



***Cytobacillus oceanisediminis* İLE BİYOAKTİF
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

Şeyda ALBAYRAK

**Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2023
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

***Cytobacillus oceanisediminis* İLE BİYOAKTİF EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**
(Production of Bioactive Exopolysaccharide by *Cytobacillus oceanisediminis*)

DOKTORA TEZİ

Şeyda ALBAYRAK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum
Aralık, 2023

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

***Cytobacillus oceanisediminis* İLE BİYOAKTİF EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Şeyda ALBAYRAK tarafından hazırlanan bu çalışma, 08/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (5./5.) ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Özlem BARIŞ Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. Burak ALAYLAR Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan “*Cytobacillus oceanisediminis* İLE BİYOAKTİF EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	1	30
Kuramsal Temeller	14	30
Materyal ve Metot	14	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	11	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	11	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Şeyda ALBAYRAK	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
27.12.2023	27.12.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, tez dönemim boyunca desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a,

Hayatımın her alanında olduğu gibi eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen güzel aileme,

Güzel ülkemizin huzur ve barış içerisinde yaşamasına vesile olan Gazilerimiz, Şehit ve şehit yakınlarına,

Son olarak sağladıkları burs imkanından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programına gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Şeyda ALBAYRAK

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Cytobacillus oceanisediminis İLE BİYOAKTİF EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Şeyda ALBAYRAK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, suda çözünebilir ekzopolisakkarit (EPS) üreten bakterilerin izole edilmesi, en verimli izolatan belirlenerek tanınması ve daha sonra en verimli izolattan saflaştırılan EPS'nin kimyasal yapısı ve bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmada kullanılan bakteriler, Erzurum'un farklı ilçelerinde bulunan çam orman topraklarından izole edildi. Suda çözünebilir EPS üretimi için seçilen en iyi izolat konvensiyonel ve moleküler yöntemlere göre tanımlandı. En iyi izolat ile maksimum EPS üretimi için bazı kültür koşulları (sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi) optimize edildi. EPS'nin karakterizasyon aşamasında, çözünürlüğü (farklı solventlerde), karbonhidrat içeriği (fenol-sülfürik asit yöntemiyle), protein içeriği (Warburg-Christian yöntemi ve Bradford yöntemiyle), monomer bileşimi (HPLC analiziyle), fonksiyonel grupları (FT-IR ile) ve molekül ağırlığı (viskozite bazlı yöntemle) araştırıldı. EPS'nin farmasotik potansiyelini ortaya çıkarmak için onun antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, anti-aging ve antiobezite aktiviteleri test edildi.

Bulgular: En yüksek miktarda suda çözünebilir EPS üreten izolat (DT3-C) konvensiyonel ve moleküler yöntemlere göre *Cytobacillus oceanisediminis* (GenBank: OR826625) olarak tanımlandı. Bu izolat ile EPS üretimi için en uygun koşullar, 8,0'lık başlangıç pH'sı, 35°C'lik inkübasyon sıcaklığı ve 48 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlendi. EPS'nin sudaki çözünürlüğünün organik çözücülerdeki çözünürlüğünden çok daha yüksek olduğu belirlendi. EPS'nin ramnoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz ve glukoz monomerlerinden oluşan bir heteropolisakkarit olduğu gösterildi ve molekül ağırlığı 142 Da olarak belirlendi. EPS'nin antikanser (akciğer, kolon, nöroblastoma ve prostat kanseri hücre dizileri üzerinde), antioksidan (DPPH, hidroksil, süperoksit ve nitrik oksit radikallerine karşı), yaşlanma karşıtı (dermal fibroblastlar üzerinde) ve antiobezite aktiviteleri sergilediği, ancak test edilen patojenlerden herhangi birine karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği bulundu.

Sonuç: *C. oceanisediminis* ile EPS üretimi literatürde ilk kez gerçekleştirildi. EPS'nin heteropolisakkarit bir yapıya sahip olduğu ve çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyebildiği gösterildi. Bu nedenle, *C. oceanisediminis*'ten elde edilen EPS'nin; gıda, biyomedikal, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde insan yararına uygulama alanı bulabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cytobacillus oceanisediminis*, ekzopolisakkarit, antioksidan, antikanser, anti-aging, antiobezite

Aralık 2023, 113 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

PRODUCTION OF BIOACTIVE EXOPOLYSACCHARIDE BY *Cytobacillus oceanisediminis*

Şeyda ALBAYRAK

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: The aims of this thesis study were to isolate water-soluble exopolysaccharide (EPS) producing bacteria, to determine and identify the most productive isolate, and then to investigate the chemical structure and some biological activities of EPS purified from the most productive isolate.

Method: Bacteria used in the study were isolated from pine forest soil samples taken from different districts of Erzurum. The best isolate selected for water-soluble EPS production was identified according to conventional and molecular methods. Some culture conditions (temperature, pH and incubation time) were optimized for maximum production of EPS by the best isolate. the highest EPS production. In the characterization stage of EPS, its solubility (in different solvents), carbohydrate content (by phenol-sulfuric acid method), protein content (by Warburg-Christian method and Bradford method), monomer composition (by HPLC analysis), functional groups (by FT-IR) and molecular weight (by viscosity-based method) were investigated. To reveal the pharmaceutical potential of EPS, its in vitro antimicrobial, anticancer, antioxidant, anti-aging and antiobesity activities were tested.

Findings: The isolate (DT3-C) producing the highest amount of water-soluble EPS was identified as *Cytobacillus oceanisediminis* (GenBank: OR826625) according to conventional and molecular methods. The optimal culture conditions for EPS production by this isolate were determined as an initial pH of 8, an incubation temperature of 35°C and an incubation time of 48 h. The solubility of EPS in water was found to be much higher than its solubility in organic solvents. EPS was shown to be a heteropolysaccharide consisting of rhamnose, xylose, arabinose, fructose and glucose monomers, and its molecular weight was determined as 142 Da. EPS exhibited anticancer (on lung, colon, neuroblastoma and prostate cancer cell lines), antioxidant (against DPPH, hydroxyl, superoxide and nitric oxide radicals), anti-aging (on dermal-fibroblast) and antiobesity activities, but no antimicrobial activity against any of the tested pathogens.

Result: EPS production by *C. oceanisediminis* was performed for the first time in the literature. The EPS was shown to have a heteropolysaccharide structure and can exhibit diverse biological activities. Therefore, it is anticipated that EPS derived from *C. oceanisediminis* may find application in the food, biomedical, cosmetic and pharmaceutical industries for human benefit.

Keywords: *Cytobacillus oceanisediminis*, exopolysaccharide, antioxidant, anticancer, anti-aging, anti-obesity

December 2023, 113 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Mikroorganizmaların Endüstriyel ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Metabolitleri.....	4
Enzimler	5
Tek hücre proteinleri	11
Biyoyakıtlar.....	11
Sekonder metabolitler	12
Antikanser peptitler.....	12
Pigmentler	13
Organik asitler	14
Polisakkaritler	17
Mikrobiyal Ekzopolisakkarit.....	18
Selüloz.....	19
Levan.....	20
Pullulan	20
Kurdlan.....	21
Ksantan.....	21
Gellan	22
Aljinat.....	22
Hyalüronik asit.....	22
Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi	23
Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar.....	24
EPS üretimini etkileyen faktörler	24

Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları	25
MATERYAL VE METOT	27
Materyal	27
Çalışmada kullanılan cihazlar	27
Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması	27
Çalışmada kullanılan kimyasallar	29
Metot	30
Mikroorganizmaların izolasyonu	30
İzolatların EPS üretim kapasitelerinin karşılaştırılması	31
Seçilen izolatın konvensiyonel yöntemlerle karakterizasyonu	31
Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi.....	32
EPS Üreten İzolatın Moleküler Tanılaması	32
Genomik DNA izolasyonu.....	32
16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu	32
16S rRNA PCR jel elektroforezi.....	33
Kompetent hücrenin hazırlanması	34
Koloni PCR reaksiyonu	34
Plazmit izolasyonu ve konsantrasyonlarının tespiti	35
DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağacın oluşturulması ..	35
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> DT3-C ile EPS Üretiminin Optimizasyonu.....	36
Optimal sıcaklığın belirlenmesi	36
Optimal pH değerinin belirlenmesi.....	36
Optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi.....	36
EPS'nin Total Üretimi	37
Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu	37
Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi	37
Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi	37
Protein içeriğinin belirlenmesi	38
Monomer kompozisyonunun belirlenmesi.....	38
Fonksiyonel grup analizi	39
Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi	39
Antimikrobiyal aktivite	39
EPS'nin antikanser aktivitesi	40
EPS' nin <i>in vitro</i> Antioksidant Aktivite Tayini	40
DPPH radikali giderme potansiyeli.....	40

Süperoxide radikali temizleme potansiyeli	40
EPS'nin ABTS radikali temizleme potansiyeli	41
EPS'nin hidroksil radikali temizleme potansiyeli	41
Nitrik oksit radikali temizleme aktivitesi	42
EPS'nin <i>in vitro</i> Anti-Aging Aktivite Tayini	42
Dermal fibroblast hücrelerinde EPS'nin antiaging aktivitesi.....	42
Dermal fibroblast hücrelerinde ROS seviyelerinin araştırılması	43
<i>In vitro</i> Antiobezite Etki.....	43
Hücre kültürü ve adiposit farklılaşması	43
Adipositlerde hücre içi lipit birikimi üzerine EPS'nin etkisi.....	44
Adiposit hücre hattı üzerine EPS' nin sitotoksik etkisi	44
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	45
Bakterilerin İzolasyonu ve EPS Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi.....	45
Seçilen İzolatın Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu	46
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> ile EPS Üretiminin Optimizasyonu.....	49
Optimal sıcaklığın belirlenmesi	49
Optimal pH değerinin belirlenmesi.....	50
Optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi.....	51
EPS'nin Total Üretimi	52
Üretilen EPS'nin Karakterizasyonu	52
Farklı solvent içerisinde çözünürlüğünün belirlenmesi	52
Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi	53
Protein İçeriğinin Belirlenmesi	55
Warburg-Christian yöntemi	55
Bradford yöntemi	55
Monomer kompozisyonunun belirlenmesi.....	56
Saflaştırılan EPS' nin Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile fonksiyonel gruplarının analizi	58
EPS' nin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	60
Üretilen EPS'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	61
Antimikrobiyal aktivitenin araştırılması	61
EPS'nin antikanser etkinliğinin araştırılması.....	62
EPS'nin Antioksidant Potansiyelinin Araştırılması.....	64
EPS' nin <i>in vitro</i> anti-aging aktivite tayini	66
<i>In vitro</i> Antiobezite Etki.....	70

SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	99



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Enzim Sınıfları, Reaksiyon Türleri ve Karşılık Gelen Enzimler.....	6
Tablo 2. Mikrobiyal Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları	6
Tablo 3. Mikrobiyal Enzimlerin Bazı Terapötik Uygulamaları	8
Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Markaları.....	27
Tablo 5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları	29
Tablo 6. 16S rRNA PCR İşleminde Kullanılan Reaktifler	33
Tablo 7. PCR Programı.....	33
Tablo 8. Koloni PCR Programı.....	35
Tablo 9. İzolatların Biyokütle ve EPS Üretme Kapasiteleri	45
Tablo 10. Sıcaklığın EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi	50
Tablo 11. pH'nın EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi	51
Tablo 12. İnkübasyon Süresinin EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi	51
Tablo 13. EPS'nin Farklı Çözücülerdeki Çözünürlüğü	53
Tablo 14. Standart Grafiğin Oluşturulması İçin Hazırlanan Glikoz Miktarı ve Absorbans Değerleri.....	54
Tablo 15. Protein Miktar Tayini İçin Alınan Spektrofotometrik Sonuçlar.....	55
Tablo 16. Total Protein Tayini İçin Oluşturulan Standartın Absorbans Ölçümleri.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Toprakтан izole edilen suşların bazılarının petri görüntüleri	46
Şekil 2. DT3-C kodlu izolatın petri görüntüsü	46
Şekil 3. DT3-C Kodlu izolatın 16S rRNA Jel görüntüsü	47
Şekil 4. Mavi- beyaz koloni görüntüsü	47
Şekil 5. Koloni PCR görüntüsü M;Markır (BioLabs N0550S), 4,6,11,14,15 ve 17 Pozitif olarak alınan örnekler	48
Şekil 6. DT3-C kodlu <i>Cytobacillus oceanisediminis</i> ile filogenetik ağaç çizimi.....	49
Şekil 7. Başlangıçtan ürüne kadar adım adım EPS üretimi.....	52
Şekil 8. <i>C. Oceanisediminis</i> 'ten elde edilen EPS'nin fenol-sülfürik asit muamelesi sonucu gözlenen renk değişimi (soldaki tüp kör, sağdaki tüp EPS+fenol sülfirik asit)	54
Şekil 9. Fenol-sülfürik asit yönteminde kullanılan glukoz standart grafiği	54
Şekil 10. Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan BSA standart grafiği	56
Şekil 11. HPLC analizi ile monomer kompozisyonun belirlenmesi	58
Şekil 12. EPS' nin FT-IR spektrumu	60
Şekil 13. <i>Cytobacillus oceanisediminis</i> 'in ürettiği EPS'nin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	62
Şekil 14. EPS' nin farklı konsantrasyonlarının A-549 (A), SHSY-5Y(B), DU-145 (C) ve HT-29 (D) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi.....	63
Şekil 15. EPS uygulamasının hücre hatlarının canlılığı üzerindeki etkinliği.....	64
Şekil 16. EPS' nin farklı radikallere karşı antioksidant potansiyeli	66
Şekil 17. Dermal fibroblast hücrelerinde EPS'nin antiaging aktivitesi.....	69
Şekil 18.Dermal fibroblast hücrelerinde hücre içi ROS seviyeleri üzerine EPS'nin etkisi	69
Şekil 19. Adiposit hücre hattında (3T3-L1) lipid birikimi üzerine EPS' nin etkisi.....	71

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
BSA	: Bovine serum albümin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: 2,2',2'',2'''- (Ethane-1,2-diyl dinitrilo) tetraasetik asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
EtOH	: Etil alkol
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	: Gram
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HePS	: Heteropolisakkarit
HoPS	: Homopolisakkarit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
kDa	: Kilodalton
LAB	: Laktik asit bakterisi
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molarite
ml	: Mililitre
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Potansiyel hidrojen
TCA	: Trikloroasetik asit
TSA	: Tryptone Soya Agar
TSB	: Tryptone Soya Broth
µl	: Mikrolitre

GİRİŞ

Polisakkaritler doğada bol miktarda bulunan farklı organizmalar tarafından sentezlenebilen yenilenebilir, biyoyumlu polimerlerdir. Polisakkaritlerin en önemli kaynakları bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardır. Bununla birlikte, hızlı üremeleri, kültür koşullarının daha kolay kontrol edilebilmesi, ucuz substratlar üzerinde geliştirilebilmeleri ve ürün saflaştırmalarının daha kolay olması gibi birçok sebepten dolayı polisakkaritlerin üretiminde bitki ve hayvanlara kıyasla mikroorganizmalar daha çok tercih edilmektedir (Raveendran *et al.* 2018; Gabriel *et al.* 2020; Sharma *et al.* 2020; Song *et al.* 2023).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin (EPS) üretimi esas olarak sıvı kültürlerde gerçekleştirilmektedir. Üretimde verimi arttırmak için sıcaklık, pH, azot ve karbon kaynakları, inkübasyon süresi gibi kültür koşulları optimize edilmektedir. Üretimden maliyetin azaltılması açısından da karbon ve/veya azot kaynağı olarak ucuz organik atıklardan ya da yan ürünlerden yararlanılmaktadır. Üretilen ekzopolisakkaritlerin karakterizasyonunda spektrofotometre, FT-IR, HPLC, NMR ve SEM gibi cihazlardan faydalanılmaktadır. (Castellane *et al.* 2015; Vinothkanna *et al.* 2021).

Bulunmuş olduğu yere göre mikrobiyal polisakkaritler genel olarak hücre içi depo polisakkaritleri (glikojen), kapsüler polisakkaritler (örn. K30 O-Antijen) ve ekzopolisakkaritler olarak bilinen hücre dışı polisakkaritler (örn. levan, ksantan, sfingan, aljinat, pullulan, selüloz, vb.) olmak üzere üçe ayrılabilir. Kapsüler polisakkaritler patojenite ve virulans faktörü ile ilişkili iken ekzopolisakkaritlerin çoğu biyoyumlu ve işlevsel olup biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Schmid and Sieber, 2015; Schmid *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015).

Ekzopolisakkaritlerin molekül ağırlığı 10-1000 kDa arasında değişmektedir. Diğer polisakkaritlerde olduğu gibi mikrobiyal ekzopolisakkaritlerde monomer tipine göre homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler tek tipte monomerlerden oluşurken, heteropolisakkaritlerde monomer tipi iki ve daha fazla sayıda olmaktadır. Homopolisakkaritlerden levan fruktoz, pullulan maltoz, dekstran ise glukoz monomerinden oluşmaktadır (Bajpai *et al.* 2016; Abarquero *et al.* 2022). Farklı monomerlerden oluşan heteropolisakkaritler yüklü ya da nötr şeker karışımı olarak da adlandırılmaktadır. Aynı zamanda fosfat, glukozil asetil, protein, glikolipitler vb. gibi şeker olmayan birimleri içerebildiği gibi organik ve inorganik bileşenleri de içerebilmektedir.

Örneğin; gellan zımkı, ramnoz, glikoz ve galaktozdan oluşan bir heteropolisakkarittir (Asgher *et al* 2020; Osemwegie *et al.* 2020).

EPS'lerin biyolojik aktivitelerini, çözünürlüklerini ya da fonksiyonlarını sahip oldukları monomer kompozisyonu, moleküler ağırlığı ve sülfat grupları gibi diğler bileşenlerin varlığı etkilemektedir. Örneğın sülfat gruplarının ve düşük moleküler ağırlığın EPS'lerin sudaki çözünürlüğünü arttırdığı bu sayede de daha yüksek biyolojik aktivite göstermelerine katkı yaptığı açıklanmaktadır (Kiddane and Kim 2021; Kang *et al.*, 2022; Yang *et al.*2022). Bu yüzden yapılan çalışmalarda EPS'lerdeki fonksiyonel grupların modifikasyonu (fosfat gruplarının eklenmesi gibi) ve moleküler ağırlığın değıştirilmesi şeklinde yaklaşımlarla EPS'lerin biyolojik aktiviteleri artırılmaktadır (Li *et al.*2016; Wang *et al.*2018; Rana and Upadhyay 2020).

Yapılan çalışmalarda EPS'lerin antioksidan, antiaging, antikanser, antibakteriyel, antifungal, antitrombotik, antiparazitik, antiviral, anti-inflamatuar ajan, kolesterol düşürücü, antiobezite, antidiyabetik ve bağışıklık düzenleyici gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bu yüzden de hastalıkların engellenmesinde potansiyel ilaç adayları olabileceğı açıklanmaktadır. Bu moleküller yine sağık alanında doku mühendisliği ve yara iyileşmesi çalışmalarda da kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2008; Li *et al.* 2015; Trabelsi *et al.* 2017) Gıda endüstrisinde biyoemülgatörler, jelleştirici ajanlar, biyostabilizatörler, kozmetik endüstrisinde ise kırışıklıkları giderme, deriyi nemlendirme ve elastikiyeti koruma özellikleri sayesinde deri-yaşlanma karşıtı moleküller olarak kullanılabilmektedir (Nwodo *et al.* 2012; Xu *et al.*2019; Korcz and Varga 2021).

Günümüzde gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde sentetik katkı maddeleri yerine doğal ürünlere olan ilgi her geçen gün daha da artmaktadır. Örneğın ticari olarak üretimi gerçekleştirilen ve işlevsel olarak büyük öneme sahip mikrobiyal EPS'lerden; kurdlan, selüloz, aljinat gellan, levan, pullulan, ksantan ve hiyalüronik asit endüstriyel pazarın büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Rana and Upadhyay 2020). Mikrobiyal polisakkaritler bakteri, küf ve maya gibi organizmalar tarafından üretilmektedir. EPS üreten bakterilere; *Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Xanthomonas campestris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Thermococcus litoralis*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus gonensis* örnek verilmektedir (Bibi *et al.*2021; Karadayi *et al.*2021; Yang *et al.*2023).

Bununla birlikte tez çalışmasında kullanılan *Cytobacillus oceanisediminis* türünün EPS üretme yeteneğı üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dahası bu türün diğler biyoteknolojik potansiyelleri üzerine de literatürde sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır (Baltacı, 2022; Yadav *et al.*2022; Ning *et al.*2023; Tarasov *et al.*2023; Yang *et al.*2023) Söz

konusu çalışmalarda da bakterinin probiyotik olarak kullanılma potansiyeli, Okratoksin A detoksifikasyonu, selülaz aktivitesi, lipaz, amilaz aktiviteleri araştırılmış olup EPS retme yeteneğinden bahsedilmemiştir.



KURAMSAL TEMELLER

Mikroorganizmaların Endüstriyel ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Metabolitleri

Gözle görülemeyen canlılar olan mikroorganizmalar, hayatımızın her alanında bize eşlik etmektedir. Yaşamlarımız üzerindeki etkisinin ne kadar belirleyici olduğu, hangi sorunlara neden olduğu, onlardan ne kadar faydalandığımızı ve etkilerinin ne kadar fazla olduğunu çoğu zaman fark etmeyiz. Mikroorganizmalar toplumların, siyasetin ve tarihin gelişiminde de sıklıkla belirleyici bir rol oynamaktadır. Örneğin 14.yy'daki kara veba salgını Avrupa'nın tarihine yön vermiştir. Yine son yıllarda hastalıklara sebep olan bakteri/virüsler yüzünden ekonomide ciddi değişiklikler oluşmuştur. Bunlara rağmen, mikroorganizmaların çoğu zararsızdır ve birçoğu aslında insanlara faydalıdır. Örneğin peynir, yoğurt ve diğer fermente gıdaların yapımında, antibakteriyel, antifungal, antiparazit, antiviral ve antikanser, ilaçların üretiminde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar bağırsak mikrobiyomun önemli bir kısmını oluşturmakla birlikte çevre kirliliklerinin gideriminde, petrol atıklarının uzaklaştırılmasında, ağır metal giderimi gibi çeşitli biyoremediasyon çalışmalarında yine mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Nowak *et al.*2017; Filote *et al.*2022; Kaur *et al.*2022).

Mikroorganizmalar; endüstriyel, tıbbi, mühendislik alanlarının yanı sıra savunma sanayi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle gıda, kozmetik, çevre ve ilaç sektöründe kullanılan ana ürünleri daha sürdürülebilir bir şekilde elde etmek için alternatif prosesler aranmaktadır. Bunun altında yatan en temel sebep ise, sentetik katkı maddeleri yerine doğal ürünlere olan yoğun talep ve ilgidir. Endüstriyel biyoteknoloji bu amaç için umut verici bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu alanın başarısı ise büyük ölçüde uygun bir mikroorganizmanın mevcudiyetine bağlıdır. Günümüzde biyoteknolojik proseslerde popüler olan biyosüpfaktan, aroma verici maddeler, mikrobiyal yağlar ve polisakkarit üretimi gibi çalışmalarda bulunan bir kişinin önündeki en önemli problemlerden birisi; istediği bu proseslerde kullanabileceği mikroorganizma elde etmektir. Genelde araştırmacı, uygun mikrobu bulmak için çöpler, tarımsal/endüstriyel atıklar, bozulmuş gıdalar, ekstrem ortamlar gibi çeşitli alanlarda taramalar yapmaktadır. Sonuç olarak insanlara fayda sağlayan ürünleri üretmek veya üretim süreçlerini geliştirmek için bu canlı organizmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Pessôa *et al.* 2019; Khan 2020).

Mikroorganizmaların biyoteknolojideki uygulamalarında sadece bakteriler değil makro/mikro algler, mayalar ve küfler de yer almaktadır. Mikroorganizmalar ile lipaz, amilaz,

tannaz, proteaz, invertaz, pektinaz gibi enzimlerin yanısıra pigment, organik asit, polisakkarit, sitrik asit, laktik asit, tek hücre proteinleri, antikanser peptit, etil alkol, glukonik asit gibi endüstriyel öneme sahip birçok maddenin üretimi gerçekleştirilmektedir (Rastegari *et al.*2020).

Enzimler

Enzimler kimyasal reaksiyonları yönlendiren, protein yapısında bulunan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, metabolizma, enerji üretimi ve sindirim dahil olmak üzere birçok biyokimyasal reaksiyon için gereklidir. Vücutta karaciğer, epitel, pankreas ve kas dahil olmak üzere tüm vücut dokularında bulunmaktadır. Binlerce farklı enzim türü bulunmaktadır; bu enzimlerin spesifik ortamları ve işlevleri farklılık göstermektedir (Gurung *et al.*2013; Ray *et al.* 2017) Enzimler temel olarak 6 sınıftan oluşmaktadır, enzimlerin isimleri ve katalizledikleri reaksiyonlar özet halinde Tablo1.de gösterilmiştir.

Piyasada 4000'den fazla enzim tanımlanmış olup bunların 200'ü endüstriyel amaçlı kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzimler elde edilmesinin teknik kolaylığı, ekonomik yapılabilirliği, ürün geri kazanımı, toksik yan ürün oluşturmamaları ve optimizasyonunun kolay olması nedeniyle ticari uygulamalarda genellikle tercih edilmektedir (Choi *et al.*2015; Aslam *et al.*2020). Enzim endüstrisi, biyoteknolojik proseslerdeki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda hızlı bir ilerleme göstermiştir. Enzim sayısı arttırılmakla kalmamış, enzimlerin verimliliği ve üretimde geliştirilmiştir. Ayrıca, etkili alt işlem ve immobilizasyon stratejileri, enzimlerin stabilitesinin, saflığının ve yeniden kullanılabilirliğinin arttırılmasına büyük ölçüde yardımcı olmuştur. Ticari enzimlerin neredeyse %90'ı mühendislik ürünüdür (Adrio *et al.*2014).

Geçmiş dönemlerde peynir, şarap, bira ve sirke yapımında kullanılan enzimler, rekombinant gen teknolojisinin de ilerlemesi ile hormon ve ilaç gibi yeni moleküllerin sentezlemesinde de kullanılmaktadır (Homaei 2015). Bunun yanında deterjan, deri işlemesi, gıda endüstrisi uygulamaları hatta çevre kirliliğine sebep olan atıkların bertaraf edilmesinde de enzimler yer almaktadır (May 2019). Endüstriyel ölçekli üretilen enzimlerin %75'ini hidrolazlar oluşturmaktadır. Biyoteknolojik şirketlerden olan Novozymes, Dupont, Roche ve DSM dünya enzim pazarında ön sıralarda yer almaktadır (Liu *et al.*2023). Endüstriyel enzimler için küresel talep istikrarlı bir şekilde artmakta ve 2023 yılına kadar 7,0 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %60'ı mantarlardan, %24'ü bakterilerden, %4'ü mayalardan, geri kalan %10'u ise bitki ve hayvan kaynaklarından üretilmektedir (Arun 2018). Mikropların farklı biyoproseslerde kullanımı ve ürettikleri ürünler Tablo 2.de özetlenmiştir. Mikrobiyal enzimlerin farklı sağlık sorunlarına yönelik uygulamalarına Tablo 3. de gösterilmiştir (Singh *et al.*2016).

Tablo 1. Enzim Sınıfları, Reaksiyon Türleri ve Karşılık Gelen Enzimler

Sınıf	Reaksiyon	Enzim
Oksidoredüktaz	Moleküller arasında hidrojen, oksijen veya elektronların transferi.	Dehidrojenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, peroksidazlar
Transferaz	Atom gruplarının bir molekülden diğerine aktarılması.	Fruktosiltransferazlar, transketolazlar, asiltransferazlar, transaminazlar
Hidrolaz	Bağların hidrolitik bölünmesi	Proteazlar, amilazlar, asilazlar, lipazlar, fosfatazlar, kütinazlar
Liyaz	Eliminasyon veya ekleme reaksiyonlarıyla hidrolitik olmayan bölünme	Pektat liyazlar, hidratazlar, dehidratazlar, dekarboksilazlar, fumaraz, argino süksinaz
İzomeraz	Bir molekül içinde grubun bir pozisyonundan diğerine transferi	İzomeraz, epimeraz, rasemazlar
Ligaz	ATP veya benzer trifosfatlardaki enerji açısından zengin bir bağın hidrolizi ile birlikte iki molekülün kovalent bağlanması	Sentetazlar, ligazlar

Tablo 2. Mikrobiyal Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları

Endüstri	Enzim	Enzim Fonksiyonu	Mikroorganizma
Süt	Transglutaminaz	Protein çapraz bağlama	<i>Streptomyces</i> sp.
	Asit proteinaz	Süt kuagülasyonu	<i>Aspergillus</i> sp.
	Nötr Proteinaz	Peynir olgunlaşması	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>A. oryzae</i>
	Lipaz	Peynir tadını özelleştirmek	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>
	Laktaz	Laktozu azaltılmış süt ve peynir altı suyu ürünleri	<i>Escherichia coli</i> , <i>Kluyveromyces</i> sp.
	Aminopeptidaz	Peynir olgunlaşması	<i>Lactobacillus</i> sp.
	Katalaz	Peynir olgunlaşması	<i>Aspergillus niger</i>
	Aminopeptidazlar	Acılık giderme	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. plantarum</i>
İçecek	Pektinaz	Depektinizasyon	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>
	Glukoz oksidaz	Biradan oksijenin uzaklaştırılması	<i>Aspergillus niger</i>
	Selülaz	Meyve sıvılaştırma	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
	Amilaz(L,B)	Nişasta hidrolizi	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rhizopus</i>
	B-Glukanaz	Bulanıklık giderme	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus</i> spp.

Tablo 2. (devamı)

Hayvan Yemi	Proteaz	Bulanıklık giderme	<i>Aspergillus niger</i>
	Pullulanaz	Niştastanın şekerde dönüştürülmesi	<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.
	Naringinaz	Acılık giderme	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>
	Limoninaz		
	Fitaz	Fosfor açığa çıkarmak için fitik asit hidrolizinde	<i>Aspergillus niger</i>
	Ksilanaz	Niştastanın sindirilebilirliğinin artırılmasında	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.
	B-glukanaz	Sindirime yardımcı	<i>Aspergillus niger</i>
	Lipaz	Boya kontrolü	<i>Candida antarctica</i>
	Proteaz	Biyofilm giderme	<i>Bacillus subtilis</i>
	Amilaz	Mürekkep giderme, drenaj iyileştirmesi	<i>Bacillus licheniformis</i>
Kağıt	Ksilanaz	Ağartıcı güçlendirme	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>
	Lakkaz	Klorsuz ağartma, delignifikasyon	<i>Bacillus subtilis</i>
	Selülaz	Mürekkep giderme, drenaj iyileştirmesi	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>
	Amilaz	Karbonhidrat lekesi çıkarma	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i>
	Lipaz	Yağ lekesi giderme	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. flavus</i> ,
	Proteaz	Protein lekesi çıkarma	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
	Selülaz	Renk açıklama	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus</i> sp.
	Kütinaz	Trigliserit giderimi	<i>Fusarium solani</i> f. <i>pisi</i>
	Mannanaz	Mannan leke çıkarma	<i>Bacillus</i> sp.
	Lipaz	Polikondensasyon, Laktonlar, Karbonatlar	<i>Candida antarctica</i>
Polimer	Lakkaz	Bisfenol A'nın polimerizasyonu	<i>Trametes hirsuta</i>
	Glikoz oksidaz	Anilinlerin polimerizasyonu	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
	Transglutaminaz	Proteinin çapraz bağlanması	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
	Tirozinaz	Lignin ve kitosanın polimerizasyonu	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>

Tablo 3. Mikrobiyal Enzimlerin Bazı Terapötik Uygulamaları

Tedavi	Enzim	Mikroorganizma
Antikanser	L-Asparaginaz, L-glutaminaz, L-tirozinaz, galaktosidaz	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas acidovorans</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Acinetobacter</i>
Anti-inflamatuvar	Süperoksit dismutaz, Serrapeptaz	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> <i>Glutamicum</i> ,
Antikoagulant	Streptokinaz, ürokinaz	<i>Streptococci</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i>
Antibiyotik sentezi	Penisilin oksidaz, rifamisin B oksidaz	<i>Penicillium</i> sp.
Antioksidan	Süperoksit dismutazlar, glutatyon peroksidazlar, katalaz	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>
Cilt	Kollajenaz	<i>Clostridium perfringens</i>
Detoksifikasyon	Lakkaz, Rodanese	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Antibiyotik direnci	b-Laktamaz	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Antiviral	Ribonükleaz, Serrapeptaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Gut	Ürikaz	<i>Aspergillus flavus</i>
Sindirim Bozukluğu	a-Amilaz, lipaz	<i>Bacillus</i> spp., <i>Candida lipolytica</i> , <i>A. oryzae</i>
Siyanür zehirlenmesi	Rodanaz	<i>Sulfobacillus sibiricus</i>

Endüstriyel öneme sahip enzimlerden bahsetmek gerekirse: Proteazlar, protein ve polipeptitleri oluşturan aminoasitler arasındaki amid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Proteazlar, ana besin kaynaklarımızdan biri olan proteinlerin vücuda alındıktan sonra parçalanması, işlenmesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alır. Kan pıhtılaşması, hücre ölümünün kontrolü ve doku farklılaşması gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir. Canlı vücudunda üstlendikleri görevlere ek olarak gıda (özellikle fırıncılık sektöründe), ilaç, deri, deterjan ve fotoğrafçılık gibi birçok alanda da kullanılmaktadır (Wolfe 2009). Proteazlar, kökenlerine, katalitik aktivitelerine ve reaktif grubun doğasına göre sınıflandırılmaktadır. Bu enzimlerin başlıca kaynakları mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerdir. Mikrobiyal proteazlar hücre dışı veya hücre içi olarak üretilmektedir. Bu enzimlerin mikrobiyal üretimi; türler arasında farklılık göstermekte olup, sıcaklık, beslenme, çözünmüş

oksijen konsantrasyonu, inorganik tuzlar, pH, nitrojen ve karbon kaynakları ve çalkalama gibi kültür parametrelerinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Kuddus *et al.*2008; Kasana *et al.*2011).

Proteazlar; polipeptit zincirleri üzerindeki etki yerine göre ikiye ayrılır, bunlar ekzopeptidaz ve endopeptidaz'dır. Ekzopeptidazlar, serbest bir N-terminal amino grubu, C-terminal karboksil grubu veya her ikisini birden içeren aminoasit dizilerindeki bağı hidroliz yapabilmektedir. Ekzopeptit, bir protein veya peptit substratının amino ucundaki peptitleri parçalayan proteolitik bir enzimdir. Yaşamın her alanında bulunmakla birlikte; protein dönüşümü, sinyal iletimi, hücre proliferasyonu gibi birçok hücresel süreçte de önemli rol oynamaktadır. Ekzopeptidazlar ayrıca aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar, dipeptidilpeptidazlar, peptidil-dipeptidazlar, tripeptidilpeptidazlar ve dipeptidazlar olarak 6 gruba ayrılmaktadır (Song *et al.* 2023).

Protein substratının karboksil ucundaki peptid bağı parçalayan enzim endopeptidaz olarak adlandırılmaktadır. Ekzopeptidazlar, polipeptit zincirlerinin uçlarına etki ederken, endopeptidazlar ise polipeptit zincirlerinin iç bölgelerinde gelişmiş hareket etmektedir. Endopeptidazlar, aktif bölgelerinde bulunan katalitik kalıntıya göre sistein, glutamik asit, treonin, metallo, aspartik ve serin proteaz olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır. Endopeptidaz, proteinlerin uygun şekilde parçalanmasını ve geri dönüştürülmesini sağladığı için hücrenin protein döngüsünün önemli bir bileşenidir. Sonuç olarak, ekzopeptidaz ve endopeptidazların keşfi ilaç geliştirilmesinde önemli birer hedeftir (Rawlings *et al.*2018; Mubeen *et al.*2023)

Günümüzde mikrobiyal proteazlar; fırıncılık, biracılık, deterjan, deri yapımı, eczacılık, et yumuşatma, kozmetik, tıbbi teşhis gibi çeşitli alanlarda kullanılmakla birlikte, özellikle son yıllarda yem endüstrisinde, atıkların arıtımı-yeniden kullanılması çalışmalarında da geniş kapsamlı uygulamaları bulunmaktadır (Asitok *et al.*2022; Cupi *et al.*2022). Endüstriyel alanda proteaz üreticisi mikroorganizmalara; *Bacillus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Candida* ve *Pseudomonas* türleri örnek verilebilir (Ariyaei *et al.*2019; Pereira *et al.*2020; Tekin *et al.*2020; Mechri *et al.*2021).

