39,01	23,60
72	35,82	61,47	42,21	104,85
84	83,71	42,65	82,72	122,35
96	88,78	68,74	85,98	98,15
108	152,63	75,12	89,92	87,56

4.1.4 Organik Asit ve Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

B. licheniformis B18'in EPS üretimine karbon kaynaklarının ve organik asitlerin etkisini belirlemek için glukoz, glukuronik asit ve galaktronik asit kullanılmıştır. LB besi ortamlarına 1 g/L oranında glukoz, glukuronik asit ve galaktronik ilave edilerek hazırlanan gelişme ortamlarının pH'sı 7,0'ye ayarlanmış ve 40°C'de geliştirilmiştir. İlgili sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir. Sonuçlara göre bakteri maksimum karbonhidrat oluşumuna tek karbon kaynağı olarak glukuronik asit içeren ortamda ulaşırken en düşük karbonhidrat miktarı galaktronik asit içeren ortamda tespit edilmiştir. 84. saatte yapılan ölçümler incelendiğinde galaktronik asit ilaveli ortamda 79,3 mg/L, glukoz ilaveli ortamda 43,86 mg/L, glukuronik asit ilaveli ortamda üretilen EPS miktarı 197,14 mg/L olarak görülmektedir.

Tablo 7 LB besi ortamına 1g/L oranında ilave edilen organik asit ve karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi (pH: 7; 40°C)

Toplam EPS (mg/L)			
Zaman (saat)	Galaktronik Asit	Glukoz	Glukuronik Asit
24	59,49	92,52	26,90
36	60,48	46,28	23,60
48	41,21	23,38	33,29
60	50,79	62,79	38,00
72	26,90	42,54	179,93
84	79,53	43,86	197,14
96	164,41	160,12	170,94

4.1.5 Peynir Altı Suyunun Etkisi

B. licheniformis B18 bakterisinin EPS üretimine endüstriyel bir artık olan peynir altı suyu tozunun (PAST) etkisini belirlemek için LB besi ortamına 1 g/L oranında toz halde peynir altı suyu tozu ilave edilmiştir. Hazırlanan bu gelişme ortamında öncelikle farklı pH değerleri (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) ayarlanarak optimal pH'ı belirlenmiş, daha sonra belirlenen optimal pH'ta sıcaklığın etkisi (40, 45, 50 ve 55°C) çalışılmıştır. PAST içeren gelişme ortamında bakterinin EPS üretimine pH'ın etkisi Tablo 8'de, sıcaklığın etkisi Tablo 9'da verilmiştir. Düşük ve yüksek pH'ta toplam EPS üretiminde düşüş gözlenmektedir. Peyniraltı suyu tozu içeren ortamda 40°C ve pH 7'de 48. saatte 115,64 g/L maksimum EPS üretimi gözlenirken; pH 8'de 36. saatte 132,37 g/L EPS üretimi gerçekleşmiştir. Ancak pH 8'de EPS üretiminde 36. saatten itibaren sürekli düşüş gösterdiği için pH 7 seçilmiştir (Tablo 8). Tablo 9'da verilen sonuçlara göre *B. licheniformis* B18 suşu 55°C'de maksimum verime ulaşmıştır. Bakteri inkübasyonun 84. saatinde 182,03 mg/L EPS üretmiştir. Bakterinin 40°C gelişme sıcaklığında 48. saatte maksimum 115,64 mg/L EPS ürettiği ve ilerleyen saatlerde bu EPS miktarında bir azalma olduğu gözlenmiştir. EPS miktarındaki azalmaya rağmen hücre yoğunluğunda artış olduğu gözlenmiş ve bakterinin ürettiği EPS' yi gelişme

için kullandığı sonucuna varılmıştır. Benzer durum 45°C ve 50°C sıcaklıklarda da tespit edilmiştir. Ancak genel olarak bakteri gelişimi dikkate alındığında 40°C ‘nin üstündeki sıcaklıklarda stabil olmadığı, bakterinin 40°C’de daha iyi gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle 55°C ‘de EPS üretimi her ne kadar yüksek görünse de bakteri gelişiminin zayıf olması ve stabil olmaması nedeniyle bundan sonraki çalışmalarımızda 40°C tercih edilmiştir.

Tablo 8 PAST içeren LB ortamında EPS üretimine pH’ın etkisi (Sıcaklık; 40°C)

Toplam EPS (mg/L)					
Zaman (saat)	pH				
	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
24	59,16	45,40	50,68	52,55	59,82
36	51,34	50,24	49,58	132,37	76,11
48	45,18	115,64	76,22	43,09	42,43
60	33,51	53,99	47,49	40,33	54,10
72	26,68	39,01	26,13	30,54	16,44
84	23,93	32,96	30,48	30,65	36,70
96	34,94	27,01	39,18	27,01	46,50
108	39,34	47,71	38,74	23,27	21,07

Tablo 9 PAST içeren LB ortamında EPS üretimine sıcaklığın etkisi (pH:7)

Toplam EPS (mg/L)				
Zaman (Saat)	40°C	45°C	50°C	55°C
24	45,40	27,56	59,27	16,33
36	50,24	55,75	88,33	32,52
48	115,64	57,73	110,13	14,68
60	53,99	41,43	160,12	12,92
72	39,01	70,06	11,71	67,75
84	32,96	57,95	12,17	182,03

4.1.6 Melas Besiyerinde EPS Üretimi

Melas kullanılarak hazırlanan gelişme ortamında üretilen bakteriyel toplam şeker miktarını belirlemek için öncelikle hazırlayacağımız melas besi ortamının konsantrasyonu belirlenmiştir. Bunun için farklı oranlarda melas içeren çözeltiler hazırlanmıştır (melas: dH₂O; 0,5:100, 1: 100, 1,5:100, 2: 100 v/v) ve bu ortamlarda (pH 7,0) 40°C’de geliştirilen bakterinin ürettiği toplam şeker miktarı zamana bağlı olarak ölçülmüştür (Tablo 10). Tablo 10’da görüldüğü gibi en fazla şeker üretimi 2:100 v/v olan melas besi ortamında elde edilmiştir. *B. licheniformis* B18 2: 100 v/v konsantrasyonda melas varlığında 108. saatte 637,60 g/L şeker üretimi gerçekleşirken, en düşük EPS üretimi ise 0,5:100 v/v konsantrasyonda 59,38 g/L ölçülmüştür.

Tablo 10 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına melas konsantrasyonunun etkisi (Sıcaklık; 40°C, melas/dH₂O, v/v)

Toplam EPS (mg/L)				
Melas konsantrasyonu				
Zaman (Saat)	0,5/ 100	1,0/ 100	1,5/ 100	2,0/ 100
24	39,01	192,81	254,47	295,97
36	63,34	119,82	156,15	118,06
48	213,18	106,61	102,54	110,02
60	201,29	151,31	419,61	402,98
72	113,99	135,46	72,81	213,95
84	40,66	254,03	498,11	316,78
96	52,00	227,82	221,66	311,39
108	59,38	222,21	348,71	637,60

Melas besi ortamında bakterinin optimal EPS üretim şartlarını belirlemek için farklı pH ve sıcaklıklarda toplam şeker ölçümü yapılmıştır. pH’nın etkisi (pH; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) Tablo 11’de, sıcaklığın etkisi (40, 45, 50 ve 55°C) Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 11 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına pH'nın etkisi
(Sıcaklık; 40°C)

Toplam EPS (mg/L)					
pH değerleri					
Zaman (Saat)	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
24	271,43	429,85	304,12	497,01	353,23
36	469,38	299,83	371,50	409,60	513,85
48	258,33	362,03	268,78	556,02	225,52
60	322,62	635,62	393,52	362,25	294,99
72	112,34	243,35	237,52	408,82	281,89
84	210,87	301,48	534,99	265,04	449,12
96	522,44	274,73	555,91	461,67	323,06
108	326,36	523,87	409,49	142,07	360,27
120	282,99	7,31	389,34	544,35	307,87

Tablo 12 Melaslı ortamda üretilen toplam EPS miktarına sıcaklığın etkisi
(pH:7,0 ve pH: 8,0)

Toplam EPS (mg/L)								
Zaman (saat)	40 °C		45 °C		50 °C		55 °C	
	7,0	8,0	7,0	8,0	7,0	8,0	7,0	8,0
24	429,85	497,01	337,37	171,35	336,27	275,17	113,77	140,52
36	299,83	409,60	234,65	330,54	432,71	127,64	175,53	236,63
48	362,03	556,02	215,60	376,56	413,00	517,59	188,30	140,08
60	635,62	362,25	320,52	186,54	398,69	543,47	262,06	179,38
72	243,35	408,82	229,15	649,82	345,85	212,08	288,16	153,95
84	301,48	265,04	417,30	264,49	344,30	448,67	99,78	201,51
96	274,73	461,67	177,40	702,44	251,71	335,06	200,41	292,34
108	523,87	142,07	19,97	147,24	520,90	383,61	354,10	353,55

Tablo 11 ve 12 incelendiğinde melaslı ortamda *B. licheniformis* B18 bakterisinin ürettiği EPS miktarı en yüksek değerlere pH 7,0 ve 8,0 değerinde ve 45°C sıcaklıkta ulaşmıştır. *B. licheniformis* suşunun normal gelişim şartları 40°C olmasına rağmen, bakteri 45°C pH 8 ‘de fazla miktarda karbonhidrat üretmiştir. Sonuç olarak en iyi karbonhidrat miktarı 45°C pH:8 ‘de elde edilmiştir. 2 ml melas içeren besi ortamında 45°C’de 96. saatte 702,44 g/L şeker üretimi gerçekleşmiştir. Bu nedenle çalışmamızın bu aşamasında 45°C dikkate alınmıştır.