Lipazlar, geleneksel olarak apolar, suda çözünmeyen ester substratlarını hidroliz eden lipidlerin ve yağların ester bağlarını parçalayarak; yağ asitlerine, gliserole ve diğer alkollere dönüştüren enzimlerdir. Temel fonksiyonu trigliseritlerin hidrolizini sağlamak, transesterifikasyon, esterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir. Enzimin uygulamaları arasında; özel organik sentezler, katı ve sıvı yağların hidrolizi, yağların modifikasyonu, gıda işlemede lezzetin artırılması, rasemik karışımların çözülmesi ve kimyasal analizler yer alır (Muthumari *et al.*2016; Melani *et al.* 2020). Bu çok yönlülük lipazların ilaç, kozmetik, gıda, tekstil, deterjan, deri ve kağıt sanayisinde yaygın olarak kullanılan endüstriyel

enzimlerden biri haline getirmektedir. Özellikle mikrobiyal lipazlar, endüstriyel açıdan önemli biyokatalizörler olması nedeniyle bu enzimi üreten mikroorganizmaların taranması, üretimi ve saflaştırılması var olan ihtiyaçları karşılamak için önemlidir. Bu alanda en fazla kullanılan mikroorganizma cinslerine; *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Bacillus* ve *Streptomyces* örnek verilebilir (Hwang *et al.*2014; Borrelli *et al.*2015; Lima *et al.*2018; Triyaswati *et al.*2020; Ali *et al.*2023).

Amilazlar, nişastayı ve çeşitli sakkaritleri hidrolize edebilen enzimler olup, en iyi bilinenleri α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazdır. Amilazlar bakteriler, mantarlar, mayalar ve hatta insanlara kadar çeşitli organizmalar tarafından üretilmektedir. Organizmalar tarafından üretilen amilazlar; aktivite, üretim substartları, üretim koşulları, etki ettikleri glikozit bağa göre özgülük göstermektedir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen amilazlar yüksek basınç ve sıcaklık gibi zorlu koşullar gerektiren kimyasal yöntemlere kıyasla, genetik mühendisliği ile modifikasyonlara uygun olmaları, ortam koşullarına adapte olabilmeleri, istenilen özellikte endüstriyel ürünleri üretebilmeleri gibi birçok avantajıyla endüstride sıklıkla değerlendirilmektedir (Far *et al.*2020) Mikroorganizmalar tarafından üretilen amilazlar; içecek, biyoyakıt, ilaç, giyecek, deterjan, nişasta işleme, tatlandırıcı, tekstil ve fermentasyon gibi birçok endüstride kullanılmaktadır. Literatürde amilaz üretiminde sıklıkla karşılaştığımız mikroorganizmalara; *Bacillus*, *Aspergillus*, *Geobacillus*, *Nocardiopsis*, *Nesterenkonia* ve *Streptomyces* örnek verilebilir (Sudan *et al.*2018; Niyonzima *et al.* 2023 Abd El Mageed *et al.*2023).

Pektin, tüm kara bitkilerinde bulunan primer hücre duvarının temel bileşenidir. Pektik maddeler, galakturonik asit omurgasına α (1-4) bağlantısı ile bağlanan koloidal polisakkaritlerdir. Pektinazlar, pektik polimerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen ve pektik maddelerin parçalanmasında görev alan enzimlerdir (Mohandas *et al.*2018) Bitkilerden yağ çıkarmak için pektinaz enzimleri ve diğer hücre duvarını parçalayan enzimler kullanılır. Özellikle ülkemizde ticari olarak üretilen zeytinyağının ekstraksiyonunda pektinaz selülaz ve hemiselülaz enzimleri kullanılmaktadır. Bunun yanında hurma, kanola, limon, hindistancevizi ve ayçiçeği gibi bitkisel yağların sentezinde de pektinaz enzimi tercih edilmektedir (Bajpai *et al.* 2023). Sıklıkla gıda endüstrisinde kullanılan bu enzimler sadece yağ değil şarap ve meyve suyu üretiminde de sıklıkla yer almaktadır. Pektinolitik enzimler *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cystofilobasidium*, *Clostridium* ve *Bacillus* gibi organizmalar tarafından üretilmektedir (Vaz *et al.*2021; Bezus *et al.*2022)

Ksilanazlar, ksilan içerisindeki 1,4- β -D-ksilosidik bağlantıların endohidrolizini katalize eden glikosidazlardır. Bunlar, hücre metabolizması için birincil karbon kaynağı olan ksilozun

retiminde ve bitki patojenlerinin bitki hresini enfekte etmesinde kullanılmaktadır. Ksilanazlar, algler, bakteriler, protozoalar, mantarlar ve gastropodlar dahil birçok organizma tarafından üretilmektedir. Ksilan heterojen ve kompleks bir molekül olduğu için tam hidrolizinde tek bir enzim değil birden fazla enzim grubu görev almaktadır, bunlara endo-1,4- β -D-ksilanazlar (EC 3.2.1.8), arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55), β -D-ksilosidazlar (EC 3.2.1.37), ferulik asit esterazlar (EC 3.1.1.73) ve asetilksilan esterazlar (EC 3.1.1.72) rnek verilebilir (Subramaniyan *et al.*2002; Collins *et al.*2005). Ksilanazlar, kimyasal indirgenme reaksiyonları, yem sanayisi, meyve suyu üretimi, yenilenebilir enerji, kağıt endüstrisi, atık sanayisi, bitkisel yağların eldesi, şarap üretimi ve nişasta elde etme gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bhat *et al.*2000; Beg *et al.*2001; Mathlouthi *et al.*2003) Literatürde sıklıkla karşılaşılan ksilanaz enzimini üreten türlere; *Acinetobacter*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Thermomyces* ve *Pichia* rnek verilebilir (Loera *et al.*2003; Li *et al.*2007; Mandal *et al.*2012; Purohit *et al.*2017)

Tek hücre proteinleri

Tek hücre proteini (SCP), bir grup mikroorganizmanın biyokütlesinin (maya, tek hücreli algler, siyanobakteriler, mantarlar ve bakteriler gibi) kurutulmuş formunu veya hücre kültüründen ekstrakte edilen toplam proteini ifade etmektedir. Artan dünya nüfusu ile birlikte besin kaynaklarına olan erişim kısıtlı hale gelmiş, bu da bilim insanlarını yeni besin kaynakları arayışına sokmuştur. Özellikle protein eksikliğinde SCP'ler iyi bir alternatif olmuştur. SCP kuru ağırlık bazında en az %40 ham proteinden oluşmaktadır. Soya ve balık unu gibi diğer protein kaynaklarıyla karşılaştırıldığında; daha kısa üretim süresi, daha küçük ölçekli depolama alanına ihtiyaç duyulması, hava koşullarından bağımsız olması ve daha düşük üretim maliyeti açısından avantajlar göstermektedir. Tek hücre protein kaynağı olarak mantar ve bakteriler özellikle insanlarda ve hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. Tek hücre proteinlerinin yüksek protein içeriğinin yanısıra mineral, karbonhidrat, vitamin ve esansiyel aminoasitlere de sahip olduğu bilinmektedir (Leong *et al.*2021; Sharif *et al.* 2021; Antunes *et al.*2022). SCP retimi için maya, bakteri, mantar ve algler gibi çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır. *Aspergillus awamori*, *Candida utilis*, *Aspergillus spp*, *Kluyveromyces marxianus* *Rhizopus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Rhizopus oligosporus* rnek verilebilir (Yunus *et al.*2015; Pereira *et al.*2022; Utama *et al.*2023).

Biyoyakıtlar

Biyoyakıt terimi, ağırlıklı olarak biyokütleden üretilen sıvı, gaz ve katı yakıtları ifade etmektedir. Biyoyakıtlar sürdürülebilirlik, evre dostu olma ve iyi uyum sağlama gibi

avantajlarıyla fosil yakıtların önemli bir alternatifidir. Biyoyakıtlar arasında bitkisel yağlar, biyoetanol, biyogaz, biyometanol, biyodizel, biyo-sentetik gaz, biyo-kömür, biyo-yag, biyo-kömür ve biyohidrojen yer almaktadır. Özellikle mısır, şeker pancarı, buğday ve yağlı tohum gibi tarımsal ürünlerden etanol ve biyodizel üretilmektedir. Yeryüzündeki biyoetanol üretiminin yaklaşık olarak %90'ı tarımsal ürünlerden sağlanmaktadır. Kimyasal olarak etanol ve biyoetanol aynı molekül olduğu bilinmektedir. Bu iki farklı terim literatür de sadece üretim yollarının ayrımını yapmak için kullanılmıştır. Etanol petrokimyasal, biyoetanol ise biyolojik kaynaklardan mayalanma yolu ile üretilen etanole verilen isimdir (Demirbas *et al.*2008; Su *et al.*2015). Biyoyakıt üretiminde *Escherichia coli*, *Rhodotorula glutinis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Thermoanaerobacterium aotearoense* ve *Chlorella vulgaris* (Scully *et al.*2014;Hu *et al.*2019; Chen *et al.*2021; Qu *et al.*2021; Nanda *et al.*2023.)

Sekonder metabolitler

Organik maddeler çoğunlukla birincil ve ikincil metabolitler olarak gruplandırılır. Bitkiler tarafından sentezlenen metabolitlerden birincil metabolitlere; fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi birçok önemli süreç için ihtiyaç duyulmaktadır. İkincil metabolitler, biriken ve kimyasal süreçlerin aracısı olmayan diğer fitokimyasallar olarak tanımlanır. Mikrobiyal sekonder metabolitler, genellikle mikroorganizmaların geç büyüme fazı (idiofaz) sırasında üretilen, sekonder metabolizmanın düşük moleküler kütleli ürünleridir. Alışılmadık yapılara sahiptirler ve bunların üretimi, tanımlanmış biyokimyasal yollarla daha karmaşık yapılara yoğunlaşan hücre içi ara maddelerden (amino asitler, şekerler, yağ asitleri vb.) kaynaklanır. Sekonder metabolitler üreten canlıların büyümesi için gerekli değildir ancak doğada çeşitli hayatta kalma işlevlerine hizmet ederler. Ticari öneme sahip sekonder metabolitlere; antibiyotikler, antitümör ajanları, kolesterol düşürücü ilaçlar, immünosupresanlar, antihelmintik ajanlar ve antiparazitikler örnek verilebilir. Sekonder metabolitlerin en iyi bilinen grubu antibiyotiklerdir (Ruiz *et al.*2010; Vaishnav *et al.*2011).

Sekonder metabolit üreten mikroorganizmalara *Aspergillus fumigatus*, *Trichobotrys effuse*, *Penicillium chrysogenum*, *Cystobasidium laryngis* örnek verilebilir (Limbadri *et al.*2018; Niu *et al.*2018; Niu *et al.*2019; Chen *et al.*2020)

Antikanser peptitler

Dünyada ki ölüm nedenlerinin başında yer alan kanser, hücrelerin yaşama ve bölünme konusundaki öz kontrol mekanizmalarının farklı etkenler nedeniyle kaybedilmesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser vakalarının yüksekliği ve halihazırda kullanılan antikanser

ilaçlarına karşı geliştirilen direnç göz önüne alındığında, minimal yan etkilerle tümör büyümesini kontrol edebilen yeni antikanser ilaçlarının keşfi her geçen gün dahada önem kazanmaktadır. Peptid tedavisi, 1920'li yıllardan itibaren insülin uygulamasının ortaya çıkmasıyla başlamış ve günümüzde kanser dahil hastalıkların tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Anti-kanser peptidlerinin (ACP'ler) kullanılması, kanser tedavisinin umut verici bir yoludur çünkü ACP'ler geleneksel kanser tedavilerine göre birçok avantaja sahiptir. Geleneksel kanser tedavilerinde hastaların vücudunda istenmeyen olumsuz etkiler, kimyasal ilaçlara karşı hücre direnci ve kanserli dokuların kemoterapiye karşı çoklu ilaç direncinin (MDR) oluşması gibi farklı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Öte yandan, peptitlerin özellikle kanser tedavisinde birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlar; daha küçük boyut, yüksek aktivite, düşük immünojenite, timörlere iyi penetre olabilme, yüksek çözünürlük, in vivo ile biyouyumluluk, uygun fiyatlı olması ve hızlı sentez yapılabilmesidir. Antikanser peptitlerin etki mekanizması esas olarak elektrostatik etkileşimlerle hücre membranlarının yapısını bozmak ve böylece nekroz oluşturmaya dayanmaktadır. İkinci önemli mekanizması mitokondriyal membranları parçalayarak apoptoza neden olmaktır. Bu peptitler ayrıca hücre proteinlerini hedef alma, anjiyogenezi inhibe etme veya bağışıklık sistemi hücrelerini aktive etme gibi mekanizmaları kullanarak da antikanser etki göstermektedir. (Marqus *et al.*2017; Yavari *et al.*2018; Norouzi *et al.*2022) Kanser tedavisinde doğrudan kullanılan leuprolid, goserelin, oktreotid gibi peptid ilaçların yaklaşık %75'i pazarda yıllık 1 milyar doların üzerinde satışa ulaşmış durumdadır. Bu peptitler genellikle arginin, lizin ve histidin (asidik ortamda) tarafından sağlanan 2 veya daha fazla pozitif yüklü birimin yanı sıra büyük bir kısmı (%50'nin üzerinde) hidrofobik kısımlardan oluşmaktadır (Borghouts *et al.*2005; Marqus *et al.*2017).

Antikanser peptitler bitki, böcek, hayvan, amfibi, sünger, bakteri ve mantar gibi organizmalardan izole edilebilmektedir. Fungal kökenli antikanser peptitlerden, *Simplicillium* türleri *Simplicillium obclavatum* ve *Fusarium sp.* den, *Lasiodiplodia* türleri *Lasiodiplodia theobromae* den, *Scopulariopsis* türleri *Scopulariopsis brevicaulis* den, *Aspergillus* türleri *Aspergillus wentii* den, *Microsporium* türleri *Microsporium gypseum* dan, , *Zygosporium* türleri *Zygosporium masonii* den, *Aspergillus* türleri *Aspergillus terreus* dan, ubiquitin-benzeri peptid *Calvatia caelata* dan, *Paecilomyces* türleri *Paecilomyces variotii* den, *Aspergillus* türleri *Aspergillus versicolor* dan, penisilazafilonlar *Penicillium sclerotiorum* dan ve cordyheptapeptid *Acremonium persicinum* dan izole edilmiştir (Eghedari *et al.* 2021).

Pigmentler

Pigmentler, görünür dalga boyu aralığındaki ışığı emebilen, kolay çözünmeyen, eklendikleri ortamdaki yapıda fiziksel veya kimyasal değişikliklere neden olmayan,

renklendirme gücüne sahip organik veya inorganik yapıdaki bileşiklerdir. Pigmentler bulunduğu kaynaklara göre sentetik, doğal ve inorganik olarak isimlendirilmektedir. İnorganik pigmentler metal tuzları ve demir içermeyen metallerin oksitlerinden hazırlanmaktadır. Sentetik pigmentler birkaç malzeme arasında termal ya da kimyasal süreçle elde edilirken, doğal pigmentler bitkiler, hayvanlar, böcekler, mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Doğal olarak oluşan bu pigmentler; süt ürünleri, kozmetik, tekstil, boyama, tıp ve diğer endüstrilerde büyük ekonomik potansiyele sahip ikincil metabolitlerdir. Mikrobiyal pigmentlerin yüksek maaliyet, pH dalgalanmalarını neden olduğu renk tonu değişimi, zayıf stabilite gibi dezavantajları bulunmaktadır, bu yüzden sentetik pigmentlerin yerini alamadığı düşünülmektedir. Ancak sentetik biyoloji, metabolik mühendislik ve yeşil sentez alanlarındaki son gelişmeler ekonomik olan ve endüstriyel uygulamalar için yeterli miktarda ve kalitede mikrobiyal pigment üretimine olanak sağlamaktadır (Kim *et al.*2011; Kalra *et al.*2020; Poorniammal *et al.*2021; Rajendran *et al.*2023).

Mikroorganizmaların kimyasal bileşim, fonksiyon, stabilite ve çözünürlük açısından farklılık gösteren çeşitli doğal pigment maddeleri ürettikleri bilinmektedir. Bu pigmentlere; karotenoid, flavin, indigoidin, melanin, astaksantin, kinon, prodigiozin ve sitonemin örnek verilebilir. En iyi pigment üreten mikroorganizmalar ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* ve *Corynebacterium glutamicum* olarak bilinmektedir (Fathi *et al.*2021; Ghiffary *et al.*2021; Tong *et al.*2021; Gohil *et al.*2022; Xu *et al.*2022)

Organik asitler

Organik asitler, karboksil, sülfon, alkol veya tiyol grupları gibi bir veya daha fazla asidik gruba sahip olan düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerdir. Bu fonksiyonel gruplar nedeniyle organik asitler geniş bir pazar payına sahiptir (Sauer *et al.* 2008). Organik asitlerin endüstriyel önemi yüksektir; kimyasal özellikleri nedeniyle yapı taşları olarak kullanılabilmelerinin yanı sıra, yıllık büyük bir pazara sahip tek molekülü ajanlar olarak da bilinirler. Organik asitler; petrokimyasal arıtma işlemleriyle fosil kaynaklardan elde edilebildiği gibi birçok hücre tarafından da sentezlenmektedir. Hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde; süksinat, sitrat, L-malik asit (MA), sitrik asit (CA), oksaloasetat (OAA), a-ketoglutarik asit (KGA), süksinik asit (SA) ve fumarik asit (FA) bulunmaktadır. Bu asitler, geniş uygulamaları nedeniyle organik asit endüstrisinde kilit konumlara sahip olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal hücre fabrikalarının potansiyeli ve endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesi sayesinde, geçen yüzyılın son on yıllarından itibaren bu moleküllerin mikrobiyal bazlı üretimi pazara yaklaşmaya başlamıştır (Van Dien 2013; Yin *et*

al.2015). Yiyecek-içecek endüstrisinde, ilaç-kozmetik sektörlerinde, beslenmede ve hayvan yeminde uygulama alanı bulunmakla birlikte özellikle kimya endüstrisinde (ok çeşitli polimer ve solvent üretim süreçleri için temel bileşikler olarak) organik asitler kullanmaktadır. Ayrıca hücrel metabolizma için zararlı olan reaktif ürünlerin birikmesini engelleyebildikleri için koruyucu olarak da kullanılabilirler (Di Lorenzo *et al.* 2022).

Sitrik asit $C_6H_8O_7H_2O$ formülüne sahip (CA, 2-hidroksi-propan-1,2,3-trikarboksilik asit) TCA döngüsünün bir ara ürünüdür, bu yüzden hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunur. İlk olarak 1826 yılında İngilterede limonlarda üretimi gerçekleştirilmiştir (Papagianni, 2007). evre dostu, güvenli, ekonomik olmasının yanı sıra; ayırma, tamponlama, ıslatma, temizleme ve dağıtma için çok yönlü bir kimyasaldır. Asit esas olarak tıbbi sitratların, şekerlemelerin, alkolsüz içeceklerin ve efervesan tuzların hazırlanmasında kullanılır. Birçok mikroorganizmanın CA ürettiğı tespit edilmiştir, bunlara bakteri olarak (*Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* vb), maya olarak (*Candida tropicalis*, *C. oleophila*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala* gibi) ve küf olarak *Aspergillus* cinsi örnek verilebilir (Amato *et al.* 2020; Behera *et al.* 2021)

İtakonik asit (IA), metilen süksinik asit olarak da bilinen doymamış bir dikarboksilik asittir. Beyaz kristal formda bulunan doymamış çift bağ ve fonksiyonel karboksil gruplarına sahip beş karbonlu bir asittir. Asidin sahip olduğı iki karboksil ve metil grupları itakonik aside önemli fonksiyonel çeşitlilik sağlamaktadır (Cordes *et al.* 2015). Itaconic asit, petrokimya bazlı malzemelerin yerine kullanılabilecek, biyolojik olarak parçalanabilen, evre dostu ve çok yönlü polimerler üretme konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. Ayrıca tarımsal ürünlerde biyoyakıt, deterjan, sentetik reçine ve ilaç sektöründe sıkça kullanılmaktadır (Saha and Kennedy *et al.* 2019). *Aspergillus terreus* en iyi üreticisi olmakla birlikte *Ustilago maydis*'in son yıllarda üretimde yer alması dikkat çekmektedir (Krull *et al.* 2017; Wierckx *et al.* 2020)

Fumarik asit (FA), ilk kez *Fumaria officinalis* bitkisinden izole edilen, TCA döngüsünün ara maddesi olan bir trans dört karbonlu dikarboksilik asittir. Fumarik asit, çok çeşitli alanlarda ve birçok uygulamaya sahiptir. Sitrik asitten 1,5 kat daha asidik olan fumarik asitin yiyecek ve içecek endüstrilerinde daha düşük miktarda kullanımı yeterlidir. Fumarik asit karboksilik gruba ve bir çift bağa sahiptir; bu özellikler onu esterleştirme ve polimerizasyon için kağıt reçineleri, doymamış polyester reçineleri (UPR), biyobozunur polimerler, plastikleştiriciler ve kauçuk için karboksilatlayıcı maddeler üretmek için uygun kılmaktadır. Bunun yanında son zamanlarda bağışıklık sisteminin iyileştirilmesinde, bağırsak sağığında, skeroz ve sedef hastalığının tedavisinde farmasötik uygulamalar göstermiştir (Smith, 2017; Reda *et al.* 2021). FA üretiminde *Rhizopus arrhizus*, *R. Oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* ve

Torulopsis glabrata türlerinin kullanıldığı rapor edilmiştir (Roa Engel *et al.*2008; Chen *et al.*2015; Chen *et al.*2016).

Glukonik asit, diğer bir ismiyle sakkarik asit, esas olarak glukozun oksidasyonundan elde edilen doymuş bir dikarboksilik asittir. $C_6H_{10}O_8$ moleküler formülüne sahip, suda çözünebilen katı bir maddedir ve birçok meyve- sebze de bulmaktadır (Ramachandran *et al.*2006; Megías-Sayago *et al.*2020; Hayes *et al.*2022) Glukonik asit, kimyasal, biyokimyasal, elektrokimyasal, biyoelektrokimyasal ve fermentatif olmak üzere beş yolla üretilmektedir. Fermentatif yolda *Aspergillus niger* ve *Gluconobacter oxydans* kullanılmakla beraber *Zymomonas*, *Aspergillus sp.* *Pseudomonas*, *Acetobacter* ve *Penicillium*'a ait türlerde tercih edilmektedir (Cubas-Cano *et al.*2020; Yan *et al.*2022)

Süksinik asit (SA), genellikle fosil türevli maleik anhidritin hidrojenasyonu ile üretilen bir dikarboksilik asittir. Esas olarak anaerobik fermentasyon yoluyla üretilmesine rağmen bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilen bu enzim “biyo-süksinik” olarak tanımlanır. Süksinat, trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) bir ara maddedir ve anaerobik metabolizmanın fermentasyon ürünlerinden biridir. Bu nedenle hemen hemen tüm mikrobiyal, bitki ve hayvan hücrelerinde sentezlendiği bilinmektedir (Song and Lee 2006; Putri *et al.*2020) Süksinik asit üreticisi olarak; *Yarrowia lipolytica*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Anaerobiospirillum succiniciproducens* türleri kullanılmaktadır (Van De Graaf *et al.*2015; Li *et al.*2021)

Laktik asit (LA) ilk kez 1780'de İsveçli kimyager Karl Wilhelm Scheele tarafından ekşimiş süttten izole edilmiş, daha sonra 1857 yılında mikrobiyolog Louis Pasteur, laktik asit üretimini mikroorganizmaya bağlamıştır. İki izomerik formda bulunan LA (D(-) veya L(+)) $CH_3CH(OH)COOH$ formülü ile gösterilmektedir ve büyük çoğunluğu homofermentatif yada heterofermentatif yollarla laktik asit sentezleyen bakteriler ile üretilmektedir (Ghaffar *et al.*2014; Guo and Song 2019; Meng *et al.*2020). Laktik asit hayvanlarda ve insanlarda kas dokusuna enerji sağlamanın bir yan ürünü olarak üretilir. Çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilen, biyoteknolojik olarak üretilmiş fonksiyonlu ve çok yönlü bir organik asittir. Laktik asidin kozmetikte nemlendirici, tartar önleyici, pH düzenleyici, sivilce önleyici, cilt gençleştirici ve beyazlatıcı bir madde olarak görev yaptığı bilinmektedir. Ayrıca ayran, reçel, bira, mayonez, peynir, ekşi mayalı ürünlerde ve fermente gıdalarda kullanılmaktadır (Chauhan *et al.*2023; Ojo and de Smidt 2023). Laktik asit bakterileri, potansiyel LA üreticisi olarak bilinmektedir. Bunun yanında yüksek sıcaklıklarda büyüeyebilen, kültür ortamının daha fazla sterilizasyonunu gerektirmeyen, daha ucuz besiyerinde gelişim gösteren ve bazı yan etkileri tolere edebilen *Bacillus* suşları ile de üretim yapılmaktadır. *Lactobacillus delbrueckii*,

Escherichia coli, *Sporolactobacillus* ve *Bacillus coagulans* gibi diğer mikroorganizmalar laktik asit üreticileri olarak tanımlanmış olsada, günümüzde laktik asit bakterileri (LAB'ler) hâlâ endüstriyel ölçekte en iyi üreticileri temsil etmektedir. *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Lactobacillus* cinslerine ait türler LA üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir (Abedi and Hashemi 2020; Chung *et al.*2023; Huang *et al.*2023)

Polisakkaritler

Makromoleküller, çoğunlukla daha küçük alt birimlerin (monomerlerin), polimerizasyonu ile oluşan karbonhidrat, protein ve yağ gibi büyük moleküllerdir. Polimerler; organik ve inorganik polimerler olarak ikiye ayrılır. Organik makromoleküller; lipit, protein, nükleik asit ve karbonhidratlar iken, inorganik polimerler; karbon nanotüpler ve grafenlerdir (Mülhaupt *et al.* 2004; Shukla *et al.* 2022). Besin maddelerinin en önemlilerinden olan karbonhidratlar, dört ana makromolekül sınıfından (karbonhidrat, lipit, nükleik asit ve protein) birisidir ve biyolojik sistemlerde oldukça önemli bir yere sahiptir. Karbonhidratlar, organizmaların en temel bileşenidir ve hücre yüzeyi tanıma, sinyal iletimi, tümör metastazı vb. gibi birçok önemli fizyolojik ve patojenik süreçte önemli roller oynamaktadır. Karbonhidratlar, kimyasal yapı olarak; $C_m(H_2O)_n$ formülü ile gösterilir ve monosakkaritler, disakkaritler, trisakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Dahech *et al.* 2013; Wiercigroch *et al.* 2017).

Monosakkaritler olarak adlandırılan basit şekerler, karbonhidrat polimerlerinin yapı taşlarıdır. Doğrusal polimerler olan RNA, DNA ve proteinlerin aksine, karbonhidratlar, doğal olarak oluşan çeşitli monosakaritlerin hem doğrusal hem de dallanmış kombinasyonlarından oluşmaktadır. Monosakkarit birimlerinin oluşması için, polisakkarit yapısındaki glikozidik bağların hidrolize edilmesi gerekmektedir. Monosakkarit, polisakkaritlerin depolimerizasyonu ilk adımdır ve genellikle asit hidrolizi, asit metanoliz, fiziksel destekli hidroliz ve enzimatik hidroliz ile gerçekleştirilir. Monosakkaritler hidroliz sırasında daha küçük molekül ağırlıklı şekerler vermezler (Whitfield *et al.*2016; He *et al.*2018). Besin açısından en önemli ve bol miktarda bulunan monosakkarit, insan vücudunda ana hücre yakıtı olarak kullanılan ve vücut dokularında ve sıvılarında bağlanmamış olarak bulunabilen glikozdur. Glikoz birçok polisakkaritin yapı taşı olmakla birlikte, glikoz ve fruktoz doğada en fazla bulunan monosakkarittir (Shahruzzaman *et al.*2022).

Monosakkaritler, hidrojen atomlarının bağlı olduğu karbon atomlarına bir aldehit (RCHO) veya keton (RCOR) grubunun bağlı olmasına göre aldehit-aldolaz ve ketolaz olarak isimlendirilmektedir. Genel moleküler formülü $[C(H_2O)]_n$ ($n = 3-7$) olan monosakkaritler, içerdiği karbon atomu sayısına bağlı olarak da trioz ($C_3H_6O_3$), tetroz ($C_4H_8O_4$) vb. olarak

adlandırılmaktadır. Heksoz olarak adlandırılan altı karbonlu şekerlere; glikoz, mannoz, galaktoz ve fruktoz, pentoz ismi verilen beş karbonlu şekerlere ise; arabinoz, ksiloz, riboz ve deoksiriboz örnek verilebilir (Stylianopoulos 2015; Liu *et al.*2021).

Disakkaritler, α veya β oryantasyonunda glikosidik bağlarla birbirine bağlanan iki monosakkarit ünitesinden oluşmaktadır. Bunlardan en önemlileri sakkaroz, laktoz ve maltozdur. Sükroz en bol bulunanıdır ve birbirine bağlı bir α -glikoz ve β -fruktoz molekülünden oluşmaktadır. Laktoz; β -1,4-glikosidik bağla bağlanan galaktoz ve glikozdan oluşur ve süt-süt ürünlerinde bulunur. Maltoz esas olarak nişastanın kısmi hidrolizi ile üretilir ve bir α -1,4-glikosidik bağ ile bağlanan iki glikoz ünitesinden oluşmaktadır (Nasrollahzadeh *et al.*2021).

Trisakkaritler genellikle yüksek bitkilerde bulunur ve üç monosakkaritin glikosidik bağlarla birleşiminden oluşur. En bilinen örneği rafinozdur. Galaktoz, glikoz ve fruktozun glikosidik bağlarla birleşmesiyle oluşan bir trisakkarittir (Wiercigroch *et al.*2017).

Polisakkaritler, uzun zincirli monosakkarit birimlerinin glikozidik bağlarla bağlanması sonucu oluşan makromoleküllerdir. Çeşitli sebze ve bitkiler tarafından üretilen bitki polisakkaritleri, doğadaki bollukları, yapısal çeşitlilikleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi görmektedir. Geleneksel uygulamada polisakkaritlerin ana kaynağı bitkilerdir, ancak bu kaynaklar hayvanları, algleri, mantarları ve bakterileri de içermektedir (Barbosa and de Carvalho Junior 2021). Monosakkaritlerin türüne bağlı olarak polisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Homopolisakkarit, tek tip monosakkaritin birlikteliğiyle oluşan ekzopolisakkaritler homopolisakkarit (HoPS) (nişasta, glikojen, selüloz vb.) olarak adlandırılırken, farklı tip monosakkaritleri veya bunların türevlerini (heparin, gama globülin, hyaluronik asit, iduronik asit vb.) içeren polisakkaritler ise heteropolisakkaritler (HePS) olarak adlandırılmaktadır (Wiercigroch *et al.*2017).

Mikrobiyal Ekzopolisakkarit

Polisakkaritlerin elde edildiği bir diğer önemli doğal kaynak ise mikroorganizma grubudur. Mikroorganizmalar, yapısal olarak çeşitlilik gösteren ve biyolojik olarak aktif (antitümör, antioksidan, antimikrobiyal ve immüno modülatör) polisakkaritleri üretme yeteneğine sahiptir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen polisakkaritler hücrede ki yerleşimlerine göre; hücreye karbon ve enerji kaynağı sağlayan sitozolik polisakkaritler, peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler dahil hücre duvarını oluşturan polisakkaritler ve EPS'ler olarak bilinen, hücre dışı ortama kapsül veya biyofilm şeklinde salınan polisakkaritler olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. (Sutherland 1999; Rana and Upadhyay 2020). EPS'ler temel olarak karbonhidrat ve protein içermenin yanı sıra DNA ve diğer polimerik bileşikleri de

içermektedir. Mikroorganizmaların ürettiği EPS'lerin içeriğinin farklı olmasının sebebi; üretici cinsin metabolizması ve üretim koşullarından kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal polisakkaritler içerdikleri şeker gruplarına göre homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak iki gruba ayrılmaktadır. Homopolisakkarit yapısındaki EPS'lere selüloz, glukan, mutan, pullulan, fruktanlar, dekstran, alternan, levan ve kurdan örnek verilmektedir. Heteropolisakkaritlerde ise jellan, welan, diutan ve ksantan bilinmektedir (Donot *et al.*2012; Madhuri and Vidya 2014; Yıldız and Karatas 2018)

Genel olarak bitkilerden üretimi gerçekleştirilen EPS'ler son yıllarda mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir ve gıda, tarım, eczacılık, su arıtma gibi birçok farklı endüstride kullanılmaktadır. Mikrobiyal ekzopolisakkaritlere olan ilgi ve yönelimin artmasının temel sebebi mikroorganizma ürünlerinin kısa sürede üretilmesidir. Bitkilerde yetiştirme süresinin uzun olması ve profesyonel bakım gerektirmesi gibi dezavantajlar mikroorganizmalarda bulunmamaktadır. Örneğin selüloz hem bitkilerde hem bakterilerde üretilmektedir. Ancak bitkilerde; üretim hızının yavaş olması (3 ila 6 ay), mevsim koşullarından etkilenmesi, ekilebilir arazilerin sınırlı olması, sürdürülebilir ve ekonomik olmaması bakterileri üstün kılmaktadır. EPS üretiminde bakterilerin tercih edilmesinin sebebi; hızlı bir şekilde büyümesi, genetik manipülasyona açık olması, birçok endüstriyel ve tıbbi uygulamaya uygun olması, çeşitli biyolojik aktiviteye sahip polisakkarit sentezlemesi ve ekonomik maliyetidir. (Barcelos *et al.*2020; Rana and Upadhyay 2020)

Selüloz

Selüloz, yeryüzünde en bol bulunan bir homopolisakkarittir. Karasal çevrede fotosentez sonucu oluşup, yüksek sıcaklıkta konsantre asitlerle muamele edildiğinde kimyasal olarak glikoz birimlerine ayrışmaktadır. Selüloz, selülaz olarak bilinen bir enzim katalizörü tarafından parçalanmaktadır (Zhang and Lynd 2004; Nidhi *et al.*2017). Pamuk, odun, kenevir ve bitkilerden elde edilen selüloz; kağıt üretimi, ilaç dağıtımı, biyomateryal, gıda, farmasötikler, doku mühendisliği gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Kargazadeh *et al.* 2018).

Bitkisel lif formundaki selüloz, uzun yıllardır insan yaşamında önemli bir rol oynamış; enerji, inşaat, kağıt üretimi ve kumaş malzemelesi olarak kullanılmıştır. Bitkisel kaynaklı selülozun lignin, hemiselüloz ve pektinden oluşan kısımların ayrılması gerekmektedir. Endüstriyel ölçekte, selüloz saflaştırması için yüksek enerji tüketimine ihtiyaç duyulmaktadır (yaklaşık 1000 kwh/ton) ayrıca atık suların ve toksik maddelerin arıtılması ise maliyetlidir (Siró and Plackett 2010). Mikrobiyal kaynaklı selüloz, mekanik dayanım, hidrofilik olması, biyoyuymululuk ve termostabilite gibi özelliklere sahip olmasından dolayı endüstrilerde tercih edilmektedir. Bu polimerin çok yönlü kullanımı ve çevre dostu oluşu klinik teşhis, çevresel

izleme, gıda kalite kontrolü ve biyosensör üretiminde kullanılabilir kılmaktadır (Credou and Berthelot 2014).

Selülaz üretiminde kullanılan bakterilere *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Trichoderma* cinsleri örnek verilmektedir (Han et al.2023). Gelişen teknoloji sayesinde selüloz; farmasötik uygulamalarda (Feng et al.2018), membran-filtrasyonda (Xu et al.2019; Hu et al.2019), stabilizatör-emülgatör hazırlanmasında (Lu et al.2018), ilaç dağıtımında (Khoshnevisan et al.2018), enerji depolama (Konuklu et al.2019) ve yakıt hücresi oluşturmada (Gadim et al.2017) kullanılmıştır.

Levan

Levan, hem bitkilerden hem de mikroorganizmalardan doğal olarak elde edilen bir fruktoz homopolimeridir. Moleküler ağırlığı bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmelerine göre çeşitlilik göstermektedir. Bakteriyel levanlar, çok dallı ve molekül ağırlıkları 2 ila 100 milyon Da arasında bulunurken; bitkilerden elde edilen levanların molekül ağırlıkları yaklaşık 2000 ile 33.000 Da arasında değişmektedir. Levan, biyo-uyumluluk, yenilenebilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik, çevre dostu olma ve esneklik gibi genel özelliklerinin yanında; anti-kanserojen, hiperglisemik inhibitör, anti-AIDS, antioksidan ve anti-inflamatuvar gibi bazı önemli biyomedikal özellikler de sunmaktadır. Mikrobiyal levanlar ise; gıda, ilaç, kozmetik ve sanayi sektörlerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Mükemmel polimerik tıbbi özellikleri ve üretim kolaylığı ile mikrobiyal levan, geleceğin değerli ve çok yönlü bir biyopolimeri olarak görülmektedir. Levan üreten türlere; *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* ve *Pseudomonas fluorescens* örnek verilmektedir (Lim et al.2001; Shih et al.2011; Jathore et al.2012; Molinari et al.2013; Srikanth et al.2015)

Pullulan

Pullulan, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen, beyaz veya sarımsı beyaz renge sahip bir ekzopolisakkarittir. Pullulan, hücre içinde sentezlenir ve gevşek, sümüksü bir tabaka oluşturmak üzere hücre yüzeyine salgılanmaktadır. Pullulan üretimi ilk olarak 1958 yılında yapılan bir çalışmada *Aeurobasidium pullulans* tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizma, ana pullulan üreticisi olarak bilinir ve denizde, kaya yüzeylerinde, bitki yapraklarında ve ahşap zeminler gibi çeşitli alanlardan izole edilmektedir. Pullulan'ın moleküler ağırlığı, 4.5×10^4 ile 6×10^5 Da arasında değişen önemli bir çeşitliliğe sahiptir, bu çeşitlilik yetiştirme parametrelerinden büyük ölçüde etkilenmektedir. *A. pullulans*'a ek olarak, *Cyttaria darwinii*, *Tremella mesenterica*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Cyttaria harrioti*,

Cyphonectria parasitica, *Teleoschistes flavicans* ve *Rhodotorula bacarum* gibi diğer mikroorganizma türleri de pullulan üreticileri arasında yer almaktadır (Sutherland 1998; Peterson *et al.* 2013).

Pullulanın benzersiz bağlantı modeli, biyolojik olarak parçalanabilir olması, yapışkanlık özelliği, lif oluşturma kapasitesi ve şeffaf-oksijeni geçirmeyen ince yapısı onu avantajlı kılmaktadır. Aynı zamanda pullulan üreten suşlar birçok alandan izole edilmektedir. Ancak üretimindeki yüksek maliyet ve ürünün az olması nedeniyle pullulan, diğer ekzopolisakkaritlere göre daha az tercih edilmektedir (Wani *et al.* 2021).

Kurdlan

Kurdlan, dallanmayan glukoz birimlerinden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı bir homopolisakkarittir. Renksiz, tatsız ve kokusuz özellik göstermektedir. Üretimi ilk olarak 1966 yılında yapılan bir çalışmada *Alcaligenes faecalis* ile gerçekleştirilmiştir (Harada *et al.* 1966). *Agrobacterium* sp. *Alcaligenes faecalis*, *Rhizobium radiobacter* ve *Bacillus cereus* bakterilerinin kurdlan ürettiği rapor edilmiştir. Bu cinsler arasında, *Agrobacterium* sp. kurdlan üretiminde en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubu olarak bilinmektedir.

Kurdlan'ın antitümör, antiefektif, antienflamatuar, antikoagülan aktivite'ye sahip olduğu, toksik özellik göstermediği ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğu bilinmektedir. Bu avantajları sayesinde gıda endüstrisinde, ilaç kapsüllemeye ve biyomedikal alanlarında tercih edilmektedir (Aquinas *et al.* 2022).

Ksantan

Ksantan, suda çözünebilen, kara-deniz bitkilerinden ekstrakte edilen yada farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen uzun zincirli polisakkarit olarak tanımlanmaktadır. Ksantan mannoz, glukronik asit ve glikoz birimlerinden oluşan bir heteropolisakkarittir. Ksantan'ın ilk keşfi 1950'li yıllarda *Xanthomonas campestris* isimli mikroorganizma tarafından üretilmesiyle olmuştur. Keşfinden sonra şeker kamışı, peynir altı suyu ve sakkaroz gibi karbon kaynaklarında üretimi gerçekleştirilmiştir. Ksantan, üretici cinsine bağlı olarak 500-2000 kDa arasında değişen yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Bu ekzopolisakkaritin başlıca avantajları; çevre dostu olması (biyobozunur), düşük konsantrasyonlarda bile yüksek viskozite göstermesi, geniş pH aralığında, yüksek sıcaklık -tuz oranında stabilitesini koruması ve toksik olmamasıdır (Riseh *et al.* 2022).

X. campestris tarafından üretilen mikrobiyal EPS olan ksantan zımkı, ticari olarak en fazla kullanılan biyopolimer olduğu rapor edilmiştir. Gıdalarda ve diğer segmentlerde

koyulaştırıcı, stabilize edici, jelleştirici ve emülsifiye edici bir madde olarak işlev görmektedir. (Lopez and Ramos-Cormenzana 2001; Rottava *et al.*2009)

Gellan

Gellan; bitki dokularından, tohumlardan, deniz yosunlarından ve mikroorganizmalardan elde edilen polisakkarittir. İlk keřfi *Pseudomonas elodea* olarak anılan *Sphingomonas elodea* (ATCC 31461) bakterisi ile yapılan çalıřmalarda bulunmuřtur. Yüksek aıl (HA) ve dūřuk aıl (LA) olmak ūzere iki formda mevcuttur. Beyaz renge sahip olan gellan, suda çözünebilir ve ūstün reolojik özellięi sayesinde özellikle gıda sektöründe sıklıkla tercih edilmektedir (Rehm 2010; Banerjee and Bhattacharya 2011).

Uygulama alanlarında diğer jelleştirici maddelerle kıyaslandığında iyi bir alternatiftir. Bunun sebebi ise az miktarlarda dahi etkili olması ve ısıya duyarlı olmayan berrak bir jel oluşturmasıdır. Gıda endüstrisinde; sürülebilir ūrünler, içecekler, şekerlemeler, soslar ve paketlenmiş gıdalarda kullanılmaktadır. Bunun yanında tıp, farmasötik, biyomedikal ve tarım alanlarında da gellan kullanımı mevcuttur (Dumitriu 2001; Vijan *et al.*2012)

Aljinat

Aljinat, tipik olarak kahverengi deniz yosunundan elde edilen, doęal olarak oluřan bir heteropolisakkarittir. Yapısal olarak glukuronik asit, mannuronik asitten oluřur ve dūřuk toksisite, biyouyumluluk, dūřuk maaliyet gibi özelliklerinden dolayı birçok uygulamada tercih edilmektedir (Gombotz and Wee 2012)

Aljinat hidrojeller, bugüne kadar yara iyileşmesi, hücre transplantasyonu, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği uygulamalarında özellikle ilgi çekici olmuştur. Bu jeller, dokulardaki hücre dışı matrislere yapısal olarak benzer ve çeşitli kritik rolleri oynayacak şekilde manipüle edilebilmektedir. Bu uygulamalarının yanı sıra koyulaştırıcı, stabilizatör ve jelleştirici ajan olarak; gıda, tekstil, kağıt, kozmetik endüstrilerinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Lee and Mooney 2012; Raus *et al.*2021).

Ticari olarak temin edilebilen aljinat, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Laminariadigitata* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi alglerden ekstrakte edilmesinin yanında *Azotobacter* ve *Pseudomonas* cinsi bakterilerden de ūretim gerçekleřtirilmektedir (Rinaudo 2008; Lee and Mooney 2012; Dudun *et al.*2021).

Hiyalüronik asit

Doęal polisakkaritler ve bunların tūrevlerine dayalı polimerler yeni nesil tıbbi malzemelerin ve ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Omurgalı

dokularda en yaygın bulunan ve birçok yaşamsal aktiviteden sorumlu polimerler; glikozaminoglikan ve hyaluronik asit (HA)'tır. HA, tekrarlayan N-asetil-d-glukozamin ve d-glukuronik asit birimlerinden oluşan ve monosakarit birimlerinin alternatif β -1,3 ve β -1,4 glikozidik bağları yoluyla birbirine bağlandığı doğrusal bir glikozaminoglikandır (Šmejkalová *et al.*2014; Bayer 2018).

İlk olarak hayvan dokularından elde edilen HA, günümüzde mikrobiyal kaynaklardan rekombinant teknolojiler kullanılarak üretilmektedir. Omurgalı canlıların epitel, nöral ve bağ dokularının hücre dışı matrisinde yaygın olarak bulunur ve fizyolojik olarak önemli role sahiptir. HA'nın uygulama alanlarına bakıldığında özellikle tıp ve kozmetik endüstrileri dikkat çekmektedir. Özellikle; göz cerrahisi, leke tedavisi, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, osteoartrit tedavisi ve yara iyileşmesi gibi rejeneratif tıpta sıklıkla kullanılmaktadır (Huerta-Angeles *et al.*2016; Trombino *et al.*2019)

HA üreten mikroorganizmalara; *Pasteurella multocida*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* ve *Corynebacterium glutamicum* örnek verilmektedir (Chien and Lee 2007; Chen *et al.*2009; de Oliveira *et al.*2016).

Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi

Mikroorganizmalar, çeşitli biyosentez yolları ile EPS üretmektedir. EPS, temelde dört yol üzerinden üretilir, bunlar: (1) hücre dışı sentez yolu, (2) ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıya bağımlı yol, (3) sentaz bağımlı yol ve (4) Wzx/Wzy'ye bağlı yol'dur (Schmid *et al.* 2015). Polimerlerin uzayabilmesi için gerekli olan öncü molekül, hücre içindeki çeşitli enzimatik reaksiyonlarla gerçekleştirilir ve farklı biyosentez yollarının hepsinde aynı yol izlenmektedir. Hücre dışı üretimde ise, disakkarit veya trisakkaritin bölünmesiyle elde edilen monosakaritlerin doğrudan eklenmesiyle uzatılmaktadır (Cuthbertson *et al.*2009).

Wzx/Wzy'ye bağımlı yolda, iç zardaki bir undekaprenol difosfat ankoruna (C55) bağlanan ayrı ayrı tekrar eden birimler, çeşitli glikosiltransferazlar (GT'ler) tarafından birleştirilip bir Wzx proteini tarafından sitoplazmik zar boyunca yer değiştirmektedir. Bir sonraki adımda bunların polimerizasyonu, hücre yüzeyine aktarılmadan önce Wzy proteini tarafından periplazmik alanda meydana gelmektedir. Wzx/Wzy yolu tarafından bir araya getirilen tüm polisakkaritler birden fazla şeker monomeri içerdiği için heteropolimer olarak sınıflandırılmaktadır (Islam *et al.*2010).

İkinci yol, esas olarak kapsüler polisakarit (CPS) biyosentezinde kullanılan ABC taşıyıcı bağımlı yoldur. Wzx/Wzy'ye bağımlı EPS gibi, ABC taşıyıcı bağımlı yolda sentezlenen CPS, GT'lerin iç zarın sitoplazmik yüzüyle birleşir. Tek bir GT içeren operon dahil olduğunda

homopolimer, birden fazla GT kullanıldığında heteropolimerler üretimiyle sonuçlanır. Ayrıca iç membrandan dışarı aktarım ve hücre yüzeyine translokasyon, üçlü bir akış pompası benzeri kompleks tarafından gerçekleştirildiğinden diğer sistemden farklıdır (Whitney and Howell 2013).

Üçüncü yol, membranlar ve hücre duvarı boyunca tüm polimer şeritlerini salgılayan ve tekrar birimlerinin yer değiştirmesi için flippaz dan bağımsız olan sentaza bağımlı yoldur. Translokasyon işleminin yanı sıra polimerizasyon da bazı durumlarda (aljinat, selüloz) çoklu protein kompleksinin alt birimi olan tek bir sentaz proteini tarafından gerçekleştirilmektedir. Sentaza bağımlı yollar genellikle yalnızca bir tür şeker öncüsü gerektiren homopolimerlerin birleştirilmesi için kullanılır (Rehm 2015).

Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmalar

Ekzopolisakkaritler (EPS), mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar, algler) tarafından savunma mekanizması olarak salgılanan karbonhidrat biyopolimerleridir. Mikroorganizmalar EPS üretimlerini büyüme fazından (logaritmik faz) sonra gerçekleştirmektedir (Wang *et al.*2021)

Bakteriyel EPS'lerin çoğu heteropolisakkarit yapıdadır ve üretici mikrobu sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve ışık yoğunluğu gibi elverişsiz koşullara karşı korumaktadır. Bunun yanı sıra EPS'nin antioksidan, antibakteriyel, hipoglisemik, immünomodülatör ve kolesterol düşürücü gibi insan sağlığına faydalı çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Bu yüzden EPS çalışmalarına olan ilgi her yıl artmaktadır. Ekzopolisakkarit üreten mikroorganizmalara; *Streptococcus zooepidemicus*, *Geobacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida glabrata* örnek verilebilir (Wang *et al.*2016; Tan *et al.*2019; Mohan *et al.*2022). Bunun yanında laktik asit bakterisi olarak; *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Streptococcus thermophilus* ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Angelin and Kavitha 2020; Rajoka *et al.*2022).

EPS üretimini etkileyen faktörler

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, ortamda ki basınç, sıcaklık, tuzluluk ve pH gibi değişikliklere bir yanıt olarak üretildiğinden bu faktörler EPS üretimini doğrudan etkilemektedir. Hem başlangıç mikroorganizması, hem fermantasyon parametreleri (nitrojen kaynağı, karbon kaynağı, fermantasyon şartları vb.) üretilen EPS'nin yapısını etkilemektedir. EPS üretiminde karbon kaynağı olarak; glikoz, laktoz, sükroz, maltoz ve sorbital gibi

kaynakların yanında hurma şurubu, peynir altı suyu, melas ve doğal atıklarda kullanılmaktadır (Amatayakul *et al.*2006; Moosavi and Karbassi 2010).

EPS üretimini etkileyen faktörlerden olan sıcaklık, mikroorganizmanın türüne göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin Wang ve arkadaşları (2021) EPS üretimi için termofilik bir bakteri olan *Geobacillus* sp.'i kullanmış ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlemişlerdir. Kumar ve arkadaşları ise (2022) EPS üretiminde buzullardan izole ettikleri *Mucilaginibacter* sp.'i kullanmış, optimum EPS üretimini 20°C' olarak kaydetmişlerdir.

EPS üretme kapasitesi farklı tuz konsantrasyonlarında araştırılmış, Çam ve Bicek (2023) tarafından yapılan çalışmada farklı *Azotobacter* suşları kullanılmıştır. *Azotobacter chroococcum* SBS1 ve *A. vinelandii* SBS14' de artan tuz konsantrasyonunun üretimi etkilemediği diğer yandan, *A. chroococcum* (SBS2, SBS4 ve SBS12) tuz konsantrasyonu %8'e kadar, *A. vinelandii* SBS6'da %6'ya kadar ekzopolisakkarit miktarında önemli bir artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Mikroorganizmaların çoğu, nötral pH değerlerinde gelişmektedir ve EPS üretimi içinde optimum bu değerler bulunmaktadır. Örneğin; *Aeribacillus pallidus* ile yapılan çalışmada pH değeri 6,0 ila 8,5 arasında (0,5 aralıkla) EPS üretimine etkisi araştırılmış en yüksek polimer üretimi pH 7,0'da gözlenmiştir (Radchenkova *et al.*2013). Bazı çalışmalarda ise EPS veriminin asidik pH'larda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tallon *et al.*2003; Nguyen *et al.*2020).

EPS üretimini etkileyen bir diğer önemli faktör inkübasyon süresidir. Bakteriler, logaritmik fazın sonu veya durağan fazda üretim gerçekleştirmektedir (Caccamo *et al.* 2020). Mıdık ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada inkübasyon süresinin EPS üretimine etkisine bakılmış; 48, 72 ve 120 saat denenmiştir. Çalışmada kullanılan LAB suşlarından 10'da 6'sının maksimum EPS üretimi 120 saatlik inkübasyonun sonunda elde edilirken; *L. plantarum*' da 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilmiştir ve süre arttıkça EPS veriminde düşüş gözlemlenmiştir.

Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları

EPS'ler yenilenebilir, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen özelliklere sahip olduklarından gıdadan tarıma kadar birçok alanda uygulamaya sahiptirler. Özellikle gıda endüstrisinde reolojik özelliklerinden dolayı LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler tercih edilmektedir. Bu polisakkaritler reolojik davranışlarının yanı sıra, antioksidan, antikanser, nem tutucu ve antimikrobiyal özelliklere sahip olup, kullanılan yiyeceklerin bozulmadan uzun süre saklanmasına yardımcı olurlar (Sørensen *et al.*2022; Jurášková *et al.*2022).

Farmasötik uygulamalarda ise EPS'ler; doku mühendisliği, ilaç kapsülleme, akıllı terapötik ve farmasötik maddelerin hedefe gönderimi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Biyomedikal ve tıpta ise; biyolojik olarak aktif EPS'lerin antikanser, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar özelliklerinden yararlanılmaktadır. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen EPS'lerin üretimi ve kullanım alanlarıyla ilgili aşağıdaki çalışmalarda mevcuttur.

Abid ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada, Tunus'ta üretilen hindi ve sığır eti sosislerinden laktik asit bakterileri izole etmiştir. Bu suşları EPS üretim açısından değerlendirmiş, ürettiği EPS'nin karakterizasyonunu yapıp anyonik EPS'ler ile sodyum kazeinat arasındaki etkileşimleri incelemişlerdir.

Arayes ve arkadaşları 2023 yılında yaptıkları çalışmada, yeni bir bakteri türü olan *Alkalibacillus* sp. tarafından sentezlenen ekzopolisakkariti çalışmış ve biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. En yüksek EPS üretimini elde etmek için optimum kültür koşulları, 7 günlük inkübasyon süresi, pH 10 ve 250 g/L NaCl konsantrasyonunda belirlemişlerdir. EPS üretimi için en etkili karbon-nitrojen kaynağını glikoz ve maya ekstraktı ile peptonun kombinasyonu olarak tespit etmişlerdir.

Jurášková *et al.* (2022), yaptıkları çalışmada LAB'den türetilen EPS'nin yapısı, biyosentezi ve fizikokimyasal özelliklerini detaylı olarak çalışmıştır. Bunun yanında, LAB tarafından üretilen EPS'nin gıda ürünlerinde kullanımına ilişkin mevcut stratejiler tartışmış, prebiyotik, immünomodülatör, ilaç dağıtım, antioksidan, kolesterol düşürücü, anti-biyofilm, antimikrobiyal ve antikanser özelliklerini rapor etmişlerdir.

Latif *et al.* (2022), tarafından yapılan çalışmada, EPS'nin bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) yoluyla buğdayda kuraklık stresine toleransı teşvik etmek için çalışmış; sınırlı su koşullarında buğday büyümesini iyileştirebilen EPS üreten PGPR'nin izole edilmesi, karakterize edilmesi ve taranmasını gerçekleştirmişlerdir. EPS üreten rizobakteriyel suşlarla aşılınmış fidelerde farklı stres seviyelerinde (%0, 2, 4 ve 6 PEG-6000) kök morfolojisini ve fide büyümesini iyileştirmede daha iyi sonuçlar elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Abdel-Wahab *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, denizden izole edilen *Bacillus subtilis* tanımlanmış, EPS üretimi incelenmiş ve yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Monosakarit içeriğinde glikoz, ramnoz ve arabinoz'dan oluşan bir heteropolisakkarit olduğu rapor edilmiştir. Daha sonra EPS'nin antioksidan, sitotoksikite, antiinflamatuvar ve anti-Alzheimer aktiviteleri çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar

Tablo 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Markaları

No	Cihaz	Marka
1	Otoklav	HMC Hiramaya
2	PCR Cihazı	Senso Quest
3	Dondurucu (-86°C)	Glacier Ultralow Freezer
4	Mikroskop	LEICA
5	Buzdolabı (+4/-20 °C)	Vestel
6	Santrifüj	Hettich Zentrifugen Mikro 220R
7	Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
8	Saf Su Arıtma Cihazı	MP Minipure
9	Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
10	İnkübatör	Thermo Scientific Heratherm
11	Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng
12	Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
13	pH metre	Mettler Toledo
14	Saf Su Cihazı	Mp Minipure
15	Çeker Ocak	Fume Hood mikrotest
16	Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
17	Mikropipet Takımı	Thermo Scientific ve Eppendorf
18	Vortex	Fisons WhirliMixer
19	Etüv	Redline by-BINDER
20	Su Banyosu	Memmert

Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g besiyeri ve 1000 mL distile su manyetik karıştırıcı yardımı ile iyice çözdürüldü ardından otoklavlandı.

Stok Besiyeri: 30 g TSB besiyeri, 1000 mL distile su içerisine eklenerek karıştırıldı, ardından 250 mL gliserol ilave edilerek homojen bir karışım elde edildi. Stok tüplerine paylaştırıldı ve otoklavlandı.

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g TSA tartılıp, 1000 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü, ardından otoklavlandı ve steril kabin içerisinde petrilere döküldü.

1X Bradford çözeltisi: 0,04 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 mL %95'lik EtOH ve 40 mL %85'lik fosforik asitten oluşan karışıma eklendi ve çözündürüldü. Son hacim 200 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirilerek kullanıldı.

2M Sülfürik asit çözeltisi: Çeker ocak içerisine alınan sülfürik asitten (%95'lik) 5,61 mL alındı ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

5M NaOH çözeltisi: 4 g katı formda bulunan NaOH'dan tartılarak bir kaba alındı, 16 mL distile suda tam olarak çözünene kadar karıştırıldı.

0,1 mM DPPH-EtOH çözeltisi: 4 mg DPPH'dan tartıldı, ardından 10 mL %95'lik EtOH içerisinde çözündürüldü.

%0,9'luk Fizyolojik Su Çözeltisi: 4.5 g sodyum klorür (NaCl) tartıldı, 500 ml saf suda çözününceye kadar karıştırıldı. Ardından otoklavda steril edildi.

50 mM, pH:8 EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit): 2,92 g EDTA tartıldı, 180 ml distile suda çözününceye kadar karıştırıldı ve pH 8' olacak şekilde ayarlandı toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

%70'lik Etanol: Mezür yardımı ile 140 ml EtOH alınır, 60 ml distile su eklenerek karıştırılır, çözelti kullanılır.

1X TAE (Tris Asetat EDTA): 10 ml 50X TAE (Sigma) tamponu alınır, üzerine 490 ml distile su eklenerek karıştırılır, jel yürütmek ve agaroz jel hazırlamak için kullanılır.

%1'lik agaroz jel hazırlanışı: 0,9 g agaroz (Sigma) hassas teraziye alınarak tartılır, 90 ml 1X TAE'de çözündürülür ve 3 dk süre ile kontrollü bir şekilde kaynatılır. İlk sıcaklığı geçince 2 µl Etidyum bromür (Sigma) eklenir ve jel yürütme kabına dökülür.

X-Gal Solüsyonu: Işıktan etkilenen X-gal solüsyonu (5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactopyranoside); 40 mg/ml olacak şekilde hazırlanıp etrafı alüminyum folyo ile kaplandı, -20°C'de muhafaza edildi.

IPTG Solüsyonu: Saf su ile mililitrede 23,8 mg olacak şekilde çözelti hazırlandı. Sterilizasyon için 0,22 µm çapındaki milipor filtreden geçirildi, ardından kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Lügol Solüsyonu: 2 gr iyot ve 4 gr KCl hassas terazi kullanılarak tartıldı ve cam bir kaba alındı, ardından son hacim 200 ml'ye saf su ile tamamlandı.

Safranin Solüsyonu: 2 gr safranin tartılarak erlen içerisinde alındı ve %96'lık EtOH'da çözülünceye kadar karıştırıldı ardından üzerine 200 ml saf su ilave edildi.

Kristal Violet Solüsyonu: Kristal violet 4 gr olacak şekilde tartılıp %96'lık EtOH içerisinde çözündürüldü üzerine 160 ml saf su ilave edildi.

Malaşit Yeşili: 10 g malaşit yeşili tartılıp, 200 ml saf su içerisinde eklendi, karıştırıcıda çözündürülüp kullanıldı.

KOH Solüsyonu: Hassas terazide 3 gr KOH tartılarak 100 ml steril saf su içerisinde çözüldü, kullanılmadan önce otoklavlanıp steril hale getirildi.

CaCl₂ Solüsyonu (0,1M): 2,22 gr CaCl₂ tartılıp 200 ml saf su içerisinde çözüldü. Otoklav ile steril hale getirildi, ardından buzdolabında (+4°C) saklandı.

Amfisilin Solüsyonu: Amfisilin mililitrede 20 mg olacak şekilde hazırlandı (saf su ile) ve milipor filtreden geçirilerek, steril falkonlara alındı. Daha sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tablo 5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Üretici Firmaları

Kimyasal	Üretici Firma
Ampisilin	Sigma
Tryptone Soya Agar	Oxoid
LB Agar	LabM
LB Broth	LabM
Tryptone Soya Broth	Oxoid
Agaroz (DNase-RNase-Protease free)	Merck
TEMED (N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin)	Sigma-Aldrich
dNTP	Thermo
Etanol	İso-Lab Chemicals
Coomasie Brilliant Blue G-250	Merck
İzopropanol	İso-Lab Chemicals
DNA Marker	Thermo
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma
Metanol	İso-Lab Chemicals
Trikloroasetik Asit	Sigma
NaCl	Thermo
NaOH	Sigma-Aldrich
IPTG	Sigma

Tablo 5. (devamı)

Malaşit Yeşili	Merck
Aseton	Carlo Erba Reagents
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	İnvitrogen
Safranin	Sigma
DMSO	Sigma-Aldrich
İmmersiyon Yağı	Sigma
Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Oksidaz kiti)	Biomerieux
Lizozim	Sigma
H ₂ SO ₄	Sigma
Potasyum hidroksit (KOH)	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma-Aldrich
RNaz A	İnvitrogen
Distile Su	Thermo
DPPH	Sigma
Lügol	Sigma
Kloroform	Carlo Erba Reagents
6X Yükleme tamponu	Thermo
Sülfürik Asit	Fluka BioChemika
Etidyum Bromür	Sigma
DNA İzolasyon Kiti (Promega wizard ^R genomic DNA purification kit)	Promega
Kristal violet	Sigma
Plazmit izolasyon kiti (Promega Wizard ^R Plus Minipreps DNA Purification Systems)	Promega
Xgal (5-Bromo-4-Choloro-3-Indolyß-D-Galactopyranoside)	Sigma

Metot**Mikroorganizmaların izolasyonu**

Erzurum’da ki farklı ilçelerden alınan orman toprak örnekleri steril kaplar içerisinde laboratuvar ortamına getirildi. Her bir örnek için seri dilüsyon tüpü (10^{-1} - 10^{-7}) hazırlandı (%0,9 fizyolojik). Dilüsyon işlemi gerçekleştirilen tüplerden 100 ‘er µL alınarak, üzerinde örnek kodu ve dilüsyon numarası yazılan steril TSA besiyerine inoküle edildi. 30°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından petrilere oluşan koloniler incelenerek, farklı koloni morfolojisinde olan suşlar seçildi ve TSA besiyerine ekimi gerçekleştirildi. İzolatlar saf

düşürülünceye kadar üç faz çizgi ekim yöntemi yapıldı, ardından saf düşürülen koloniler kriyo tüplerde stok kültürü yapılarak -86°C 'de saklandı (Mahdiyah *et al.*2020)

İzolatların EPS üretim kapasitelerinin karşılaştırılması

EPS üretimi

EPS üreten suşları belirlemek için; stoğa alınan izolatlar TSA besiyerinde çizgi ekim yöntemi ile canlandırıldı. Katı besiyerinde saf olarak gelişen kolonilerden ön kültür hazırlamak için öze dolusu alınarak 100 mL TSB içeren steril besin ortamına inoküle edildi. 24 saat inkübasyona bırakılan örneklerin OD₆₀₀ değerleri 1.0 absorbans verecek şekilde ayarlanıp 1 ml'si ana kültüre aktarıldı. Ana kültür olarak 250 ml'lik erlenlerde hazırlanan steril 100 ml TSB kullanıldı. EPS üretiminin gerçekleşmesi için, 30°C 120 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (Janesch *et al.*2013; Maurya *et al.*2022)

Ekstraksiyon

EPS üretimi gerçekleştirildikten sonra, her bir izolat için hazırlanan ana kültürden hücre pelletleri 6000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi ile uzaklaştırıldı. Süpernatant kısımları alınıp ortamdaki protein kirliliğinden arındırmak için %4 oranında TCA eklenip, iyice çözündürülerek +4°C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra çöken protein kirlilikleri 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Süpernatant kısmı alınan numunelere ekzopolisakkaritin çökmesi için hacminin 2 katı kadar soğuk etanol eklenip, 48 saat süre ile +4°C'de buzdolabında bekletildi. Süre sonunda 7000-8500 rpm'de 10-15 dk santrifüj işlemi ile EPS'ler çöktürüldü ve liyofilize edilerek tartıldı (Xu *et al.*2019; Sharma *et al.*2020). İzolatların EPS üretim miktarları kaydedildi, ardından deiyonize suda çözünebilirliğine bakıldı. Suda çözünebilen, en yüksek EPS üreten izolat seçilerek izolatın tanılanması için klonlama basamağına geçildi.

Seçilen izolatın konvensiyonel yöntemlerle karakterizasyonu

Gram boyama

İzolatın hücre duvarı yapısını tespit etmek amacıyla KOH ve Gram boyama testleri yapıldı. Stoktan canlandırılan izolattan öze dolusu alınarak temiz bir lam üzerine yayıldı ve fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan preperat sırasıyla kristal viyole, lügol, alkol ve safranin ile muamele edildi. Ardından mikroskopta incelendi; mavi-mor renkte görülen bakteri Gram (+), pembe-kırmızı renkte görülen ise Gram (-) olarak değerlendirildi. Diğer bir yöntem KOH testidir, bu yöntem Albayrak (2018) tez çalışmasındaki gibi yapılmıştır (Albayrak 2018).

Endospor boyama

Endospor testinde, ilk önce lam alınıp temizlenir, ardından ortasına bir damla su ve öze dolusu bakteri konularak yayıldı ve fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fikse edilmiş hücreler, kaynayan su banyosu üzerine yerleştirilerek sırasıyla malaşit yeşili ve safraninle muamele edildi. Su ile yıkanıp kurutulan preparat mikroskop altında incelendi. Boyama sonucunda endospor yeşil, vejetatif hücre ise kırmızıya boyandı (Prescott *et al.* 2002).

Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

Katalaz testi

Aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerde bulunan katalaz enzimi; ETS (elektron taşıma sistemi), birden fazla basamaktan oluşmaktadır ve son basamağında H_2O_2 üretilmektedir. Katalaz enzimi açığa çıkan hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayarak, H_2O ve O_2 'e dönüştürür. Açığa çıkan O_2 gazı kabarcıklar halinde görülür ve katalaz enziminin varlığını gösterir. Analiz Albayrak (2018) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Oksidaz testi

Mitokondride bulunan 'Sitokrom c' proteini, transmembran proteini olup, solunum olayında yer almaktadır. Oksidaz testi ile bir mikroorganizmanın, sitokrom c proteini taşıyıp-taşımadığı tespit edilmektedir. Deney Albayrak (2018) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

EPS Üreten İzolatın Moleküler Tanılaması

Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonuna başlamadan önce mikrobun canlandırma işlemi vardır. Bunun için TSA besiyerinde stoktan canlandırılan DT3-C kodlu izolat $30^{\circ}C$ 'de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Saf olarak geliştirilen kültürden tek koloni alınıp, 100 mL steril TSB içeren besiyerine aktarıldı ve inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gelişen izolat santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı, ardından izolasyon 'Promega WizardR (A2360)' kitine uygun olarak gerçekleştirildi (Baltacı and Adiguzel 2016).

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu

Bakteri taksonomisinde yaygın olarak kullanılan 16S rRNA gen bölgesi evrimsel olarak korunmuştur. Genomik DNA izolasyonundan sonra gen bölgesi amplifiye edildi. Her bir DNA örneği için, Tablo 6. de verilen reaksiyon tüpleri hazırlandı. PCR tüpleri termal döngü cihazına

yerleştirildi ve Tablo 7.'de yer alan program ile istenilen DNA bölgesi çoğaltıldı (Varol *et al.*2023).

Tablo 6. 16S rRNA PCR İşleminde Kullanılan Reaktifler

REAKTİF	KONSANTRASYON	MİKTAR(μl)
PCR Buffer (sigma)	10X	3
dNTP	10 mM	0,6
MgCl ₂	25 mM	1,8
27F	5 mM	3
1492R	5 mM	3
DMSO	%99	1,2
ddH ₂ O	-	14,4
DNA		3-4

Tablo 7. PCR Programı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	49	1	36
Uzama	72	2	1
Son Uzama	72	5	
Saklama	4	∞	

16S rRNA PCR jel elektroforezi

Agarozdan 1,6 gr tartılıp 250 ml erlen içerisine alındı. Daha sonra üzerine 160 mL TAE eklenip, karıştırıldı ve mikrodalga fırınında agaroz kaynatıldı (iyice çözünmesi sağlandı). Karışım çeker ocağın içerisine alınıp 50°C'ye kadar soğuması beklendi ve etidyum bromür eklenip iyice karıştırıldı. Elde edilen karışım, jel elektoroforez tankına alındı ve donuncaya kadar beklendi.

Elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile dolduruldu ve örneklerin yükleme işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez düzeneği 110 voltta 60-100 dk yürütüldü ve bantlar jel görüntüleme sisteminde incelendi (Adigüzel 2006).

Kompotent hücrenin hazırlanması

Klonlama işleminin ilk basamağı kompotent hücre hazırlanmasıdır. Kompotent hücre hazır olarak satın alınabildiği gibi CaCl_2 ile de hazırlanır. Tez kapsamında *Escherichia coli JM101* suşu ile CaCl_2 kullanılarak Baltacı and Adiguzel (2016) protokolü uygulanıp kompotent hücre hazırlandı.

Ligasyon

Ligasyon işlemi için; ligasyon tamponu (5 μL), 16S PCR ürünü (3 μL), vektör (pGEM-T/Promega) (1 μL) ve T4 DNA ligaz (1 μL) PCR tüpünde bir araya getirildi ve karışım 16°C 'de 13-15 saat boyunca inkübe edildi, süre sonunda ligasyon ürünleri $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Albayrak 2018).

Transformasyon

Eppendorf tüplerine önceden hazırlanan 200 μL kompotent hücre konuldu, üzerine 2,5 μL ligasyon ürünü eklenip, 30 dk süre ile buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda buzda bekletilen tüpler alınarak karışımın ısı şokuna uğratılması amacıyla 42°C 'de 2 dk süreyle bekletildi. Ardından tüpteki solüsyona 200 μL LB eklendi ve 37°C 'de 60-100 dk (süre bakterilerin gelişimine bağlı olarak değişebilir) bekletildi. Daha sonra eppendorf'ta bulunan kompotent hücre ve ligasyon ürünü karışımından 150 μL alınıp, X-Gal, IPTG ve amfisilin içeren LB Agara yayıldı. Petriler koloni oluşuncaya kadar 37°C 'de inkübe edildi (Baltacı and Adiguzel 2016). İnkübasyon sonunda petriler $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece bekletildi. Petrilerde gözlenen mavi ve beyaz kolonilerden, beyaz olanlar seçildi ve koloni PCR aşamasına geçildi.

Koloni PCR reaksiyonu

Transformasyon işleminden sonra yapılan yayma ekimler sonucunda petrilerde mavi-beyaz koloniler gözlemlendi. Beyaz kolonilerden örnek alınarak koloni PCR yapıldı. Koloni PCR reaksiyon karışımı ve PCR programı aşağıdaki gibidir (Tablo 8).