4.2. Saf EPS’nin Kimyasal İçeriği

B. licheniformis B18 hücrelerinden EPS saflaştırması LB, LB+PAST, LB+ Glukuronik asit ve Melas besi ortamında yapılmıştır. EPS eldesi için hazırlanan besi ortamlarının pH ve sıcaklıkları önceki çalışmalarımızda elde edilen optimal değerlere ayarlanmıştır (LB: pH 7,0; 40°C, 4 gün inkübasyon; Melas: pH 8,0; 45°C, 5 gün inkübasyon; LB+past: pH 7,0;40°C, 2 gün inkübasyon; LB+glukuronik asit: pH 7,0; 40°C, 4 gün inkübasyon) (Tablo 13). *B. licheniformis* B18 suşundan 5 gün melas besi ortamında inkübasyon süresi sonunda elde edilen çözünmüş EPS’nin görünümü Şekil 2’de verilmiştir. Geliştirilen hücrelerden çözünmüş ve membrana bağlı olmak üzere iki tip EPS elde edilmiştir. Elde edilen EPS’lerin kimyasal içeriğini belirlemek için toplam şeker, toplam protein ve üronik asit miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 13 *B. licheniformis* B18’in optimal EPS üretim şartları

Besi Ortamı	pH	Sıcaklık	İnkübasyon süresi (Gün)
LB	7,0	40°C	4
LB+PAST	7,0	40°C	2
LB+Glukuronik asit	7,0	40°C	4
Melas	8,0	45°C	5



Şekil 2 Melasta geliştirilen *B. licheniformis* B18 suşunun ürettiği çözünmüş EPS'nin membran filtrasyon düzeneğindeki görünümü

Tablo 14 *B. licheniformis* B18'den saflaştırılan EPS'lerin biyokimyasal içeriği

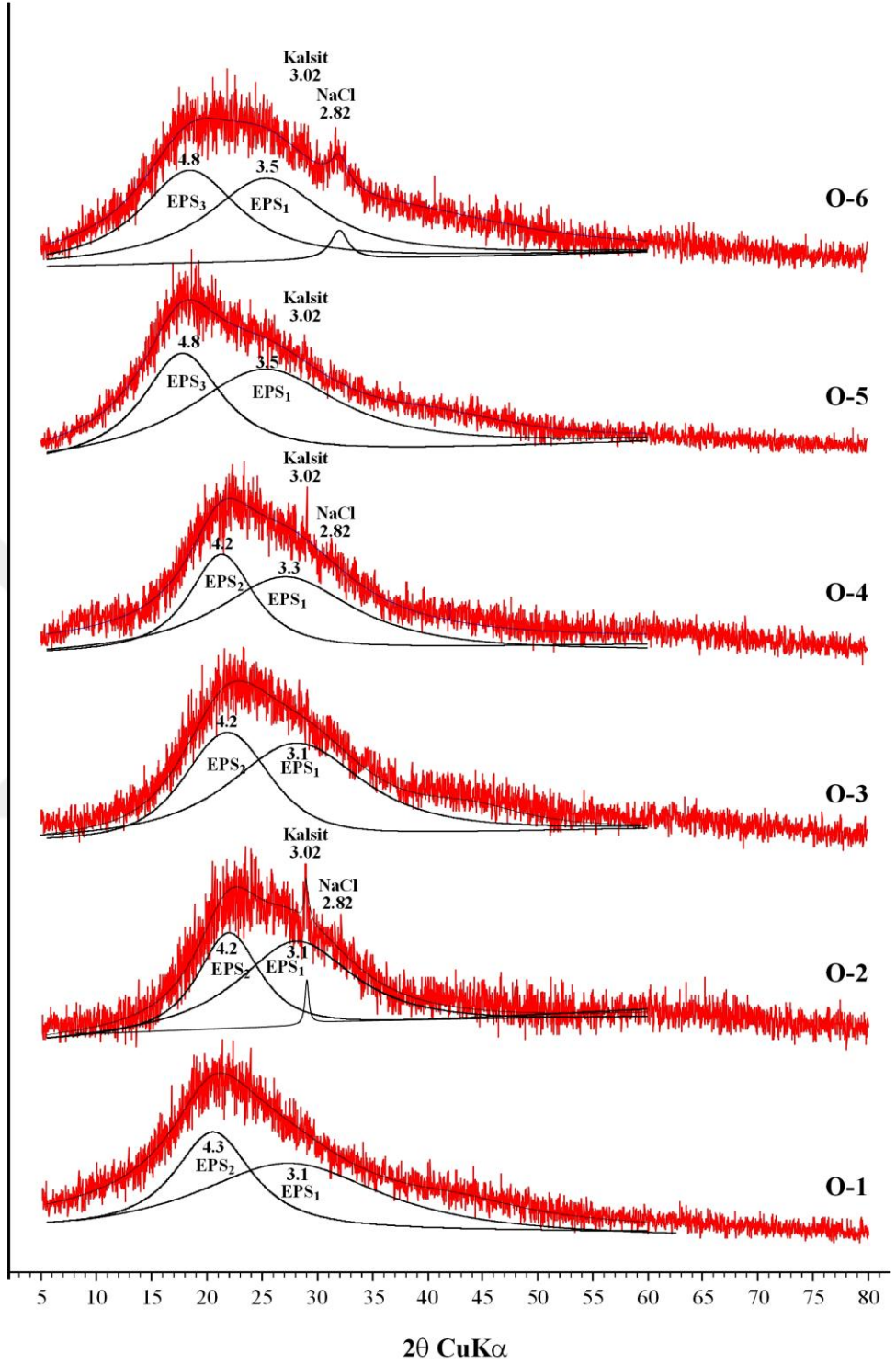
Besi Ortamı	Kaynak	Toplam şeker (mg/g EPS)	Toplam üronik asit (mg/g EPS)	Toplam protein (mg/g EPS)
LB	Membrana bağlı EPS	0,20	47,58	216,20
	Çözünen EPS	0,17	43,64	392,30
Melas besi ortamı	Membrana bağlı EPS	0,76	58,78	857,00
	Çözünen EPS	0,92	161,54	99,57
LB+PAST	Membrana bağlı EPS	0,08	63,68	368,50
	Çözünen EPS	0,31	41,20	368,50
LB+Glukuronik asit	Membrana bağlı EPS	0,19	24,54	539,60
	Çözünen EPS	0,12	41,06	342,10

Melas besi ortamında inkübe edilen *B. licheniformis* B18 bakterisinden ekstrakte edilen 1 g çözünmüş ve membrana bağlı kuru EPS numunesindeki toplam şeker miktarı sırasıyla 0,92 ve 0,76 mg, protein miktarları ise 99,57 ve 857 mg'dır. Tablo 13'te görüldüğü gibi, protein ve üronik asit tüm EPS'lerin temel bileşeni iken toplam şeker içerikleri nisbeten düşüktür.

4.3. Saf EPS'nin Karakterizasyonu

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

B.licheniformis B18 'den farklı gelişme ortamlarında elde edilen çözünmüş ve membrana bağlı EPS'lerin XRD analiz sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (O-1), LB ortamında üretilen membrana bağlı EPS (O-2), past ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (O-3), past ilaveli ortamda üretilen membrana bağlı EPS (O-4), melaslı ortamda üretilen çözünmüş (O-5) ve melaslı ortamda üretilen membrana bağlı EPS (O-6) EPS ürünlerinin XRD desenleri genel olarak değerlendirildiğinde, bunların büyük ölçüde amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Membrana bağlı (pellet) ve çözünmüş (süpernatant) örnekler EPS pikleri bakımından büyük benzerlik sunmaktadır. Ancak pellet örnekleri az miktarda da olsa tuz (NaCl) ve kalsit (CaCO_3) içermeleri bakımından süpernatant örneklerine göre farklılık sunmaktadır. Diğer bir ifadeyle, pelletler kristalin fazları içermekte olup, EPS'lerin farklı yapılarının farklı bileşimler sergileyebilecekleri açısından örnek teşkil etmektedir. NaCl varlığı besiyeri ortamına eklenen tuz bileşenini temsil etmektedir. Kalsitin (CaCO_3) varlığı ise büyük olasılıkla bakteriler tarafından üretilmiş olabileceğini düşündürmektedir. WINFIT programı (Krumm, 1996) kullanılarak pik çözümlemeleri yapılan EPS'lerin XRD verilerinin farklı besiyeri ortamlarına göre değerlendirildiğinde; LB ve past ilaveli ortamlarda üretilen EPS örnekleri benzer olup, 3.1 Å (EPS₁) ve 4.2 Å (EPS₂) değerlerine sahip iki pik sunmaktadır. Melas ortamında üretilen EPS'ler ise 3.5 Å (EPS₁) ve 4.8 Å (EPS₃) değerlerine sahip olup, diğer besiyeri ortamlarındakilerden farklıdır. İlgili piklerin hangi bileşenlere ait olduğu net bir şekilde bilinmemekle birlikte, 4.8 Å da gözlenen piklerin kitin veya kitosan benzeri bileşenlere (EPS₃), 4.2 Å daki piklerin ise protein bileşenine (EPS₂) işaret ettiği belirtilebilir (Doğan ve diğ., 2015).

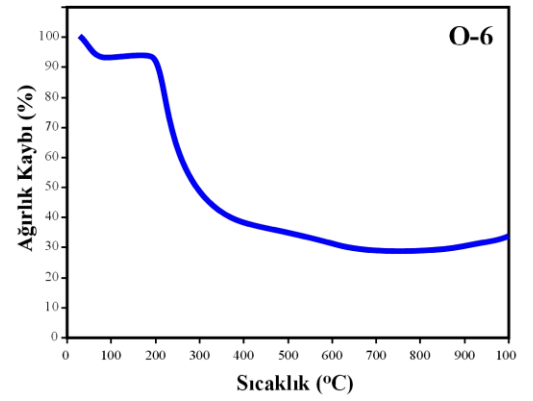
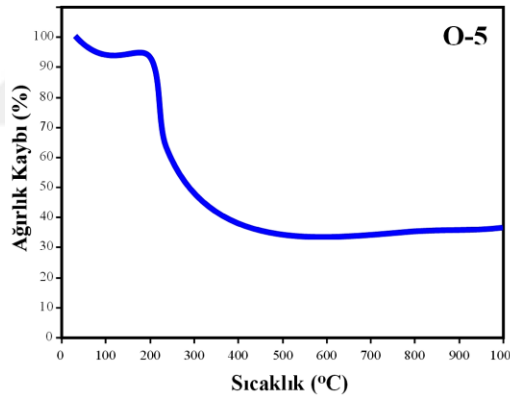
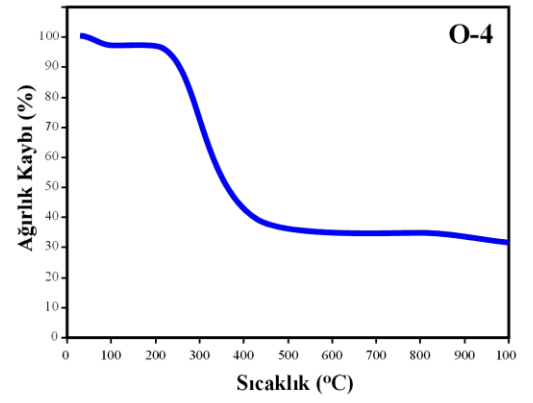
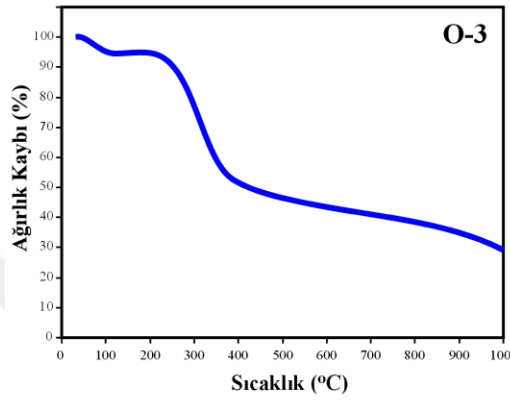
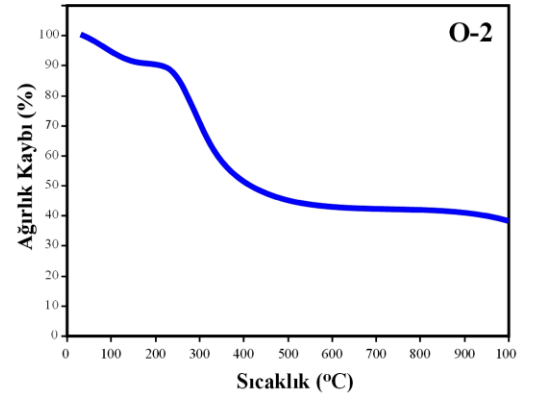
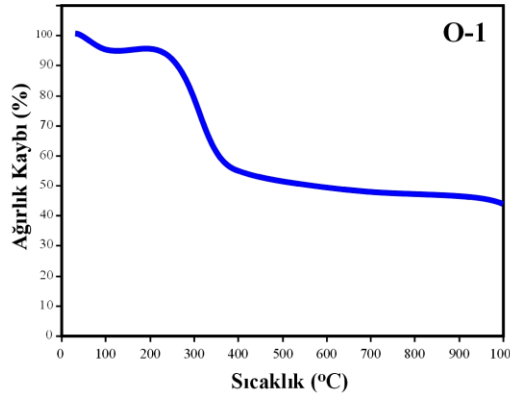