Koloni PCR reaksiyon karışımı;

- ✓ 16,1 μL dH_2O
- ✓ 1,8 μL MgCl_2 (25mM)
- ✓ 2'şer μL 5 μM primer [T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') ve SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')]
- ✓ 0,3 μL Taq DNA polimeraz
- ✓ 3 μL tampon (MgCl_2 'süz)
- ✓ 0,6 μL dNTP mix

- ✓ 1,2 µl DMSO
- ✓ Koloni

Tablo 8. Koloni PCR Programı

İŞLEM	SICAKLIK (°C)	SÜRE (dk,sn)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	36
Bağlanma	55	30 sn	36
Uzama	72	2 dk	36
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

Koloni PCR'ın yürütülmesi için %1'lik agaroz jel (EtBr içeren) hazırlandı. Markır ve örnekler yüklenerek 100-110 voltta 60 dakika süre ile yürütüldü. Görüntüleme işleminin ardından pozitif koloniler seçilerek, amfisilin içeren LB sıvı besiyerine aktarıldı. 37°C'de 14 saat süre ile inkübasyona bırakılan örnekler inkübatörden alınarak plazmit izolasyon basamağına geçildi.

Plazmit izolasyonu ve konsantrasyonlarının tespiti

İnkübatörden çıkarılan kültürler, 10.000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Plazmitler, Promega firmasına ait "A1330 plazmit izolasyon kit" protoküle göre saflaştırıldı. Plazmit yoğunluğunu belirlemek için 998 µL saf su ve 2 µL plazmit karıştırılıp 260 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Ölçüm sonunda yoğunluğu 100-200 ng aralığında olan plazmitler sekans işlemi için uygun olarak değerlendirildi ve MacroGen firmasına gönderilmeden önce EcoRI enzimi ile kesilip kontrol edildi (Baltacı 2020)

DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağacın oluşturulması

Sekans işlemi MacroGen (Hollanda) firmasında yaptırıldı. Gelen sekans sonuçları 'BioEdit' programı ile analiz edilip, FASTA formatına çevrildi. Dizi analizi sonucu Albayrak *et al.*(2019) çalışmasında ki gibi değerlendirilerek Genbank numarası alındı ve MEGA 4.0 yazılımı ile filogenetik ağaç (neighbor-joining) çizildi (Albayrak *et al.* 2019).

***Cytobacillus oceanisediminis* DT3-C ile EPS Üretiminin Optimizasyonu**

Optimal sıcaklığın belirlenmesi

EPS üretiminde ilk olarak sıcaklık parametresi optimize edildi. Bunun için *Cytobacillus oceanisediminis* DT3-C bakterisi stoktan TSA besiyerine canlandırıldı. Saf olarak canlandırılan bakteriler TSB ön kültürüne alınarak 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometrede 600 nm'de OD ölçümü alındı ve 1.0 absorbans olacak şekilde hesaplaması yapıp içerisinde 100 ml TSB içeren 6 erlene inoküle edildi. Erlenler sırasıyla 20,25,30,35,40,45°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörlerde 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde sırasıyla; 6500 rpm'de 10 dk santrifüjlenip hücreler uzaklaştırıldı, yeni bir erlene alınan örneklerin üzerine TCA eklenip proteinlerin çökmesi sağlandı ve santrifüj edildi. Süpernatant alınıp 1:2 oranında etanol eklenerek +4°C'de bir gece beklendi ve santrifüj işlemi ile EPS çöktürmeleri elde edildi. Ardından liyofilizasyon yapıldı ve miktarlar kaydedildi. En yüksek EPS üretimine sahip sıcaklık değeri sonraki optimizasyon basamaklarında kullanıldı.

Optimal pH değerinin belirlenmesi

EPS üretiminde en uygun pH değerinin belirlenmesi için hücreler stoktan alınarak TSA besiyerinde canlandırıldı ve TSB ön kültürüne alındı. Ön kültürün OD değeri 1.0 absorbans olacak şekilde hesaplandı ve önkültürden sırasıyla 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerlerine sahip 100 mL optimal besiyeri içeren fermentasyon ortamına inoküle edildi. Optimum sıcaklıkta 24 saat inkübe edilen kültüre sırasıyla bakterilerin uzaklaştırması, protein çöktürmesi ve etil alkolde EPS çöktürmesi yapılarak EPS'ler miktar tayini için liyofilizasyona gönderildi. Farklı pH değerlerinde üretilen EPS miktarları kaydedilerek elde edilen verilere göre en yüksek EPS üretimine sahip pH değeri çalışmanın takip eden aşamaları için seçildi.

Optimal fermantasyon süresinin belirlenmesi

Optimum inkübasyon süresini belirlemek için TSA'da canlandırılan bakteriden tek koloni alınıp TSB besiyerine ekim yapıldı. Ön kültürün OD değeri hesaplandı ve 100 ml TSB (Optimal pH'da) içeren erlenlere eşit miktarda inokülasyon gerçekleştirildi. Örnekler 24, 48, 72 ve 96 saat olacak şekilde optimal sıcaklığa ayarlanan inkübatöre bırakıldı. Süre sonunda sırasıyla kültürler hücre çöktürmesi (santrifüj), TCA ile protein çöktürmesi ve etanolle muamele yapılarak EPS' nin elde edilmesi gerçekleştirildi. Sonrasında saflaştırılan EPS liyofilize hale getirildi. Liyofilize örneklerin ağırlığı belirlendi ve maksimum EPS üretiminin olduğu fermantasyon süresi sonraki çalışmalarda kullanıldı.

EPS'nin Total Üretimi

Total EPS üretimi optimal koşullar altında toplam 4 litre (250 ml erlenlerin her birinde 100 ml TSB olacak şekilde 10 erlende gerçekleştirildi ve bu basamak 4 kere tekrarlandı) hacimde TSB besiyerinde gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda gelişen kültür 6000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı, elde edilen süpernatant üzerine %4 oranında TCA eklenip 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler 6000 rpm'de 10-15 dk santrifüj edilerek proteinler uzaklaştırıldı ve supernatant üzerine hacimce iki katı olacak şekilde saf etanol (önceden buzdolabında soğutularak) eklenerek +4°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 7000-8000 rpm'de 10-15 dk santrifüj edilerek supernatant atıldı ve toplanan EPS'ler liyofilize edilerek karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Üretilen Ekzopolisakkaritin Karakterizasyonu

Farklı solventler içerisinde çözünürlüğün belirlenmesi

Liyofilize hale getirilen EPS örneğinden etanol, izopropanol, distile su, metanol, klorofom, DMSO, hekzan, formaldehit ve aseton'da çözünürlüğü araştırıldı. Bunun için 5 ve 10 mg/mL olacak şekilde EPS- çözücü örnekleri ependorflarda hazırlandı ve tüpler vortekslenerek çözünürlükleri gözlemlendi. Daha sonra örnekler 5 dakika boyunca 12000 rpm de santrifüjlendi ve süpernatanttan 0,5 mL alınıp şeker içeriğinin analizi için kullanıldı. EPS içeriğinin büyük bir kısmı karbonhidrattan oluşturduğu için EPS' nin çözünürlüğünü belirlemede çözücüye geçen karbonhidratın toplam miktarı göz önüne alındı. Çözünürlük belirlemede fenol sülfirik asit yöntemi kullanılarak şeker miktarı hesaplandı (Ciezack *et al.*2010).

Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

Liyofilize edilen EPS örneğinin total karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol-sülfirik asit yöntemi ile analiz gerçekleştirildi. Bu yöntem için, distile su içerisinde çözünmüş 1 mg/mL EPS örneğinden 100 µL alınıp cam tüpe aktarıldı, ardından üzerine 1 mL %6'lık fenol ve 5 mL sülfirik asit eklenerek oda sıcaklığında 15 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler soğutularak spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart grafik için 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL ve 0,8 mg/mL olacak şekilde glukoz örnekleri hazırlandı. Her bir tüpe 1 mL %6'lık fenol ve 5 mL saf sülfirik asit eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı ve spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Ölçülen absorban değerleri ile standart grafik oluşturuldu ve EPS'nin spektrofotometrik ölçümü yapılarak bu grafiğe göre toplam karbonhidrat içeriği hesaplandı (Vosough *et al.*2022).

Protein içeriğinin belirlenmesi

Warburg-Christian yöntemi

Kolay ve hızlı sonuç veren Warburg – Christian yöntemi ile numunedeki yaklaşık protein miktarı ölçülmektedir. Bu yöntem nükleik asit, karbonhidrat ve proteinlerin farklı dalga boylarında absorbans vermelerine dayanır. Proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan grupları maksimum 280 nm’de, nükleik asitler 260 nm’de ve karbonhidratlar 230 nm de absorbans verir. Bu yöntemde; liyofilize 5 mg EPS örneği 1 ml distile su içerisinde vortekslenerek çözündürüldü, daha sonra karışım 230, 260 ve 280 nm’de ölçüldü (Genc *et al.*2021).

Bradford yöntemi

Liyofilize edilen EPS örneğindeki toplam protein miktarını belirleyebilmek için bradford yöntemi ile analiz gerçekleştirildi. Bu yöntemde, öncelikle 0,02 g Coomasie Brilliant Blue G-250 tartılarak erlen içerisine alındı, üzerine 10 mL %95’lik EtOH ve 20 mL %85’lik fosforik asit karıştırılarak son hacmi distile su ile 200 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Liyofilize haldeki EPS örneğinde son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde distile suda hazırlandı. EPS örneğinden 100 µL alınıp üzerine 900 µL bradford çözeltisi eklendi ve spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda köre (distile su ve Bradford ile hazırlanan) karşı ölçüm alınarak absorbans değeri ölçüldü. Standart grafiği oluşturmak için; 0,8 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL konsantrasyonlarda olan BSA örnekleri hazırlandı. Her bir örnekten 100 µL alınıp üzerine 900 µL bradford çözeltisi eklendi ve spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. Elde edilen değerler ile standart eğri oluşturuldu ve EPS’nin verdiği değer standartta yerine konularak toplam protein miktarı belirlendi (Seo *et al.*2015).

Monomer kompozisyonunun belirlenmesi

Monomer kompozisyonun belirlemeden önce polimer yapıda bulunan glikozidik bağların kırılması ve monosakkaritlerin serbest halde bulunması gerekmektedir. Bunun için 200 mg EPS örneği (liyofilize halde), 2M 5 mL sülfürik asit ile 100°C’de 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda inkübatörden alınarak oda ısısında soğuması beklendi ve 5M NaOH ile nötralize edildi. Nötralizasyon sonrasında oluşan küçük partiküllerin giderimi için 4500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Alınan supernatant 0,45 µm çaptaki membran filtreden geçirildi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonuna yerleştirildi. Monosakkaritlerin analizi, 40°C’de bir Inertsil NH2 kolonu (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) ve RID detektör sistemi ile donatılmış bir Prominence LC-20A HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirildi. Hareketli faz olarak belirlenen Asetonitril:su (4:1) karışımı 1 mL/dk akış

hızında kolona verildi. HPLC analizi, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) tarafından gerçekleştirildi (Shang *et al.*2014).

Fonksiyonel grup analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile ekzopolisakkarit örneğinin fonksiyonel grupları ve yapısal karakterizasyonu hakkında bilgi edinmek amacıyla liyofilize haldeki örnek, analiz için Doğu Anadolu Araştırma Merkezi (DAYTAM)'a götürüldü.

Moleküler ağırlığın belirlenmesi

EPS'nin moleküler ağırlıkları (MW'ler) Mark-Houwink-Sakurada denklemine göre belirlendi. Moleküler ağırlık hesaplanırken iki denklem kullanıldı. 1. Denklemden, η = içsel viskozite, K = verilen çözünen-çözücü sistemi a= sıcaklık için spesifik sabit değerler ve Mw = viskozite-ortalama moleküler ağırlıktır. Yöntem aynı hacimdeki çözücünün (%1 asetik asitten oluşan) ve ürettiğimiz ekzopolisakkaritten oluşan çözeltilerin akış süresinin ölçülmesine dayanmaktadır. İçsel viskozite 2. Denklemlerle hesaplandı: Burada η = içsel viskozite, η_{sp} = spesifik viskozite ve C = EPS numunelerinin konsantrasyonudur (Kayar *et al.*2022).

$$\eta = K.Mw^a \quad 1$$

$$\eta = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad 2$$

Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite

Üretilen ekzopolisakkaritin antimikrobiyal aktivitesine bakmak amacıyla disk difüzyon testi yapıldı. İlk önce patojen türler stoktan TSA besiyerine ekildi ve 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Tür olarak *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Bacillus cereus* (ATCC 33019) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) kullanıldı. İnkübasyon sonrasında saf olarak gelişen kolonilerden steril çubuklar ile alınarak, steril fizyolojik tüplere inoküle edildi ve Mc Farland 0,5 olacak şekilde ayarlandı. Her bir tüpten 100 µL alınarak TSA besiyeri ortamına cam drigalski ile yayma ekim yapıldı. Liyofilize olan EPS örnekleri 10 mg/mL 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı. Boş antimikrobiyal disklerle 20 µL emdirilerek petrilere yerleştirildi ve 37 °C'de 24 - 48 saatlik inkübasyon sonunda zon çapları ölçüldü (Genc *et al.*2021).

EPS'nin antikanser aktivitesi

Üretilen EPS'nin insan nöroblastoma kanser hücreleri (SHSY-5Y), kolon kanseri hücreleri (HT-29), prostat kanseri hücreleri (DU-145) ve akciğer kanseri hücreleri (A-549) üzerinde antikanser etkileri araştırıldı. Hücre çizgileri, %10 fetal sıgır serumu ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren RPMI 1640 hücre ortamında, 37 °C'de %5 CO₂ içeren bir fırında kültürlendi. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 96 oyuklu plakalara (oyuk başına 5000 hücre) aktarıldı. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra farklı konsantrasyonlarda (suda 0-2,5 mg/mL) hazırlanan EPS örnekleri besiyerine eklendi. Hücreler tekrar 24 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 3 µL WST-1 eklendi ve %5 CO₂ içeren fırında 37°C'de 2 saat daha inkübasyona devam edildi. İnkübasyondan sonra plaka 1 dakika çalkalandı ve absorbans, ELISA okuyucusu (SpectraMax Molecular Devices, ABD) kullanılarak 650 nm referansa karşı 450 nm'de ölçüldü. Antikanser faaliyetlerine ilişkin kültür görüntüleri Olympos invert mikroskop kullanılarak kaydedildi (Karadai *et al.*2021)

EPS' nin *in vitro* Antioksidant Aktivite Tayini

DPPH radikali giderme potansiyeli

EPS'nin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini temizleme potansiyeli Blois (1957) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirildi. Bunun için; yaklaşık 0,9 ml DPPH çözeltisi (0,05-3,2 mg/ml), 0,3 ml EPS çözeltisine (0,05-2.5 mg/ml) ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında (karanlıkta) 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 517 nm'de absorbans ölçüldü. Deneyler süresince deiyonize su (0,3 mL) kontrol olarak (A₀) ve vitamin C (askorbik asit) çözeltisi (0; 0,05; 1, 2 ve 2,5 mg/ml) pozitif kontrol olarak kullanıldı. DPPH radikali giderme potansiyeli aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Temizleme} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: EPS/askorbik asit}$$

çözeltisi yerine deiyonize su ve DPPH ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A₁: deiyonize su içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve DPPH ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A₂: DPPH içermeyen fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin Absorbansını temsil etmektedir).

Süperoxide radikali temizleme potansiyeli

EPS' nin süperoksit (O₂•-) radikalini giderme potansiyeli Liu *et al* (1997) ve Xu *et al* (2009) tarafından belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi. Bunun için EPS veya askorbik asit (pozitif kontrol) deiyonize suda (0; 0,05; 0,1; 1, 2 ve 2,5 mg/mL' lik konsantrasyonlarda)

çözüldü. Her numune çözeltisinin 0,1 ml'lik bir kısmı, 78 µM NADH içeren 1 ml 16 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 µM fenazin metosülfat (PMS) içeren 1 ml 16 mM Tris-HCl (pH 8,0) ve 1 mL 50 µM nitrotetrazolium mavi klorür (NBT) içeren 16 mM Tris-HCl (pH 8,0) ile karıştırıldı. Çözelti 25 °C'de 5 dakikalık inkübasyona bırakıldıktan sonra çözeltinin absorbansı 560 nm'de ölçüldü. O₂•- radikal etkisi temizleme potansiyeli aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Temizleme} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: EPS/askorbik asit}$$

çözeltisi yerine deiyonize su ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin absorbansını, A_1 : PBS içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_2 : NBT içermeyen (yerine PBS) fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin Absorbansını temsil etmektedir).

EPS'nin ABTS radikali temizleme potansiyeli

EPS'nin 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radikal temizleme aktivitesi, Cheng *et al* (2021) ve Ji *et al* (2022) tarafından önerilen yöntemle göre ölçüldü. Bunun için ilk olarak, 9,9 mg potasyum persülfat 15 ml 5,55 mmol/L ABTS sulu çözeltisi ile karıştırılmış ve mavi-yeşil bir renk oluşumu için çözelti karanlık bir ortamda 25°C'de 15 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bu çözelti, absorbans değeri 734 nm'de 0,70 oluncaya PBS (100 µmol/L, pH 7,4) ile seyreltilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki (0; 0,05; 0,1; 1; 2 ve 2,5 mg/ml) EPS örnekleri (1 ml) ve ABTS solüsyonu (2 ml) ile 25 dakika reaksiyona sokulmuş ve ardından karışımın absorbans değeri 734 nm'de ölçülmüştür. Askorbik asit çözeltisi pozitif kontrol olarak kullanıldı. Temizleme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Temizleme} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: EPS/askorbik asit}$$

çözeltisi yerine deiyonize su ve ABTS ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_1 : PBS içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve ABTS ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_2 : ABTS içermeyen fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin Absorbansını temsil etmektedir).

EPS'nin hidroksil radikali temizleme potansiyeli

EPS' nin hidroksil radikal (OH•) temizleme aktivitesi, Qiao *et al* (2009) tarafından belirtien yöntemle göre belirlendi. Bunun için; deiyonize su içerisinde farklı konsantrasyonlarda (0; 0,05; 0,1; 1, 2 ve 2,5 mg/ml) hazırlanan EPS çözeltisi (0,5 ml), 0,5 ml salisilik asit çözeltisi (9 mmol/L), 0,5 ml FeSO₄ çözeltisi (9 mmol/L) ve 0,5 ml H₂O₂ çözeltisi (9 mmol/L) ile karıştırıldı. Hazırlanan final çözeltisi kısa süreli çalkalama işeminin ardından 37°C'de 40 dakika

süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışımın absorbansı 510 nm'de ölçüldü. Deneylerde pozitif kontrol olarak EPS ile aynı konsantrasyonda askorbik asit çözeltisi kullanıldı. Temizleme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Temizleme} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: EPS/askorbik asit}$$

çözeltisi yerine deiyonize su ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_1 : PBS içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_2 : H_2O_2 içermeyen (yerine deiyonize su) fakat diğer bileşenleri içeren çözeltinin Absorbansını temsil etmektedir).

Nitrik oksit radikali temizleme aktivitesi

EPS' nin nitrik oksit ($NO\bullet$) radikali temizleme aktivitesi Larocca *et al* (2018) tarafından yazılan yönteme göre yapıldı. Deiyonize su içerisinde EPS (0; 0,05; 0,1; 1, 2 ve 2,5 mg/ml) ile hazırlanan çözeltinin 0,1 ml' si, 20 mM sodyum nitroprussid çözeltisinin 0,1 ml' si ile karıştırıldı ve 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışıma 0,1 ml Griess reaktifi ilave edildi ve karanlıkta 10 dakika süreye tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardında 560 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Deneylerde pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanıldı. Temizleme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Temizleme} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad (\text{Formülde } A_0 \text{ yani kontrol: EPS/askorbik asit}$$

çözeltisi yerine deiyonize su ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını, A_1 : PBS içerisinde EPS/askorbik asit çözündürülmüş çözelti ve diğer bileşenler ile hazırlanan çözeltinin Absorbansını temsil etmektedir).

EPS'nin *in vitro* Anti-Aging Aktivite Tayini

Dermal fibroblast hücrelerinde EPS'nin antiaging aktivitesi

Normal insan dermal fibroblastları (NHDF'ler), L-penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu (Gibco) ile desteklenmiş PromoCell fibroblast büyüme ortamında kültürlendi (%5 CO_2 ile nemlendirilmiş atmosferle 37 °C'de). Ortam her 2-3 günde bir yenilendi ve fibroblastlar %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücreler pasajlandı. Yaşlanma sürecini taklit etmek için NHDF'ler, büyüme ortamındaki 96 yuvalı bir plakada 8000 hücre/oyuk yoğunlukta gece boyunca kültürlendi. Daha sonra senesensi indüklemek için NHDF' lerin bir grubuna 300 μM hidrojen peroksit (H_2O_2) eklenmiş ve yaşlı grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Diğer taraftan, iki NHDF grubuna H_2O_2 ' nin yanısıra farklı konsantrasyonlarında EPS (1 ve 2 mg/mL)'de uygulanarak EPS' nin koruyucu rolünün ortaya çıkarılması amaçlanmıştır (uygulama grupları). H_2O_2 ve EPS' uygulaması yapılmayan NHDF' ler ise normal kontrol

grubu olarak değerlendirilmiştir. Bütün gruplar 24 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Tüm koşullarda ortam yalnızca %0,5 FBS içermiştir) (Quiles *et al.* 2022). 24 saatlik inkübasyonun ardından ortam uzaklaştırılmış, kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve daha sonra WST-1 ile hücre canlılığı ölçülmüştür

Dermal fibroblast hücrelerinde ROS seviyelerinin araştırılması

Hücre içi ROS seviyesinin ölçümünde kullanılan yöntemlerden biriside redoks duyarlı floresan boya 2',7'-diklorodihidrofloresan diasetat (DCFH-DA) kullanımıdır. Yöntemin esası; DCFH-DA hücrelere girmesi, hücresel esterase tarafından floresan olmayan 2',7'-diklorodihidrofloresin'e (DCFH) deasetillenmesi ve DCFH' ninde ROS tarafından hızla yüksek floresanslı 2',7'-diklorodihidrofloresin'e (DCF) oksitlenmesi esasına dayanır. DCFH'nin oksidasyonu ise neredeyse yalnızca sitozolde meydana gelir ve hücre içi ROS seviyesiyle orantılı bir floresan tepkisi üretir (Bielecka-Kowalska *et al.*, 2018). Mevcut çalışmada da, NHDF'lerdeki ROS seviyesi bu yöntemle belirlenmiştir. Bunun için, PBS ile yıkanan hücrelere, 20 uM DCFH-DA çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler daha sonra 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Hücre içi ROS seviyesi, yeşil floresans yoğunluğun bir mikropilaka okuyucu kullanılarak floresans sinyalinin (uyarma ve emisyon dalga boyları: sırasıyla 488 nm ve 510 nm) değişimi ile belirlendi (Bielecka-Kowalska *et al.* 2018; Pattananandecha *et al.* 2021).

In vitro Antiobezite Etki

Hücre kültürü ve adiposit farklılaşması

3T3-L1 preadiposit hücre hattı (ATCC, ABD), %9 fetal sığır serum, NaHCO₃ (1,5 g/L) ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyerinde (yüksek glikozlu DMEM), %5 CO₂' li inkübatör ortamında 37°C'de inkübe edildi. Adiposit farklılaşmasını tetiklemek için 3T3-L1 hücreleri daha sonra (10⁵ hücre/oyuk) 0,5 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX), 1 µM deksametazon (DEX), 1 µM insülin, 1,5 g/L NaHCO₃ ve %1 penicillin-streptomycin içeren DMEM-temelli farklılaşma ortamına aktarıldı. 4 günlük inkübasyonun ardından ortam, %8 fetal sığır serumu, 1 µM insülin, 1,5 g/L NaHCO₃ ve %1 penicillin-streptomycin içeren yüksek glukozlu DMEM'le değiştirildi ve hücreler tekrar 2 günlük inkübasyona bırakıldı. En son olarakda, olgun 3T3-L1 adipositleri, uygun dozlarda polisakkarit çözeltisi (0, 25, 50 ve 100 ve 200 µg/mL) ile muamele edildi ve ardından 48 saat süreyle inkübe edildi (Cheng *et al.* 2023).

Adipositlerde hücre içi lipit birikimi üzerine EPS'nin etkisi

Farklılaşmış adipositin hücre içi lipit birikimi, ORO (oil-red O) boyama yöntemine göre belirlendi. Bunun için, 3T3-L1 hücreleri PBS ile yıkandı ve ardından bir saat boyunca %10 formalin solüsyonunda sabitlendi. Sabitlenmiş hücreler %20 izopropanol çözeltisiyle yıkandı ve 37°C'de havayla kurutuldu. Daha sonra, hücrelere %0,6 ORO solüsyonu ile boyama işlemi uygulandı ve yeniden boyanmış hücreler iki saat süreyle tekrar havayla kurutma işlemine bırakıldı. İki saat sonra hücreler, akan musluk suyuyla üç kez hafifce yıkandı ve tekrar havayla kurutuldu. Ardından her kuyucuğa 2-propanol eklenerek lipit çözeltisi (100 µL) alındı. Çözelti 96 kuyucuklu plakaya aktararak mikropilaka okuyucu kullanılarak 500 nm'de absorban ölçümü yapıldı (Lee *et al.* 2023).

Adiposit hücre hattı üzerine EPS' nin sitotoksik etkisi

MTT analizi metabolik olarak aktif hücrelerin basit, doğru ve güvenilir sayımına olanak sağlayan bir yöntemdir. Mitokondriyal aktivite doğrudan canlı hücrelerin sayısı ile ilişkili olduğundan, bu analiz genellikle farklı hücre hatlarındaki farklı bileşiklerin çoğalma kapasitesini ve sitotoksik potansiyelini değerlendirmek için yapılır. MTT analizi, bir maddenin hücre canlılığı üzerinde oluşturduğu etkileri yansıtır; bu etkiler, hücre canlılığı tehlikeye girerse toksik etkiler (sitotoksikite) veya hücre canlılığı artarsa uyarıcı etkiler (çoğalma) olarak yorumlanabilir. Canlı hücrelerin hücre sayımını gerçekleştirmek için hücre canlılığı, tripan mavisi çözeltisi ile boyanarak kontrol edilir, canlı hücreler mikroskop altında sayılır (Quiles *et al.* 2022).

Yukarıda da belirtildiği gibi olgunlaşma aşamasına kadar getirilmiş 3T3-L1 adipositleri, uygun dozlarda polisakkarit çözeltisi (0, 25, 50 ve 100 ve 200 µg/mL) ile muamele edildi ve ardından 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucuklara 50 µL MTT (2 mg/mL) ilave edildi ve tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve ortama 200 µL DMSO (formazan kristallerinin çözünmesi için) ilave edildi. Oluşan formazan kristallerinin içeriği, mikropilaka okuyucu kullanılarak 540 nm'de tespit edildi.

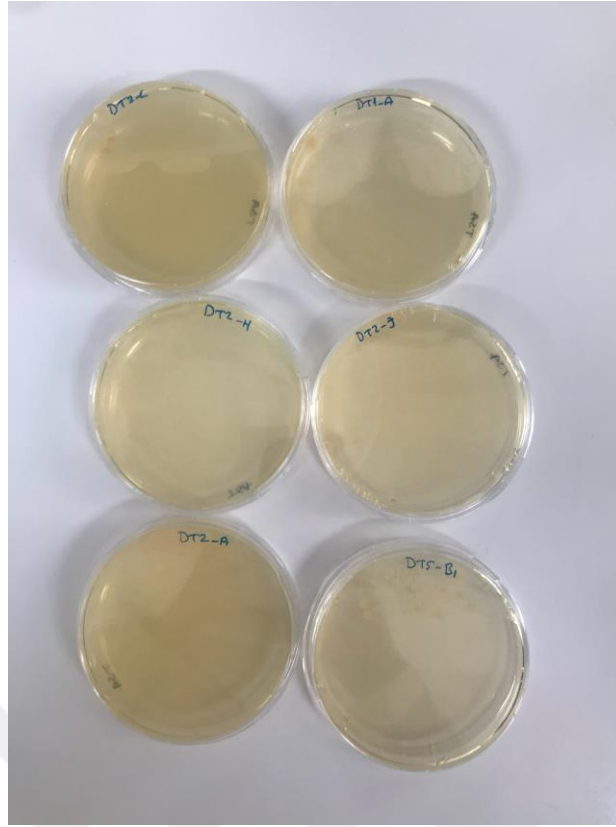
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bakterilerin İzolasyonu ve EPS Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Erzurum'un ilçelerinden Hasankale (40°04'52.0"N 41°44'05.8"E), İspir (40°30'27.9"N 41°02'04.8"E), Oltu (40°41'15.1"N 41°55'49.7"E), Narman (40°13'08.6"N 41°52'38.9"E) ve Tortum (40°23'46.3"N 41°25'03.2"E)'da bulunan çam ormanlarının altındaki toprak örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi ve toplam 143 bakteri izole edildi. İzole edilen bakteriler mikroskopik ve koloni yapılarına göre (petride oluşturdıkları) seçildi ve farklı olduğu düşünülen 70 izolata indirildi, ardından bu izolatlar stok kültüre alındı (Şekil 1) Seçilen izolatlardan EPS üretimi gerçekleştirildi ve kaydedildi. İzolatlardan DT1-DT15 arasındaki izolatlar Narman'dan, DT16-DT30 arası Tortum'dan, DT31-DT46 arası İspir'den, DT47-DT59 arası Hasankale'den ve DT60-DT70 arası Oltu'dan izole edildi. 70 izolattan 25 tanesinin EPS ürettiği ancak bu EPS'lerden sadece 5 tanesinin suda çözünebilir olduğu belirlendi (Tablo 9). Tez kapsamında suda çözünebilen EPS bulunması amaçlandığı için; suda çözünebilir olan en yüksek EPS üretimine sahip izolat seçilerek klonlama basamağına geçildi.

Tablo 9. İzolatların Biyokütle ve EPS Üretme Kapasiteleri

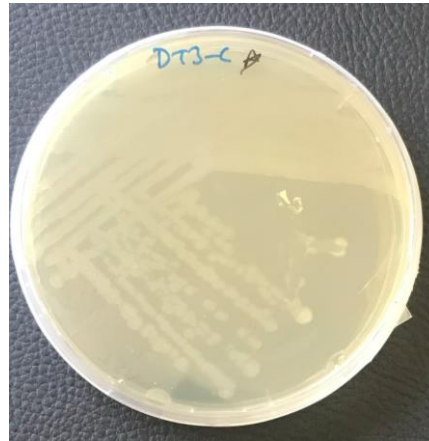
İzolatlar	EPS (g/L)	Biyokütle (g/L)
DT3-C	0,40	1,29
DT21-A	0,11	1,13
DT30-A	0,25	1,15
DT65-B	0,19	1,16
DT66-C	0,27	1,23



Şekil 1. Topraktan izole edilen suşların bazılarının petri görüntüleri

Seçilen İzolatın Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu

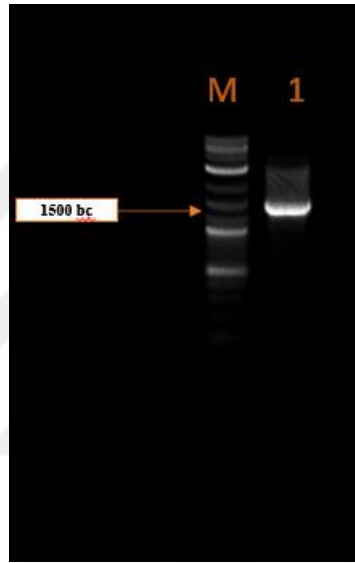
Yapılan analizler sonucunda test suşunun; çubuk şeklinde, beyaz dairesel koloni morfolojisine sahip, oksidaz, katalaz, gram ve endospor pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 2). Yang ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada Çin’de bulunan toprak örneklerinden *Cytobacillus oceanisediminis* bakterisi izole edilip konvensiyonel teste tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlar çalışmamızla paralel bulunmuştur (Yang *et al.*2023).



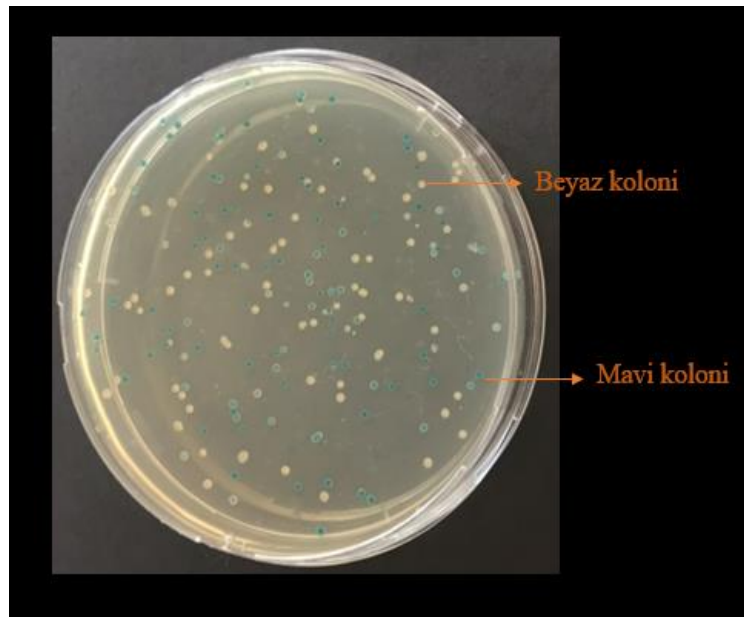
Şekil 2. DT3-C kodlu izolatın petri görüntüsü

İzolatın moleküler tanılamasının yapılabilmesi için öncelikle genomik DNA izole edildi. Elde edilen DNA’ların konsantrasyonu nanodropta ölçüldü ve %1’lik agaroz jelde

yürütülerek jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi. Uygun standartlara sahip DNA alınarak 16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve izolatin 1500 bp büyüklüğünde tek bant içerdiği gözlemlendi (Şekil 3). 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra uygun Pgem-t easy vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu işlem için sırasıyla ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra rekombinant ürünleri içeren *E.coli* izolatları amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mavi-beyaz tarama işlemi yapıldı (Şekil 4). İlgili gen bölgesini ihtiva eden en uygun koloninin tespiti amacıyla koloni PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi.

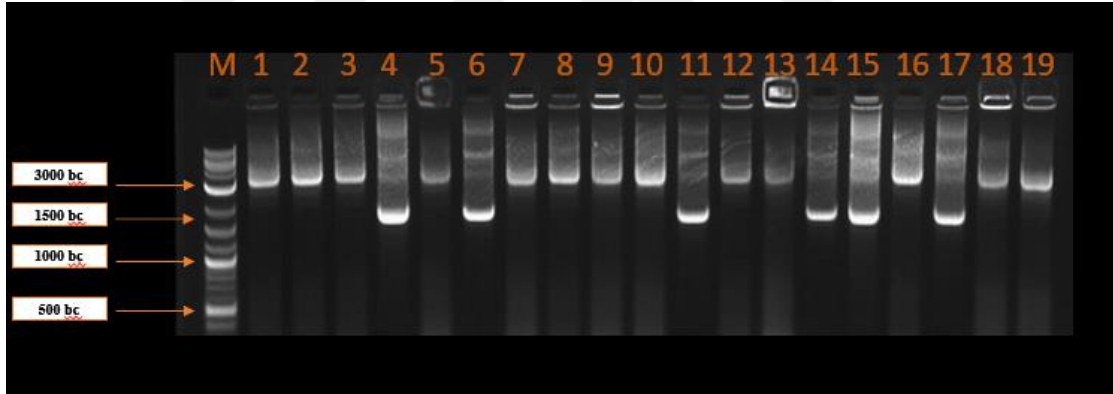


Şekil 3. DT3-C Kodlu izolatin 16S rRNA Jel görüntüsü



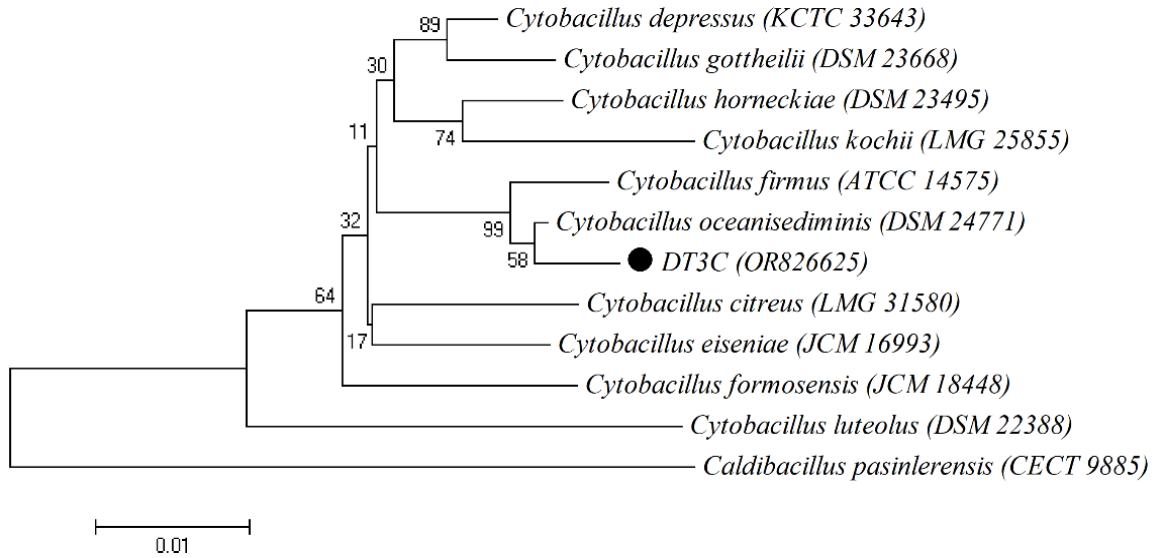
Şekil 4. Mavi- beyaz koloni görüntüsü

Agaroz jelde, 1500 bp'de tek bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyon aşamasına geçildi (Şekil 5). Bunun için ilgili koloniler petriden alınarak amfisilinli LB Broth'a aktarıldı ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonunun ardından Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak plazmit izole edildi. Daha sonra plazmitin istenen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı EcoRI kesim enzimi kullanılarak incelendi. Klonlanan bakteri Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi. Analiz sonucunda elde edilen veriler Eztaxon ve NCBI'daki verilerle mukayese edilerek, izolatın %99 oranında *Cytobacillus oceanisediminis* 'e benzerlik gösterdiği tespit edildi. Daha sonra dizi Gen bankasına girilerek, numara alındı (OR826625). Çalışma kapsamında elde edilen veriler kullanılarak diğer bakteriler ile filogenetik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi ile bir filogenetik ağaç çizildi (Şekil 6). Çalışmamıza paralel olarak topraktan *Cytobacillus* cinsinin izole edildiği birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; Liu ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptıkları çalışmada, turuncgil toprağından *Cytobacillus citreus* sp. izole etmiş. Alyousif (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, Irak topraklarından *Bacillus* ile ilgili türlerin dağılımını belirlemiştir. Çinde bulunan toprak örneklerinden *Cytobacillus oceanisediminis* izolasyonu ise 2023 yılında Yang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.



Şekil 5. Koloni PCR görüntüsü M;Markır (BioLabs N0550S), 4,6,11,14,15 ve 17 Pozitif olarak alınan örnekler

Çalışmanın bir sonraki basamağında, *Cytobacillus oceanisediminis* DT3-C bakterisinden daha yüksek EPS üretimi elde edebilmek için, kültür parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 6. DT3-C kodlu *Cytobacillus oceanisediminis* ile filogenetik ağaç çizimi

***Cytobacillus oceanisediminis* ile EPS Üretiminin Optimizasyonu**

Optimal sıcaklığın belirlenmesi

Ekzopolisakkarit üretimi sıcaklık, pH, nitrojen kaynağı, karbon kaynağı ve inkübasyon süresi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Sıcaklık bu faktörler arasında EPS üretimini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Ortam sıcaklığının EPS verimi üzerinde etkileri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örneğin psikrofilik bakterilerden EPS üreten Nichols ve arkadaşları (2005) psikrofilik bakterilerde -2°C ve 10°C'deki EPS verimini birçok psikrotolerant suş için optimum büyüme sıcaklığı olan 20°C'dekinden 30 kat daha yüksek olarak belirlemiştir. Hu ve arkadaşları ise 2021 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus* cinslerinde 10-25°C arasında EPS üretimini çalışmış, en yüksek verimi 25°C'de bulmuşlardır. *Bacillus* cinsi ile yapılan başka bir çalışmada Asgher ve arkadaşları (2021) en yüksek EPS verimini 50°C'de olarak belirlemiştir.

Yapılan tez çalışmasında, izolat stoktan canlandırıldı ve TSB besiyerinde ön kültüre alındı. Daha sonra ön kültürden eşit miktarda ana kültürler alınarak 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C arasındaki sıcaklıklara ayarlı çalkalamalı inkübatörlerde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyel gelişim ve EPS üretimi her sıcaklık için kaydedildi (Tablo 10). Bu sonuçlara göre DT3-C kodlu izolatın bakteriyel gelişimi en fazla 40°C'de görülürken, maksimum EPS üretimi 35°C'de görüldü. Sonraki optimizasyon çalışmalarında sıcaklık 35°C olarak kullanıldı.

Tablo 10. Sıcaklığın EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi*

Ortam Sıcaklığı (°C)	EPS (g/L)	Biyokütle (g/L)
20	0,15±0,03 ^c	1,19±0,12 ^a
25	0,32±0,05 ^{ab}	1,27±0,14 ^a
30	0,40±0,06 ^a	1,29±0,10 ^a
35	0,45±0,06 ^a	1,33±0,14 ^a
40	0,37±0,04 ^{ab}	1,33±0,12 ^a
45	0,33±0,06 ^{ab}	1,28±0,18 ^a

*Tüm ölçümler, altı sonucun (n=6) ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma (±SD) olarak verilmiştir. Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen değerler arasında p<0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak fark yoktur.

Optimal pH değerinin belirlenmesi

EPS üretiminde etkili olan diğer bir faktör pH'dır. Her mikroorganizma için canlılığını devam ettirdiği belirli bir pH aralığı vardır. Literatürdeki bazı çalışmalar, besiyeri ortam pH'sının EPS üretimini etkileyen bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Torino ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada, farklı pH (4.5, 5.0 ve 6.2) koşullarında *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807'nin fermantasyon modelini ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimini çalışmışlar, kullandıkları standart suşta EPS'nin düşük pH koşullarında üretimini daha verimli bulmuşlardır. Gangalla ve arkadaşlarının *Bacillus aerophilus* türü ile 2021 yılında yaptıkları çalışmada; pH değerleri (6,0, 6,5, 7,0, 8,0) arasında değişen kültür koşulları oluşturmuş, en yüksek EPS üretimini nötral pH'da bulmuşlardır. *Bacillus mycoides* ile çalışan Farag ve arkadaşları (2020) EPS üretiminin optimum pH aralığını belirleyebilmek için 4,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0 arasındaki değerlerde besiyeri hazırlanmış ve optimum pH'yı 7 olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada, diğer basamaklarda da uygulandığı gibi bakteri canlandırılması, ön kültüre inokülasyonu gerçekleştirildi ve 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 250 mL'lik erlenmayerler içerisinde 100 mL olacak şekilde hazırlanan fermantasyon ortamlarının pH'ları 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlanarak, çalkalı inkübatörde 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda farklı pH'larda üretilen EPS miktarları belirlendi (Tablo 11). *C.oceanisediminis*'in maksimum hücre büyümesi gösterdiği pH değeri 8 olup, EPS üretimi için de aynı değer optimum olarak belirlenmiştir. Bu büyüme pH'sı literatürle uyum göstermektedir. Devam eden çalışmalarda, pH değeri 8 olarak kullanılmıştır.

Tablo 11. pH'nın EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi*

Ortam pH'sı	EPS (g/L)	Biyokütle (g/L)
5	0,32±0,03 ^b	1,25±0,14 ^a
6	0,39±0,04 ^{ab}	1,29±0,10 ^a
7	0,45±0,06 ^a	1,33±0,12 ^a
8	0,48±0,05 ^a	1,34±0,10 ^a
9	0,35±0,07 ^{ab}	1,29±0,16 ^a

*Tüm ölçümler, altı sonucun (n=6) ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma (±SD) olarak verilmiştir. Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen değerler arasında p<0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak fark yoktur.

Optimal fermentasyon süresinin belirlenmesi

Ekzopolisakkarit üretiminde verimi etkileyen bir diğer parametre de inkübasyon süresidir. İnkübasyon süresinin çok kısa ve çok uzun olması ürün verimini azaltabileceği, bu nedenle uygun sürenin belirlenmesinin çok önemli bir kriter olduğu bilinmektedir. Solmaz ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus pseudomycoides*'dan EPS üretmiş, inkübasyon süresini optimize ederken 24-96 saatler arasını denemişlerdir. Çalışmalarında en yüksek EPS verimini 60. saatte kaydetmiş, 72. ve 84. saattlerde ise EPS veriminin düştüğünü göstermiştir. Krishnamurthy ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada, EPS üretiminde izole ettikleri *Bacillus cereus* suşunu kullanmış, fermentasyon süresi olarak 24, 48, 72, 96 ve 120 saatleri araştırmışlardır. Maksimum EPS üretimini 96. saatte bulmuş, 120. saatte EPS miktarında düşüşün başladığını rapor etmişlerdir. 2020 yılında *Bacillus* cinsiyle yapılan bir başka çalışmada ise Asgher ve arkadaşları *Bacillus licheniformis* için optimal fermentasyon süresini 48 saat olarak belirlemiştir.

Mevcut çalışmada EPS ve hücre büyümesi üzerine fermentasyon süresinin araştırılması için izolat, optimum sıcaklık ve pH'ya ayarlı besiyerinde 24-96 saatleri arasında inkübasyona bırakıldı. 24-48. saate kadar hücre büyümesi artarken, sonraki saatlerde hücre büyümesinin düştüğü, EPS miktarı için ise maksimuma 48. saatte ulaştığı belirlendi. 48. saaten sonra EPS miktarındaki azalma ortamdaki karbon kaynağının tükenmesine ve buna bağlı olarak mikroorganizmanın kendi ürettiği EPS'ye yönelmesi ile açıklanabilir (Tablo 12).

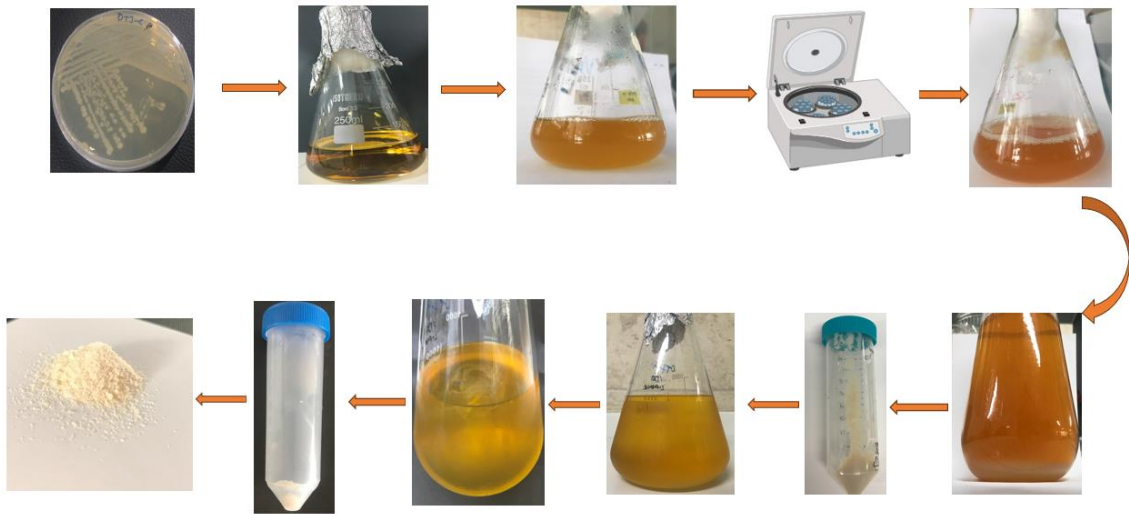
Tablo 12. İnkübasyon Süresinin EPS Üretimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi*

İnkübasyon Süresi	EPS (g/L)	Biyokütle (g/L)
24 saat	0,48±0,04 ^b	1,34±0,12 ^{ab}
48 saat	0,65±0,07 ^a	1,60±0,10 ^a
72 saat	0,61±0,08 ^a	1,52±0,18 ^a
96 saat	0,50±0,05 ^{ab}	1,42±0,12 ^a

*Tüm ölçümler, altı sonucun (n=6) ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma (±SD) olarak verilmiştir. Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen değerler arasında p<0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak fark yoktur.

EPS'nin Total Üretimi

Optimizasyon çalışmalarından sonra DT3-C kodlu *Cytobacillus oceanisediminis* için en uygun kültür parametreleri 35°C, başlangıç pH'sı 8 ve inkübasyon süresi 48 saat olarak tespit edildi. Daha sonra 4 litre (250 ml erlenlerin her birinde 100 ml TSB olacak şekilde 10 erlende gerçekleştirildi ve bu basamak 4 kere tekrarlandı) TSB besiyerinde gerçekleştirildi. Üretilen EPS sırasıyla hücre çöktürmesi, TCA muamelesi, etil alkol ile çöktürme, santrifüj ve EPS saflaştırması işlemleri yapıldı. Ardından toplanan EPS'ler liyofilize edilerek karakterizasyon çalışmalarında ve biyolojik aktivitenin araştırılmasında kullanıldı. Şekil 7'de sırasıyla bakterinin canlandırılması, optimum pH'da hazırlanan steril besiyeri, inkübasyon süresini tamamlamış kültür ortamı, bakterilerin santrifüjle uzaklaştırılması, proteinleri çöktürmek için TCA eklenmesi, proteinlerin çökmesi, santrifüj sonrası falkonlarda biriken proteinler, soğuk etanol eklenmesi, EPS'nin görünür hale gelmesi, santrifüj ile EPS'lerin toplanması ve liyofilizasyondan sonra elde ettiğimiz EPS şema halinde gösterildi.



Şekil 7. Başlangıçtan ürüne kadar adım adım EPS üretimi

Üretilen EPS'nin Karakterizasyonu

Farklı solvent içerisinde çözünürlüğünün belirlenmesi

Bir ekzopolisakkaritin solventlerdeki çözünürlüğü, temel olarak moleküler yapıya, moleküler ağırlığa ve biyolojik kökene bağlıdır. EPS'nin farklı solventlerdeki çözünürlüğü içerisinde bulunan hidrofilik ve hidrofobik gruplarla ilişkilidir; hidrofilik grup içeren EPS'ler polar solventlerde çözünürken, hidrofobik grup bakımından zengin olan EPS'ler apolar çözücülerde çözünürler (Patil and Shirsath, 2015; Asgher *et al.* 2020).

C. oceanisediminis tarafından üretilen EPS'nin distile suda yüksek çözünürlüğe sahip olduğu; metanol, izopropanol, asetonunda %50'sinin, DMSO ve etanol'de %10'unun çözündüğü

tespit edildi. Ayrıca formaldehit, petrol eteri, kloroform ve hekzanda çözünmeden pellet halinde kaldığı belirlendi. Üretilen EPS'nin distile sudaki konsantrasyonu 5mg/ml olduğunda %98'inin, 10 mg/mL' de %97'sinin çözündüğü gözlemlendi (Tablo 13).

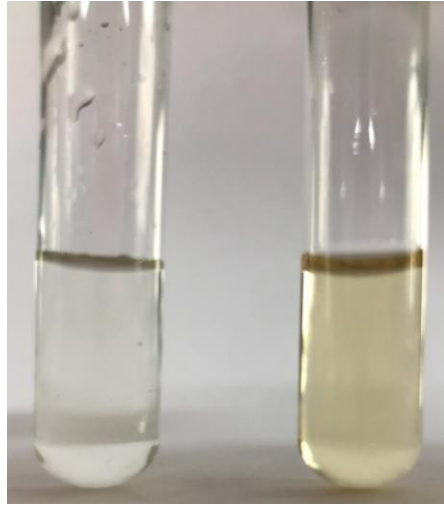
Tablo 13. EPS'nin Farklı Çözücülerdeki Çözünürlüğü

Çözücü Solvent	Çözünürlük Derecesi
Distile Su	++++
Metanol	++
İzopropanol	++
Aseton	++
DMSO	+
Etanol	+
Formaldehit	-
Petrol eteri	-
Hekzan	-
Kloroform	-

(Çözünürlük derecesinde; ++++= %90 üzerindeki çözünürlüğü, ++=%50 üzerindeki çözünürlüğü, += %10 üzerindeki çözünürlüğü, - = çözücü içerisinde hiç çözünmediğini göstermektedir.)

Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi

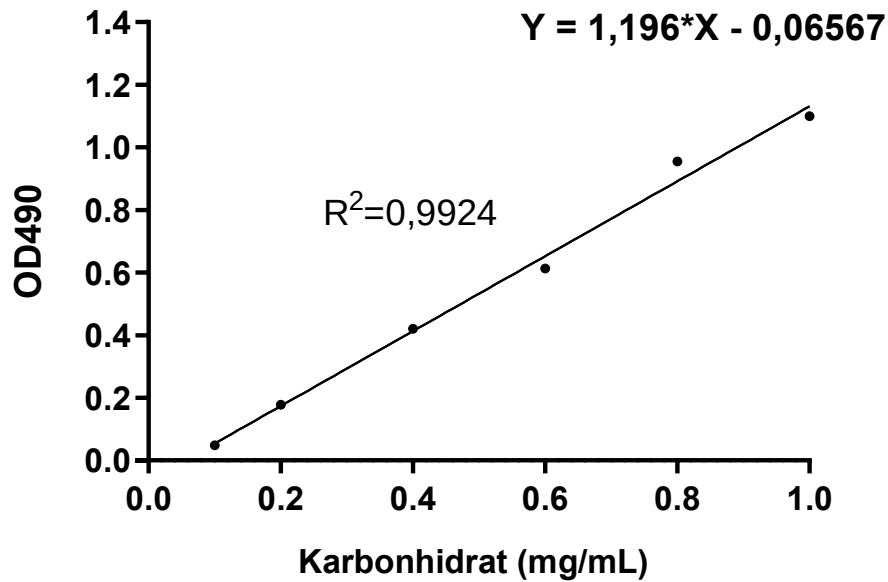
Karbonhidrat içeriğinin belirlenmesinde kullanılan fenol-sülfürik asit yöntemi literatürde sıklıkla kullanılan bir metot olmasıyla beraber; duyarlılığı, maliyetinin düşük olması ve kolay yapılması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Kolorometrik bir metot olan fenol sülfürik asit yöntemi ile oligosakkaritler, proteoglikanlar, glikoproteinler ve glikolipidlerdeki nötr şekerleri ölçmek güvenilir ve kolaydır (Le and Stuckey 2016; Felz *et al.* 2019). Ortam da karbonhidrat varlığında oluşması beklenen renk sarı-kahverengidir. Şekil 8. de görülen soldaki tüp kör (EPS içermeyen çözücü), sağdaki tüp numunemizden (EPS ve çözücünden) oluşmaktadır. Beklenildiği gibi DT3-C kodlu izolattan elde ettiğimiz EPS örneği, karbonhidrat içerdiği için sarı renk gözlemlendi. Numunemizin içerdiği karbonhidrat miktarını belirleyebilmek için glukozdan oluşan standart bir grafik çizildi. Bunun için 6 farklı konsantrasyonda glukoz hazırlandı (Tablo 14), fenol sülfürik asitle muamele edilerek spektrofotometre de 490 nm'de ölçüldü ve standart grafik çizildi (Şekil 9). Standart grafik referans alınarak EPS'nin içeriğinde ne kadar karbonhidrat olduğu belirlendi.



Şekil 8. *C. Oceanisediminis*'ten elde edilen EPS'nin fenol-sülfürik asit muamelesi sonucu gözlenen renk değişimi (soldaki tüp kör, sağdaki tüp EPS+fenol sülfürik asit)

Tablo 14. Standart Grafiğin Oluşturulması İçin Hazırlanan Glikoz Miktarı ve Absorbans Değerleri

Glukoz Miktarı	Absorbans Değeri
0,1 mg/mL	0,048
0,2 mg/mL	0,178
0,4 mg/mL	0,421
0,6 mg/mL	0,613
0,8 mg/mL	0,955
1,0 mg/mL	1,100



Şekil 9. Fenol-sülfürik asit yönteminde kullanılan glukoz standart grafiği

Oluşturulan standart grafik formülünden y yerine EPS örneğinin spektral sonucu yazılarak elde edilen x değeri, EPS'nin içeriğinde ne kadar karbonhidrat olduğunu vermektedir. Renk değişiminin gözlemlendiği EPS örneğinin spektrofotometrik ölçümü sağlandı ve

absorbans değeri 1,17 olarak belirlendi. Formülde X değeri yerine 1,17 yazılarak karbonhidrat varlığı 0,923 olarak belirlendi.

Yani, $1,17 = 1,196 * X + 0,06567$ denkleminde $x = 0,923$ bulundu. Bu da elde edilen liyofilize haldeki 1 mg EPS içerisinde 0,923 mg karbonhidrat bulunduğunu, diğer bir ifadeyle 1 mg/mL EPS örneğinin %92,3 oranda karbonhidrat içerdiğini ortaya koydu.

Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Warburg-Christian yöntemi

Ekzopolisakkaritler, büyük oranda karbonhidrat içermelerinin yanında protein ve nükleik asitte içermektedir. Spektrofotometre de polisakkaritler 230 nm’de, nükleik asitler 260 nm’de ve proteinler 280 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Bu yöntemde numune 230,260 ve 280 nm’lerde spektrofotometrik ölçümleri alınarak absorbansları kaydedildi ve formülde yerine konularak protein miktarı hesaplandı (Tablo 15). Elde edilen absorbans değerleri incelendiğinde karbonhidratı temsil eden 230 nm’de yüksek bir absorbans değeri kaydedildi. Bu sonuç fenol-sülfirik asit yöntemi ile paralellik göstermektedir.

EPS içerisinde bulunan total protein miktarı (%) = $1,55 * A_{280} - 0,76 * A_{260}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Sonuç olarak, 1 mg liyofilize EPS örneğinin %1,83 miktarda protein içerdiği belirlenmiş olup, bu da 0,018 mg’a denk gelmektedir.

Tablo 15. Protein Miktar Tayini İçin Alınan Spektrofotometrik Sonuçlar

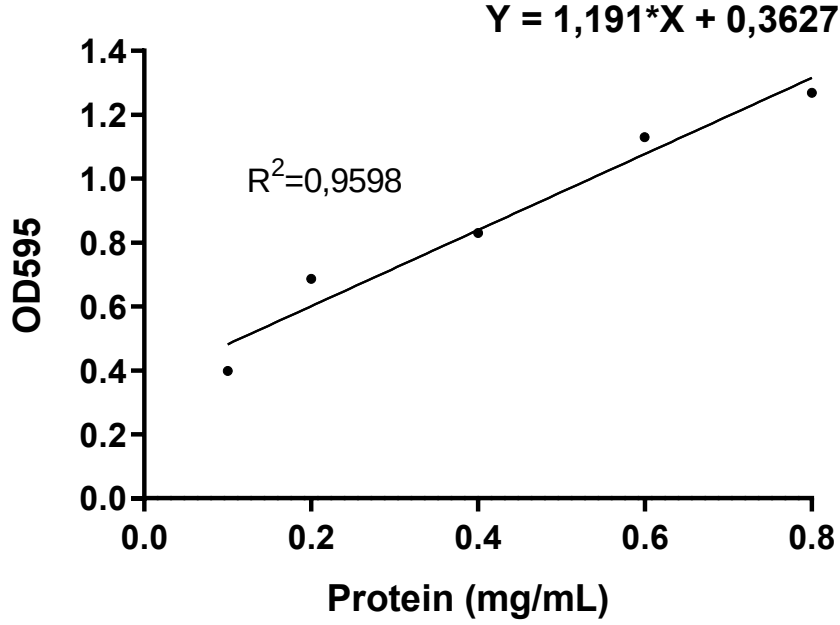
230 nm	260 nm	280 nm
2,925	2,540	2,430

Bradford yöntemi

EPS örneğindeki protein içeriğini belirlemek için kullanılan bir diğer yöntem ise Bradford’dur. Spektrofotometrik yöntemlerden olan Bradford’da, boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250, standart olarak Bovine Serum Albumin kullanıldı. EPS’deki protein miktarını belirleyebilmek için, BSA farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak Bradford çözeltisi ile muamele edildi ve 595 nm’de ölçülerek standart grafik hazırlandı (Şekil 10).

Tablo 16. Total Protein Tayini İçin Oluşturulan Standartın Absorbans Ölçümleri

BSA Miktarı (mg/mL)	Absorbans Değeri
0,8	1,269
0,6	1,130
0,4	0,830
0,2	0,687
0,1	0,398



Şekil 10. Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan BSA standart grafiği

EPS örneği istenilen konsantrasyonda tartılıp suda çözündü ve Bradford çözeltisi ile muamele edildi. Ardından 595 nm’de absorbans değeri ölçüldü ve 0,483 olarak kaydedildi. Oluşturulan standart grafikten çıkarılan formülde y yerine EPS örneğinin ölçülen absorbans değeri yazılarak x bulundu.

Yani, $0,483 = 1,191 * x + 0,3627$ denkleminde $x = 0,101$ bulunmuştur. Elde edilen sonuca göre liyofilize haldeki 10 mg EPS örneğinde 0,101 g protein bulunur, bu da yaklaşık olarak %1’e denk gelmektedir.

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında *C. oceanisediminis* tarafından üretilen EPS’nin karbonhidrat içeriği %92,3, protein içeriği %1-1,83 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu değerler literatürde bulunan birçok çalışma ile uyum göstermektedir (Genc *et al.*2021; Selim *et al.* 2022; Díaz-Cornejo *et al.*2023; Marimuthu *et al.*2023)

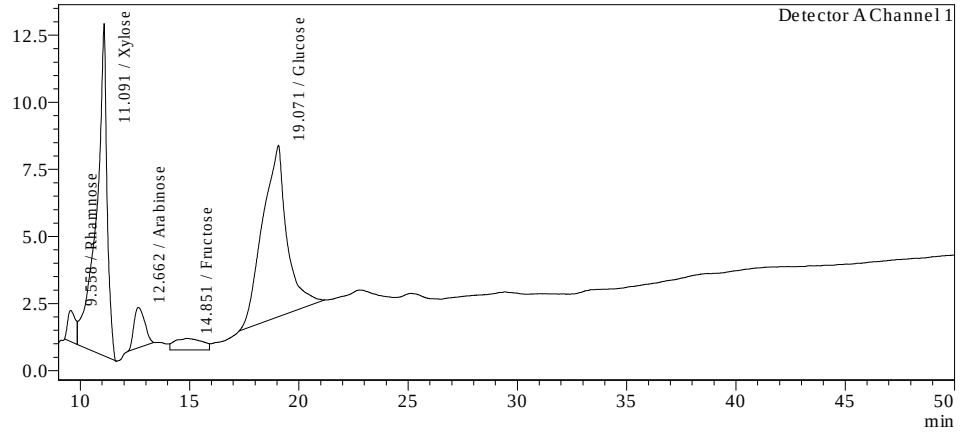
Monomer kompozisyonunun belirlenmesi

Monomer kompozisyonu polisakkaritlerin karakterizasyonunda göz önünde bulundurulacak bir diğer önemli kavramdır. Mikrobiyal polisakkaritlerde en yaygın görülen monomerler D-glikoz, D-galaktoz, D-mannoz, L-fukoz, L-ramnoz, N-asetil-D-glukozamin ve N-asetil-D-galaktozamin dir. D-glukuronik ve D-galakturonik gibi üronik asitler de bazı mikrobiyal polisakkaritlerde mevcut olabilir. Mikrobiyal polisakkaritlerde birçok başka şeker de mevcuttur ancak bunların bulunma sıklığı daha düşüktür (Ahmad *et al.* 2015). Polisakkaritler monomerlerinin çeşidine göre homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. Homopolisakkaritler tek tipte monomerden oluşurken, heteropolisakkaritler

birden çok tip monomer içermektedirler (Mahmoud *et al.* 2021). Örneğin dekstran, curdlan ve selüloz, glikoz monomerinden meydana gelen bakteriyel glukanlardır (Özcan ve Öner, 2015). Bir diğer homopolisakkarit olan levan ise fruktoz monomerlerinden oluşmakta olup *Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* ve *Zymomonas* cinslerine ait bitkiler tarafından üretilmektedir (Öner ve ark. 2016). Heteropolisakkaritlerde yine bakterilerin *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* gibi *Phyla*' ları tarafından üretilmektedir (Wang *et al.* 2017; Vinothini *et al.* 2019; Kim *et al.* 2022; Huang-Lin *et al.* 2022; Gongi *et al.* 2022; Xu *et al.* 2023; Sánchez-León *et al.* 2023). Örneğin, yapılan bir çalışmada (Wang *et al.* 2017), *Firmicutes* phylum' una bağlı olan *Lactobacillus plantarum* KX041 bakterisi tarafından üretilen EPS' nin arabinoz, mannoz, glikoz ve galaktoz' dan meydana gelen bir heteropolisakkarit olduğu gösterilmiştir. Vinothini *et al.* (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, bir actinobakteri olan *Streptomyces griseorubens* GD5' un ürettiği EPS' nin arabinoz, mannoz, glikoz, galaktoz ve ksiloz' dan meydana gelen bir heteropolisakkarit olduğu ortaya çıkarılmıştır. Gongi ve arkadaşları (2022) filamentli siyanobakteri *Leptolyngbya* sp.'nin EPS'sinin mannoz, arabinoz, glukoz ramnoz ve üronik asitten oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu göstermiştir Huang-Lin ve arkadaşları (2022), firmicutes phylum' una ait olan *Bacillus xiamenensis* RT6 türünden türetilen EPS'nin glikoz, mannoz ve galaktoz monomerlerinden oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu ortaya çıkarmıştır. Mevcut çalışmada da, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' nin monomer kompozisyonu belirlenerek, EPS' nin karakterize edilmesi amaçlanmıştır (Şekil 11). HPLC temelli analizler EPS' nin ramnoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz ve glikoz monomerlerinden oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu ortaya çıkarmıştır. Monomerler arasında ise en yüksek konsantrasyona ksilozun, ardından da glikozun sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde bakteriyel polisakkaritlerin ksiloz içeriklerinin düşük olduğu belirtilmektedir (Frengova *et al.* 2000; Ghosh *et al.* 2011; Kalpana *et al.* 2018). Sadece bir çalışmada (Karadayi *et al.* 2020), bakteriyel EPS' lerin esas monomerinin ksiloz olabileceği rapor edilmiştir. *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin esas monomerinin ksiloz olduğunun ortaya çıkartılması bu yönüyle bilimsel önem taşımaktadır.

<Chromatogram>

mV



<Peak Table>

Detector A Channel 1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit
1	Rhamnose	9.558	29272	1157	63.170	mg/L
2	Xylose	11.091	417641	12381	1819.783	mg/L
3	Arabinose	12.662	51403	1503	134.228	mg/L
4	Fructose	14.851	37428	423	107.742	mg/L
5	Glucose	19.071	496535	6382	1675.330	mg/L
Total			1032279	21846		

Şekil 11. HPLC analizi ile monomer kompozisyonun belirlenmesi

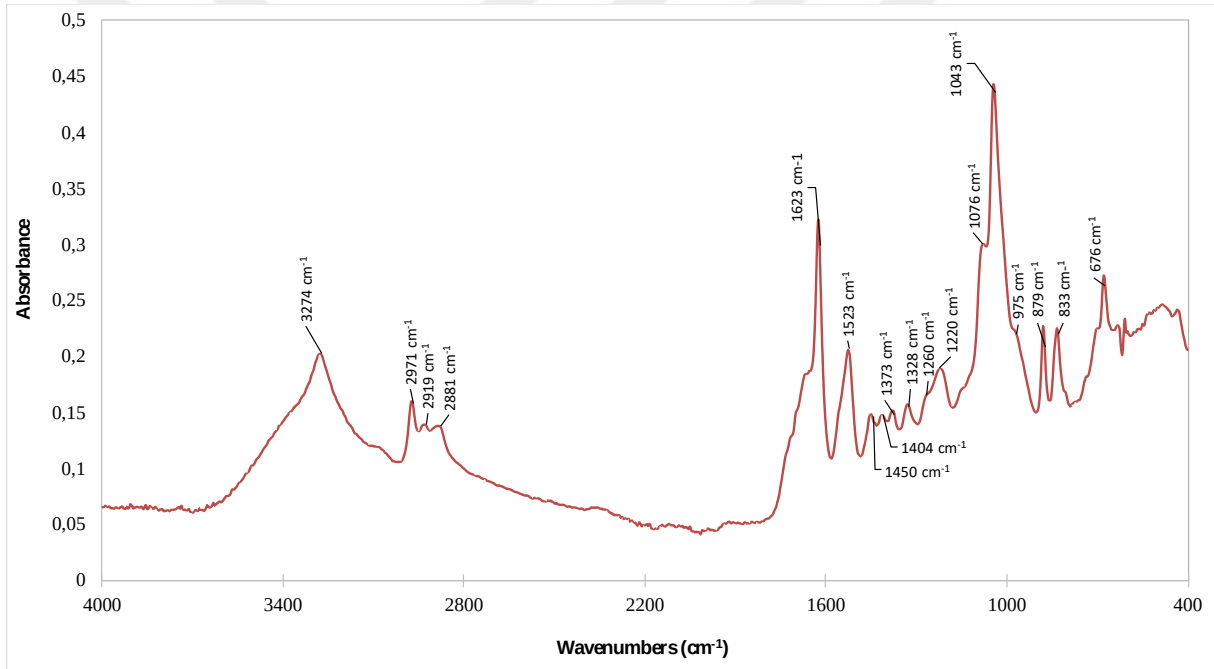
Saflaştırılan EPS' nin Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ile fonksiyonel gruplarının analizi

Polisakkaritlerdeki karakteristik fonksiyonel grupların belirlenmesinde FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bilginin ışığında, mevcut çalışmada EPS' nin fonksiyonel gruplarının analizi içinde FT-IR kullanılmış ve belirlenen bantlar literatür verilerine göre değerlendirilmiştir. Şekil 12' den görülebileceği gibi EPS için 3274, 2971, 2919, 2881, 1623, 1523, 1450, 1404, 1373, 1328, 1259 (zayıf bant), 1220, 1076, 1043 (en güçlü bant), 975 (zayıf bant) 879, 833 ve 676 cm^{-1} dalga boylarında bantlar tespit edilmiştir. EPS' nin 3274 cm^{-1} ' deki bandı moleküller arası hidrojen bağlarının ve –OH gerilme titreşiminin varlığıyla açıklanmıştır (3600–3200 cm^{-1}) (Kavita *et al.* 2011; Kayar *et al.* 2022). Hidroksil gruplarının varlığı daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi (Karbowski *et al.* 2011; Castellane *et al.* 2015; Karadayi *et al.* 2021), EPS' nin sudaki çözünürlüğünün bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. EPS için 2971, 2919, 2881 cm^{-1} ' de tespit edilen bantlar lipitler ve/veya karbonhidratlardaki fonksiyonel grupların C-H germe titreşimi (–CH₃, >CH₂ ve >CH–) ile ilişkilendirilmiştir. 1700–1770 cm^{-1} bölgesinde FTIR bantları EPS' lerde uronik asit monomerlerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Mevcut EPS örneğimizde ise belirtilen dalga boylarında bantlar tespit edilmemiştir. Bu yüzden, EPS örneğimizin uronik asit içermediği sonucu çıkarılmıştır (Wang *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Hospodarova *et al.* 2018; Nandiyanto *et al.* 2019; Karadayi *et al.* 2021). Amid bantları (I, II ve III), bir numunede proteinlerin varlığını gösterir. Amid I'in ikincil proteine en duyarlı spektral bölge olduğu

bilinmektedir. Proteinlerin FTIR spektrumlarında, Amid I, 1600 ila 1700 cm^{-1} aralığında absorbands vermekte ve C=O (yaklaşık %80) ve C-N gruplarının gerilme titreşimi ile ilişkilendirilmektedir. 1480-1575 cm^{-1} dalga boyları arasındaki absorbandslar ise Amid II' ye ait olup, N-H bükülme (%40-60) ve C-N germe titreşimleri (%18-40) ile açıklanmaktadır. 1200 ile 1350 cm^{-1} arasındaki absorbandslar ise Amid III' e bağlanmaktadır (Naumann *et al.* 1982; Kong and Yu 2007; Hashim *et al.* 2010; Aboul-Enein *et al.* 2014; Dawood *et al.* 2020; Ji *et al.* 2020). Bu yüzden, literatürde de belirtildiği gibi, EPS örneğimiz için 1623 cm^{-1} de tespit edilen bant amid I' e, 1523 cm^{-1} de tespit edilen bandın Amide II' ye ve 1328 ve 1220 cm^{-1} de tespit edilen bantların ise Amid III'e ait olduğu düşünülmüştür. Amid II esas olarak N-H bükülmeyi işaret ettiği ve Amid II bandının da Amid I' den daha zayıf olduğu tespit edildiği için EPS örneğinin protein içeriğinin düşük olduğu düşünülmüştür. EPS örneğine başlangıçta TCA ile protein giderme işlemi uygulandığı gerçeği göz önüne alındığında bu durum şaşırtıcı olmamalıdır. Diğer taraftan, TCA çöktürmesine rağmen EPS yapısında protein tespit edilmesi de bu proteinlerin serbest formdan ziyade EPS ile bağlı halde bulunması ile açıklanmıştır.