Şekil 3 *B. licheniformis* B18 saf EPS'sinin XRD analiz sonuçları

O1: LB+çözünmüş EPS; **O2:** LB+membrana bağlı EPS; **O3:** PAST ilaveli LB+çözünmüş EPS; **O4:** PAST ilaveli LB+membrana bağlı EPS; **O5:** melaslı besi ortamı+çözünmüş EPS; **O6:** melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS

4.3.2. TGA Analizi

B.licheniformis B18'den farklı gelişme ortamlarında elde edilen çözünmüş ve membrana bağlı EPS'lerin TGA analiz sonuçları Şekil 3'de verilmiştir. Sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (O-1) ve membrana bağlı EPS'nin (O-2), past ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (O-3 ve membrana bağlı EPS'nin (O-4), melaslı ortamda üretilen çözünmüş (O-5) ve membrana bağlı EPS'nin (O-6) TGA eğrileri hem farklı besiyeri ortamları hem de aynı besiyeri ortamındaki çözünmüş (süpernatant) ve membrana bağlı (pellet) ürünler için kısmen de olsa farklılık sunmaktadır. TGA verileri genel olarak değerlendirildiğinde; tüm örnekler için artan sıcaklıkla birlikte ilki az miktarda ikincisi belirgin olmak üzere iki aşamalı bir kütle kaybı söz konusudur. İlk aşama 20-200°C arasındaki yaklaşık % 5-10'luk bir ağırlık kaybı olup, su moleküllerinin (veya nem içeriğinin) ve muhtemel karboksil grubu bileşenlerin kaybını temsil etmektedir. İkinci aşama ise 200-500 °C arasındaki daha belirgin ve şiddetli ağırlık kaybı % 40-60 arasında değişmekte olup, EPS'nin bütünüyle yıkıldığının (pirolizini) göstergesidir. 500 °C'deki ağırlık kayıpları temel alındığında, melas ortamında üretilen EPS'lerin diğer ortamdakilere göre % 5-10 arasında değişen miktarlarda daha fazla ağırlık kaybına uğradıkları gözlenmiştir (Şekil 3). XRD verilerine göre de gözlenen farklılık TGA verilerine de yansımış gözükmemektedir. TGA verileri PL ve past ilaveli besiyer ortamlardaki çözünmüş (süpernatant) ve membrana bağlı (pellet) ürünleri arasında da farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur. 500 °C'deki ağırlık kayıpları temel alındığında, pellet örneklerinin süpernatantlara göre % 5-10 arasında daha fazla kütle kaybına uğradıkları belirlenmiştir. Bu durum artan kütle kaybıyla orantılı olarak EPS miktarlarının pelletlerde az da olsa arttığı şekilde yorumlanabilir.

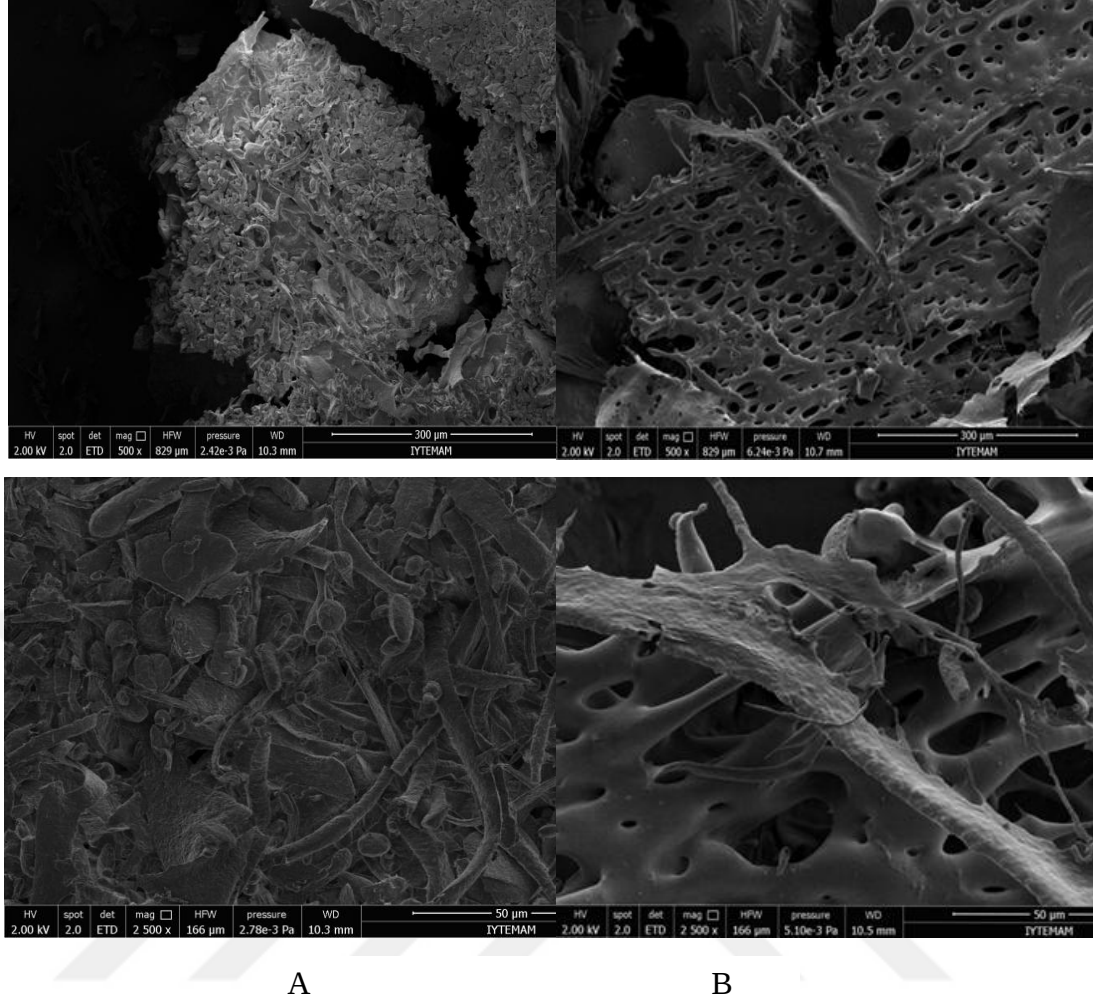


Şekil 4 *B. licheniformis* B18 saf EPS'sinin TGA analiz sonuçları

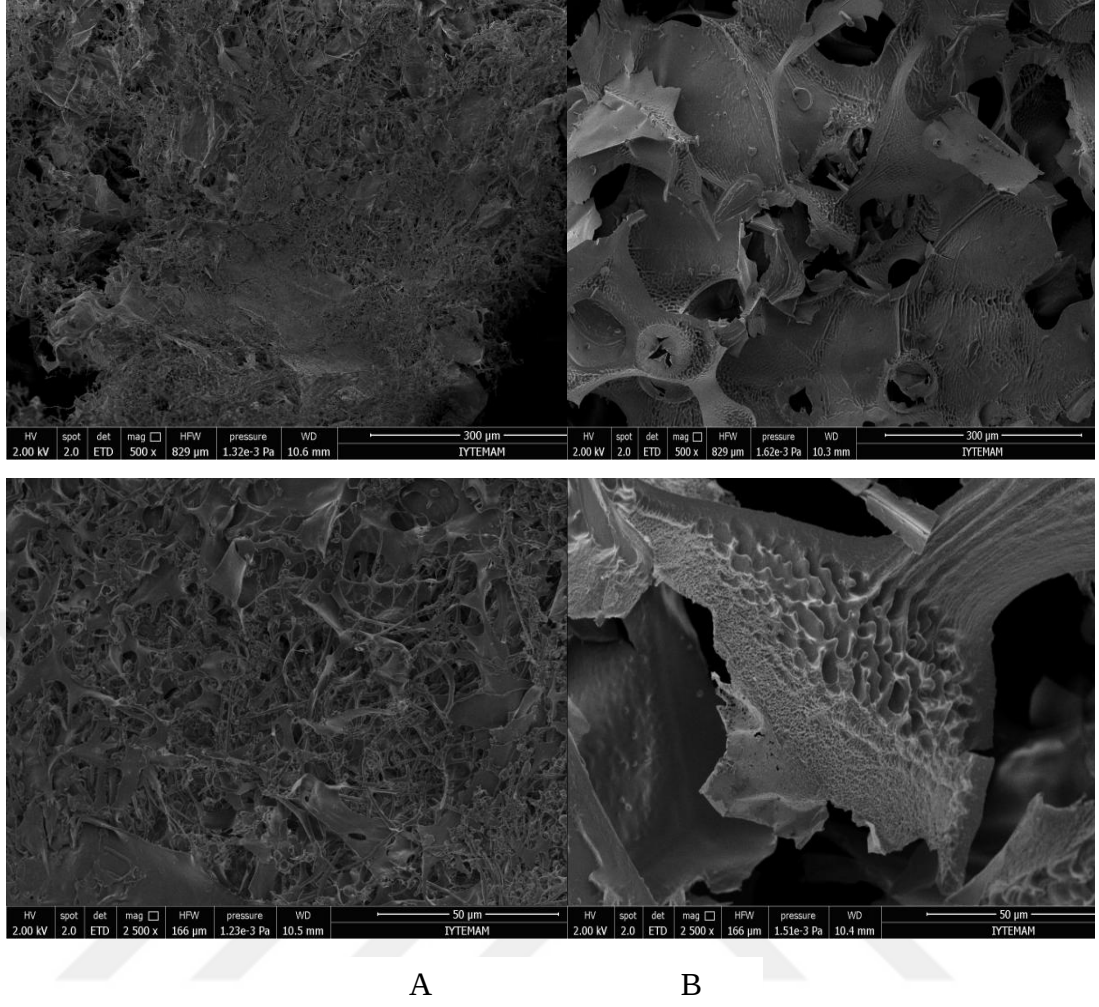
O1: LB+çözünmüş EPS; **O2:** LB+membrana bağlı EPS; **O3:** PAST ilaveli LB+çözünmüş EPS; **O4:** PAST ilaveli LB+membrana bağlı EPS; **O5:** melaslı besi ortamı+çözünmüş EPS; **O6:** melaslı besi ortamı+membrana bağlı EPS