Literatürde, RNA veya DNA' ya ait fosfat gruplarının 980 cm^{-1} çevresinde FTIR' da bant verdiği açıklanmaktadır (Clarke and Khalid 2015). Mevcut çalışmada, ise EPS örneği için 975 cm^{-1} de çok zayıf bir bantın varlığı göze çarpmıştır. Bu yüzden, EPS örneğinin çok düşük konsantrasyonda nükleik asit barındırdığı kanaatine varılmıştır. Bu durum ise, başlangıçta bakteri hücrelerin santrifüj işlemi ile EPS' den uzaklaştırılması ve böylece olası nükleik asit kontaminasyonunun en düşük seviyelere indirgenmesiyle açıklanmıştır. Lipitlerin FTIR spektrumunda 1450-1400 ve 1400-1350 cm^{-1} aralıklarında da bant verdikleri belirtilmektedir (Gieroba *et al.* 2020). Bu yüzden, mevcut EPS örneği için 1450, 1404 ve 1373 cm^{-1} de tespit edilen bantlar EPS' nin lipid içermesine bağlanmıştır. FTIR spektrumunda 1200-800 cm^{-1} 'e aralığı polisakkaritler için parmak izi bölgesi olarak bilinmektedir (Copikova *et al.* 2006). EPS için bu aralıkta 1076, 1043, 879 ve 833 cm^{-1} de dört güçlü bant belirlenmiştir. Hatta, EPS' nin en güçlü bandının 1043 cm^{-1} de absorbands vermesi, EPS' nin yapısında yüksek oranda karbonhidrat mevcut olduğunun işareti olarak kabul edilmiştir. Anomerik bölgede (1200–1000 cm^{-1}) 1043 cm^{-1} ' deki güçlü absorpsiyon, EPS'deki C–C ve C–O gerilme modlarına ve glikozidik bağların (C–O–C) titreşimine bağlanmıştır (Vijayabaskar *et al.* 2011; Sardari *et al.* 2017). Literatürde de belirtildiği gibi (Muhidinov *et al.* 2020), 879 cm^{-1} de ki bant polisakkaritin β -konfigurasyonuna sahip olduğunu işaret etmektedir. FTIR spektrumunda polisakkaritler için 830 ve 1260–1210 cm^{-1} çevresinde kaydedilen bantlar sülfat (S=O) gruplarının varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Mata *et al.* 2006; Barros *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2013; Korva *et al.* 2016; Chambi *et al.* 2021; Figueroa *et al.* 2022). Sülfat grupları hem polisakkaritlerin sudaki çözünürlüğünü hemde onların biyoaktivitesini artırmaktadır. Bu

yüzden, sülfatlı polisakkaritlerin tıbbi öneminin fazla olduğu bildirilmektedir (Korva *et al.* 2016; Kang *et al.* 2022). Mevcut çalışmada da, EPS için 833 ve 1220' de cm^{-1} ' de güçlü, 1260 ise zayıf bir bant tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin sülfat içerdiğini işaret etmektedir. Sülfat gruplarının varlığı çoğunlukla alg kökenli polisakkaritler için karakteristik olsada (Dumitriu 2004; Jiao *et al.* 2011; Barros *et al.* 2013; Wang *et al.* 2017), istisna olarak bazı bakteri türlerinde (*Halomonas ventosae*, *H. anticariensis*, *Pseudoalteromonas marinoglutinosus*, *Marinicella litoralis*, *Bacillus* sp. BU-4 ve *Anoxybacillus gonensis* YK25) sülfatlı-polisakkaritleri üretebileceği rapor edilmiştir (Komandrova *et al.* 1998; Mata *et al.* 2006; Kokoulin *et al.* 2020; Karadayi *et al.* 2021; Chambi *et al.* 2021). Bakteri kökenli polisakkaritlerde sülfat gruplarına nadiren rastlandığından dolayı, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin sülfat içerdiğinin belirlenmesi bilim dünyası bir yenilik olarak kabul edilebilir.



Şekil 12. EPS' nin FT-IR spektrumu

EPS' nin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Polisakkaritlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde; son grup analizi, osmometre, Jel Geçirgenliği Kromatografi (GPC), Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon kütle spektroskopisi (MALDI-MS), Difüzyon sıralı NMR spektroskopisi (DOSY), ışık saçınımı ve viskozite ölçümü temelli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Viskozite ölçüm yöntemi ucuz ve geniş bir aralıkta moleküler ağırlığın tespitine olanak vermesi açısından avantajlı kabul edilmektedir. Bu yöntemde viskozimetre kullanılarak polimerin viskozitesi belirlenmekte ve viskozite değerine göre molekül ağırlığı hesaplanmaktadır. Bu ölçüm yönteminde moleküler ağırlık; viskozite ortalama moleküler ağırlık (M_v) olarak ifade edilmektedir (Umoren and Solomon

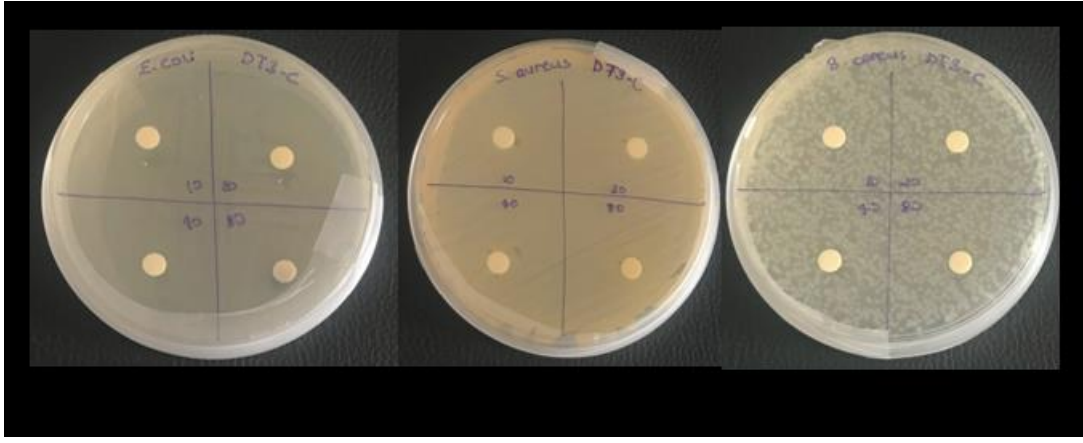
2016). Bu yöntem; bitki, mantar ve bakteri kökenli polisakkaritlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Leung *et al.* 2009; Pawar and Lalitha 2015; Karadayi *et al.* 2020; Silva *et al.* 2021). Mevcut çalışmada, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin moleküler ağırlığı (Mv) 142 Da olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürdeki diğer bakteri kaynaklı EPS' lerin pek çoğunun moleküler ağırlıklarından daha düşüktür. Örneğin, önceki çalışmalarda *Lactobacillus sakei* MN1 (moleküler ağırlığı 1.74×10^8 Da), *Bacillus megaterium* PL8 (moleküler ağırlığı 4.55×10^6 Da) ve *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 (moleküler ağırlığı 23.24×10^6 Da) gibi bakteri türlerinin EPS'leri için çok daha yüksek moleküler ağırlık değerleri rapor edilmiştir (Han *et al.* 2015; Zarour *et al.* 2017; Pu *et al.* 2018). Moleküler ağırlık polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerini ve çözünürlüğünü etkileyen önemli bir faktördür. Molekül ağırlığının artmasıyla çözünürlük azalmaktadır. Çözünürlüğün azalması da polisakkaritlerin membranlardan girişini sınırlandırmakta dolayısıyla da polisakkaritlerin hücrelerdeki biyolojik aktivitelerini azaltmaktadır (Gu *et al.* 2017; Yu *et al.* 2018; Yang *et al.* 2022). Bu yüzden, düşük moleküler ağırlığa sahip polisakkaritler biyolojik aktivite açısından daha avantajlı kabul edilmektedir. Bu bilgilerin ışığında, *Cytobacillus oceanisediminis* düşük moleküler ağırlıklı EPS' sinin yüksek biyolojik aktiviteye sahip olabileceğini söylemek olasıdır.

Üretilen EPS'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin araştırılması

Cytobacillus oceanisediminis ile üretilen EPS'nin antimikrobiyal aktivitesini belirleyebilmek için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Antimikrobiyal aktivitede *C. albicans* (ATCC 10231), *B. cereus* (ATCC 33019), *E. coli* (ATCC 43894), *L. monocytogene* (ATCC 7644), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) ve *S. aureus* (ATCC 25923) mikroorganizmaları kullanıldı. Liyofilize haldeki EPS 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL olacak şekilde distile su ile farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Elde edilen EPS'nin herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı kaydedildi (Şekil 13).

Literatürde, izolatlardan üretilen EPS'lerden bazılarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirtilirken (Nehal *et al.* 2019; Rajoka *et al.* 2019; Abdalla *et al.* 2021); birkaç çalışmada çalışmamıza paralel olarak antimikrobiyal aktivite görülmemiştir (Karadayi *et al.* 2021; Genc *et al.* 2021).



Şekil 13. *Cytobacillus oceanisediminis*'in ürettiği EPS'nin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

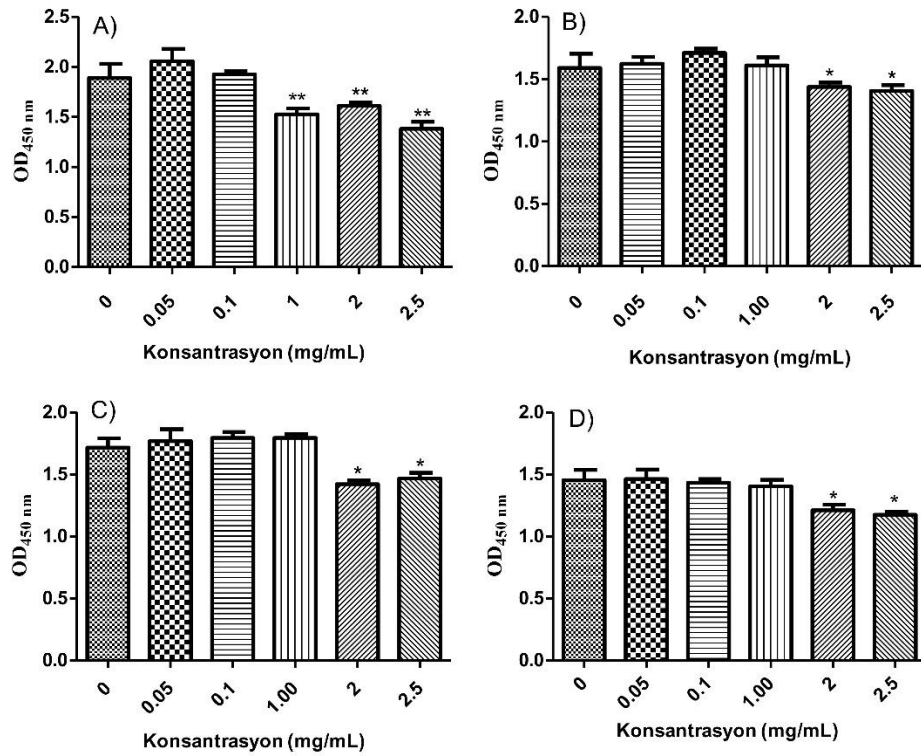
EPS'nin antikanser etkinliğinin araştırılması

Bitki, alg, mantar ve bakteri kökenli polisakkaritlerin antikanser aktiviteye sahip olduğu literatürde rapor edilmektedir (Asker *et al.* 2018; Yarley *et al.* 2021; Ouyang *et al.* 2021; Naveen *et al.* 2023). Mevcut çalışmada, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin antikanser potansiyeli dört farklı kanser hücre hattında test edilmiştir. Şekil 14' den görülebileceği gibi EPS hücre canlılıklarını istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltarak test edilen bütün hatları üzerinde özellikle akciğer kanseri hücre hattı (A-549) üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. EPS' nin A-549 (Şekil A) hücre hattı üzerindeki sitotoksi etkisi, 1 mg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda, diğer hücre hatları [SHSY-5Y (Şekil B) DU-145 (Şekil C) ve HT-29 (Şekil D)] üzerindeki sitotoksik etkisi ise 2 ve 2.5 mg/ml' lik konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. A-549 hücre hattının aksine söz konusu diğer üç hücre hattı üzerinde 1 mg/ml' lik EPS konsantrasyonunda sitotoksik etki belirlenmiştir. Şekil 15' den de görülebileceği kontrole oranla EPS uygulanmış hücre hatları apoptoza uğrayarak canlılıklarını kaybetmiştir.

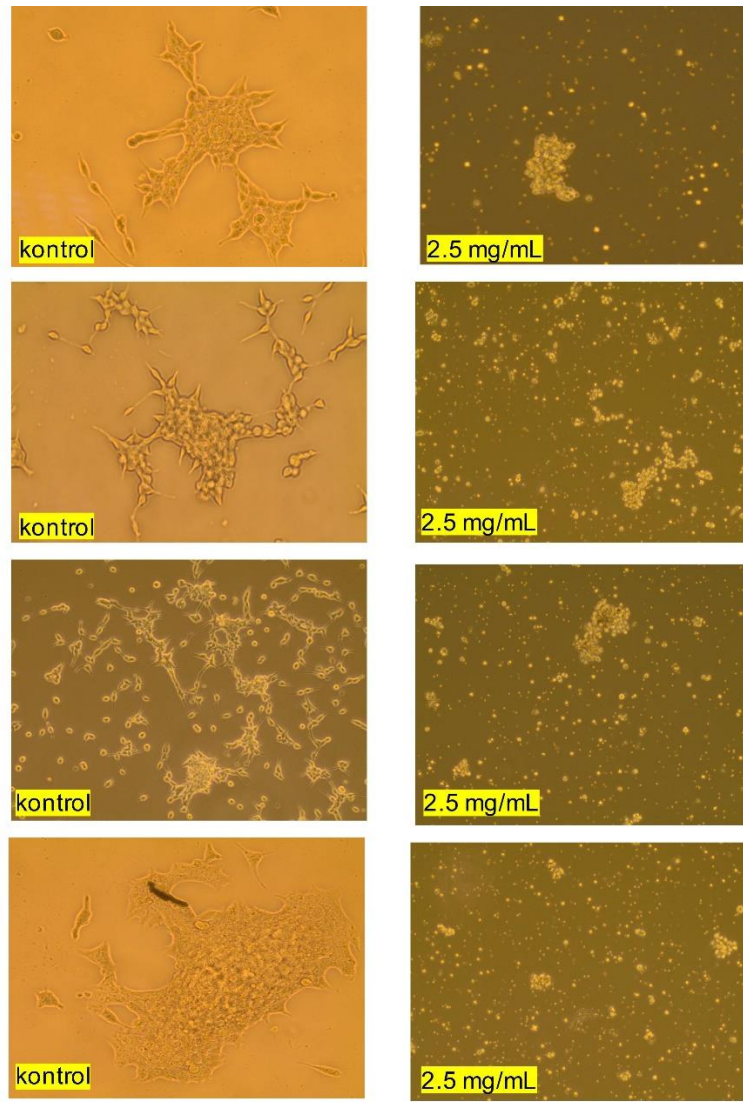
Literatürde, moleküler ağırlık, çözünürlük, monomer kompozisyonu ve sülfat grubu varlığının gibi antikanser aktivite dahil polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerini etkilediği rapor edilmektedir. Sülfat gruplarının ve düşük moleküler ağırlığın hem polisakkaritlerin sudaki çözünürlüğünü hemde onların antikanser aktivitesini artırdığı belirtilmektedir (Tao *et al.* 2006; Zhong *et al.* 2012; Lemieszek and Rzeski 2012; Karadayi *et al.* 2020; Kiddane and Kim 2021). Mevcut çalışmada da, EPS' nin düşük moleküler ağırlığa ve sülfat gruplarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden, düşük moleküler ağırlık ve sülfat grubu varlığının EPS' nin sudaki çözünürlüğünü artırarak EPS' nin hücre içerisine daha fazla girmesine ve böylece hücre içerisinde daha fazla sitotoksik etki göstermesine katkı yapmış olabileceği kanaatine varılmıştır. Yine, literatürde galaktoz, ksiloz, mannoz, fruktoz, ksiloz, arabinoz ve uronik asit gibi monomerlerinde polisakkaritlerin antikanser aktivitesini artırdığıda açıklanmaktadır (Mizuno

1995; Lemieszek and Rzeski 2012; Karadayi *et al.* 2020; Yang *et al.* 2022). Mevcut çalışmada, ise EPS' nin söz konusu bu monomerlerden ksiloz, arabinoz ve fruktozu içerdiği belirlenmiştir. Bu yüzden, EPS' nin antikanser aktivitesindeki üçüncü önemli etkenin monomer kompozisyonu olduğunu söylemek olasıdır.

Hali hazırda kullanılan ilaçların çoğunluğunun sudaki çözünürlüğü düşüktür. Bu yüzden çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak onların sudaki çözünürlükleri artırılmaya çalışılmaktadır. Örneğin, etanol, kremofor ve polisorbat 80 gibi çözücüler antitümör ajanlarının çözünürlüğünü arttırmak için kullanılır; ancak bu solventler emboliye, aşırı duyarlılık, periferik nöropati gibi yan etkilere neden olmaktadır (Pery 2008; Gowardhane *et al.* 2014; Kalepu *et al.* 2015; Karadayi *et al.* 2020). Mevcut çalışmada ise, EPS' nin suda yüksek çözünürlük gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, EPS' nin toksik çözücülere ihtiyaç olmadan su içerisinde çözündürülerek kanser tedavilerde doğrudan kullanılabileceğini işaret etmektedir.



Şekil 14. EPS' nin farklı konsantrasyonlarının A-549 (A), SHSY-5Y(B), DU-145 (C) ve HT-29 (D) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi (Veriler ortalama $\pm$ SS ve $n \geq 5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs 0 ve ** $p < 0.01$ vs 0 olarak verilmiştir)



Şekil 15. EPS uygulamasının hücre hatlarının canlılığı üzerindeki etkinliği

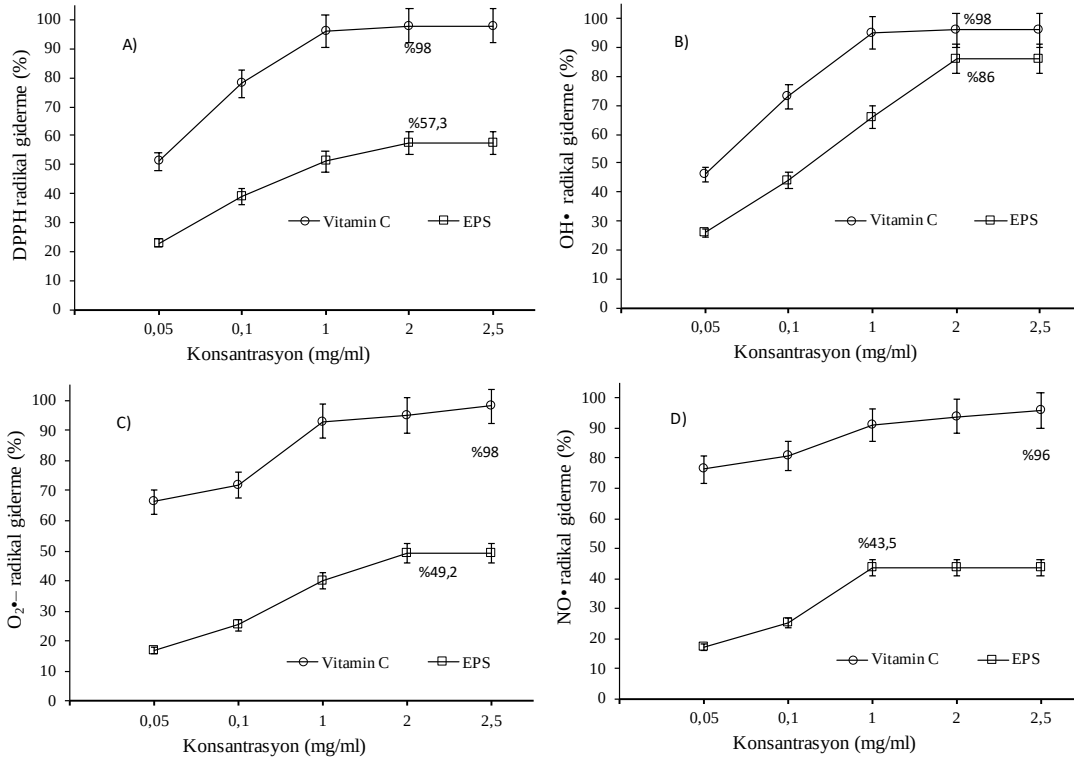
A-549 (A), SHSY-5Y(B), DU-145 (C) ve HT-29 (D) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi. Kontrol grubu için EPS uygulaması yapılmamıştır. EPS' nin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini göstermek içinse, bütün hücre hatları için en fazla toksisitenin gözlemlendiği 2,5 mg/mL EPS konsantrasyonundaki görüntüler seçilmiştir.

EPS'nin Antioksidant Potansiyelinin Araştırılması

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller esas olarak oksijenden (reaktif oksijen türleri-ROS) ve nitrojenenden (reaktif nitrojen türleri-RNS) üretilir. En önemli ROS' lar süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($1/2O_2$), peroksil ($ROO^{\bullet}$), hipoperoksitler ($ROOH$) ve hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$), önemli RNS' ler nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$), nitroz asit (HNO_2), nitroksil anyon (NO^-) ve peroksinitrit ($NOOO^-$) dir (Poljsak *et al.* 2013; Martemucci *et al.* 2022; Khan *et al.* 2023). ROS ve RNS esas olarak mitokondri, kloroplast, endoplazmik retikulum, peroksizomlar, lizozom, sitoplazma ve plazma membranları gibi hücreye yapılarında metabolizmanın bir sonucu olarak üretilmektedir. Özellikle mitokondri, ROS üretimine en büyük katkıyı sağlayan yapıdır (Jasid *et al.* 2006; Hameister *et al.* 2020). Bu yapıların yanı sıra, hava kirlenitçiler, radyasyon, sigara, ksenobiyotikler, ilaçlar, ağır metaller, organik çözücüler ve pestisitler gibi birden fazla dış

faktöre bağılı olarak da üretilmektedir (Jasid *et al.* 2006; Hameister *et al.* 2020; Ashok *et al.* 2022; Curieses Andrés *et al.* 2023). Düşük veya orta düzeylerde ROS/RNS hücresel fonksiyonlar için (hücre hayatta kalması, çoğalması, göçü, farklılaşması, apoptoz vb.) gereklidir (Martinez and Andriantsitohaina 2009; Phaniendra *et al.* 2015; Jomova *et al.* 2023). Tam tersine hücrelerde ROS/RNS' nin aşırı birikimi, oksidatif stres oluşturarak proteinler, nükleik asitler ve lipitler üzerinde hasara neden olmaktadır. Bu moleküllerde ortaya çıkan hasar ise insanlarda yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumlara sebebiyet vermektedir (Phaniendra *et al.* 2015; Eddaikra and Eddaikra, 2021; Ashok *et al.* 2022). Hücrelerde aşırı ROS birikimi ise vücut tarafından üretilen endojen antioksidantlar (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroxidaz, albumin etc) ve vücuda dışardan alınan ekzojen antiosidantlar tarafından engellenmektedir (Rao *et al.* 2011; Moussa *et al.* 2019; Hussain and Kayani 2020). Bitkisel ve hayvansal gıdaların yanı sıra mantarlar, likenler, algler ve bakterilerde ekzojen antioksidantların önemli kaynakları olarak işlev görmektedir. (Mirończuk-Chodakowska *et al.* 2018; Chandra *et al.* 2020; Wu *et al.* 2022; Sánchez-León *et al.* 2023; Panova and Tatikolov 2023;). Bakteriler tarafından üretilen önemli antioksidanlardan biriside polisakkaritlerdir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, ***Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Lactobacillus*** gibi farklı cinslere ait türlerin antioksidant aktiviteli polisakkaritleri üretebileceği rapor edilmiştir (Ye *et al.* 2016; Wang *et al.* 2019; Huang-Lin *et al.* 2022; Mahmoud *et al.* 2023). Mevcut çalışmada da, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin antioksidant aktivitesi araştırılmıştır. Antioksidant aktivite ise *in vitro*' da NO•, OH•, DPPH ve O₂•– radikali süpürme ve demir indirgeme potansiyeli yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada, EPS' nin 5 farklı konsantrasyonu (0.05, 0.1, 1, 2 ve 2.5 mg/ml) test edilmiş ve askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. EPS' nin bütün konsantrasyonlarının DPPH radikalini giderme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, EPS' nin DPPH radikalini giderme potansiyelinin konsantrasyona bağılı olarak arttığı ve 2 mg/ml konsantrasyonda maksimuma ulaştığı (%57,3) ve daha yüksek konsantrasyonda (2.5 mg/ml' lik) ise sabit kaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, EPS' nin OH• ve O₂•– radikallerini giderme yeteneğinde konsantrasyona bağılı olarak arttığı ve maksimum potansiyele 2 mg/ml konsantrasyonda ulaştığı belirlenmiştir. 2 mg/ml' lik optimum EPS konsantrasyonunda, OH• ve O₂•– radikallerinin giderilme oranları sırasıyla %86 ve %49 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonunda (2.5 mg/ml) ise EPS' nin OH• ve O₂•– radikallerini giderme yeteneğinin kısmen azaldığı tespit edilmiştir. OH•, DPPH ve O₂•– radikallerinin aksine, NO• (Şekil 16) radikaline karşı EPS' nin maksimum giderme potansiyeline (%43,5) 1.5 mg/ml konsantrasyonunda ulaşılmış ve daha yüksek EPS konsantrasyonlarında ise NO• giderim oranının sabit kaldığı belirlenmiştir. EPS' nin ABTS radikaline karşı ise kayda değer bir giderim potansiyeli göstermediği belirlenmiştir (1 mg/ml

konsantrasyonda sadece %9' luk bir giderim potansiyeli tespit edilmiştir). Kısacası, EPS' nin ABTS hariç test edilen bütün radikallere karşı (özellikle DPPH ve OH• radikallere karşı) güçlü giderme yeteneği sergilediği belirlenmiştir.



Şekil 16. EPS' nin farklı radikallere karşı antioksidant potansiyeli Süperoksit radikali (O₂•⁻), hidroksil radikali (OH•), nitrik oksit radikali (NO•) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali. Tüm ölçümler, altı sonucun (n = 6) ortalama ± standart sapması (±SD) dır. Varyans analizi SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü ANOVA testine (P<0.05) göre yapıldı.

EPS' nin *in vitro* anti-aging aktivite tayini

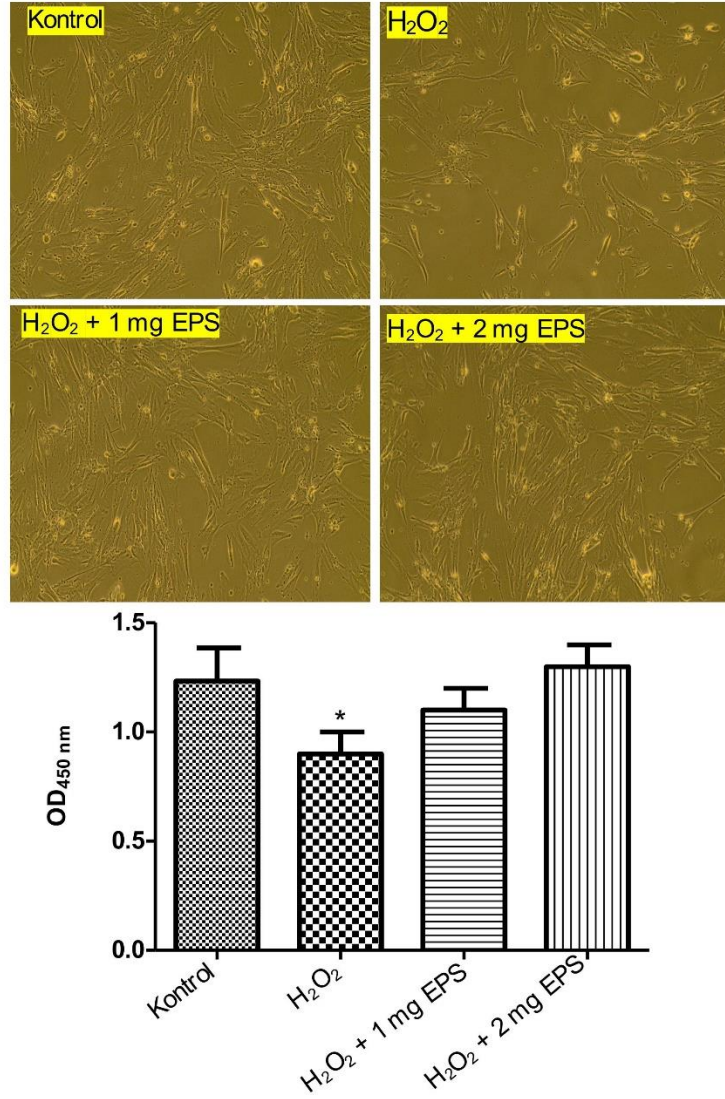
Deri insan vücudunun en büyük ve en hızlı büyüyen organıdır. Deri çevresel ve mekanik koruma, uyarıları algılama, termoregülasyon, D vitamini sentezi, bağışıklık denetimi ve nem regülasyonu gibi birçok önemli fizyolojik görevlerde rol üstlenir (Anderson *et al.* 2015).

Yaşlanma birçok dejeneratif hastalığın ana nedenidir. Yaşlanmanın en belirgin sonucu esas olarak deride ortaya çıkar ve deri yapısında ve görünümünde artan kırışıklıklar, gevşeklik, elastoz, telanjiyektazi ve ciltte anormal pigmentasyon gibi değişikliklerle kendisini gösterir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesiyle indüklenen oksidatif stres diğer organlarda olduğu gibi deri yaşlanmasının en önemli içsel sebeplerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, diğer organlarından farklı olarak deri, yalnızca içsel yaşlanma sürecinden değil, aynı zamanda yaşlanmayı hızlandıran çeşitli dışsal çevresel faktörlerden, özellikle de ultraviyole (UV) radyasyondan da etkilenmektedir (Gu *et al.* 2020).

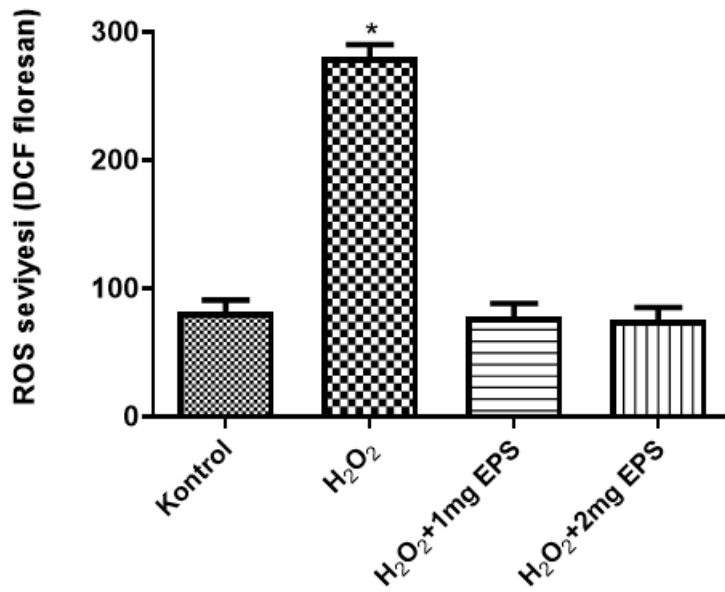
Yaşlanma durumunda hücreler proliferatif kapasitelerini kaybederler ve daha sonra replikatif yaşlanma olarak adlandırılan, geri dönüşü olmayan bir hücre döngüsü durması durumuna girerler. Derinin yaşlanma sürecinde ise çoğalma yetenekleri kaybolmuş yaşlı cilt fibroblastlarının baskın durumu ortaya çıkmaktadır. Yapısal düzeyde, yaşlanmayla ilişkili en ilgili değişiklikler artan kollajen yıkımı ve azalan kollajen biyosentezidir; bu da net bir kollajen eksikliğinin yanı sıra elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar gibi diğer iskele moleküllerinin anormal üretimiyle sonuçlanır. Moleküler düzeyde cilt yaşlanması, diğerlerinin yanı sıra dengesiz redoks durumu, DNA mutasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, telomer kısalması, hücre yaşlanması ve ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) dermiste birikmesinden kaynaklanan karmaşık ve çok faktörlü bir süreçtir (Quiles *et al.* 2022). Yaşlanma karşıtı tıp, nispeten yeni ve çok hızlı gelişen sağlık alanıdır. Bu alan, yaşa bağlı işlev bozukluklarının önlenmesi, erken teşhisi, tedavisi ve iyileştirilmesinde ileri bilimsel ve tıbbi teknolojilerin uygulamalarına odaklanmaktadır. Anti-aging tıp uygulamalarında sadece yaşam süresini uzatmak değil, sağlıklı bir yaşamın daha uzun süre sürdürülmesini sağlamak amaçlanmaktadır. Bu yüzden, anti-aging yerine sağlıklı yaşlanma terimide sıklıkla kullanılmaktadır (Björklund *et al.* 2022).

Günümüzde, derideki yaşlanmayı durdurma veya engellemeye yönelik olarak yeni cilt bakım ürünlerini geliştirme çalışmaları artan bir yoğunlukta devam etmektedir. Bu durum ise, kozmetik endüstrisi pazarının her geçen gün daha da büyümesini sağlamaktadır. Cilt bakım ürünleri derinin su tutma kapasitesini artırma, kollajen sentezini indüklemeye ve pigmentasyonu engellemenin yanı sıra antioksidant ve anti-inflammatör aktivite gösterme mekanizmaları ile yaşlanma karşıtı özellik göstermektedir (Zaid and Al Ramahi 2019; Resende *et al.* 2021; Fernandes *et al.* 2023). Cilt bakım ürünlerinin en önemlilerini, vitaminler, polifenoller, mycosporin-benzeri aminoasitler, karotenoidler, polisakkaritler oluşturmaktadır. Bunlar bitki, bakteri, mantar, alg, plankton ve sünger dahil değişik organizmalardan elde edilmektedir (Zaid and Al Ramahi 2019; Kageyama and Waditee-Sirisattha 2019; Resende *et al.* 2021; Costa *et al.* 2022; Fernandes *et al.* 2023). Örneğin, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bakteri kökenliler dahil farklı kaynaklardan elde edilen pek çok polisakkaritin deri-yaşlanmasına karşı koruyucu özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Falcao *et al.* 2020; Baptista and Freitas 2021; Jo *et al.* 2021; Lee *et al.* 2021; Wang *et al.* 2022). Mevcut çalışmada da *Cytobacillus oceanisediminis* dan elde edilen EPS' nin *in vitro*' da deri yaşlanmasına karşı koruyucu rolü araştırılmıştır. Deri yaşlanma modeli insan deri fibroblast hücreleri ile hazırlanmıştır. Şekil' den görülebileceği gibi H₂O₂ veya EPS uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, H₂O₂ uygulanmış yaşlı-model grubunda fibroblast hücre yoğunluğunda önemli bir azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte, H₂O₂ + EPS uygulanmış gruplarda (1 veya 2 mg/mL EPS), sadece H₂O₂ uygulanmış

yaşlı gruba oranla hücre yoğunluğunda artış tespit edilmiştir. Özellikle, yüksek doz EPS uygulanmış grubun (2 mg/mL EPS) hücre yoğunluğunun yaşlı gruba oranla çok daha yüksek olduğu ve hatta kontrol grubundaki hücre yoğunluğundan bile birazcık daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, H₂O₂ ile üretilen ROS (oksidatif strese) karşı EPS' nin fibroblast hücrelerini koruma potansiyeline sahip olduğunu işaret etmektedir. Mevcut çalışmamızın daha önceki aşamalarında EPS *in vitro* ölçümlerde çeşitli radikallere karşı antioksidant potansiyel ortaya koymuştur. EPS' nin antioksidant potansiyeli göz önüne alındığında H₂O₂ uygulaması ile oluşturulan ROS' a karşı fibroblast hücrelerini koruyucu bir rol üstlenmesi şaşırtıcı olmamalıdır. Dahası, hücre içi ROS ölçüm sonuçlarında bu hipotezimizi destekler niteliktedir. Şekil 17' de görülebileceği gibi yaşlı grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek ROS içeriği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, yaşlı grubunun ROS içeriği EPS gruplarına oranla daha yüksek bulunmuştur. Hatta, yüksek doz EPS grubu ve kontrol grubu arasında ROS seviyeleri bakımından istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda, EPS uygulamasının NHDF'lerde H₂O₂ kaynaklı ROS' u yüksek bir başarı oranı ile elemine ettiğini göstermektedir. Antioksidant rolünün yanısıra, EPS suda çözünme potansiyeline sahip olduğu için dermal fibroblastlar (NHDF'ler) içerisine girerek kollajen sentezinide artırmış olabilir. Bununla birlikte, EPS' nin kollajen sentezi üzerindeki rolünü ortaya çıkarmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



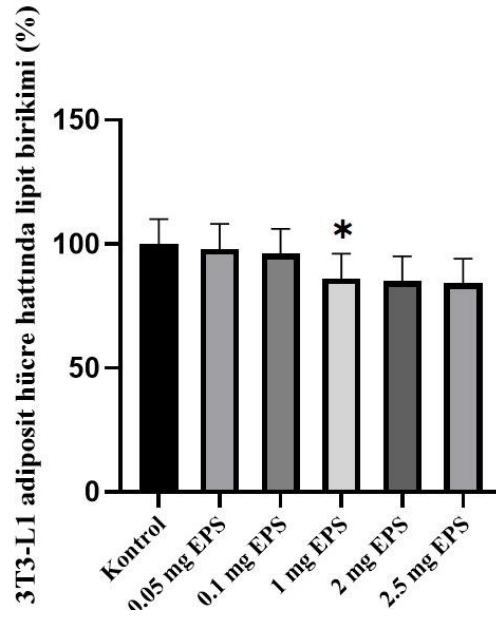
Şekil 17. Dermal fibroblast hücrelerinde EPS'nin antiaging aktivitesi
(Veriler ortalama $\pm$ SS ve $n \geq 5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs kontrol olarak verilmiştir)



Şekil 18. Dermal fibroblast hücrelerinde hücre içi ROS seviyeleri üzerine EPS'nin etkisi
(Veriler ortalama $\pm$ SS ve $n \geq 5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs kontrol olarak verilmiştir)

***In vitro* Antiobezite Etki**

Obezite, vücut kitle indeksinin (BMI) 30'un üzerinde olması olarak tanımlanır. Obezite hastalarında yağ dokularında yüksek hücre içi trigliserit (TG) birikimi meydana gelmektedir. Artan TG' de vücut ağırlığında artışa sebebiyet vermektedir. Aşırı yüksek kalorili gıda alımı, obezitenin en önemli sebeplerinden birisidir. Obezite; diyabet, hipertansiyon, kalp hastalığı, koroner kalp hastalığı, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi metabolik hastalıkların görülme riskini artırmaktadır (Lee *et al.* 2023). Literatürde, bitki, mantar, alg ve bakteri gibi kaynaklardan elde edilen doğal ürünlerin TG ve lipit birikimini engelleyerek anti-obezite etki gösterdiği belirtilmektedir (Wan-Loy and Siew-Moi 2016; Wang *et al.* 2018; Dinda and Dinda 2022). Örneğin, bu organizmalardan elde edilen polisakkaritlerin, özelliklede sülfatlı polisakkaritlerin gerek *in vitro* e gerekse *in vivo* modellerde anti-obezite aktivite gösterdiği literatürde açıklanmaktadır (Friedman 2016; Nakahara *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020, Do *et al.* 2021; Lan *et al.* 2022; Yang *et al.* 2022; Lee *et al.* 2023). Mevcut çalışmada da, *Cytobacillus oceanisediminis* EPS' sinin sülfat içerdiği tespit edildiği için, bu EPS' nin antiobezite aktivitesinin araştırılmasına karar verilmiştir. EPS' nin bu potansiyeli *in vitro* olarak adiposit hücreleri üzerinde test edilmiştir. EPS uygulanmayan hücre grubu kontrol olarak değerlendirilmiş ve lipit biriktirme düzeyi 100% olarak kabul edilmiştir. Şekil 19'dan görülebileceği gibi EPS' nin 0,05 ve 0.1 mg/mL' lik konsantrasyonlarında kontrole oranla lipit içeriğinde çok fazla bir değişim tespit edilmemiştir. 1 mg/mL' lik EPS konsantrasyonunda ise adipositlerin lipit içeriğinin hızlı bir düşüş gösterdiği ve %86 seviyesine kadar indiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek EPS konsantrasyonlarında, lipit içeriğinde önemli sayılabilecek seviyede daha ileri düşüşler belirlenmemiştir (2 ve 2,5 mg/mL EPS konsantrasyonlarında sırasıyla %85 ve %84 lipit içerikleri). Bu sonuçlar, EPS' nin obeziteye karşı doğal bir ürün olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu hipotezi desteklemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 19. Adiposit hücre hattında (3T3-L1) lipit birikimi üzerine EPS' nin etkisi
(Veriler ortalama $\pm$ SS ve $n \geq 5$ olarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ vs kontrol olarak verilmiştir)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Erzurum'un farklı ilçelerinden (Hasankale, İspir, Oltu, Narman ve Tortum) alınan orman toprak örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi ve toplam 143 bakteri izole edildi. İzole edilen bakteriler mikroskopik ve koloni yapılarına göre (petride oluşturdıkları) seçildi ve farklı olduğu düşünülen 70 izolata indirildi. Seçilen izolatlar EPS üretim kapasitelerine göre karşılaştırıldı, 25 suşun EPS ürettiği, diğer suşların üretmediği tespit edildi. Tez kapsamında suda çözünebilir EPS arandığı için, izolatların ürettiği EPS'ler suda çözünübilirlik yönünden değerlendirildi ve 5 EPS'nin suda çözündüğü tespit edildi. En yüksek verimde suda çözünebilir EPS üreten izolat klonlandı ve DT3-C kodu ile *Cytobacillus oceanisediminis* olarak tanımlandı. Bu sonuçlar bize ülkemiz topraklarının EPS üretimi için önemli bir mikrobiyal rezerv olabilme potansiyelini gösterdi. Aynı zamanda bu bakteri cinsi ile EPS üretimi literatürde ilk kez yapıldı.

Tez çalışmasında kullandığımız DT3-C kodlu *Cytobacillus oceanisediminis* EPS üretimi için TSB besiyerinde geliştirildi. Üretim çalışmaları sırasında EPS verimini arttırmak için bazı kültür koşullarının optimizasyonu yapıldı. Mikrobiyal kültürlerde karbon ve azot kaynakları büyük maliyetler oluşturmaktadır. Bu nedenle üretimde maliyeti azaltmak için karbon ve/veya azot bakımından zengin olan atık ya da yan ürün özelliğindeki organik materyaller besiyerlerinde substrat olarak tercih edilmektedir. Mevcut tez çalışmasında bu özellikleri taşıyan bir atık ya da yan ürün kullanılmamış olsada gelecek çalışmalarda DT3-C izolatı ile EPS üretimi için melas, peynir altı suyu ve mısır maserasyon sıvısı gibi organik materyallerin substrat olarak kullanımı gerçekleştirilebilir.

Üretilen EPS'nin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiobezite ve anti-aging aktivitelere sahip olduğu mevcut tez çalışmasında ortaya çıkartılmış olsa da antiparazit, antiviral ve immünomodülatör gibi diğer biyolojik aktiviteleri test edilmemiştir. Gelecek çalışmalarda söz konusu aktiviteler dahil daha farklı biyolojik aktiviteler de araştırılabilir.

Literatürde *Cytobacillus* cinsinin insan patojeni olmadığı ve hatta probiyotik olarak da kullanılabildiği rapor edilmektedir. Bu yüzden DT3-C kodlu izolatımızın insan ve hayvan çalışmalarında probiyotik olarak kullanılma potansiyeli de söz konusu olabilir. Bununla birlikte

probiyotik potansiyelini tam olarak ortaya çıkarmak için gastrointestinal koşullara (düşük pH, pepsin, pankreatin direnci gibi) dayanıklılık ve patojenitesinin olmaması (virülans

genlerinin olmaması, hemoliz göstermemesi gibi) gibi özelliklerinin ortaya çıkartılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde bu bakteri türünün sadece probiyotik olarak kullanılabilme ve enzim üretme yeteneğinden bahsedilmektedir. Bu yüzden yeni çalışmalarda söz konusu izolatın çalışılmamış enzimleri üretme, organik asitleri, peptitleri ve tek hücre proteini gibi metabolitleri üretme yeteneği test edilebilir. Dahası tarımsal çalışmalarda bitki büyümesini teşvik edici, çevre biyoteknolojisi çalışmalarında ise toksik kimyasalların biyoremediasyonu gibi alanlarda kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J. M., and Tornadijo, M. E., 2022. Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 16-26.
- Abd El Mageed, B. M., Ali, S. G., Hammouda, O., and Raslan, M., 2023. Optimization of α -amylase Activity Enzyme Produced By *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(3), 421-426.
- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., and Holley, R., 2021. Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395.
- Abdel-Wahab, B. A., F. Abd El-Kareem, H., Alzamami, A., A. Fahmy, C., H. Elesawy, B., Mostafa Mahmoud, M., and M. Saied, E. 2022. Novel exopolysaccharide from marine *Bacillus subtilis* with broad potential biological activities: Insights into antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxicity, and anti-Alzheimer activity. *Metabolites*, 12(8), 715.
- Abedi, E., and Hashemi, S. M. B., 2020. Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10).
- Abid, Y., Joulak, I., Amara, C. B., Casillo, A., Attia, H., Gharsallaoui, A., and Azabou, S. 2018. Study of interactions between anionic exopolysaccharides produced by newly isolated probiotic bacteria and sodium caseinate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 516-523.
- Aboul-Enein, Y., BUNACIU, A., and FLESCHEIN, S., 2014. Evaluation of the protein secondary structures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Gazi University Journal of Science*, 27(1), 637-644.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adrio, J. L., and Demain, A. L., 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Albayrak, S. Genc B. Ozkan H. Taskin M. Adiguzel A., 2019. Presence of different bacterial species in thermal sources and novelty in their industrial enzyme productions. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13 (3), 1375-1387.
- Albayrak, Ş., 2018. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., and Lee, I. J., 2023. The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11(2), 510.
- Alyousif, N. A., 2022. Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus* related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(2).

- Amatayakul, T., Sherkat, F., and Shah, N. P. 2006. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. *Food hydrocolloids*, 20(2-3), 314-324.
- Amato, A., Becci, A., and Beolchini, F., 2020. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical reviews in biotechnology*, 40(2), 199-212.
- Anderson, J., Anderson, Y., Diyabalanage T., 2015. Paving the way with actives for skincare. *Planta Med* 81:IL23.
- Angelin, J., and Kavitha, M. 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
- Antunes, F. A. F., Rocha, T. M., Philippini, R. R., Martiniano, S. E., Prado, C. A., Mier-Alba, E., ... and Da Silva, S. S., 2022. 5.07-The Potential of Vegetal Biomass for Biomolecules Production.
- Aquinas, N., Bhat M, R., and Selvaraj, S. 2022. A review presenting production, characterization, and applications of biopolymer curdlan in food and pharmaceutical sectors. *Polymer Bulletin*, 79(9), 6905–6927. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03860-1>
- Arayes, M. A., Mabrouk, M. E., Sabry, S. A., and Abdella, B. 2023. Exopolysaccharide production from *Alkalibacillus* sp. w3: statistical optimization and biological activity. *Biologia*, 78(1), 229-240.
- Ariyaei, A., Farhadi, A., Moradian, F., and Rahimi Mianji, G., 2019. Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine protease gene from native Iranian *Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock. *Gene* 693, 10–15.
- Arun, K., 2018. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications.
- Asgher, M., Rani, A., Khalid, N., Qamar, S. A., and Bilal, M., 2021. Bioconversion of sugarcane molasses waste to high-value exopolysaccharides by engineered *Bacillus licheniformis*. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 3, 100084.
- Asgher, M., Urooj, Y., Qamar, S. A., and Khalid, N., 2020. Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: optimization and structural/functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 984-992.
- Ashok, A., Andrabi, S. S., Mansoor, S., Kuang, Y., Kwon, B. K., and Labhasetwar, V., 2022. Antioxidant therapy in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: Role of nanoparticle-based drug delivery systems in clinical translation. *Antioxidants*, 11(2), 408.
- Asitok, A., Ekpenyong, M., Takon, I., Antai, S., Ogarekpe, N., Antigha, R., *et al.*, 2022. Overproduction of a thermo-stable halo-alkaline protease on agro-waste-based optimized medium through alternate combinatorial random mutagenesis of *Stenotrophomonas acidaminiphila*. *Biotechnol. Rep.* 35:e00746.
- Asker, M. S., El Sayed, O. H., Mahmoud, M. G., Yahya, S. M., Mohamed, S. S., Selim, M. S., ... and Abo Elsoud, M. M., 2018. Production of exopolysaccharides from novel marine bacteria and anticancer activity against hepatocellular carcinoma cells (HepG2). *Bulletin of the National Research Centre*, 42, 1-9.
- Aslam, F., Ansari, A., Aman, A., Baloch, G., Nisar, G., Baloch, A. H., and Rehman, H. U., 2020. Production of commercially important enzymes from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB3 using date fruit wastes as substrate. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-7.

- Bajpai, P., 2023. Developments and Applications of Enzymes from Thermophilic Microorganisms. Academic Press.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., ... and Park, Y. H., 2016. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 11(1), 1-23.
- Baltacı, M.Ö., 2020. Ham Petrol Kontaminasyonunun Mikrobiyal Olarak Biyoremediasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Baltacı, M. O. Adigüzel A., 2016. Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 11 (2), 32-38.
- Baltacı, M. O., 2022. Enhancement of cellulase production by co-culture of *Streptomyces ambofaciens* OZ2 and *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 isolated from rumen samples. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(2), 144-152.
- Banerjee, S., and Bhattacharya, S. 2011. Compressive textural attributes, opacity and syneresis of gels prepared from gellan, agar and their mixtures. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 287-292.
- Baptista, S., and Freitas, F., 2021. Bacterial Polysaccharides: Cosmetic Applications. In *Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications* (pp. 1-42). Cham: Springer International Publishing.
- Barcelos, M. C., Vespermann, K. A., Pelissari, F. M., and Molina, G. 2020. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475-1495.
- Barros, F. C., Silva, D. C., Sombra, V. G., Maciel, J. S., Feitosa, J. P., Freitas, A. L., Paula, R.C., 2013. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydr. Polym*, 92, 598–603.
- Bayer, I. S. 2018. Advances in tribology of lubricin and lubricin-like synthetic polymer nanostructures. *Lubricants*, 6(2), 30.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56, 326-338.
- Behera, B. C., Mishra, R., and Mohapatra, S., 2021. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1), 62-76.
- Bezus, B., Cavello, I., Contreras-Esquivel, J. C., and Cavalitto, S., 2022. Pectinases produced by extremophilic yeasts: from cold environments to the food industry. In *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology* (pp. 437-452). Academic Press.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., ... and Aadil, R. M., 2021. Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and its application in the food industry: A review. *Sustainability*, 13(22), 12429.
- Bielecka-Kowalska, A., Czarny, P., Wigner, P., Synowiec, E., Kowalski, B., Szwed, M., ... and Kowalski, M., 2018. Ethylene glycol dimethacrylate and diethylene glycol dimethacrylate exhibits cytotoxic and genotoxic effect on human gingival fibroblasts via induction of reactive oxygen species. *Toxicology in vitro*, 47, 8-17.

- Bjørklund, G., Shanaida, M., Lysiuk, R., Butnariu, M., Peana, M., Sarac, I., ... and Chirumbolo, S., 2022. Natural compounds and products from an anti-aging perspective. *Molecules*, 27(20), 7084.
- Blois, MS., 1957. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199–1200.
- Borghouts, C., Kunz, C., and Groner, B., 2005. Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 11(11), 713-726.
- Borrelli, G. M., and Trono, D., 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20774-20840.
- Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., and Magazù, S. 2020. Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163>
- Castellane, T. C. L., Otoboni, A. M. M. B., and Lemos, E. G. D. M., 2015. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobia species. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39, 1566-1575.
- Chambi, D., Romero-Soto, L., Villca, R., Orozco-Gutiérrez, F., Vega-Baudrit, J., Quillaguamán, J., ... and Carrasco, C., 2021. Exopolysaccharides production by cultivating a bacterial isolate from the hypersaline environment of Salar de Uyuni (Bolivia) in pretreatment liquids of steam-exploded quinoa stalks and enzymatic hydrolysates of curupaú sawdust. *Fermentation*, 7(1), 33.
- Chandra, P., Sharma, R. K., and Arora, D. S., 2020. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129, 108849.
- Chauhan, S., Mitra, S., Yadav, M., and Kumar, A., 2023. Microbial production of lactic acid using organic wastes as low-cost substrates. *Physical Sciences Reviews*, (0).
- Chen, G., Fang, C., Chen, X., Wang, Z., Liu, M., and Kan, J., 2019. High-Pressure Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Mentha Haplocalyx*: Structure, Functional and Biological Activities. *Industrial Crops Prod.* 130, 273–284.
- Chen, S. J., Chen, J. L., Huang, W. C., and Chen, H. L. 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26, 428-432.
- Chen, S., Liu, Z., Chen, Y., Tan, H., Li, S., Liu, H., ... and Zhu, S., 2020. Highly substituted phenol derivatives with nitric oxide inhibitory activities from the deep-sea-derived fungus *Trichobotrys effuse* FS524. *Marine Drugs*, 18(3), 134.
- Chen, X., Wu, J., Song, W., Zhang, L., Wang, H., and Liu, L., 2015. Fumaric acid production by *Torulopsis glabrata*: engineering the urea cycle and the purine nucleotide cycle. *Biotechnology and bioengineering*, 112(1), 156-167.
- Chen, X., Zhu, P., and Liu, L., 2016. Modular optimization of multi-gene pathways for fumarate production. *Metabolic engineering*, 33, 76-85.
- Chen, Y., Nie, X., Ye, J., Wang, Y., Chen, J., and Xu, J., 2021. Biodiesel from microorganisms: a review. *Energy Technology*, 9(10), 2001053.
- Cheng, H. L., Chang, W. T., Lin, J. L., Cheng, M. C., Huang, S. C., Chen, S. C., ... and Hsu, C. L., 2023. An innovative mei-gin formula exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects in 3T3-L1 adipocyte and high-fat diet-induced obese rats. *Foods*, 12(5), 945.

- Chien, L. J., and Lee, C. K. 2007. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 77, 339-346.
- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. *Biotechnol Adv*, 33:1443–1454.
- Chung, M. R. W. Y., Tan, I. S., Foo, H. C. Y., Lam, M. K., and Lim, S., 2023. Potential of macroalgae-based biorefinery for lactic acid production from exergy aspect. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(4), 2623-2653.
- Ciezack, G., Hazo, L., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud-Funel, A., and Dols-Lafargue, M., 2010. Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *Journal of applied microbiology*, 108(2), 499-509.
- Clarke, R.J. and Khalid, A.A., 2015. Pumps, channels and transporters: Methods of functional analysis. John Wiley & Sons, New Jersey, 3.
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.
- Copikova, J., Barros, A.S., Smidova, I., Cerna, M., Teixeira, D.H., Delgadillo, I., Syystya, A. and Coimbra, M.A., 2006. Influence of hydration of food additive polysaccharides on FT-IR spectra distinction. *Carbohydr Polym*, 63: 355-359.
- Cordes, T., Michelucci, A., and Hiller, K., 2015. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annual review of nutrition*, 35, 451-473.
- Costa, E. F., Magalhães, W. V., and Di Stasi, L. C., 2022. Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. *Molecules*, 27(21), 7518.
- Credou, J., and Berthelot, T. 2014. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30), 4767-4788.
- Cubas-Cano, E., Venus, J., González-Fernández, C., and Tomás-Pejó, E., 2020. Assessment of different *Bacillus coagulans* strains for l-lactic acid production from defined media and gardening hydrolysates: Effect of lignocellulosic inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 323, 9-16.
- Cupi, D., Thorsen, M., Elvig-Jørgensen, S. G., Wulf-Andersen, L., Berti-Sorbara, J., Cowieson, A. J., *et al.*, 2022. Efficacy and safety profile of a subtilisin protease produced by fermentation in *Bacillus licheniformis* to be used as a feed additive. *Heliyon* 8:e10030.
- Curieses Andrés, C. M., Pérez de la Lastra, J. M., Andrés Juan, C., Plou, F. J., and Pérez-Lebeña, E., 2023. From reactive species to disease development: Effect of oxidants and antioxidants on the cellular biomarkers. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e23455.
- Cuthbertson, L., Mainprize, I. L., Naismith, J. H., and Whitfield, C. 2009. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), 155-177.
- Çam, S., and Bicek, S. 2023. The effects of temperature, salt, and phosphate on biofilm and exopolysaccharide production by *Azotobacter* spp. *Archives of Microbiology*, 205(3), 87.
- Dahech, I., Fakhfakh, J., Damak, M., Belghith, H., Mejdoub, H., and Belghith, K. S., 2013. Structural determination and NMR characterization of a bacterial exopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 417-422.

- Dawood, D. H., Elmongy, M. S., Negm, A., and Taher, M. A., 2020. Extraction and chemical characterization of novel water-soluble polysaccharides from two palm species and their antioxidant and antitumor activities. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 141-158.
- de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., and Parachin, N. S. 2016. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial cell factories*, 15(1), 1-19.
- Demirbas, A., 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy conversion and management*, 49(8), 2106-2116.
- Di Lorenzo, R. D., Serra, I., Porro, D., and Branduardi, P., 2022. State of the Art on the Microbial Production of Industrially Relevant Organic Acids. *Catalysts*, 12(2), 234.
- Díaz-Cornejo, S., Otero, M. C., Banerjee, A., and Gordillo-Fuenzalida, F., 2023. Biological properties of exopolysaccharides produced by *Bacillus* spp. *Microbiological Research*, 268, 127276.
- Dinda, B., and Dinda, M., 2022. Natural products, a potential source of new drugs discovery to combat obesity and diabetes: their efficacy and multi-targets actions in treatment of these diseases. In *Natural Products in Obesity and Diabetes: Therapeutic Potential and Role in Prevention and Treatment* (pp. 101-275). Cham: Springer International Publishing.
- Do, M. H., Lee, H. B., Oh, M. J., Jhun, H., Choi, S. Y., and Park, H. Y., 2021. Polysaccharide fraction from greens of *Raphanus sativus* alleviates high fat diet-induced obesity. *Food Chemistry*, 343, 128395.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., and Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- Dudun, A. A., Akoulina, E. A., Zhuikov, V. A., Makhina, T. K., Voinova, V. V., Belishev, N. V., and Bonartsev, A. P. 2021. Competitive biosynthesis of bacterial alginate using *Azotobacter vinelandii* 12 for tissue engineering applications. *Polymers*, 14(1), 131.
- Dumitriu, S. (Ed.). 2001. *Polymeric biomaterials, revised and expanded*. Crc Press.
- Dumitriu, S., 2004. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Boca Raton: CRC.
- Eddaikra, A., and Eddaikra, N., 2021. Endogenous enzymatic antioxidant defense and pathologies. *Antioxidants-benefits, sources, mechanisms of action*. IntechOpen.
- Eghedari, M., Porzani, S. J., and Nowruzi, B., 2021. Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. *Phytochemistry Letters*, 42, 87-103.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Falcao, B., Vishwakarma, J., Jadav, H., and Vavilala, S. L., 2020. In vitro evaluation of the antioxidant and anti-skin aging properties of green algal sulfated polysaccharides. *Archives of Microbiology & Immunology*, 4(2), 75-90.
- Far, B. E., Ahmadi, Y., Khosroshahi, A. Y., and Dilmaghani, A., 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350.

- Farag, M. M., Moghannem, S. A., Shehabeldine, A. M., and Azab, M. S., 2020. Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycoides*. *Microbial pathogenesis*, 140, 103947.
- Fathi, Z., Tramontin, L. R. R., Ebrahimipour, G., Borodina, I., and Darvishi, F., 2021. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of β -carotene from hydrophobic substrates. *FEMS Yeast Research*, 21(1), foaa068.
- Felz, S., Vermeulen, P., van Loosdrecht, M. C., and Lin, Y. M., 2019. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, 157, 201-208.
- Feng, Z., Odelius, K., Rajarao, G. K., and Hakkarainen, M. 2018. Microwave carbonized cellulose for trace pharmaceutical adsorption. *Chemical Engineering Journal*, 346, 557-566.
- Fernandes, A., Rodrigues, P. M., Pintado, M., and Tavaría, F. K., 2023. A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. *Phytomedicine*, 154824.
- Figuerola, F. A., Abdala-Díaz, R. T., Pérez, C., Casas-Arrojo, V., Nesic, A., Tapia, C., ... and Cabrera-Barjas, G., 2022. Sulfated polysaccharide extracted from the green algae *Codium bernabei*: Physicochemical characterization and antioxidant, anticoagulant and antitumor activity. *Marine Drugs*, 20(7), 458.
- Filote, C., Roşca, M., Simion, I. M., and Hlihor, R. M., 2022. Continuous systems bioremediation of wastewaters loaded with heavy metals using microorganisms. *Processes*, 10(9), 1758.
- Friedman, M., 2016. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*, 5(4), 80.
- Gabriel, L., Koschella, A., Tied, A., Pfeifer, A., and Heinze, T., 2020. Sulfoethylation of polysaccharides—A comparative study. *Carbohydrate polymers*, 246, 116533.
- Gadim, T. D., Loureiro, F. J., Vilela, C., Rosero-Navarro, N., Silvestre, A. J., Freire, C. S., and Figueiredo, F. M. 2017. Protonic conductivity and fuel cell tests of nanocomposite membranes based on bacterial cellulose. *Electrochimica Acta*, 233, 52-61.
- Gangalla, R., Sampath, G., Beduru, S., Sarika, K., Govindarajan, R. K., Ameen, F., ... and Thampu, R. K., 2021. Optimization and characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus aerophilus* rk1 and its in vitro antioxidant activities. *Journal of King Saud University-Science*, 33(5), 101470.
- Genc, B., Taskin, M., and Adiguzel, A., 2021. Exopolysaccharide of *Anoxybacillus pushchinoensis* G11 has antitumor and antibiofilm activities. *Archives of Microbiology*, 203, 2101-2118.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., ... and Mehmood, S., 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of radiation research and applied Sciences*, 7(2), 222-229.
- Ghiffary, M. R., Prabowo, C. P. S., Sharma, K., Yan, Y., Lee, S. Y., and Kim, H. U., 2021. High-level production of the natural blue pigment indigoidine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for sustainable fabric dyes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(19), 6613-6622.
- Gieroba, B., Krysa, M., Wojtowicz, K., Wiater, A., Pleszczyńska, M., Tomczyk, M., and Sroka-Bartnicka, A., 2020. The FT-IR and Raman spectroscopies as tools for biofilm

- characterization created by cariogenic streptococci. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3811.
- Gohil, N., Bhattacharjee, G., Gayke, M., Narode, H., Alzahrani, K. J., and Singh, V., 2022. Enhanced production of violacein by *Chromobacterium violaceum* using agro-industrial waste soybean meal. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1121-1133.
- Gombotz, W. R., and Wee, S. F. 2012. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 194-205.
- Gowardhane, A.P., Kadam, N.V. and Dutta, S., 2014. Review on enhancement of solubilization process. *Am J Drug Discov Dev*, 4:134–152.
- Gu, Y., Han, J., Jiang, C., and Zhang, Y., 2020. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing research reviews*, 59, 101036.
- Guo, M., and Song, W., 2019. The growing U.S. bioeconomy: Drivers, development and constraints. *New Biotechnology*, 49, 48-57.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 1-18.
- Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S. T., Lohmann, C. H., and Singh, G., 2020. Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2073-2087.
- Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., ... and Li, P., 2015. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers*, 115, 230-237.
- Han, Y., Liu, W., Chang, N., Sun, L., Bello, A., Deng, L., and Sun, Y. 2023. Exploration of β -glucosidase-producing microorganisms community structure and key communities driving cellulose degradation during composting of pure corn straw by multi-interaction analysis. *Journal of Environmental Management*, 325, 116694.
- Harada, T., Fujimori, K., Hirose, S., and Masada, M. 1966. Growth and β -Glucan 10C3K
- Hashim, D.M., Man, Y.C., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., Syahariza, Z.A., 2010. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. *Food Chem*, 118: 856-860.
- Hayes, G., Laurel, M., MacKinnon, D., Zhao, T., Houck, H. A., and Becer, C. R., 2022. Polymers without petrochemicals: sustainable routes to conventional monomers. *Chemical Reviews*, 123(5), 2609-2734.
- Homaei, A., 2015. Enzyme immobilization and its application in the food industry. *Advances in food biotechnology*, 145-164.
- Hospodarova, V., Singovszka, E., and Stevulova, N., 2018. Characterization of cellulosic fibers by FTIR spectroscopy for their further implementation to building materials. *American journal of analytical chemistry*, 9(6), 303-310.
- Hu, M. X., Niu, H. M., Chen, X. L., and Zhan, H. B. 2019. Natural cellulose microfiltration membranes for oil/water nanoemulsions separation. *Colloids and surfaces a: Physicochemical and engineering aspects*, 564, 142-151.
- Hu, X., Fu, H., Bao, M., Zhang, X., Liu, W., Sun, X., and Pan, Y., 2021. Temperature mediates metabolism switching of *Bacillus* sp. ZT-1: Analysis of the properties and structure of exopolysaccharides. *Microbiological Research*, 251, 126839.

- Hu, Z., Qi, Y., Zhao, L., and Chen, G., 2019. Interactions between microalgae and microorganisms for wastewater remediation and biofuel production. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 3907-3919.
- Huang, Y., Wang, Y., Shang, N., and Li, P., 2023. Microbial Fermentation Processes of Lactic Acid: Challenges, Solutions, and Future Prospects. *Foods*, 12(12), 2311.
- Huang-Lin, E., Sánchez-León, E., Amils, R., and Abrusci, C., 2022. Potential Applications of an Exopolysaccharide Produced by *Bacillus xiamenensis* RT6 Isolated from an Acidic Environment. *Polymers*, 14(18), 3918.
- Huerta-Angeles, G., Brandejsová, M., Kulhánek, J., Pavlík, V., Šmejkalová, D., Vágnerová, H., and Velebný, V. 2016. Linolenic acid grafted hyaluronan: Process development, structural characterization, biological assessing, and stability studies. *Carbohydrate polymers*, 152, 815-824.
- Hussain, F., and Kayani, H.U.R., 2020. Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6(5).
- Hwang, H. T., Qi, F., Yuan, C., Zhao, X., Ramkrishna, D., Liu, D., and Varma, A., 2014. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. *Biotechnology and bioengineering*, 111(4), 639-653.
- Islam, S. T., Taylor, V. L., Qi, M., and Lam, J. S. 2010. Membrane topology mapping of the O-antigen flippase (Wzx), polymerase (Wzy), and ligase (WaaL) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 reveals novel domain architectures. *MBio*, 1(3), 10-1128.
- J., and Lin, N. 2018. Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose*, 25(4), 2151–2189. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>
- Janesch, B., Koerdt, A., Messner, P., and Schäffer, C., 2013. The S-layer homology domain-containing protein SlhA from *Paenibacillus alvei* CCM 2051T is important for swarming and biofilm formation. *PLoS One*, 8(9), e76566.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., and Puntarulo, S., 2006. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 142(3), 1246-1255.
- Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V., and Annapure, U. S. 2012. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1045-1053.
- Ji, N., Liu, P., Zhang, N., Yang, S., and Zhang, M., 2022. Comparison on Bioactivities and Characteristics of Polysaccharides From Four Varieties of *Gastrodia elata* Blume. *Frontiers in Chemistry*, 10, 956724.
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., ... and Cao, Y., 2020. DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components. *ACS omega*, 5(15), 8572-8578.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. and Ewart, H.S., 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs*, 9: 196–223.
- Jo, M. H., Kim, B., Ju, J. H., Heo, S. Y., Ahn, K. H., Lee, H. J., ... and Oh, B. R., 2021. *Tremella fuciformis* TFCUV5 mycelial culture-derived exopolysaccharide production and its anti-aging effects on skin cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 26, 738-748.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., and Valko, M., 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 1-76.

- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., and Silva, C. C. 2022. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156.
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., and Silva, C. C. 2022. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156.
- Kageyama, H., and Waditee-Sirisattha, R., 2019. Antioxidative, anti-inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging. *Marine Drugs*, 17(4), 222.
- Kalepu, S. and Nekkanti. V., 2015. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5:442–453.
- Kalra, R., Conlan, X. A., and Goel, M., 2020. Fungi as a potential source of pigments: Harnessing filamentous fungi. *Frontiers in Chemistry*, 8, 369.
- Kang, J., Jia, X., Wang, N., Xiao, M., Song, S., Wu, S., ... and Guo, Q., 2022. Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review. *Food Hydrocolloids*, 123, 107049.
- Karadayi, Y. I., Aykutoglu, G., Arslan, N. P., Baltaci, M. O., Adiguzel, A., and Taskin, M., 2021. Production of water-soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(5), 1258-1266.
- Karbowiak, T., Ferret, E., Debeaufort, F., Voilley, A. and Cayot, P., 2011. Investigation of water transfer across thin layer biopolymer films by infrared spectroscopy. *J Memb Sci*, 370: 82-90.
- Kargarzadeh, H., Mariano, M., Gopakumar, D., Ahmad, I., Thomas, S., Dufresne, A., Huang, Kasana, R. C., Salwan, R., and Yadav, S. K., 2011. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 262-276.
- Kaur, G., Kaur, G., Krol, M., and Brar, S. K., 2022. Unraveling the mystery of subsurface microorganisms in bioremediation. *Current Research in Biotechnology*.
- Kavita, K., Mishra, A. and Jha, B., 2011. Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*, 27: 309-317.
- Kayar, F., Doymus, M., Ozkan, H., Arslan, N. P., Adiguzel, A., and Taskin, M., 2022. Preparation of chitosan with high antibacterial efficiency from *penicillium crustosum* TZ18. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(9), 3598-3608.
- Kayar, F., Doymus, M., Ozkan, H., Arslan, N. P., Adiguzel, A., and Taskin, M., 2022. Preparation of Chitosan with High Antibacterial Efficiency from *Penicillium crustosum* TZ18. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-11.
- Khan, F. A., 2020. *Biotechnology fundamentals* (Third edition). CRC Press.
- Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T. N. I., Saqib, S., Ullah, F., Ayaz, A., and Zaman, W., 2023. The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant–microbe interactions. *Antioxidants*, 12(2), 268.
- Khoshnevisan, K., Maleki, H., Samadian, H., Shahsavari, S., Sarrafzadeh, M. H., Larijani, B., and Khorramizadeh, M. R. 2018. Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications and recent advances. *Carbohydrate polymers*, 198, 131-141.
- Kiddane, A.T., and Kim, G.D., 2021. Anticancer and immunomodulatory effects of polysaccharides. *Nutrition and Cancer*, 73(11-12), 2219-2231.