4.3.3. SEM Analizi

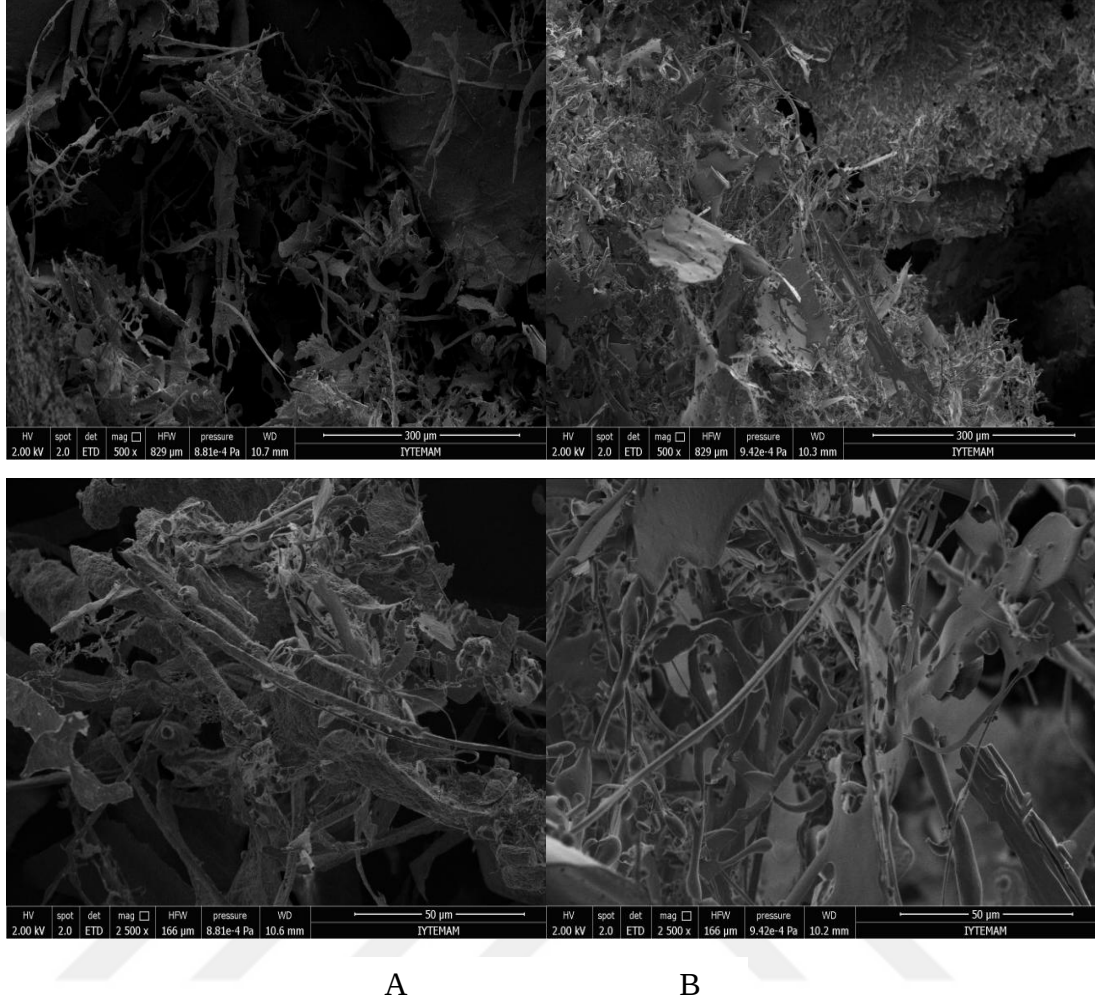
Saf EPS morfolojisi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için *B.licheniformis* B18 bakterisinin SEM analizi yapılmıştır. Farklı kültür ortamlarında geliştirilen mikroorganizmanın ürettiği EPS'lerin yapısındaki morfolojik farklılıklar Şekil 5–8'de görülmektedir. Şekil 5'de LB besi ortamında saflaştırılan membrana bağlı EPS'nin yüzeyi ve hücreleri birbirleriyle yoğun topluluklar halinde kümeleştiği (A) , çözünmüş EPS'nin hücreleri ise birbirleriyle bağlantılarının EPS iplikleri ile daha düzenli bir yapı gerçekleştirdiği görülmektedir (B) . Şekil 6'da Melas besi ortamında saflaştırılan membrana bağlı EPS'nin yüzeyinde bakterilerin yoğun topluluklar halinde kümeleştiği (A) ve çözünmüş EPS'nin morfolojik görünümünün ise yapraksı şekilde oluşum gösterdiği görülmektedir (B) . Şekil 7'de Peyniraltı suyu içeren besi ortamında saflaştırılan çözünmüş (B) ve membrana bağlı EPS'nin (A) morfolojik görünümünde ise EPS ipliklerinin hücre üzerindeki bağlantı oluşturdıkları gözlenmektedir. Glukronik asit içeren besi ortamında saflaştırılan çözünen EPS'nin SEM görünümünde ise kırıklı bir yapı oluşumuna sahip olduğu gözlenmektedir (Şekil 8).



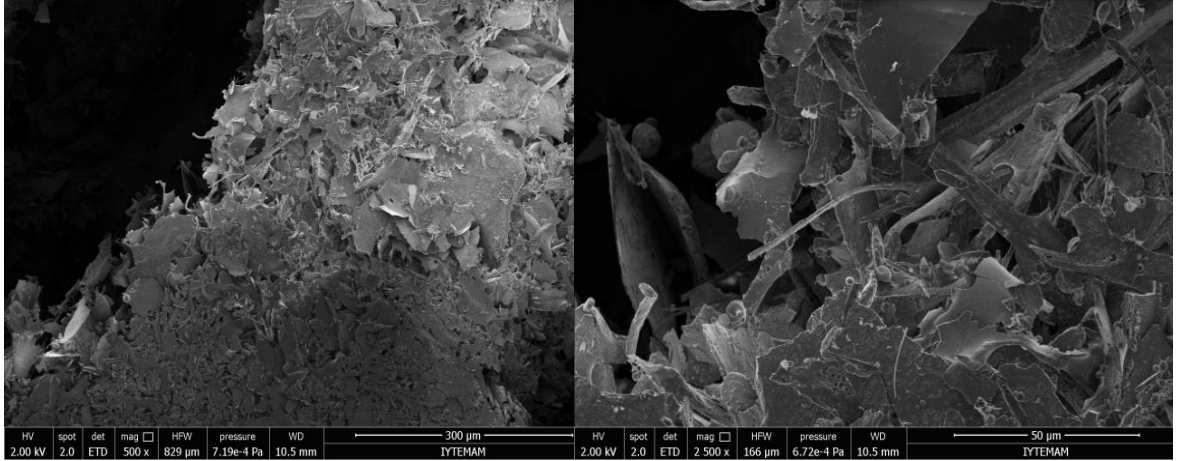
Şekil 5 LB besi ortamında geliştirilen B18 bakteri EPS'sinin SEM görünümü
(A: Membrana bağlı EPS, B: Çözünmüş EPS)



Şekil 6 Melaslı besi ortamında geliştirilen B18 bakteri EPS'sinin SEM görünümü
(A: Membrana bağlı EPS, B: Çözünmüş EPS)



Şekil 7 Peynir altı suyu tozu ilave edilen besi ortamında geliştirilen B18 bakterisi EPS'sinin SEM görünümü (A: Membrana bağlı EPS, B: Çözülmüş EPS)

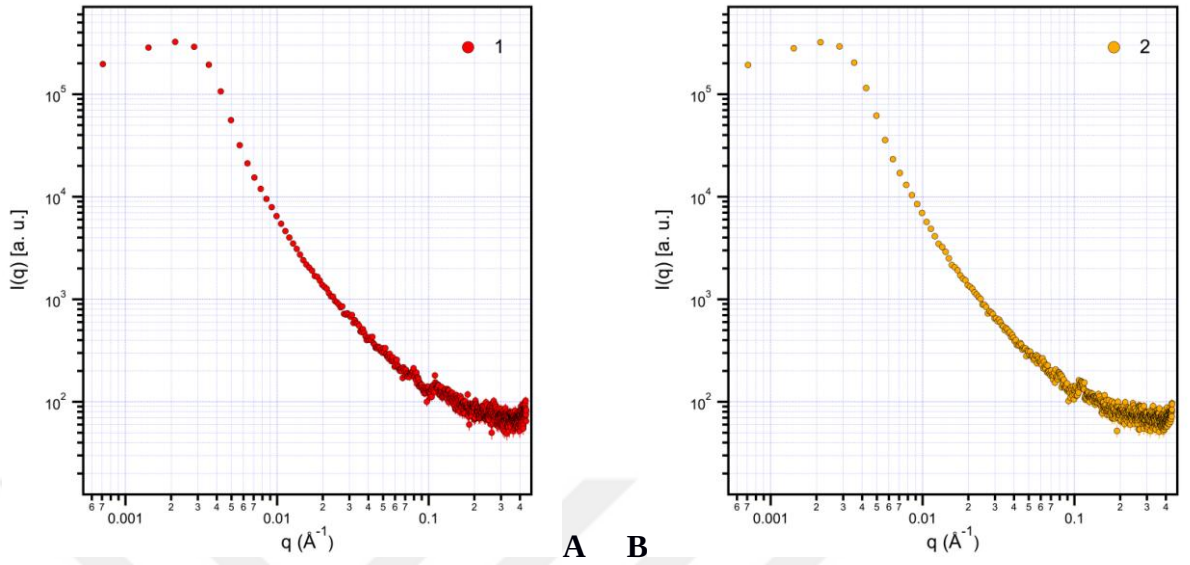


Şekil 8 Glukuronik asit ilave edilen besi ortamında geliştirilen B18 bakterisi çözünmüş EPS'sinin SEM görünümü

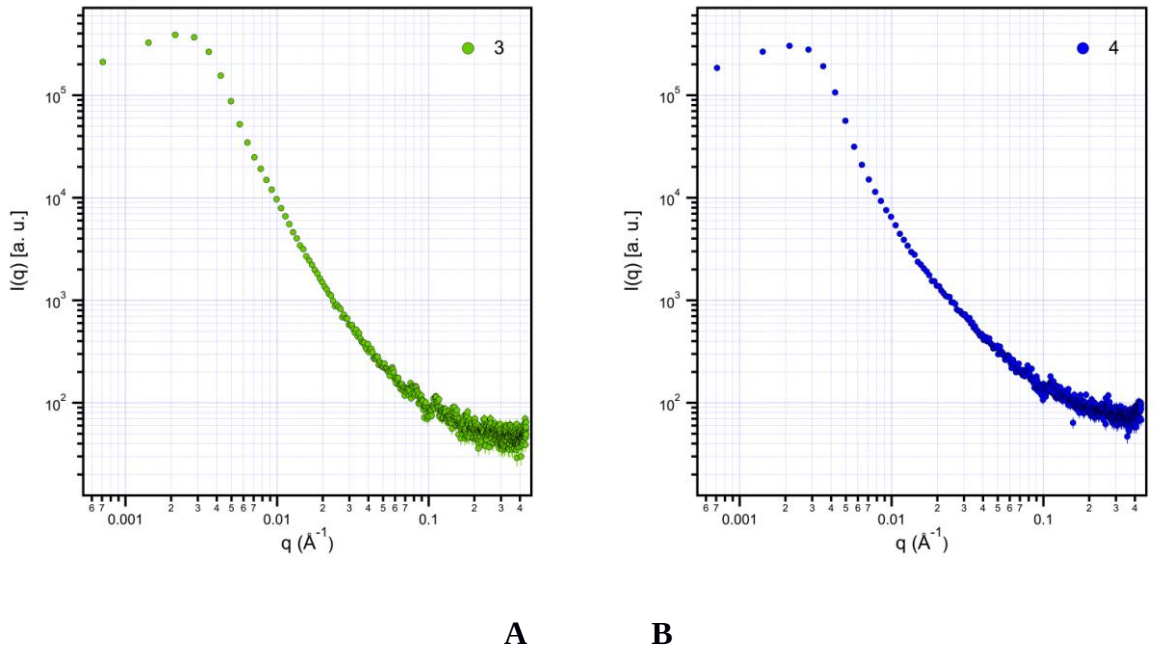
4.3.4 SAXS Analizi

Bacillus licheniformis B18'den ekstrakte edilen EPS'nin karakterizasyonu küçük açılı X-ışını saçılması (SAXS) tarafından detaylı olarak çalışılmıştır. EPS'nin özgün yapısı; boyut, şekil ve iki katmanlı kalınlığı da dahil olmak üzere SAXS analizi ile karakterize edilmiştir. EPS'nin yapısını SAXS yöntemi ile karakterize edebilmek için EPS'lerin sulu çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 9 - 12 sırasıyla LB ortamında üretilen çözünmüş (O1) ve membrana bağlı EPS'nin (O2), PAST ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (O3) ve membrana bağlı EPS (O4) melaslı ortamda üretilen çözünmüş (O5) ve membrana bağlı EPS'nin (O6), ile son olarak glukuronik asit ilaveli ortamda üretilen çözünmüş (O7) ve membrana bağlı EPS'nin (O8) SAXS eğrileri verilmiştir. SAXS eğri verileri IGOR PRO Programı kullanılarak, yapılan hesaplamalar sonunda uyum model fonksiyonlarından faydalanarak grafikleri elde edilmiştir.

Fit yapılmış grafikleri:

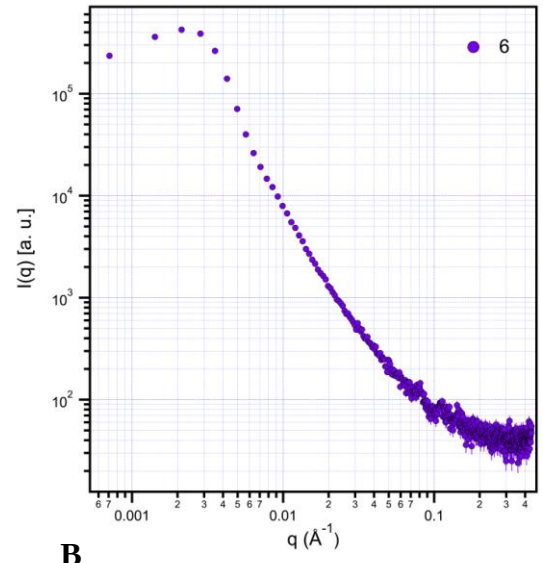
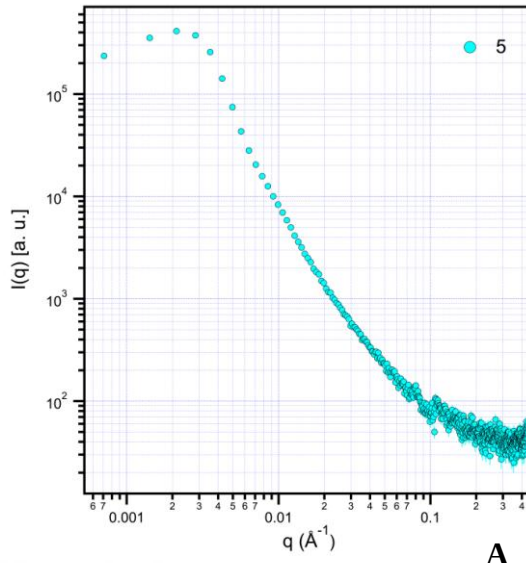


Şekil 9 LB ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS uyum grafiği

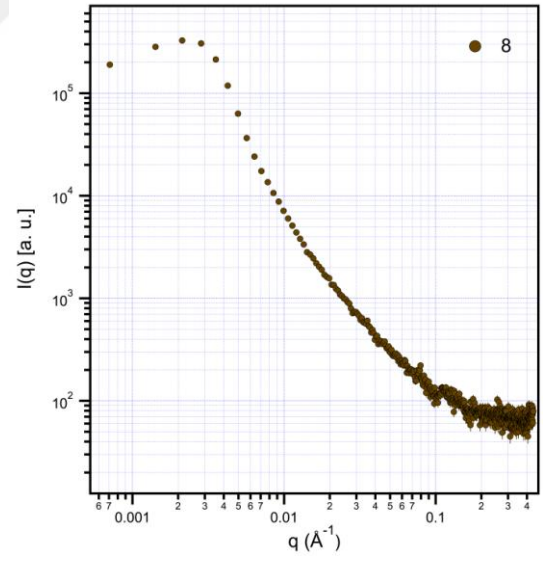
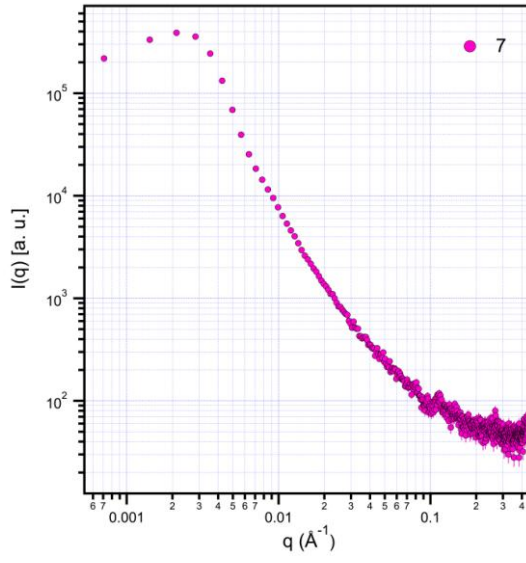


Şekil 10 PAST ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı

(B) EPS'nin SAXS grafik deseni



Şekil 11 Melaslı besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni



Şekil 12 Glukuronik asit ilaveli besi ortamında üretilen çözünmüş (A) ve membrana bağlı (B) EPS'nin SAXS grafik deseni

5. TARTIŞMA

Bakteriyal ürünlerin üretimi; suşun geliştirilmesinin yanı sıra, uygun fermentasyon şartlarının ve ayırma yöntemlerinin belirlenmesi veya ucuz karbon kaynaklarının kullanımı ile düzenlenir. Günümüzde polimerik materyallerin üretiminde toplam üretim maliyeti, ham materyal kullanımı ile doğrudan ilişkilidir. Özellikle bakteriyel polimerlerin ekonomik yönden daha fazla üretilebilmesi amacıyla ucuz karbon kaynaklarının kullanımına gereksinim duyulduğu bilinmektedir. Bu amaçla nişasta, peyniraltı suyu, şeker pancarı melası, şeker kamışı melası, buğday melası, pirinç kepeği vb. atık maddeler, polimerlerin ucuz ve kolay yönden üretilebilmesi için düşünülmektedir. Şeker pancarı melası ve pirinç kepeğinin EPS üretiminde kullanımı Abdul Razack ve diğ. (2013) tarafından gösterilmiştir. Yapılan çalışmada melasın EPS üretimi üzerine daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı karbon kaynakları kullanılarak çeşitli bakteri suşlarında EPS üretimi gerçekleştirilmiştir (Aslım ve diğ., 2005; Doğan ve diğ., 2014). Örneğin, probiyotik bakteri grubunda yer alan ve laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının optimal sıcaklık, pH ve inkübasyon zamanına bağlı olarak MRS ve M17 besiyerlerinde EPS üretimleri üzerine etkileri araştırılmış; EPS üretiminde elde edilen toplam şeker miktarlarının bakteri tipi ve besiyerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Aslım ve diğ., 2005). *B. subtilis* tarafından glukoz, galaktoz, früktoz ve glukuronik asit içeren ortamda polisakkarit üretimi yapılmıştır. Ayrıca *Bacillus* CMG1447 cinsinde ise glukuronik asit, galaktoz, mannoz ve ramnoz içeren ortamlarda yüksek moleküler ağırlığa sahip asidik heteropolisakkaritler üretilmiştir (Küçükkaşık ve diğ., 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise *B. subtilis* tarafından üretilen EPS için uygun ve optimize şartların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca artık kaynakların ve sentetik besiyerlerinin EPS üretimi üzerine etkisi karşılaştırılmıştır (Abdul Razack ve diğ., 2013).

Sunulan bu çalışmada termotolerant bir bakteri olan *Bacillus licheniformis* B18 suşunun EPS üretimine, melas ve diğer karbon kaynaklarının (glukuronik asit, galaktronik asit, glukoz ve peyniraltı suyu tozu) kullanımında çeşitli koşulların etkisi incelenmiştir. Optimal şartların belirlenmesinde inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, farklı karbon kaynakları çalışılmıştır. Ayrıca optimal şartlarda suşlardan saflaştırılan EPS'lerin hem içeriği tespit edilmiş hem de XRD, TGA ve SEM analizleri yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmasının ilk aşamasında *B.licheniformis* B18 bakterisinin EPS üretimi üzerine TSB, LB ve NB besiyerinin etkisi araştırılmıştır. Tablo 4'e bakıldığında LB besiyerinde EPS üretiminin NB ve TSB besiyerine kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. B18 bakterisinin farklı inkübasyon süresince LB besiyerindeki EPS üretim miktarı 25,14-152,63 mg/L arasında tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4). B18'in EPS üretimi TSB besiyerinde 1,47- 48,37 mg/L ve NB besiyerinde 24,81-79,01 mg/L arasında olmuştur. Sonuçlara göre en iyi üretimin gerçekleştirildiği LB besiyeri, EPS optimizasyon çalışmalarında tercih edilmiştir. Daha sonra, bakterinin farklı pH ve sıcaklıkta süreye bağlı olarak EPS içeriği incelenmiştir. Buna göre bakteri maksimum EPS üretimine pH 7,0 ve 40°C'de (152,63 mg/L, 108. saat) ulaşmıştır.

Çalışmamızın ikinci basamağında, en yüksek EPS veriminin elde edildiği LB besi ortamına farklı karbon kaynakları (glukuronik asit, galaktronik asit, glukoz) ilave edilerek sıcaklık ve pH'da toplam şeker üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara göre bakteri maksimum şeker üretimine glukuronik asit içeren besiyerinde (197,14mg/L) 84. saatte ulaşırken en düşük şeker miktarı glukoz içeren besiyerinde (160,12mg/L) 96.saatte tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 7). Karbon kaynağı ilave edilmesi kontrole göre kıyaslandığında EPS üretimini olumlu etkilemiştir. *B. licheniformis* B18 suşu en iyi toplam şeker miktarına tek karbon kaynağı olarak eklenen glukronik asit varlığında ve sıcaklık 40°C'de ulaşmıştır.

Çalışmamızın üçüncü basamağında ise, peynir altı suyu ve melas gibi artık materyallerin ucuz ve kolay temin edilebilir olması nedeniyle ve endüstriyel fermentasyonlarda da kullanıldığı için bu materyallerin EPS üretimine etkisi incelenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarla şeker pancarı melası ve peynir altı

suyunun EPS üretiminde kullanımı gösterilmiştir. Süt ve yeniden sulandırılmış peyniraltı suyu tozu kullanılarak Zhou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Rhizobium radiobacter* S10 suşunun bu iki ortamdaki EPS üretimi karşılaştırılmıştır. Bakterilerin %10 (w/w) oranındaki yeniden sulandırılmış PAST'lı ortamda geliştirilmesiyle en yüksek EPS üretimi ($2834,2 \pm 226$ mg/L) elde edilmiştir (Zhou ve diğ., 2014).

LB besiyerine 1 g/L Peynir altı suyu tozu ilave edilmiş ve bakteri farklı pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 ve 9,0) ve sıcaklıklarda (40, 45, 50 ve 55°C) geliştirilmiştir. İnkübasyonun ilerleyen saatlerinde 55°C'de bakterinin ilk 84 saatte (182,03 mg/L) maksimum EPS ürettiği, daha önceki saatlerde ise EPS miktarında düşüş olduğu dikkati çekmiştir. Tüm şartlar dikkate alındığında bakteri 40°C'de, pH 7,0'de 48. saatte maksimum EPS üretimine ulaşmıştır (158,8 mg/L). *Bacillus licheniformis* B18 suşu 55°C maksimum karbonhidrat oluşumuna ulaşmasına rağmen bakteri popülasyonu bir anda arttığı için üretilen EPS' yi besin kaynağı olarak kullanmış olduğunu düşünmekteyiz. Bu sebeple diğer sonuçlarla karşılaştırma yapılabilmesi için en uygun sıcaklık 40°C seçilmiştir. Svendsen ve Breddam (1992) 'ın yaptığı çalışmada ise, enzim hidrolizi üzerine pH etkisini test etmek için, peynir altı suyundan hazırlanan besi ortamlarının pH'ı (6,0; 7,0; 8, 0 ve 9, 0) ayarlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerlerinde enzim seçiciliği üzerine pH'ın büyük etkisi gözlenmiştir. *Bacillus licheniformis*'in enzim seçiciliği üzerine yapılan çalışmada optimal pH 8,0 bulunmuştur. *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M suşu ile yapılan çalışmada ise besi ortamına ilave edilen peyniraltı suyu tozunun EPS üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada peyniraltı suyu içine maya ekstresi takviye edilmiş besi ortamı hazırlanmış ve pH 5,0'e ayarlanmıştır. Maksimum EPS üretimi 25°C ve pH 5,0'te ölçülmüştür. (Lacroix ve diğ., 2002).

Bir diğer endüstriyel artık olan melasın besiyeri olarak kullanıldığı optimizasyon çalışmamızda ise farklı konsantrasyonlarda melas (v/v; 0,5/100; 1/100; 1,5/100 ve 2/100) hazırlanmış ve bakterinin EPS üretimi incelenmiştir. Buna göre en iyi üretime 2/100 v/v melas besiyerinde 45°C'de ve pH 8,0'de ulaşılmıştır. Bakteri bu şartlarda 96. saatte 702,44 mg/L miktarında EPS üretmiştir (Bkz. Tablo 12). Abdul Razack ve diğ. (2013)' lerinin çalışmasında *Bacillus subtilis* suşunda şeker üretimi, en iyi %2 şeker kamışı melas konsantrasyonunda EPS üretimi önemli ölçüde gerçekleşmiştir. *Bacillus subtilis* suşundan %2 şeker

kamışı melas konsantrasyonunda 4,86 g EPS/L şeker üretimi gerçekleşmişken, %2 sukroz konsantrasyonunda ise 2,98 g EPS/L şeker üretimi gerçekleşmiştir. *Bacillus subtilis* suşunda şeker üretimi, 37°C ve 24 saat inkubasyon sonunda ölçülmüştür. Tharek ve diğ. (2006) 'lerinin çalışmasında ise *Bacillus licheniformis* 221a suşunda şeker üretimi en iyi %1 sukroz konsantrasyonunda EPS üretimi gerçekleşmiştir. *B. licheniformis* 221a suşundan %1 sukroz konsantrasyonunda 13.57 g EPS/L şeker üretimi gerçekleşmiştir. Kuntiya ve diğ. (2010) 'lerinin çalışmalarına göre karbon kaynaklarının konsantrasyon oranı %2'nin altına düşerse, hücrelerin büyümesi ve gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Cibis ve diğ. (2004) 'lerinin yaptığı çalışmada ise *Bacillus* bakterileri içeren bir karışık kültür kullanılarak pancar melasından hazırlanmış ortamda 6,5 ile 8,0 arasında bir pH değerinde biodegrasyon (biyolojik bozulma) yapılmış. Bu çalışmada ise en uygun pH 6,5 bulunmuştur. Cibis ve diğ. (2006)'lerinin yaptığı diğer bir çalışmada ise *Bacillus* bakterileri içeren bir karışık kültür kullanılarak pancar melasından hazırlanmış ortamda pH 6,5'da sıcaklık (27, 36, 45, 54 ve 63°C) çalışılmıştır. *Bacillus* bakterileri için en uygun sıcaklık 36°C bulunmuştur. Biosurfactant üretimi için yapılan çalışmalarda *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 ve *Bacillus* suşu HS3 için hazırlanan optimal şartlarda besi ortamı olarak pekmez ve peyniraltı suyu kullanılmış ve sıcaklık 45°C'de çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada belirlenen optimal şartlarda bakteri popülasyonunda hızlı bir artış olmuş biosurfaktant üretimi başarıyla sonuçlanmıştır (Desai ve diğ., 2005). *Mucor rouxii* tarafından sentezlenen bir hücre dışı ekzopolisakkarit (EPS), aşırı değişen pH değerleri veya abiyotik strese karşı hücrelerin korunması için önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. *M. Rouxii*, pH 3,5'ta ve 28°C hazırlanan pancar melası besi ortamında 48 saat sonunda, hızlı bir şekilde EPS oluşumu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *M. rouxii* tarafından üretilen EPS yeni bir asidik polisakarit olduğunu ortaya koymuştur (Abdel-Aziz ve diğ., 2012).

Çalışmamızın son basamağında, *Bacillus licheniformis* B18 'in farklı besi ortamlarında EPS saflaştırılıp kompozisyonu analiz edilmiştir (Tablo 14). Genel olarak Tablo 14'e bakıldığında çözünmüş ve membrana bağlı EPS'deki şeker ve protein, üronik asit miktarları kaynağa göre değişkenlik göstermiştir. EPS'deki şeker oranı, melas besiyerinde artarken, glukuronik asit ve PAST içeren gelişme

ortamında azalma gözlenmiştir (Bkz. Tablo 14). Melas besi ortamında saflaştırılan çözünmüş EPS'deki şeker miktarı 0,92 mg/g iken glukronik asit içeren ortamda 0,122 mg/g olarak tespit edilmiştir. Melasın aksine, bakteri peynir altı suyu tozu ilaveli (PAST) besi ortamında geliştirildiğinde, bakteriyel EPS'deki şeker miktarı azalırken protein miktarında artış olmuştur. Buna göre PAST içeren ortamda çözünmüş ve membrana bağlı EPS'de 368,5 mg/g miktarında protein tespit edilmiştir. Aynı şartlarda çözünmüş EPS'deki şeker miktarı 0,31 mg/g ve membrana bağlı EPS'de ise 0,078 mg/g olarak belirlenmiştir. Kontrol olarak düşünülen LB besiyerinde ise membrana bağlı ve çözünmüş EPS'de birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. EPS sentezi sırasında, melas ve PAST içeren ortamda EPS'deki protein miktarını arttırdığı gözlenmiştir. Saf kültürlerdeki EPS'nin ana içeriğinin karbohidrat olduğu düşünülmüştür (Sutherland and Kennedy, 1996; Sutherland, 1997). Fakat yapılan çalışmalarda farklı bakterilerden elde edilen EPS'de karbohidrat dışında özellikle ekzoenzim olmak üzere büyük miktarda protein varlığı da rapor edilmiştir (Dignac ve diğ., 1998). Çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçların literatür bilgileri ile paralel nitelikte olduğu görülmektedir.

EPS ürünlerinin XRD desenleri genel olarak değerlendirildiğinde, bunların büyük ölçüde amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Membrana bağlı (pellet) ve çözünmüş (süpernatant) örnekler EPS pikleri bakımından büyük benzerlik sunmaktadır. WINFIT programı (Krumm, 1996) kullanılarak pik çözümlemeleri yapılan EPS'lerin XRD verilerinin farklı besiyer ortamlarına göre değerlendirildiğinde; LB ve past ilaveli ortamlarda üretilen EPS örnekleri benzer olup, 3.1 Å (EPS1) ve 4.2 Å (EPS2) değerlerine sahip iki pik sunmaktadır. Melas ortamında üretilen EPS'ler ise 3.5 Å (EPS1) ve 4.8 Å (EPS3) değerlerine sahip olup, diğer besiyer ortamlarındakilerden farklıdır. İlgili piklerin hangi bileşenlere ait olduğu net bir şekilde bilinmemekle birlikte, 4.8 Å da gözlenen piklerin kitin veya kitosan benzeri bileşenlere (EPS3), 4.2 Å daki piklerin ise protein bileşenine (EPS2) işaret ettiği belirtilebilir (Doğan ve diğ., 2015). TGA verileri genel olarak değerlendirildiğinde; tüm örnekler için artan sıcaklıkla birlikte ilki az miktarda ikincisi belirgin olmak üzere iki aşamalı bir kütle kaybı söz konusudur. İlk aşama 20-200°C arasındaki yaklaşık %5-10'luk bir ağırlık kaybı olup, su moleküllerinin

(veya nem içeriğinin) ve muhtemel karboksil grubu bileşenlerin kaybını temsil etmektedir. İkinci aşama ise 200-500°C arasındaki daha belirgin ve şiddetli ağırlık kaybı % 40-60 arasında değişmekte olup, EPS'nin bütünüyle yıkıldığının (pirolizini) göstergesidir. 500°C'deki ağırlık kayıpları temel alındığında, melas ortamında üretilen EPS'lerin diğer ortamdakilere göre % 5-10 arasında değişen miktarlarda daha fazla ağırlık kaybına uğradıkları gözlenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde EPS'nin üretildiği ortamın EPS yapısında meydana getirdiği değişiklikler görsel olarak iyi şekilde görülmektedir. LB ortamında geliştirilen B18 EPS'sinin 300 µmlik görüntüsü daha çok lamelar (yapraksı) biçimde iken (bkz. Şekil 5) melas besi ortamından elde edilen EPS'nin 100 µmlik görüntüsü daha çok bir bütün halinde gerilmiş bir yüzey şeklindedir (bkz. Şekil 6).

Sonuç olarak bu çalışmada EPS oluşumu besin düzeyleri, pH, karbon kaynakları ve sıcaklığa göre farklılık göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada melasın ve diğer karbon kaynaklarının kontrole kıyasla toplam şeker üretimine olan olumlu etkisinin tespit edilmiş olması, ekonomik ve ucuz bir materyal olarak melasın ve diğer karbon kaynaklarının kullanılabilirliğini bir kez daha test etmiş olmaktayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *Bacillus licheniformis* B18 bakterisinin farklı ortamlarda ürettiği EPS'nin; miktar, içerik ve ince yapı karakterizasyonu yapılmıştır. Bakteriyel EPS üretimine melas ve peynir altı suyu gibi endüstriyel artık materyallerin EPS üzerine etkisi ortaya konmuştur. EPS'deki protein ve karbohidrat miktarlarının mineral ve besiyeri tipine göre değiştiği tespit edilmiştir. EPS ürünlerinin XRD desenleri genel olarak değerlendirildiğinde, bunların büyük ölçüde amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Membrana bağlı (pellet) ve çözünmüş (süpernatant) örnekler EPS pikleri bakımından büyük benzerlik sunmaktadır. TGA eğrileri hem farklı besiyeri ortamları hem de aynı besiyeri ortamındaki çözünmüş (süpernatant) ve membrana bağlı (pellet) ürünler için kısmen de olsa farklılık sunmaktadır. TGA verileri genel olarak değerlendirildiğinde; tüm örnekler için artan sıcaklıkla birlikte ilki az miktarda ikincisi belirgin olmak üzere iki aşamalı bir kütle kaybı söz konusudur. İlk aşama 20-200 °C arasındaki yaklaşık % 5-10'luk bir ağırlık kaybı olup, su moleküllerinin (veya nem içeriğinin) ve muhtemel karboksil grubu bileşenlerin kaybını temsil etmektedir. İkinci aşama ise 200-500 °C arasındaki daha belirgin ve şiddetli ağırlık kaybı % 40-60 arasında değişmekte olup, EPS'nin bütünüyle yıkıldığının (pirolizini) göstergesidir. 500 °C'deki ağırlık kayıpları temel alındığında, melas ortamında üretilen EPS'lerin diğer ortamdakilere göre % 5-10 arasında değişen miktarlarda daha fazla ağırlık kaybına uğradıkları gözlenmiştir. Asıl EPS yapısının yaklaşık 200 °C civarında bozunduğu görülmektedir. Bu da bize üretilen EPS'nin ticari olarak kullanım alanına göre kaç derece sıcaklığa kadar dayanabildiği hakkında önemli bir bilgi vermektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde EPS'nin üretildiği ortamın EPS yapısında meydana getirdiği değişiklikler görsel olarak iyi şekilde görülmektedir. LB ortamında geliştirilen B18 EPS'sinin 300 µmlik görüntüsü daha çok lamelar (yapraksı) biçimde iken (bkz. Şekil 5) melas besi ortamından elde edilen EPS'nin 100 µmlik görüntüsü daha çok bir bütün halinde gerilmiş bir yüzey şeklindedir (bkz. Şekil 6).

EPS'ler biyomateryaller olarak kullanılabildiği için, bu çalışma sonucu *B.licheniformis* B18 bakterisinin dört farklı ortamda ve her bir ortamda ürettiği bağlı ve çözünmüş EPS yapısı araştırılarak ileride bu araştırmalar geliştirilip imkânlar dâhilinde EPS'nin kullanılacak alana göre ticari olarak üretilmesi istenilen bir hedeftir. Elde edilen EPS'lerin yapılarının aydınlatılması ve faydalı özellikler içerip içermediğinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda bakterimiz için doğal yaşama ortamları olan bazı endüstriyel artıkların EPS üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi önemlidir. Bu çalışma sonunda termal bölge izolatu olan B18'in melas ve peynir altı suyunda EPS üretim potansiyelleri belirlenerek ve üretilen EPS'nin kullanımına yönelik fikir elde edilmiştir. Ayrıca çalışma endüstriyel artıkların değerlendirilmesi açısından da ayrı bir önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abdel-Aziz, S., Hamed, H.A., Mouafi, F.E., Gad, A.S. ‘‘Acidic pH-Shock Induces the Production of an Exopolysaccharide by the Fungus *Mucor rouxii*: Utilization of Beet-Molasses.’’ New York Science Journal, 5(2), (2012).

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

Ak, İ. ‘‘Yoğunlaştırılmış Melas Şilempesinin Besin Maddeleri İçeriği ve Hayvan Beslemede Kullanılma Olana k lar ı.’’ Yem Magazin Aylık Dergi, Temmuz 1997, s.19-21, (1997).

Alazze h, A.Y. ; Ibrahim, S.A.; D. Song, A. ; Shahbazi, A.A.Abu, Ghazaleh. ‘‘Carbohydrate and Protein Sources Influence the Induction of α -and β - Galactosidases in *Lactobacillus reuteri*’’, Food Chemistry, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.065, (2009).

Anonim. ‘‘Şeker, Nişasta, ve Fosfor Analiz Metodları. ‘‘29 Temmuz 1978 tarih ve 16361 sayılı Resmi Gazete, Ankara, (1978).

Anonym. International Dairy Federation. Whey. Proceedings of the Second International Whey Conference, held in Chicago, USA, 27-29 October 1997. International Dairy Federation ,Brussels, Belgiu, (1998).

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

Bar, C., Patil,R., Doshi,J., Kulkarni, M.J.,Gade, W.N. ‘‘Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance-A proteomic approach’’, (2007).

Batat, P. 'Bazı hidrojellerin ve polimer kaplı nanomanyetik parçacıkların yapılarının SAXS yöntemi ile incelenmesi', Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2008).

Batra, N., Shing, J., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R., Sobti, R.C. "Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36, 1- 6, (2002).

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

Britten, M. And H.J. Giroux." Acid – Induced Gelation Of Whey Protein Polimers: Effects of pH And Calcium During Polymerization. *Food Colloids* 15 : 609 – 617", (2001).

Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Oberg, C. J. ve Welker, D. L., 'Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve functionality of low fat cheese', *Int. Dairy J.*, 11, 433-439, (2001).

Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C. ve de Franc, F. P. 'Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains', *Biotechnol Lett*, 19 (1), 19-21, (1997).

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

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao J., Tian, F and Zhang, H. "Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*", *J. Dairy Sci*, 91: 1751–1758, (2008).

Cibis, E., Krzywonos, M., Miśkiewicz, T." Aerobic biodegradation of potato slops under moderate thermophilic conditions: effect of pollution load." *Bioresour. Technol.* 97, 679e685, (2006).

Cibis, E. "Tlenowa biodegradacja skrobiowych wywarów gorzelnicznych za pomocą mieszanej kultury bakterii termo-i mezofilnych z rodzaju *Bacillus* (Aerobic biodegradation of starch stillages from rural distilleries by means of mixed culture of thermo- and

mesophilic bacteria of the genus *Bacillus*).” Pr. Nauk. Akad. Ekon. im. Oskara Langego we Wrocławiu 1028, pp. 1e113, (2004).

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell D., Korber D., and James G. “Biofilms the Customized Microniche”, J. Bacteriol. 176, 2137-2142, (1994).

Curtin, L.V. “Molasses – General Considerations, National Feed Ingredients Association,” West Des Moines, Iowa,(1983).

De Wit, J.N.” Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products.” Journal of Dairy Science 81: 597, (1998).

De la Fuente, M.A., Y. Hemar, M. Tamehana, P.A. Munro and H. Singh. “Process – Induced Changes in Whey Proteins During The Manufacture of Whey Protein Concentrates.” International Dairy Journal. 12: 361- 369,(2002).

Degeest, B., Vaningelgem, F., Laws, A. P. ve De Vuyst, L. ‘UDP-N Acetylglucosamine 4-Epimerase Activity indicates the presence of N-Acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains’, *Appl. Environ. Microbiol*, 67 (9), 3976-3984, (2001).

Denny T.P. “Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 173-197, (1995).

Desai, J.D., Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. “ Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions.” *Bioresource Technology.*, 99, 195–199, (2005).

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

Doğan, N.M., Acar Doğanlı, G., Doğan, G., Bozkaya, Ö. “Characterization of Extracellular Polysaccharides (EPS) produced by Thermal *Bacillus* and determination of environmental conditions affecting exopolysaccharide production.” *International Journal*

of Environmental Research. *International Journal of Environmental Research*, 9(3), 1107-1116, (2015).

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

Duboc, P. ve Mollet, B. 'Applications of exopolysaccharides in the dairy industry', *International Dairy J.*, 11, 759- 768, (2001).

Dubois, M., Gilles, G. A., Hamilton, J. K., Peters, P. A., Smith, F. 'Colorimetric method for determination of sugars and related substances', *Anal Chem.*, 28, 350-356, (1956).

Fajardo-Lira, C., Garibay, M. G., Rodarte, C. V., Farres, A. ve Marshall, V. M. 'Influence water activity on the fermentation of yoghurt made with exacellular polysaccharide-producing or non-producing starter', *International Dairy Journal*, 7, 279-281, Flemming, H. C. ve Wingender, J., 'The biofilm matrix', *Nat Rev Microbiol.*, 8, 623-633, (1997).

Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., Simov, Z. I. 'Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures', *Can J Microbiol.*, 46, 1123-1127, (2000).

Fiedurek, J. ; Szczodrak, J., 'Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*'. *Acta Microbiol. Pol.* , 43, 57– 65, (1994).

Foegeding, E.A. ; J.D. Davis, D. Doucet and M.K. McGuffey. 'Advances In Modifying and Understanding Whey Protein Functionalty'. *Trends in Food Science & Technology* 13: 151 – 159, (2002).

German, J.B., C.J. Dillard and R.L. Walzem. "U.S. Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review". May 2000. U.S. Dairy Export Council, (2001).

Gote, M.M. ; Khan, M.I. ; Khire M. J. "Active site directed chemical modification of β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146)"; Involvement of lysine,

tryptophan and carboxylate residues in catalytic site, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 1312–1320, (2007).

Gönen F., Aksu Z. ‘Use of response surface methodology (RSM) in the evaluation of growth and copper(II) bioaccumulation properties of *Candida utilis* in molasses medium’. *Journal of Hazardous Materials* 154, 731–738, (2008).

Gugliandola, C., Maugeri, T. L., Cacamo, D. ve Stackebrandt, E. ‘*Bacillus aeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus Species* from Eolian Islands (Italy)’, *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 172-176, (2003).

Gül-Güven, R.’’ Alicyclobacillus acidocaldarius subspecies Rittmannii’nın β -galaktozidaz enzimi üzerine çalışmalar’’, Yüksek Lisans Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 50-51s, (2004).

Güngen, İ. ‘‘Melas Nedir, Kim Alır, Kim Satar, Nasıl Satılır?’’ Güngen Dış Ticaret Lim.Şrk., Ankara. 34 s. (Seminer), (1991).

Griffiths, M. W. ; Muir, D.D. ‘‘Properties of a thermostable O β - Galactosidase from a thermophilic Bacillus: Comparison of the enzyme activity of whole cells, purified enzyme and immobilised whole cells’’, *Journal of the Science of food and Agriculture*, Vol. 29, Issue 9, pp.753 – 761, (1978).

Harper, W.J. ‘‘Biological Properties of Whey Components’’. A Review. Chicago, IL: The American Dairy Products Institute, (2000).

Haider, T. ; Qayyum, H. ‘‘Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose’’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 72–80, (2007).

Hartree, E.F. ‘Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response, Agricultural Research Council’, *Unit of Reproductive Physiology and Biochemistry*, 307, (2004).

Hung, C.C. ve Santschi, P.H. 'Spectrophotometric determination of total uronic acids in seawater using cation-exchange separation and pre-concentration by lyophilization', *Analytica Chimica Acta.*, 427, 111–117, (2001).

Hung, C.C., Santschi, P.H., Gillow, J.B. 'Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II', *Carbohydr Polym.*, 6, 141–147, (2005).

Itoh, K. ; Toba, T. ; Itoh, T. ; Adachi, S. 'Properties of β -galactosidase of *Lactobacillus kefirianofaciens* K-1 isolated from kefir grains', *Letters in Applied Microbiology*, 15, 232–234, (1993).

İmİK, H. ve Şeker, E. 'Melas ve Hayvan Beslemede Kullanımı. Türk Veteriner Hekimliği Dergisi', 9 (2) : 36-42, (1997).

Jolly, L., Vincent, S.J.F., Duboc, P., Neeser, J.R. 'Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria', *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 367-374, (2002).

Karaalp, T. 'Bakteriyel Selüloz Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Değerlendirilmesi'. Yüksek Lisans Tezi, s.32, İstanbul Teknik Üniversitesi, (2007).

Karabulut, A. 'Yemler Bilgisi ve Yem Teknolojisi. U.Ü. Ders Notları', s.258, No: 67, Bursa, (1995).

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

Kim, W.J. ; Rajagopal, S.N. 'Isolation and Characterization of β -galactosidases from *Lactobacillus crispatus*', *Folia Microbiology*, 45(1), 29– 34, (2000).

Konsoula, Z. ; Liakopoulou-Kyriakides, M. 'Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates', *Bioresource Technology.*, 98, 150–157,(2007).

Krumm, S. 'WINFIT 1.2: version of November 1996 (The Erlangen geological and mineralogical software collection) of WINFIT 1.0: a public domain program for interactive

profile-analysis under WINDOWS'. XIII Conference on Clay mineralogy and Petrology, Praha, 1994. Acta Universitatis Carolinae, Geologica, 38, 253-261, (1996).

Krylova T., Popova L., Pechurkin N., Kashperova T., Belyavskaya V. 'Population Heterogeneity of Plasmidbearing and Plasmid-Free *Bacillus subtilis* Strains Under Different Environmental Conditions', *Microbiologia*, 69, 220-224, (2000).

Kuntiya A, Hanmoungjai P, Techapun C et al. 'Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute'. *Maejo Int J Sci Technol* 4: 318–330, (2010).

Küçükkaşık F, Kazak H, Güney D et al. 'Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp.' *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1729-1740, (2011).

Lacroix C.,Macedo M.G.,Gardner N.J.,Champagne C.P. ' Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate', *International Dairy Journal* 12, 419–426, (2002).

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

Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H. 'Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16/2, 71-75,(1997).

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 'Protein measurement with the Folin Phenol Reagent', *J Biol Chem.*, 193, 265-275, (1951).

Margaritis A., Pace G. W., Microbial Polysaccharides. In: Blanch H. W., Drew S., Wang D. I. C., editors, 1985 p. 'Comprehensive Biotechnology, vol. 3.The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products'. Oxford: Pergamon Pres,. 1005-44, (1985).

Mcdonald, P., Henderson, A.R, A.R., Heron, S.J.E. 'The Biochemistry of Silage'. (2. ed. Chalcombe Publ., Churchlane, Kingston, Canterbury, Kent, UK, (1991).

Moller S., Sternberg C., Andersen J., Christensen B., Ramos J., Givskov M., Molin, S. 'Insituexpression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members', *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 721-732, (1998).

Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK et al. 'Biosurfactants: properties, commercial production and application'. *Curr Sci* 94: 736–747, (2008).

Nagy, Z. ; Kiss, T. ; Szentirmai, A, and Biro, S. 'β-Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme, Protein Expression and Purification', 21, 24–29, (2001).

Olbrich H. 'The Molasses. Biotechnologie-Kempe GmbH Publishers'. Kleinmachnow, Germany, (2006).

Ophir, T., ve Gutnick, D. L. 'A Role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation', *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (2), 740-745, (1994).

Orujalipoor, I. 'Sikloheksen Orta Zincirli Polistiren veya Polikaprolakton Polimerlerinin Karakterizasyonu ve Sıcaklığa Bağlı Yapısal Davranışlarının İncelenmesi', Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2012).

Perry, D. B., McMahon, D. J. ve Oberg, C. J. 'Effect of exopolysaccharide- producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese', *J. Dairy Sci.*, 80, 799-805, Ramana- Rao, M.V. ; Dutta, S.M. Production of β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* ,1977, 34, 185– 188, (1997).

Ramana, K.V., Tomar, A. and Singh, L. 'Effect of Various Carbon and Nitrogen Sources on Cellulose Synthesis by *Acetobacter xylinum*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 245-248, (2000).

Ramesh H. P. and Tharanathan R. N. 'Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value', *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173, (2003).

Renyard, S.J., P.D. Whitehead. 'Milk Concentrates. The Technology of Dairy Products'. (ED. By. R. Early), 147 –166, (1991).

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

Sarıççek, B. Z., Ocak, N., Çayiroğlu, H. 'Vibrotal İlavesinin Kuru Çayır Otunun Rumen Parçalanabilirliği ve Toklularda Büyüme Performansı Üzerine Etkisi. *Hayvansal Üretimi*' (38), s.47-54, (1998).

Shaikh, S.A. ; Khire, J.M.; Khan, M.I. 'Production of β —galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. 'J. Ind. Microbiol. Biotech. , 19, 239– 245, (1997).

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

Sheridan, P. P. and Brenchley E. J. 'Characterization of a Salt-Tolerant Family 42 β -Galactosidase from a Psychrophilic Antarctic *Planococcus* Isolate', *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2438–2444, (2000).

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. ve Corrieu, G. 'The relative effect of milk base, starter and process on yoghurt texture: A review', *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrit.*, 44, 113-137, (2004).

Stiles, M. E. ve Holzapfel, W. H. 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29, (1997).

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

Sutherland I. W. 'Extracellular Polysaccharides'. In: Rehm H. J., Reed G., editors. *Biotechnology*, Weinheim VCH., 6, 615-57, (1996).

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

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

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

Svendsen, I., & Breddam, K. 'Isolation and amino acid sequence of a glutamic acid specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis*'. *European Journal of Biochemistry*, 204, 165-171, (1992).

Takada Y., H. Matsuyama, K. Kato, N. Kobayashi, J. Yamamura, M. Yahiro and S. Aoe. 'Milk Whey Protein Enhances The Bone Breaking Force in Ovariectomized Rats'. *Nutrition Research* 17 : 1709-1720, (1997).

Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C. 'Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56', *Research in Microbiology*, 154, 705-712, (2003).

Tarakçı, Z ve E. Küçüköner. 'Peyniraltı Suyu Proteinleri, Fonksiyonel Özellikleri ve Gıdalarda Kullanımı'. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu 22 – 23 Mayıs 2003 İzmir Bildiriler kitabı*(Editör: N. Akbulut). Isbn: 975-288-286-2. Sf: 329 – 334 *Tibyan Yayıncılık. İzmir*, (2003).

Tharek M, Ibrahim Z, Hamzah SH et al. 'Isolation, screening and characterization of soluble exopolymer-producing bacteria for enhanced oil recovery'. *Regional Postgraduate Conference on Engineering and Science (RPCES 2006)*, Johore: 649–654, (2006).

Troccon, J. L; Demarouilly, C. 'La Vinasse de molasse de betterave pour les ruminants. *INRA Station de Recherches sur la Vache Laitiere*', 35590 Saint-Gilles, *INRA L'nite de la Valeur Alimentaire, Theix 63122 Ceyrat*, (1989).

Wolfaardt G., Lawrence J., Robarts R., Caldwell S., Caldwell D. 'Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community', *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 434-446, (1994).

Welman, A.D., Maddox, I.S. 'Exopolysaccharides from lactic acid bacteria', *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274, (2003).

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

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





EKLER

8. EKLER

EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler

Triptic Soy Broth(TSB) (Merck, Fluka)

- Tripton 17,0 g
- Soya unu peptonu 3,0 g
- D(+) glukoz 2,5 g
- Sodyum klorür 5,0 g
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Triptic Soy Agar (TSA) (Merck)

- Tripton 17,0 g
- Soya unu peptonu 3,0 g
- D(+) glukoz 2,5 g
- Sodyum klorür 5,0 g
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g
- Agar 15,0 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri $7,0\pm0,2$ 'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. İzole edilen suşlar, TSA içeren tüplerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

EPS saflaştırma ve içerik tayininde kullanılan kimyasallar

- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich)
- Trikloraasetik asit (TCA) (Merck)
- Fenol (Merck)

- H_2SO_4 (Merck)
- Sodyum-potasyum tartarat- NaCO_3 reaktifi: 100 ml saf suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 10 g NaCO_3 çözülür.
- Sodyum-potasyum tartarat- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ reaktifi: 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 0,1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9 ml saf suda çözülür. Üzerine 1 ml 1 N NaOH ilave edilir.
- Folin-Ciocolteu reaktifi: 1 ml'si 15 ml saf su ile seyreltilir (çalışma esnasında günlük hazırlanır).
- Sulfomik asit (Sigma-Aldrich)
- Sodyum tetraborat (Sigma-Aldrich)
- m-hidroksifenil (Sigma-Aldrich)

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem ÇETİN

Doğum Yeri ve Tarihi : Acıpayam/DENİZLİ 12.07.1989

Lisans Üniversite : Gazi Üniversitesi

Elektronik posta : ozlem2019@hotmail.com

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

Konferans listesi :

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

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