- Kim, M. J., Lim, J. W., Seo, J. H., and Jung, H. K., 2011. Hybrid optimization strategy using response surface methodology and genetic algorithm for reducing cogging torque of SPM. *Journal of Electrical Engineering and Technology*, 6(2), 202-207.
- Kokoulin, M. S., Lizanov, I. N., Romanenko, L. A., and Chikalovets, I. V., 2020. Structure of phosphorylated and sulfated polysaccharides from lipopolysaccharide of marine bacterium *Marinicella litoralis* KMM 3900T. *Carbohydrate research*, 490, 107961.
- Komandrova, N. A., Tomshich, S. V., Isakov, V. V. and Romanenko, L. A., 1998. Structure of sulfated O-specific polysaccharide of the marine bacterium *Pseudoalteromonas marinoglutinosa* KMM 232. *Biochemistry (Mosc)*, 63:1200–1204.
- Kong, J., and Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Konuklu, Y., Erzin, F., Akar, H. B., and Turan, A. M. 2019. Cellulose-based myristic acid composites for thermal energy storage applications. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 193, 85-91.
- Korcz, E., and Varga, L., 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375-384.
- Korva, H., Kärkkäinen, J., Lappalainen, K., and Lajunen, M., 2016. Spectroscopic study of natural and synthetic polysaccharide sulfate structures. *Starch-Stärke*, 68(9-10), 854-863.
- Krishnamurthy, M., Uthaya, C. J., Thangavel, M., Annadurai, V., Rajendran, R., and Gurusamy, A., 2020. Optimization, compositional analysis, and characterization of exopolysaccharides produced by multi-metal resistant *Bacillus cereus* KMS3-1. *Carbohydrate polymers*, 227, 115369.
- Krull, S., Hevekerl, A., Kuenz, A., and Prüße, U., 2017. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10), 4063-4072.
- Kuddus, M., and Ramteke, P. W., 2008. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. *The Journal of general and applied microbiology*, 54(6), 385-392.
- Kumar, A., Mukhia, S., and Kumar, R. 2022. Production, characterisation, and application of exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium *Mucilaginibacter* sp. ERMR7: 07. *Process Biochemistry*, 113, 27-36.
- Lan, Y., Sun, Q., Ma, Z., Peng, J., Zhang, M., Wang, C., ... and Liu, X., 2022. Seabuckthorn polysaccharide ameliorates high-fat diet-induced obesity by gut microbiota-SCFAs-liver axis. *Food & Function*, 13(5), 2925-2937.
- Larocca, M., Di Marsico, M., Riccio, P., Rossano, R., 2018. The in vitro antioxidant properties of *Muscari comosum* bulbs and their inhibitory activity on enzymes involved in inflammation, post-prandial hyperglycemia, and cognitive/neuromuscular functions. *J. Food Biochem*, e12580.
- Latif, M., Bukhari, S. A. H., Alrajhi, A. A., Alotaibi, F. S., Ahmad, M., Shahzad, A. N., and Mattar, M. A. 2022. Inducing drought tolerance in wheat through exopolysaccharide-producing rhizobacteria. *Agronomy*, 12(5), 1140.
- Le, C., and Stuckey, D.C., 2016. Colorimetric measurement of carbohydrates in biological wastewater treatment systems: a critical evaluation. *Water research*, 94, 280-287.

- Lee, H. G., Hyun, J., Liyanage, N. M., Jayawardhana, H. H. A. C. K., Nagahawatta, D. P., Choi, Y. S., ... and Jeon, Y. J., 2023. Investigating in vitro antiobesity properties of enzyme-assisted hydrolysate and its crude sulfated polysaccharide from *Padina arborescens*. *Journal of Functional Foods*, 108, 105704.
- Lee, K. Y., and Mooney, D. J. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- Lee, K., Kim, H. J., Kim, S. A., Park, S. D., Shim, J. J., and Lee, J. L., 2021. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* HY7714 protects against skin aging through skin–gut axis communication. *Molecules*, 26(6), 1651.
- Lemieszek, M. and Rzeski, W., 2012. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the basidiomycetes class. *Contemp Oncol*, 16: 285–289.
- Lemieszek, M., and Rzeski, W., 2012. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 16(4), 285-289.
- Leong, B. F., Chuah, W. C., and Chye, F. Y., 2021. Recent advances and emerging trends in the utilization of dairy by-products/wastes. *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products*, 371-389.
- Leung, P. H., Zhao, S., Ho, K. P., and Wu, J. Y., 2009. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. *Food Chemistry*, 114(4), 1251-1256.
- Li, C., Ong, K. L., Cui, Z., Sang, Z., Li, X., Patria, R.D., ... and Lin, C. S.K., 2021. Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. *Journal of hazardous materials*, 401, 123414.
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., ... and Lin, Y., 2016. Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237-250.
- Li, W., Xia, X., Tang, W., Ji, J., Rui, X., Chen, X., ... and Dong, M., 2015. Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(13), 3454-3463.
- Li, Y., Liu, Z., Cui, F., Xu, Y., and Zhao, H., 2007. Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp. ZH-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 837-843.
- Lim, S., Lee, K. Y., Lee, Y. B., and Song, K. B. 2001. Immobilization of levan fructotransferase for the production of di-fructose anhydride from levan. *Biotechnology letters*, 23, 1335-1339.
- Lima, A. C. P., Cammarota, M. C., and Gutarra, M. L., 2018. Obtaining filamentous fungi and lipases from sewage treatment plant residue for fat degradation in anaerobic reactors. *PeerJ*, 6, e5368.
- Limbadi, S., Luo, X., Lin, X., Liao, S., Wang, J., Zhou, X., ... and Liu, Y., 2018. Bioactive novel indole alkaloids and steroids from deep sea-derived fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012. *Molecules*, 23(9), 2379.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., and Chang, S. T., 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life sciences*, 60(10), 763-771.

- Liu, G. H., Narsing Rao, M. P., Liu, D. Q., Tang, R., Chen, Q. Q., Shi, H., ... and Zhou, S. G., 2023. *Cytobacillus citreus* sp. nov., isolated from citrus rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(3), 005753.
- Liu, X., and Kokare, C., 2023. Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 405-444). Academic Press.
- Loera, O., and Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 177-181.
- Lopez, M. J., Moreno, J., and Ramos-Cormenzana, A. 2001. Xanthomonas campestris strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water Research*, 35(7), 1828-1830.
- Lu, M. K., Lin, T. Y., and Chang, C. C., 2018. Chemical identification of a sulfated glucan from *Antrodia cinnamomea* and its anti-cancer functions via inhibition of EGFR and mTOR activity. *Carbohydrate polymers*, 202, 536-544.
- Lu, X., Zhang, H., Li, Y., and Huang, Q. 2018. Fabrication of milled cellulose particles-stabilized Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 77, 427-435.
- Madhuri, K. V., and Vidya Prabhakar, K. 2014. Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Oriental journal of chemistry*, 30(3), 1401-1410.
- Mahdiyah, D., Farida, H., Riwanto, I., Mustofa, M., Wahjono, H., Nugroho, T. L., and Reki, W., 2020. Screening of Indonesian peat soil bacteria producing antimicrobial compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(10), 2604-2611.
- Mahmoud, M. G., Awady, M. E. E., Selim, M. S., Ibrahim, A. Y., Ibrahim, F. M., and Mohamed, S. S., 2023. Characterization of biologically active exopolysaccharide produced by *Streptomyces* sp. NRCG4 and its anti-Alzheimer efficacy: in-vitro targets. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 1-17.
- Mandal, A., Kar, S., Das Mohapatra, P. K., Maity, C., Pati, B. R., and Mondal, K. C., 2012. Regulation of xylanase biosynthesis in *Bacillus cereus* BSA1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 1052-1060.
- Marimuthu, S., and Rajendran, K., 2023. Structural and Functional Characterization of Exopolysaccharide Produced by a Novel Isolate *Bacillus* sp. EPS003. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19.
- Marqus, S., Pirogova, E., and Piva, T. J., 2017. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of biomedical science*, 24(1), 1-15.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., and D'Alessandro, A. G., 2022. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.
- Martinez, M. C., and Andriantsitohaina, R., 2009. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(3), 669-702.
- Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., Quesada, E., 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res. Microbiol*, 157, 827-835.
- Mathlouthi, N., Mohamed, M. A., and Larbier, M., 2003. Effect of enzyme preparation containing xylanase and β -glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley- or maize/soybean meal-based diets. *British poultry science*, 44(1), 60-66.

- Maurya, A., Kumar, R., Yadav, P., Singh, A., Yadav, A., Chowdhary, P., and Raj, A., 2022. Biofilm formation and extracellular polymeric substance (EPS) production by *Bacillus haynesii* and influence of hexavalent chromium. *Bioresource Technology*, 352, 127109.
- May, O., 2019. Industrial enzyme applications—overview and historic perspective. *Industrial enzyme applications*, 1-24.
- Mechri, S., Zarái Jaouadi, N., Bouacem, K., Allala, F., Bouraoui, A., Ferard, C., *et al.*, 2021. Cloning and heterologous expression of subtilisin SAPN, a serine alkaline protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2AT in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 105, 27–41.
- Megías-Sayago, C., Navarro-Jaén, S., Castillo, R., and Ivanova, S., 2020. Recent advances in selective oxidation of biomass-derived platform chemicals over gold catalysts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 21, 50-55.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., and Silveira, E., 2020. Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158.
- Meng, K., Zhang, G., Ding, C., Zhang, T., Yan, H., Zhang, D., ... and Jin, X., 2020. Recent advances on purification of lactic acid. *The Chemical Record*, 20(11), 1236-1256.
- Midik, F., Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., and Özçelik, F. 2020. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. *Archives of microbiology*, 202, 875-885.
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., and Zujko, M. E., 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- Mizuno, T. Yamabushitake, 1995. *Hericium erinaceum*: bioactive substances and medicinal utilization. *Food Rev Int* ,11:173–178.
- Mohan, N., Pavan, S. S., Jayakumar, A., Rathinavelu, S., and Sivaprakasam, S. 2022. Real-time metabolic heat-based specific growth rate soft sensor for monitoring and control of high molecular weight hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3), 1079-1095.
- Mohandas, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Abraham, A., Athira, R. S., Mathew, A. K., and Pandey, A., 2018. Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 110.
- Molinari, M. L., and Boiardi, J. L. 2013. Levans production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 7-7.
- Moosavi, A., and Karbassi, A. 2010. Bioconversion of sugar-beet molasses into xanthan gum. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(2), 316-322. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00376.x>
- Moussa, Z., Judeh, Z. M., and Ahmed, S. A., 2019. Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free radical medicine and biology*, 1, 11-22.
- Mubeen, A., Nazim, H., Zulqarnain, B., Muhammad, B., Ajay, K., Luiz, F. R. F., *et al.*, 2023. “Bioprospecting microbial proteases in various industries/sectors,” in *Microbial biomolecules*. eds. Ajay Kumar, Muhammad Bilal and Madhuree Kumari, *et al.* (Salt Lake City, UT: Academic Press), 301–324.
- Muhidinov, Z. K., Bobokalonov, J. T., Ismoilov, I. B., Strahan, G. D., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., and Liu, L., 2020. Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan. *Food Hydrocolloids*, 105, 105768.

- Muthumari, G. M., Thilagavathi, S., and Hariram, N., 2016. Industrial enzymes: Lipase producing microbes from waste volatile substances. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(5), 2201.
- Mülhaupt, R., 2014. Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 43:1054–63.
- Nakahara, D., Nan, C., Mori, K., Hanayama, M., Kikuchi, H., Hirai, S., and Egashira, Y., 2020. Effect of mushroom polysaccharides from *Pleurotus eryngii* on obesity and gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *European journal of nutrition*, 59, 3231-3244.
- Nanda, S., Pattnaik, F., Patra, B. R., Kang, K., and Dalai, A. K., 2023. A review of liquid and gaseous biofuels from advanced microbial fermentation processes. *Fermentation*, 9(9), 813.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., and Ragadhita, R., 2019. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97-118.
- Naumann, D., Barnickel, G., Bradaczek, H., Labischinski, H. and Giesbrecht, P., 1982. Infrared spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan. Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin. *Eur J Biochem*, 125: 505-515.
- Naveen, K. V., Sathiyaseelan, A., Mandal, S., Han, K. and Wang, M. H., 2023. Unveiling the structural characteristics and bioactivities of the polysaccharides extracted from endophytic *Penicillium* sp. *Molecules*, 28(15): 5788.
- Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S., and Mohammed, S., 2019. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microbial pathogenesis*, 132, 10-19.
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., and Nguyen, H. T. 2020. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(4), 451.
- Nichols, C. M., Bowman, J. P., and Guezennec, J., 2005. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3519-3523.
- Nidhi, C., Sharma, B., and Singh, P. K. 2017. Energy value in biomass and plastic components of municipal solid waste. *MATTER: International Journal of Science and Technology*, 3(2).
- Ning, Y., Zhang, L. Y., Mai, J., Su, J. E., Cai, J. Y., Chen, Y., ... and Hu, B. B., 2023. Tobacco microbial screening and application in improving the quality of tobacco in different physical states. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), 1-17.
- Niu, S., Xia, M., Chen, M., Liu, X., Li, Z., Xie, Y., ... and Zhang, G., 2019. Cytotoxic polyketides isolated from the deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292. *Marine Drugs*, 17(12), 686.
- Niu, S., Xie, C. L., Xia, J. M., Luo, Z. H., Shao, Z., and Yang, X. W., 2018. New anti-inflammatory guaianes from the Atlantic hydrotherm-derived fungus *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421. *Scientific reports*, 8(1), 530.
- Niyonzima, F. N., Mahnashi, M. H., Shaikh, I. A., Mannasaheb, B. A., Ghoneim, M. M., Asdaq, S. M. B., ... and Vidya, A. S., 2023. Detergent-Compatible amylases produced by fungal species and their applications in detergent industry. *Science of Advanced Materials*, 15(5), 607-616.

- Norouzi, P., Mirmohammadi, M., and Tehrani, M. H. H., 2022. Anticancer peptides mechanisms, simple and complex. *Chemico-Biological Interactions*, 110194.
- nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(2), 790–795. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.047613-0>
- Nowak, A., Nowak, M. J., and Cybulska, K., 2017. Stories with microorganisms.... *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology*, 22.
- Nwodo, U. U., Green, E., and Okoh, A. I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Ojo, A. O., and de Smidt, O., 2023. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. *Processes*, 11(3), 688.
- Osemwegie, O. O., Adetunji, C. O., Ayeni, E. A., Adejobi, O. I., Arise, R. O., Nwonuma, C. O., and Oghenekaro, A. O., 2020. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. *Heliyon*, 6(6).
- Ouyang, Y., Qiu, Y., Liu, Y., Zhu, R., Chen, Y., El-Seedi, H. R., ... and Zhao, C., 2021. Cancer-fighting potentials of algal polysaccharides as nutraceuticals. *Food Research International*, 147, 110522.
- Panova, I. G., and Tatikolov, A. S., 2023. Endogenous and Exogenous Antioxidants as Agents Preventing the Negative Effects of Contrast Media (Contrast-Induced Nephropathy). *Pharmaceuticals*, 16(8), 1077.
- Papagianni, M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), 244-263.
- Patil, S. Shirsath L., 2015. Production of exopolysaccharide by an osmotolerant thermostable and metal resistant *Bacillus subtilis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4(2), 965-971.
- Pattananandecha, T., Apichai, S., Julsrigival, J., Ungsurungsie, M., Samuhasaneetoo, S., Chulasiri, P., ... and Saenjum, C., 2021. Antioxidant activity and anti-photoaging effects on UVA-irradiated human fibroblasts of rosmarinic acid enriched extract prepared from *Thunbergia laurifolia* leaves. *Plants*, 10(8), 1648.
- Pawar, H. A., and Lalitha, K. G., 2015. Extraction, characterization, and molecular weight determination of *Senna tora* (L.) seed polysaccharide. *International Journal of Biomaterials*, 2015.
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Garcia-Oliveira, P., Otero, P., Soria-Lopez, A., Cassani, L., ... and Simal-Gandara, J., 2022. Single-cell proteins obtained by circular economy intended as a feed ingredient in aquaculture. *Foods*, 11(18), 2831.
- Pereira, L., Gheda, S. F., and Ribeiro-Claro, P. J., 2013. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013.
- Pereira, W. E. S., da Silva, R. R., de Amo, G. S., Ruller, R., Kishi, L. T., Boscolo, M., *et al.*, 2020. A collagenolytic aspartic protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 191, 1258–1270.
- Perry, M.C., (ed), 2008. The chemotherapy source book. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

- Pessôa, M. G., Vespermann, K. A., Paulino, B. N., Barcelos, M. C., Pastore, G. M., and Molina, G., 2019. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnology advances*, 37(2), 319-339.
- Peterson, S. W., Manitchotpisit, P., and Leathers, T. D. 2013. *Aureobasidium thailandense* sp. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*.
- Poljsak, B., Šuput, D., and Milisav, I., 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Poorniammal, R., Prabhu, S., Dufossé, L., and Kannan, J., 2021. Safety evaluation of fungal pigments for food applications. *Journal of Fungi*, 7(9), 692.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., 2002. Laboratory exercises in microbiology. Place McGraw-Hill Companies,
- production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes* in defined medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(8), 764–769. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858682>
- production from agro-based wastes by *Aureobasidium pullulans* and its applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, 102846. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102846>
- Pu, L., Zeng, Y. J., Xu, P., Li, F. Z., Zong, M. H., Yang, J. G., and Lou, W. Y., 2020. Using a novel polysaccharide BM2 produced by *Bacillus megaterium* strain PL8 as an efficient bioflocculant for wastewater treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 374-384.
- Purohit, A., Rai, S. K., Chownk, M., Sangwan, R. S., and Yadav, S. K., 2017. Xylanase from *Acinetobacter pittii* MASK 25 and developed magnetic cross-linked xylanase aggregate produce predominantly xylopentose and xylohexose from agro biomass. *Bioresource technology*, 244, 793-799.
- Putri, D. N., Sahlan, M., Montastruc, L., Meyer, M., Negny, S., and Hermansyah, H., 2020. Progress of fermentation methods for bio-succinic acid production using agro-industrial waste by *Actinobacillus succinogenes*. *Energy Reports*, 6, 234-239.
- Qiao, D., Ke, C., Hu, B., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., ... and Zeng, X., 2009. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate polymers*, 78(2), 199-204.
- Qu, C., Dai, K., Fu, H., and Wang, J., 2021. Enhanced ethanol production from lignocellulosic hydrolysates by *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27/ Δ argR1864 with improved lignocellulose-derived inhibitors tolerance. *Renewable Energy*, 173, 652-661.
- Quiles, J., Cabrera, M., Jones, J., Tsapekos, M., and Caturla, N., 2022. In vitro determination of the skin anti-aging potential of four-component plant-based ingredient. *Molecules*, 27(22), 8101.
- Quiles, J., Cabrera, M., Jones, J., Tsapekos, M., and Caturla, N., 2022. In vitro determination of the skin anti-aging potential of four-component plant-based ingredient. *Molecules*, 27(22), 8101.
- Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., and Kambourova, M. 2013. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171, 31-43.

- Rajendran, P., Somasundaram, P., and Dufossé, L., 2023. Microbial pigments: Eco-friendly extraction techniques and some industrial applications. *Journal of Molecular Structure*, 135958.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., ... and Shi, J., 2019. Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 1132-1142.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Kitazawa, H., Barba, F. J., Berthelot, L., Umair, M., and Zhao, L. 2022. Techno-functional properties and immunomodulatory potential of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* MM89 isolated from human breast milk. *Food Chemistry*, 377, 131954.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., and Larroche, C., 2006. Glukonska kiselina: svojstva, primjena i proizvodnja s pomoću mikroorganizama. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 185-195.
- Rana, S., and Upadhyay, L. S. B. 2020. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International journal of biological macromolecules*, 157, 577-583.
- Rana, S., and Upadhyay, L. S. B., 2020. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International journal of biological macromolecules*, 157, 577-583.
- Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., and Mamidi, S., 2011. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4), 2-7.
- Rastegari, A. A., Yadav, A. N., and Yadav, N. (Eds.), 2020. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: trends of microbial biotechnology for sustainable agriculture and biomedicine systems: diversity and functional perspectives. Elsevier.
- Raus, R. A., Nawawi, W. M. F. W., and Nasaruddin, R. R. 2021. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 280-306.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., ... and Pandey, A., 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic acids research*, 46(D1), D624-D632.
- Ray, R. C., and Rosell, C. M. (Eds.), 2017. Microbial enzyme technology in food applications. CRC Press.
- Reda, F. M., Ismail, I. E., Attia, A. I., Fikry, A. M., Khalifa, E., and Alagawany, M., 2021. Use of fumaric acid as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth rate, carcass, nutrient digestibility, digestive enzymes, blood metabolites, and intestinal microbiota. *Poultry Science*, 100(12), 101493.
- Rehm, B. H. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.
- Rehm, B. H. A. 2015. Synthetic biology towards the synthesis of custommade polysaccharides, *Microb. Biotechnol.* 8 19–20.

- Resende, D. I., Ferreira, M., Magalhães, C., Lobo, J. S., Sousa, E., and Almeida, I. F., 2021. Trends in the use of marine ingredients in anti-aging cosmetics. *Algal Research*, 55, 102273.
- Rinaudo, M. 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer international*, 57(3), 397-430.
- Riseh, R. S., Tamanadar, E., Pour, M. M., and Thakur, V. K. 2022. Novel approaches for encapsulation of plant probiotic bacteria with sustainable polymer gums: application in the management of pests and diseases. *Advances in Polymer Technology*, 2022, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/4419409>
- Roa Engel, C. A., Straathof, A. J., Zijlmans, T. W., van Gulik, W. M., and van der Wielen, L. A., 2008. Fumaric acid production by fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 78, 379-389.
- Rottava, I., Batesini, G., Silva, M. F., Lerin, L., de Oliveira, D., Padilha, F. F., and Treichel, H. 2009. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 65-71.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... and Langley, E., 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167.
- Saha, B. C., and Kennedy, G. J., 2019. Phosphate limitation alleviates the inhibitory effect of manganese on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101016.
- Sánchez-León, E., Huang-Lin, E., Amils, R., and Abrusci, C., 2023. Production and Characterisation of an Exopolysaccharide by *Bacillus amyloliquefaciens*: Biotechnological Applications. *Polymers*, 15(6), 1550.
- Sardari, R. R. R., Kulcinskaja, E., Ron, E. Y. C., Björnsdóttir, S., Friðjónsson, Ó. H., Hreggviðsson, G. Ó., and Karlsson, E. N., 2017. Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. *Carbohydr Polym* 156:1–8.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., and Branduardi, P., 2008. Microbial production of organic acids: Expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 100-108.
- Schmid, J., and Sieber, V., 2015. Enzymatic transformations involved in the biosynthesis of microbial exo-polysaccharides based on the assembly of repeat units. *Chembiochem*, 16(8), 1141-1147.
- Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 496.
- Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B., 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 496.
- Scully, S. M., and Orlygsson, J., 2014. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8(1), 1-30.
- Selim, S., Almuhayawi, M. S., Alharbi, M. T., Nagshabandi, M. K., Alanazi, A., Warrad, M., ... and Ali, A. S., 2022. In vitro assessment of antistaphylococci, antitumor, immunological and structural characterization of acidic bioactive exopolysaccharides from marine *Bacillus cereus* isolated from Saudi Arabia. *Metabolites*, 12(2), 132.
- Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., and Park, Y. H., 2015. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content,

- antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian J. Pharm. Educ. Res*, 49(4), 282-292.
- Shang, A., Liu, H., Li, S., Chai, Z., Qiao, L., and Mou, H., 2014. Preparation and characterization of the enzymatic degradation products of the exopolysaccharide from *Klebsiella* K13. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 33(2), 68-85.
- Sharif, M., Zafar, M. H., Aqib, A. I., Saeed, M., Farag, M. R., and Alagawany, M., 2021. Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*, 531, 735885.
- Sharma, H., and Upadhyay, S. K., 2020. Enzymes and their production strategies. In *Biomass, biofuels, biochemicals* (pp. 31-48). Elsevier.
- Sharma, K., Sharma, N., Handa, S., and Pathania, S., 2020. Purification and characterization of novel exopolysaccharides produced from *Lactobacillus paraplantarum* KM1 isolated from human milk and its cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 56.
- Shih, L., Chen, L. D., Wang, T. C., Wu, J. Y., and Liaw, K. S. 2010. Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chemistry*, 12(7), 1242-1247.
- Shukla., S., 2022. Century impact of macromolecules for advances of sensing. *Sciences Chemistry Africa*. 1-23.
- Silva, I. M., Machado, F., Moreno, M. J., Nunes, C., Coimbra, M. A., and Coreta-Gomes, F., 2021. Polysaccharide structures and their hypocholesterolemic potential. *Molecules*, 26(15), 4559.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Mehta, P. K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech*, 6, 1-15.
- Siró, I., and Plackett, D. 2010. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17, 459-494.
- Šmejkalová, D., Nešporová, K., Huerta-Angeles, G., Syrovátka, J., Jiráček, D., Gálisová, A., and Velebný, V. 2014. Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan polymeric micelles. *Biomacromolecules*, 15(11), 4012-4020.
- Smith, D., 2017. Fumaric acid esters for psoriasis: a systematic review. *Irish Journal of Medical Science* (1971-), 186, 161-177.
- Solmaz, K. B., Ozcan, Y., Mercan Dogan, N., Bozkaya, O., and Ide, S., 2018. Characterization and production of extracellular polysaccharides (EPS) by *Bacillus pseudomycoloides* U10. *Environments*, 5(6), 63.
- Song, H., and Lee, S. Y., 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 352-361.
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., and Wei, F., 2023. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Song, Y., Li, S., Gong, H., Yip, R. C. S., and Chen, H., 2023. Biopharmaceutical applications of microbial polysaccharides as materials: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124259.
- Sørensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., and Freeland, B. 2022. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients*, 14(14), 2938.

- Srikanth, R., Reddy, C. H. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., and Uppuluri, K. B. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate polymers*, 120, 102-114.
- Su, Y., Zhang, P., and Su, Y., 2015. An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 991-1003.
- Subramaniyan, S., and Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1), 33-64.
- Sudan, S. K., Kumar, N., Kaur, I., and Sahni, G., 2018. Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. *International journal of biological macromolecules*, 117, 831-839.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Sutherland, I. W. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 38(4), 319-328.
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712.
- Tan, R., Lyu, Y., Zeng, W., and Zhou, J. 2019. Enhancing scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii* WSH-G01 through a pH-shift strategy based on kinetic analysis. *Bioresource technology*, 293, 122098.
- Tao, Y., Zhang, L., and Cheung, P. C., 2006. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 341(13), 2261-2269.
- Tarasov, K., Yakhnenko, A., Zarubin, M., Gangapshev, A., Potekhina, N. V., Avtikh, A. N., and Kravchenko, E., 2023. *Cytobacillus pseudoceanisediminis* sp. nov., a novel facultative methylotrophic bacterium with high heavy metal resistance isolated from the deep underground saline spring. *Current Microbiology*, 80(1), 31.
- Tekin, A., Uzuner, U., and Sezen, K., 2020. Homology modeling and heterologous expression of highly alkaline subtilisin-like serine protease from *Bacillus halodurans* C-125. *Biotechnol. Lett.* 43, 479–494.
- Tong, Y., Zhou, J., Zhang, L., and Xu, P., 2021. A golden-gate based cloning toolkit to build violacein pathway libraries in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology*, 10(1), 115-124.
- Torino, M. I., Taranto, M. P., Sesma, F., and De Valdez, G. F., 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 846-852.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Slima, S. B., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., and Salah, R. B., 2017. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International journal of biological macromolecules*, 103, 194-201.
- Triyaswati, D., and Ilmi, M., 2020. Lipase-producing filamentous fungi from non-dairy creamer industrial waste. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 48(2), 167-178.
- Trombino, S., Servidio, C., Curcio, F., and Cassano, R. 2019. Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(8), 407.

- Umoren, S. A., and Solomon, M. M., 2016. Polymer characterization: polymer molecular weight determination. *Polymer Science: research advances, practical applications and educational aspects, Formatex Research Center SL, 1*, 412-419.
- Utama, G. L., Putri, S. L., Balia, R. L., Verma, D. K., and Patel, A. R., 2023. Electro-stimulation of tofu wastewater for the production of single cell protein from various microorganisms. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(7), 103679.
- Vaishnav, P., and Demain, A. L., 2011. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29(2), 223-229.
- Van De Graaf, M. J., Valianpoer, F., Fiey, G., Delattre, L., and Schulten, E. A. M., 2015. U.S. Patent Application No. 14/528,321.
- Van Dien, S., 2013. From the first drop to the first truckload: commercialization of microbial processes for renewable chemicals. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 1061-1068.
- Varol, A., Albayrak, S., Ozkan, H., Demir, Y., Taskin, M., and Adiguzel, A., 2023. Production, purification and characterization of novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus atropheus* V4. *Biologia*, 78(2), 591-600.
- Vaz, R. P., Vici, A. C., Teixeira de Moraes Polizeli, M. D. L., Magalhães, P. O., and Filho, E. X. F., 2021. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(1), 197-208.
- Vijan, V., Kaity, S., Biswas, S., Isaac, J., and Ghosh, A. 2012. Microwave assisted synthesis and characterization of acrylamide grafted gellan, application in drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 90(1), 496-506.
- Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T. and Anandapandian, K.T.K., 2011. Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Adv Biol Res*, 5: 71-76.
- Vinothkanna, A., Sathiyarayanan, G., Balaji, P., Mathivanan, K., Pugazhendhi, A., Ma, Y., ... and Thirumurugan, R., 2021. Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 174, 144-152.
- Vosough, P. R., Dovom, M. R. E., Najafi, M. B. H., Javadmanesh, A., and Mayo, B., 2022. Biodiversity of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Iranian traditional Kishk and optimization of EPS yield by *Enterococcus* spp. *Food Bioscience*, 49, 101869.
- Wang, J., Salem, D. R., and Sani, R. K. 2021. Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New Biotechnology*, 61, 29-39.
- Wang, J., Salem, D. R., and Sani, R. K. 2021. Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New Biotechnology*, 61, 29-39.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. and Yang, Z., 2015. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr Polym*, 125: 16-25.
- Wang, K., Niu, M., Yao, D., Zhao, J., Wu, Y., Lu, B., and Zheng, X., 2019. Physicochemical characteristics and in vitro and in vivo antioxidant activity of a cell-bound

- exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* S1. *International journal of biological macromolecules*, 139, 252-261.
- Wang, L. C., Pan, T. M., and Tsai, T. Y., 2018. Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *journal of food and drug analysis*, 26(3), 973-984.
- Wang, L., Wang, X., Wu, H., and Liu, R., 2014. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*, 12(9), 4984-5020.
- Wang, P., Zhong, Z., Zhou, J., Cai, T., and Zhu, J., 2008. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. *Archives of microbiology*, 189, 525-530.
- Wang, R., Chen, P., Jia, F., *et al.*, 2012. Optimization of polysaccharides from *Panax japonicus* CA Meyer by RSM and its anti-oxidant activity. *Int J Biol Macromol*, 50(2):331–336.
- Wang, Z., Sun, Q., Fang, J., Wang, C., Wang, D., and Li, M., 2022. The anti-aging activity of *Lycium barbarum* polysaccharide extracted by yeast fermentation: In vivo and in vitro studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 2032-2041.
- Wang, Z., Wu, J., Zhu, L., and Zhan, X. 2016. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. *Bioresource Technology*, 211, 390-397.
- Wang, Z., Xie, J., Shen, M., Nie, S., and Xie, M., 2018. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 147-157.
- Wani, S. M., Mir, S. A., Khanday, F. A., and Masoodi, F. A. 2021. Advances in pullulan
- Wan-Loy, C., and Siew-Moi, P., 2016. Marine algae as a potential source for anti-obesity agents. *Marine drugs*, 14(12), 222.
- Whitney, J. C., and Howell, P. L. 2013. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, 21(2), 63-72.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., and Malek, K., 2017. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317–335.
- Wierckx, N., Agrimi, G., Lübeck, P. S., Steiger, M. G., Mira, N. P., and Punt, P. J., 2020. Metabolic specialization in itaconic acid production: a tale of two fungi. *Current opinion in biotechnology*, 62, 153-159.
- Wolfe, M.S., 2009. Intramembrane-cleaving proteases. *The journal of biological chemistry*, 284(21), 13969-13973.
- Wu, C. C., Li, H., Yin, Z. W., Zhang, H. T., Gao, M. J., Zhu, L., and Zhan, X. B., 2022. Isolation, purification, and characterization of novel melanin from the submerged fermentation of *Rhizobium radiobacter*. *Process Biochemistry*, 121, 263-275.
- Wu, S., Liu, Y., Jiang, P., Xu, Y., Zheng, W., Song, S., and Ai, C., 2020. Effect of sulfate group on sulfated polysaccharides-induced improvement of metabolic syndrome and gut microbiota dysbiosis in high fat diet-fed mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2062-2072.

- Xu, W., Zhang, F., Luo, Y., Ma, L., Kou, X., and Huang, K., 2009. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydrate research*, 344(2), 217-222.
- Xu, X., Chu, X., Du, B., Huang, C., Xie, C., Zhang, Z., and Jiang, L., 2022. Functional characterization of a novel violacein biosynthesis operon from *Janthinobacterium* sp. B9-8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8), 2903-2916.
- Xu, X., Long, Y., Li, Q., Li, D., Mao, D., Chen, X., and Chen, Y. 2019. Modified cellulose membrane with good durability for effective oil-in-water emulsion treatment. *Journal of Cleaner Production*, 211, 1463-1470.
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., ... and Lü, X., 2019. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475-499.
- Xu, Z., Chen, G., Xue, L., Zhang, H., Wang, J., Xiang, H., ... and Zheng, K., 2019. Isolation, structural characterizations and bioactivities of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis*. *International journal of biological macromolecules*, 141, 298-306.
- Yadav, M., Kumar, T., Kanakan, A., Maurya, R., Pandey, R., and Chauhan, N. S., 2022. Isolation and characterization of human intestinal bacteria *Cytobacillus oceanisediminis* NB2 for probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*, 13, 932795.
- Yan, Y., Liu, X., Jiang, X., Zhang, W., Wang, Y., Wang, Y., ... and Tu, T., 2022. Surface charge modifications modulate glucose oxidase pH-activity profiles for efficient gluconic acid production. *Journal of Cleaner Production*, 372, 133817.
- Yang, M., Zhou, D., Xiao, H., Fu, X., Kong, Q., Zhu, C., ... and Mou, H., 2022. Marine-derived uronic acid-containing polysaccharides: Structures, sources, production, and nutritional functions. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 1-12.
- Yang, W., Zhao, P., Li, X., Guo, L., and Gao, W., 2022. The potential roles of natural plant polysaccharides in inflammatory bowel disease: A review. *Carbohydrate polymers*, 277, 118821.
- Yang, Y., Jiang, G., and Tian, Y., 2023. Biological activities and applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(6), 155.
- Yang, Y., Zhong, W., Liu, Z., Xue, X., Gao, Q., Wang, D., ... and Zhang, J., 2023. Isolation and identification of a *Cytobacillus oceanisediminis* strain with ochratoxin A detoxification ability. *Food Control*, 151, 109797.
- Yang, Y., Zhong, W., Liu, Z., Xue, X., Gao, Q., Wang, D., ... and Zhang, J., 2023. Isolation and identification of a *Cytobacillus oceanisediminis* strain with ochratoxin A detoxification ability. *Food Control*, 151, 109797.
- Yang, Z., Wang, H., Liu, N., Zhao, K., Shen, Y., Pang, H., ... and Li, S., 2022. Algal polysaccharides and derivatives as potential therapeutics for obesity and related metabolic diseases. *Food & Function*.
- Yarley, O. P. N., Kojo, A. B., Zhou, C., Yu, X., Gideon, A., Kwadwo, H. H., and Richard, O., 2021. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 183, 2262-2271.
- Yavari, B., Mahjub, R., Saidijam, M., Raigani, M., and Soleimani, M., 2018. The potential use of peptides in cancer treatment. *Current Protein and Peptide Science*, 19(8), 759-770.

- Ye, S., Zhang, J., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., and Li, Y. O., 2016. Biosynthesis of selenium rich exopolysaccharide (Se-EPS) by *Pseudomonas* PT-8 and characterization of its antioxidant activities. *Carbohydrate polymers*, 142, 230-239.
- Yildiz, H., and Karatas, N. 2018. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41-46.
- Yin, X., Li, J., Shin, H., Du, G., Liu, L., and Chen, J., 2015. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnology Advances*, 33(6), 830-841.
- Yunus, F. U. N., Nadeem, M., and Rashid, F., 2015. Single-cell protein production through microbial conversion of lignocellulosic residue (wheat bran) for animal feed. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4), 553-557.
- Zaid, A. N., and Al Ramahi, R., 2019. Depigmentation and anti-aging treatment by natural molecules. *Current pharmaceutical design*, 25(20), 2292-2312.
- Zarour, K., Llamas, M. G., Prieto, A., Ruas-Madiedo, P., Dueñas, M. T., de Palencia, P. F., ... and López, P., 2017. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 174, 646-657.
- Zhang, Y. H. P., and Lynd, L. R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 797-824.
- Zong, A., Cao, H., and Wang, F., 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1395-1410.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Şeyda ALBAYRAK
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi /Erzurum
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta