



***LACTOBACILLUS PENTOSUS* KS27’NİN
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ VE ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Fevzi BEKAR

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Mühendisliği

Ana Bilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU

2022

(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**LACTOBACILLUS PENTOSUS KS27’NİN EKZOPOLİSAKARİT ÜRETİMİ VE
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

(Exopolysaccharide Production of *Lactobacillus pentosus* KS27 and Optimization of
Production Conditions)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fevzi BEKAR

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU

Bayburt
Ocak, 2022

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Lactobacillus pentosus* KS27’nin Ekzopolisakkarit Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Fevzi BEKAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süreci boyunca karşılaştığım bütün problemlerde çözüme yönlendiren, akademik gelişimimde büyük pay sahibi olan, çalışmam sürecinde elde ettiğim sonuçların yorumlanmasında yardımcı olan, değerli vaktini bıkmadan ve yorulmadan benim için harcayan, laboratuvar çalışmalarında bütün imkanlarını önüme sunan ve yardımını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim sürecinde büyük pay sahibi olan ve bugün sahip olduğum bilgi ve birikimimi borçlu bulunduğum ve desteklerini her zaman hissettiğim başta kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Ümmügülsüm ERDOĞAN'a, sayın Prof. Dr. Vecihi AKSAKAL, sayın Doç. Dr. Enes DERTLİ ve sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Hakkı KARAKAŞ hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Canım anneme babama, hayatımın her safhasında bütün sorunlarımda yardımını esirgemeyen, engin tecrübeleriyle beni yönlendiren, desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, maddi ve manevi yönden asla yalnız bırakmayan, bugün olduğum kişi olmamda en büyük pay sahibi olan değerli ağabeyim Arş. Gör. Özgür Aydın BEKAR ve Ali BEKAR'a, kıymetli ablalarım Güllü BAŞTÜRK, Elif KUFACI ve Gülhan KAHYAOĞLU'na teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan birlikte yıllarımı geçirdiğim ve birbirimize her anlamda destekte bulunduğumuz değerli dostlarım Gıda Mühendisi Erdem KABAN ve Gıda Mühendisi Esra ARSLAN ve yüksek lisans süreci boyunca tecrübe ve bilgilerimizi paylaştığımız, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Gıda Yüksek Mühendisi Habibe MEMİŞ'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LACTOBACILLUS PENTOSUS KS27’NİN EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ VE ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Fevzi BEKAR

Ocak 2022, 55 sayfa

Bu çalışma ile *Lactobacillus pentosus* KS27’nin, ortam sıcaklığı, inkübasyon süresi ve besiyeri bileşimine bağlı olarak ekzopolisakkarit (EPS) üretimi ve bu şartların optimum koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimum şartlara bağlı olarak üretilen ekzopolisakkaritin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada ortam sıcaklığı için 3 ayrı koşul (25°C-35°C-45°C) belirlenmiş, besiyeri olarak gliserol ve sükroz kullanılmış, gelişim süresi olarak ise yine 3 farklı süre (24-36-48 saat) belirlenmiştir. Belirlenen değişkenlere göre Box-Behnken deney matrisi ile 27 farklı EPS üretim denemesi belirlenmiştir. Bu denemelerde en yüksek verim 25°C’de 36 saatlik inkübasyon sonucunda alınmıştır. Karbon kaynağı olarak %7,5 sükroz konsantrasyonu ve %7,5 gliserol konsantrasyonu kullanılmış ve 1913,75 mg/L EPS elde edilmiştir. Denemelerde en düşük verim ise 25°C, 36 saat inkübasyon süresine sahip olan ve %7,5 sükroz konsantrasyonu %0 gliserol konsantrasyonu bulunan deneme olmuştur. Bu denemede elde edilen EPS miktarı 213,75 mg/L olmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda optimum nokta belirlenmeye çalışılmış ve istenirlilik derecesi 1 olan 100 koşuldan en yüksek verim elde etme amacıyla sükroz konsantrasyonunun %5,31, gliserol konsantrasyonunun %10,92 sıcaklığın 26°C ve inkübasyon süresinin 46,14 saat olduğu koşul ile üretim yapıldığında 2158 mg/L EPS üretimi gerçekleşeceği verisine ulaşılmıştır. Belirtilen koşullarda üretim gerçekleştirildiğinde 2178 mg/L EPS üretimi sağlanmıştır. Optimum koşullarda üretilen EPS’nin çözünürlüğünün en yüksek su ile (%98 ± 0,01) sağlandığı belirlenirken, su bağlama kapasitesi de %1970 ± 0,01 gibi yüksek bir değer bulunmuş ve ortak EPS özelliklerine uyum göstermiştir. Diferansiyel Tarama Kalorimetre analizinde 250°C civarına kadar kademeli bozulma ve 400°C’ye kadar yavaş bir bozulma görülmüştür. FTIR analizi ile 3289 ve 517 cm⁻¹ arasında pik değerleri alınmış ve fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. NMR spektrumu incelendiğinde, pik varlıkları üç ayrı bölge ile tanımlanarak EPS’lerin yapısına uygun heterojen yapı çözümlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekzopolisakkarit, Box-Behnken, sükroz, gliserol.

ABTRACT

MASTER THESIS

EXOPOLISACCARIDE PRODUCTION of *LACTOBACILLUS PENTOSUS* KS27 and OPTIMIZATION of PRODUCTION CONDITIONS

Fevzi BEKAR

January 2022, 55 pages

In this study, it was aimed to determine the exopolysaccharide (EPS) production of *Lactobacillus pentosus* KS27 depending on the temperature, incubation time and medium composition and to determine the optimum conditions of these conditions. The characterization of the exopolysaccharide produced under optimum conditions was carried out. In the study 3 different time conditions (25°C-25°C-45°C) were determined for the temperature, glycerol and sucrose were used as the medium and 3 different periods (24-36-48 hours) were determined. According to the determined variables, 27 different EPS production trials were determined with the Box-Behnken experiment matrix. In these experiments, the highest yield was obtained as a result of 36 hours incubation at 25°C. %7,5 sucrose concentration and %7,5 glycerol concentration were used as carbon sources and 1913,75 mg/L EPS was obtained. The amount of EPS obtained in this trial was 213,75 mg/L. According to the obtained data, the optimum point was tried to be determined and the production of 2158 mg/L EPS was estimated when production was carried out with the condition that the sucrose concentration was %5,31, the glycerol concentration was %10,92, the temperature was 25°C and the incubation period was 46,14 hours for the highest yield from 100 conditions with an expectation degree of 1. When production was carried out under the specified conditions, 2178 mg/L EPS production was achieved. It was determined that the solubility of EPS produced under optimal conditions was achieved with the highest water content ($98 \pm 0,01$), while the water binding capacity was also found to be as high as $1970 \pm 0,01$ and showed compliance with common EPS characteristics. The Differential Scanning Calorimeter analysis showed a gradual deterioration of to 250°C and a slow deterioration of up to 400°C. With the FTIR analysis peak values between 3289 and 517 cm^{-1} were deciphered and functional groups were determined. When the NMR spectrum was examined, the heterogeneous structure suitable for the structure of EPS was analyzed by defining the peak entities with three separate regions.

Keywords: Exopolysaccharide, Box-Behnken, sucrose, glycerol.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZ.....	iii
ABTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş	1
-------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

Kaynak özetleri	3
Polisakkaritler.....	3
Mikrobiyal polisakkaritler.	4
Ekzopolisakkaritler.....	5
Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve sınıflandırılması.....	7
Homopolisakkaritler.	8
Heteropolisakkaritler.	10
Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi.....	11
Laktik Asit Bakterilerinin Ürettikleri ve Diğer Bazı Önemli Ekzopolisakkaritler	14
Dekstran.....	14
Levan.	14
İnülin türleri.....	14
Alternan.	15
Reuteran.....	15
Alginat.	15
Ksantan.	15
Ekzopolisakkaritlerin Kullanıldığı Alanlar	16
Ekzopolisakkarit Üretimini Etkileyen Faktörler	17

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem	24
Materyal	24
Kullanılan besiyeri.....	24
Bakterilerin muhafazası.....	24
Kullanılan çözelti, besi yerleri ve malzemelerin sterilizasyonu.	24

Yöntem.....	24
EPS üretimi.....	24
DNS yöntemi ile EPS’lerde toplam şeker analizi.....	25
Deneme planı.....	26
EPS üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi.....	28
Çözünürlük değerinin belirlenmesi.....	29
Yağ / su alma kapasitesinin belirlenmesi.....	29
Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	29
Differansiyel tarama kalorimetre (DTK) analizi.....	29
Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi.....	30
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme aktivitesinin tayini.....	30
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	
Araştırma Bulguları ve Tartışma	31
Modelin Doğrulanması.....	36
Optimum Noktanın Belirlenmesi	37
Çözünürlük Değerinin Belirlenmesi.....	38
Yağ Bağlama / Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi	38
Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	39
Differansiyel Tarama Kalorimetre (DTK) Analizi.....	40
1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikali Süpürme Aktivitesinin Tayini	42
Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi.....	42
BEŞİNCİ BÖLÜM	
Sonuçlar	44
Kaynakça	45
ÖZGEÇMİŞ	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>EPS Üretebilen Laktik Asit Bakterileri</i>	6
Tablo 2. <i>Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bazı Homopolisakkaritler.</i>	8
Tablo 3. <i>Gıdalarda Kullanılan EPS' lerin Özellikleri ve Uygulama Alanları.</i>	16
Tablo 4. <i>Bağımsız Değişkenlerin Alt ve Üst Sınır Değerleri</i>	27
Tablo 5. <i>Box-Behnken Deney Tasarımı.</i>	27
Tablo 6. <i>Box-Behnken Deney Matrisi ile Elde Edilen Sonuçlar</i>	31
Tablo 7. <i>EPS Üretim Miktarına Ait YYY Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi.</i>	33
Tablo 8. <i>Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalardaki Üretilen EPS'lerde DTK Analiz Sonuçları.</i>	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Glukanların yapısı.....	9
Şekil 2. Fruktanların yapısı (A. Levan, B. İnülin tipi fruktan).	10
Şekil 3. Laktoz, galaktoz ve glukozun EPS'ye ve LAB'de glikolize dönüşümünün genel diyagramı.	13
Şekil 4. Glikoz standardı eğrisi.	26
Şekil 5. Sükroz konsantrasyonu, gliserol konsantrasyonu, sıcaklık ve sürenin EPS üretimi üzerine etkisini gösteren 3D plot ve kontür grafikleri.	36
Şekil 6. Optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu.	37
Şekil 7. 400-4000 cm ⁻¹ aralığında, sentezlenen EPS'nin FTIR spektrum görüntüsü.	40
Şekil 8. <i>L. pentosus</i> KS27 suşuna ait EPS'nin DTK analiz görüntüsü.	42
Şekil 9. <i>L. pentosus</i> KS27'den elde edilen EPS'e ait NMR spektrumu.	43

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

NH₄Cl	: Amonyum Klorür
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum Sülfat
dak	: Dakika
Da	: Dalton
(NH₄)₂HPO₄	: DiamonyumHidrojen Fosfat
DPPH	: Difenilpikrilhidrazil
DTK	: Diferansiyel Tarama Kalorimetre
DNS	: Dinitro Salisilikasit
EPS	: Ekzopolisakkarit
FDA	: Food and Drug Administration
FTIR	: Foruier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
FDP	: Fruktoz Di Fosfat
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
GRAS	: Generally Recognized as Safe
g	: Gram
HePS	: Heteropolisakkarit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HoPS	: Homopolisakkarit
CPS	: Kapsül Polisakkarit
C	: Karbon
kDA	: Kilo Dalton
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
LPS	: Lipopolisakkaritler
L	: Litre
MHz	: Megahertz
m	: Metre
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
NIR	: Near-infrared
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ppm	: Parts Per Million
KOH	: Potasyum Hidroksit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
rpm	: Revolution Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
°C	: Santigrat Derece
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCl	: Sodyum Klorür
NaNO₃	: Sodyum Nitrat
SI	: Uluslararası birim sistemi
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Biyoteknolojik gelişmelerin hızla devam ettiği son yıllarda, işlenmiş gıda üretiminde üretilen gıdanın tekstürel özelliklerinin korunması, gıdaların kendilerine özgü duyuşal özelliklerinin devamlılığının sağlanması ve son ürünün raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan katkı maddeleri için biyoteknolojinin en çok başvurulmuş alan olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmaktadır (Borlaug 2000, McGloughlin 1999).

Biyoteknolojinin gelişim göstermesiyle ön plana çıkan bakteriler incelendiğinde ise laktik asit bakterilerinin isimleri ilk sıralarda görülmektedir (Ghaffar vd. 2014).

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten, Gram pozitif, genellikle katalaz negatif ve birkaç suş haricinde hareketsiz, yüksek asit toleranslarından dolayı pH 5 ve altında yaşayabilen ve cinslerine bağlı olarak 20-45°C sıcaklıklar arasında optimal gelişim gösterebilen bakterilerdir (Hofvendahl, & Hahn-Hägerdal 2000).

LAB'leri karbon kaynağı olarak kullandığı glukozu 2 farklı şekilde katabolize etmektedirler. Homofermentatif olarak glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak laktik asit üretmektedirler. Ayrıca ortamda farklı karbon kaynaklarının da bulunmasıyla laktik asit haricinde formik asit, asetik asit ve etanol de üretebilmektedirler. Heterofermentatif olarak ise Hegzos Mono Fosfat yolu ile de glukozu parçalayarak fermantasyon sonucunda laktik asit, etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluşturmaktadırlar (Özden 2005, Erbil 2012, Geçer, & Akgün 2006, Oral, 2015).

İnsanlar yüzyıllardan beri farkında olmadan da olsa ikincil ve ileri gıdalar üretiminde bu mikroorganizmaları kullanmaktadırlar. Genel olarak aynı yöntemi ve prosesleri kullansalar da biyoteknolojide yaşanan gelişmeler, bu ürünlerin bilinçli üretimini ve kullanımını getirmektedir. Beyaz biyoteknoloji olarak adlandırılan bu gelişme sonrasında yeni ürünler geliştirilmiş ve bunların devamlılığı sağlanmıştır (Akkaya, & Pazarlıoğlu 2012). Geleneksel yöntem olarak kabul edilen, bilgiyi bir sonraki nesile aktarma yolu ile kazanılan üretim tekniklerine bağlı olarak üretilen fermente gıdaların, fermantasyon aşaması esnasında ve sonrasında tat, aroma ve özgül tekstürün oluşmasında laktik asit bakterileri, gıda içeriğinde bulunan karbonhidratları fermente ederek laktik asit üretirler. Bunlara ek olarak besin ortamı bakımından zengin olan gıdalarda ise laktik asit bakterileri çeşitli organik asitler, hidrojen

peroksit, bakteriyosin veya ekzopolisakkarit gibi çeşitli fermantasyon ürünleri de üretebilmektedir (Dinçer vd. 2010). Bunların yanı sıra, ekzopolisakkaritler (EPS) de bu bakterilerin gelişimleri esnasında ürettikleri fermantasyon ve teknolojik gıda üretiminde kullanılan metabolitlerdir (Narayanan vd. 2004, Yılmaz 2014).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bu metabolitler tek tip şeker monomerlerinden oluşan homopolisakkaritler veya birden fazla ve farklı tip şekerlerden oluşan heteropolisakkaritler şeklinde oluşabilmektedir. LAB'ların bu yetenekleri suşa ve büyüme ortamına göre çok fazla değişiklik göstermekte ve özellikle düşük inkübasyon sıcaklıklarında EPS üretimlerinin fazla olduğu görülmektedir (Broadbent vd. 2001).

Biyoteknolojik yöntemler ile elde edilen polisakkaritler, bitki ve hayvan kaynaklı polisakkaritlere göre, üretim parametreleri üzerinde değişiklik yapma imkânı ve üretilen polisakkaritin standardizasyonu açısından daha avantajlı durumdadır. Kısa sürelerde elde edilebilir olması, kalite ve verim açısından ise büyük avantaja sahip olması nedeniyle ayrı bir önem taşımaktadır. Bakteriler ve mantarlar tarafından hücre içi veya hücre dışı yöntemlerle üretilmektedirler. Çeşit ve miktar bakımından ise en iyi üretici konumunda laktik asit bakterileri bulunmaktadır (Yılmaz, & Çelik 2007, Singha 2012, Donot vd. 2012).

Ekzopolisakkaritlerin, gıda ürünlerinde prebiyotik etki gösterme, viskoziteyi arttırmada olumlu etki, su bağlama özelliği, stabilize ve emülsiye etme özelliği, fermente ürünlerin kendine has olan tat ve aromasının oluşumunda fayda sağlama ve gıdanın tekstürel özelliklerinde iyileştirilme gibi faydalı etkileri bulunmaktadır. EPS'ler üretildikleri hücreyi dış etmenlerden korurken, hücrenin kurumasına da engel olmaktadır. Bunula birlikte genetik bilginin korunması, protein, fosfat gibi moleküllerin depolanması ayrıca antibakteriyel etkenler ve ağır metallere karşı da koruma görevi üstlenmektedirler (Bhaskar, & Bhosle 2005, Singh vd. 2011).

Bu çalışmanın amacı geleneksel fermente bir et ürünü olan sucuktan izole edilen *Lactobacillus pentosus* KS27'nin EPS üretiminin optimizasyonu sağlanarak elde edilen EPS'nin karakterizasyonunu gerçekleştirmektir.

İKİNCİ BÖLÜM

Kaynak özetleri

Polisakkaritler

Polisakkaritler yüksek molekül ağırlıklarıyla karbonhidratların büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Asit ve spesifik enzimlerle hidrolize edildiklerinde monosakkaritleri ve bunların çeşitli türevlerini vermektedirler. Polisakkaritlerin, molekül ağırlığı bakımından ve yapısal anlamda birçok çeşidi bulunmaktadır. Bir kısmı düz zincir yapıda iken diğer bir kısmı ise dallı-polimerler şeklindedir (Yılmaz, & Çelik 2007, Ergene, & Avcı 2016). Monosakkarit olarak polisakkaritlerin yapısında D-ksiloz, D-fruktoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-arabinoz ve L-galaktoz bulunurken en yaygın olarak ise D-glukoz bulunmaktadır. Bu monosakkaritlerin türevleri olarak ise D-glukozamin, D-galaktozamin, D-glukuronik asit, N-asetil muramik asit ve N-asetil neuramik asit bulunmaktadır. Polisakkaritlerde bulunan bu monosakkarit ve türevleri glikozidik bağlarla bağlanmış olarak bulunmaktadır (Pigman, & Horton 1957).

Polisakkaritler genel anlamda iki guruba ayrılmaktadırlar. Bunlar bir monosakkarit ve türevlerinden oluşmakta ise homopolisakkariler ismini alırken, farklı monosakkarit ve türevlerinden oluşmakta ise heteropolisakkaritler ismi verilmektedir. Homopolisakkarit olarak nişasta, glikojen, dekstran, selüloz, inülin ve kitin, heteropolisakkarit olarak ise hiyaluronik asit, kondrotin sülfatlar, heparin, kan gurubu polisakkaritleri, pektin ve alginik asitler örnek olabilmektedirler (Varki vd. 2015).

Polisakkaritlerin bir diğer adlandırılma yöntemi ise içerdikleri monosakkaritlere göre değişiklik göstermektedir. Buna örnek olarak ise glukoz birimlerinden oluşan nişasta ve glikojen glukanlar, mannoz birimlerinden oluşanlara ise mannanlar isminin verilmesi görülmektedir (Korolenko vd. 2019, Gökalp vd. 1992).

Endüstriyel olarak üretilmiş gıdalarda içerik olarak bitki, hayvan ve mikrobiyel kaynaklı polimerler büyük önem arz etmektedirler. Özellikle tekstür oluşumunda suda çözünmüş veya dispers yapıda kalarak katkıda bulunan yüksek molekül ağırlıklı ve uzun zincirli yapıda bulunan bu polimerler gıdaların spesifik özelliklerinin büyük bir bölümünden sorumludurlar. Bu biyopolimerlerden sıkça kullanılanları ise bitkilerden elde edilen nişasta, pektin, keçi boynuzu gamı, guar gamı, alglerden karragenan ve alginat, hayvansal proteinli hidrokolloid olarak ise kazeinat ve jelatin olarak sıralanabilmektedir. Bunlar arasında bitkisel olarak elde edilen

karbonhidratların fonksiyonel özellikleri ve yapısal karakteristikleri tam olarak belirlenmiş ve gıda ürünlerine modifiye edilmiştir. Bu sebeple bu ürünlerin Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı belirli şartlara bağlanmış ve kısıtlanmıştır. Bu ürünler kullanıldığı taktirde etiketlerinde E-numarası bulunması zorunlu kılınmıştır. Bunlara alternatif olarak ise mikrobiyal polisakkaritler üretilmiştir. Bio kıvamlaştırıcılar bunlardan birisi olarak gösterilebilmektedir (De Vuyst vd. 2001).

Mikrobiyal polisakkaritler.

Mikrobiyal polisakkaritler iyonik veya iyonik olmayan ve suda çözünebilen, glikozidik bağlar ile bağlanmış, düzenli, dallanmış veya dallanmamış yapıdaki biyopolimerlerdir (Suresh Kumar vd. 2007).

19. yüzyıl ortalarında Louis Pasteur şarapta bulunan dekstranı, mikrobiyal anlamda kullanılan ilk polisakkarit olarak keşfetmiştir. Dekstranın *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen bir mikrobiyal polisakkarit olduğu ise Van Tiegham tarafından keşfedilmiştir. 1883 yılında ise yüksek moleküler kütleye sahip olan aljinat Edward Stanford tarafından keşfedilmiştir. Bu keşfi takiben 1886 yılında selülozun bir bakteri tarafından üretilbildiğinin ispatlanması takip etmiştir. Bundan kısa bir süre sonra ise ilk hücre içi depo polimer keşfedilmiştir. Siyonabakterlerin bu depo polimerleri ürettiğinin anlaşılmasından 40 yıl sonra ise *Bacillus megaterium* tarafından polihidroksibutiratın üretilmesi takip etmiştir. Bu keşifleri takiben yirminci yüzyıl ortalarına kadar keşifler hızlanmış ve bu süreç içerisinde de alginat, ksantan ve polifosfat gibi diğer bakteriyel polimerler keşfedilmiştir. Bilim dünyasına kazandırılan bu biyopolimerlerin incelenmesinden sonra biyosentez enzimlerinin aktiviteleri tanımlanmış ve öncü maddeler kullanılarak biyopolimer üretimi için farklı yollar denenerek keşiflere yön verilmiştir (Novak, & Vetricka 2008, d' Ayala vd. 2008, Ulvskov, & Harholt 2018, Rehm 2010).

Gıdalarda kullanımına ilk izin verilen mikrobiyal polisakkarit ise *Xanthomonas campestris* tarafından üretilen ksantan olarak bilinmektedir. 1969 yılında ksantan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımına izin verilen ilk mikrobiyal polisakkarit olarak tarihteki yerini almaktadır (De Vuyst, & Degeest 1999).

Uluslararası düzeyde mikrobiyal polisakkaritlerin gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılması sabit kurallar içermemektedir. Gıdanın nerede üretildiği ve nerede satılacağı bu anlamda büyük önem arz etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ksantan gam, jellan gam, kurdlan ve pullulan GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilen) listesinde yer almaktadır. Ayrıca bu dört gıda katkı maddesi Kore Gıda Katkıları Kodu ve Codex Alimentarius Genel

Standartları'nda da izin verilen gıda katkı maddeleri listesinde yer almaktadır. Bu gıda katkı maddelerinden ksantan, gellan ve pullulan gamlarına ise Avrupa Birliği ülkelerinde izin verilmekteyken Kanada, Avusturalya ve Yeni Zelanda'da ise sadece ksantan ve gellan gamlarının kullanımına izin verilmektedir. Japonya gıda yönetmelikleri ise bunlara ek olarak makrofomopsis, rhamsan, sklero ve welan gamlarının kullanılmasına da izin vermektedir (Jani vd. 2009, Auld 2010, Pettitt 2020, Kandil vd. 2017).

Mikrobiyal türlerin ve özellikle prokaryotların polisakkarit üretim yetenekleri bulunmaktadır. Çok sayıda bakteri polisakkarit üretim yeteneğine sahiptir ancak bunların az bir kısmı ticari olarak üretilmektedir. Öncelikle bu bakterilerin (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) patojen olması bu durumu olumsuz yönde etkilemektedir Endüstriyel olarak piyasada EPS üretiminde şu anda *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes* cinslerine ait suşlar kullanılmaktadır (Sutherland 2001, Béjar vd. 1998, Dağbağlı, & Göksungur 2013, Akepaer vd. 2015).

Ekzopolisakkaritler.

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen ve GRAS olarak kabul edilen ekzopolisakkaritlere son yıllarda endüstriyel anlamda ilginin arttığı görülmektedir (De Vuyst, & Marshall 2001). Ekzopolisakkarit ismi ise ilk olarak 1972 yılında Sutherland tarafından önerilmiş ve bilim dünyasına kazandırılmıştır (Welman, & Maddox 2003).

Ekzopolisakkaritler genel tanımıyla mikroorganizmalar tarafından hücre içi, hücre duvarı ve hücre dışına sentezlenen ve doğal polimer metabolitler olarak bilinmektedirler (Milci, & Yaygın 2005). Mikrobiyal polisakkaritler; intraselüler polisakkaritler, lipopolisakkaritler ve EPS olarak adlandırılan ekstraselüler polisakkaritler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. EPS'ler arke, bakteri ve ökaryotların farklı türleri tarafından üretilmektedir (Soyuçok vd. 2016, Yılmaz, & Çelik 2007). Bakteriyel olarak besiyeri ortamında üretimi mümkün olan EPS'ler genellikle katı besi yerinde mukoid koloni olarak belirirken, sıvı besi yerinde ise viskoz bir görüntü almaktadırlar. Özelliği, miktarı ve yapısal özellikleri ise bulunduğu ortamın karbon formuna göre değişiklik göstermektedir. Hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan polisakkaritler, kapsül polisakkaritler (CPS), hücre duvarı bileşeni olarak lipopolisakkaritler (LPS), hücre dışına kovalent olmayan bağlarla gevşek şekilde bağlanmış veya hücre dışı ortamına sentezlenen polisakkaritler (LAM) olarak adlandırılmaktadırlar (Yılmaz, & Çelik 2007, Levander vd. 2002, Mozzi vd. 2006). Üretilen bu EPS'lerden CPS ve LPS'nin tıp ve sağlık

alanında kullanımı yaygınken LAM ise kendisine gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadır (Barcelos vd. 2020, Sengupta, & Dey 2019).

LAB'lerinden üretilen EPS'ler kimyasal kompozisyonlarına göre ise iki grupta toplanmaktadır. Bunlardan biri genellikle tek tip monosakkarit olan glikoz ve fruktoz içeren glukan ve fruktan olarak adlandırılan tek şekerli homopolisakkaritler iken diğeri ise farklı monosakkaritlerin yapısal olarak birbirini tekrarlar şekilde bulunduğu ve çoklu monomer yapılardan oluşan polimer yapıdaki heteropolisakkaritler olarak bilinmektedirler (Ergene, & Avcı 2016, Dağbağlı, & Göksungur 2013, Sayiner 2016). Heteropolisakkaritlerin bu çeşitsel farklılığı, laktik asit bakterilerinin üreme ortamlarına, moleköl ağırlıklarına, fonksiyonel özelliklerine, inokülasyon şartlarına, ortam pH'sına ve ortam sıcaklıklarına göre değişiklik göstermektedir (Degeest, & De Vuyst 1999). Ekzopolisakkarit üretebilen laktik asit bakterileri Tablo 1. de gösterilmiştir (Pektaş 2014).

Tablo 1. *EPS Üretebilen Laktik Asit Bakterileri*

<i>Lactobacillus</i> cinsi	<i>Streptococcus</i> cinsi	<i>Lactococcus</i> cinsi	<i>Leuconostoc</i> cinsi
<i>L. hilgardii</i>	<i>S. mutans</i>	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	<i>Leu.mesentereoides ssp. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>L. lactis ssp. cremoris</i>	<i>Leu. Mesentereoides ssp. mesentereoides</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i>		<i>Leu.mesentereoides NRRL B-640</i>
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>S. mutans 6715</i>		<i>Leu.mesentereoides B-742</i>
<i>L. reuteri strain LB 121</i>	<i>S. salivarius</i>		<i>Leu.mesentereoides B-1355</i>
<i>L. reuteri ATCC 55730</i>	<i>S. mutans JC2</i>		<i>Leu.mesentereoides B-1299</i>
<i>L. reuteri strain 35-5</i>			<i>Leu.mesentereoides NRRL B-1355</i>
<i>L. sanfanciscensis LTH-2590</i>			<i>Leu.mesentereoides NRRL B-1501</i>
<i>L. johnsonii NCC 533</i>			<i>Leu.mesentereoides NRRL B-1498</i>
<i>L. reuteri 121</i>			<i>Leu.mesentereoides</i>
<i>L. kefiranafaciens</i>			
<i>L. kefirgranum</i>			
<i>L. parakefir</i>			

EPS' ler için gıda sanayisi, tekstil, madencilik, endüstriyel atık arıtma, ilaç üretimi, kozmetik, tıp ve petrol arıtma gibi farklı kullanım alanları bulmaktadır (Freitas vd. 2011). Endüstride kullanılan bu EPS'leri üreten LAB'leri genellikle fermente süt ürünleri, sucuk, sosis ve ekşi hamur gibi fermente ürünlerden izole edilmektedirler (Ruas-Madiedo, & De Los Reyes-Gavilán 2005).

EPS' nin üreticisi konumundaki laktik asit bakterileri genellikle probiyotik özellik taşımaktadır (Tükenmez, & Aslım 2018). Fermente ürünlerin sağlık üzerine olumlu etkileri üzerinde laktik asit bakterilerinin ürettiği ekzopolisakkaritlerin de rolü olduğu düşünülmektedir (Yılmaz, & Çelik 2007). Fermente gıdaların sindirimi esnasında sürenin uzun olmasının ve bu esnada da probiyotik bakterilerin bağırsak yüzeyine kolonize olması ve bağırsak florasının düzenlenmesinde de yine hücre yüzeyine salgılanan EPS'lerin önemli olduğu bildirilmektedir (Yıldıran vd. 2017, Doğan 2017, Yıldırım, & Osmanağaoğlu 2007, Türköz, & Akpınar 2019).

Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve sınıflandırılması.

Ekzopolisakkaritler üretildikleri mikroorganizma tarafından kendini koruma amaçlı üretilmesinden kaynaklanan, gücünü bulunduğu doğal ortamda koruyarak yapısal anlamda karakteristiğini bozmayan metabolitlerdir. Bu nedenle ekzopolisakkaritler bulunduğu ortamın şartlarına uyum ve elde edilen verim konusunda önemli bir role sahiptirler. Sahip olduğu bu özellik sadece üretildiği hücreyi çevresel etmenlerden korumakla sınırlı olmadığı da bilinmektedir. Mikroorganizmayı kurumaya karşı korurken aynı zamanda difüzyon özelliği kazandırarak hem hücre içine girişte hem de hücre dışına çıkışta ekstra özellikler kazandırmaktadır. Bunun en büyük örneği olarak ise polimer matriks içinde bulunan hücrelerin antibiyotiklere karşı direnç sağladığı gösterilebilmektedir. Buna ek olarak anyonik ekzopolisakkaritler toksik metal iyonlarına da bağlanarak hücre içine girmelerine de engel olmaktadır (Suresh Kumar vd. 2007).

Patojen bakteriler ve patojen olmayan bakterilerin ekzopolisakkarit üretimleri kıyaslandığında ise patojen bakterilerde kapsül formunda ekzopolisakkarit üretiminin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Sentezleme oranı ve miktarı mikroorganizmanın patojenitesi ile büyük oranda değişmektedir (Suresh Kumar vd. 2007, Deepak vd. 2016, Nwodo vd. 2012, Ruas-Madiedo vd. 2002, Ergene, & Avcı 2016).

Sağlık ve tıp alanında yapılan çalışmalar incelendiğinde ekzopolisakkaritlerin sadece bağırsak mikroflorasını düzenlemekle kalmadığı buna ek olarak antitümör etki mekanizmasında etkili olduğu (Farak vd. 2020), kolesterol düşürücü olduğu (Korcz vd. 2018), antioksidan aktivitede etkisinin olduğu (Liu vd. 2011) görülmektedir.

Polisakkaritlerin yapısı Gram negatif bakterilerde genel olarak basit olmakta ve homopolisakkaritleri ya da heteropolisakkaritleri kapsamaktadır. Heteropolisakkariler 2 ile 4 monosakkarit türünden ve bunların tekrar eden dizilimleri ile disakkaritlerden oligosakkaritlere değişen boyutlarda açıl gruplarının ilave düzenlemeleriyle oluşmaktadır. Asetat esterleri ve pruvat ketalleri en yaygın açıl bileşikler olarak bilinmektedirler. Ketallerin veya uronik asitlerin varlığı, doğrusal polianyonik makromoleküllerin sonucudur. Bakteriyal alijinatlar bu durumun dışında kalmaktadır. Bazı polisakkaritler bu bileşik ünitelere göre daha büyük tekrar eden gruplara ve daha büyük moleküllere ve açıl yapılara sahiptirler. *Rhizobium* ve *Agrobacterium spp.* tarafından sentezlenen suksinoglikon molekülleri bu yapıları oluşturmaktadırlar (Sutherland 2001).

Homopolisakkaritler.

Homopolisakkaritler tek tip monosakkaritlerden oluşmaktadır (D-glukopiranoz ve D-fruktofuranoz). Selüloz, dektran, pullulan, levan ve kurdan polisakkaritleri bunlara örnek olarak verilebilirler. LAB'lerinin birçoğu sakkarozdan yararlanarak dekstran, levan ve mutan üretme yeteneğine sahiptirler (Laws vd. 2001, Sutherland 2001).

Homopolisakkaritlerin moleküler ağırlıkları 4.0×10^4 ile 6.0×10^6 Dalton arasında değişmektedirler. *Lactobacillus* suşları tarafından salgılanan monosakkaritler arasından glukoz ve fruktoz içeren monosakkaritler glukanolar ve fruktanolar olarak iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Molekül ağırlıkları, bağlanma şekilleri, uzunluk ve kimyasal yapısına göre ise bu iki sınıfa ait çok çeşitli polisakkarit grupları bulunmaktadır (Badel vd. 2011, Özkaya vd. 2017).

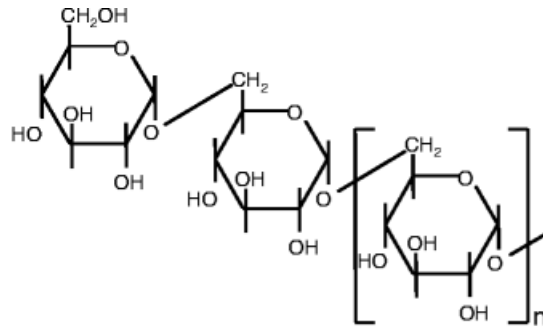
Alfa glukanolar (Şekil 1) α -1,6 ve α -1,3 bağlı glikozidik birimlerden oluşmaktadırlar. *Leuconostoc mesenteroides subs. mesenteroides* ve *Leuconostoc mesenteroides dextranicum* tarafından üretilen dekstranlar, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* tarafından üretilen mutanlar bu guruba dahildirler (Vuyst, & de Ven 1998).

Fruktanlar (Şekil 2) ise β -2,6 bağlı fruktoz moleküllerinden oluşmaktadırlar. *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen levan bu grupta yer almaktadır (Vuyst, & de Ven 1998).

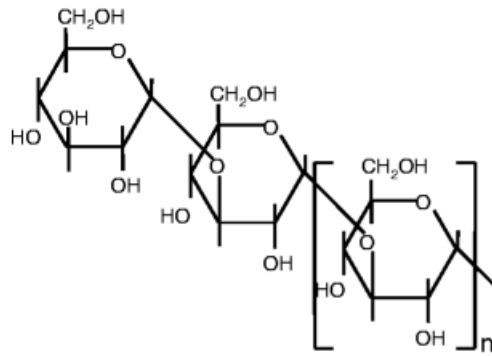
Tablo 2. Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Bazı Homopolisakkaritler.

EPS	LAB	Bağ Türü
α- D -glukanolar		
dekstran	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>	α -D-glikoz 1,6

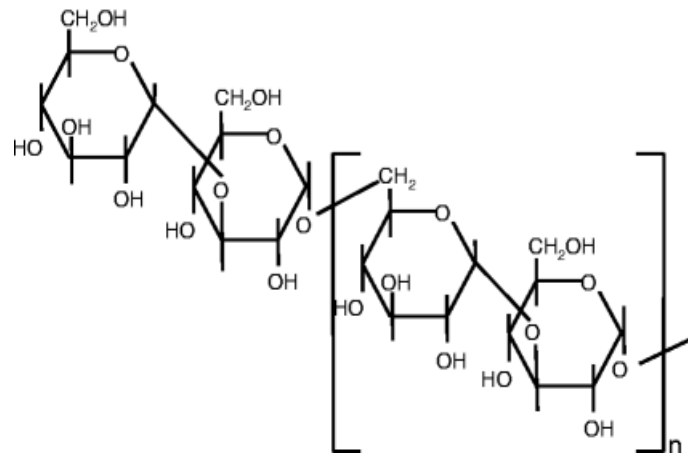
mutan	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>	α -D-glikoz 1,3
alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-glikoz 1,3-1,6
β- D- glukanlar	<i>Pediococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>	β -D-glikoz 1,3
fruktanlar		
levanlar	<i>Streptococcus salivarius</i>	β -D-fruktoz 2,6
inülin benzerleri	<i>Streptococcus mutans</i>	β -D-fruktoz 2,1
poligalaktan	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> H414	α -D-galaktoz β -D-galaktoz



Dextran

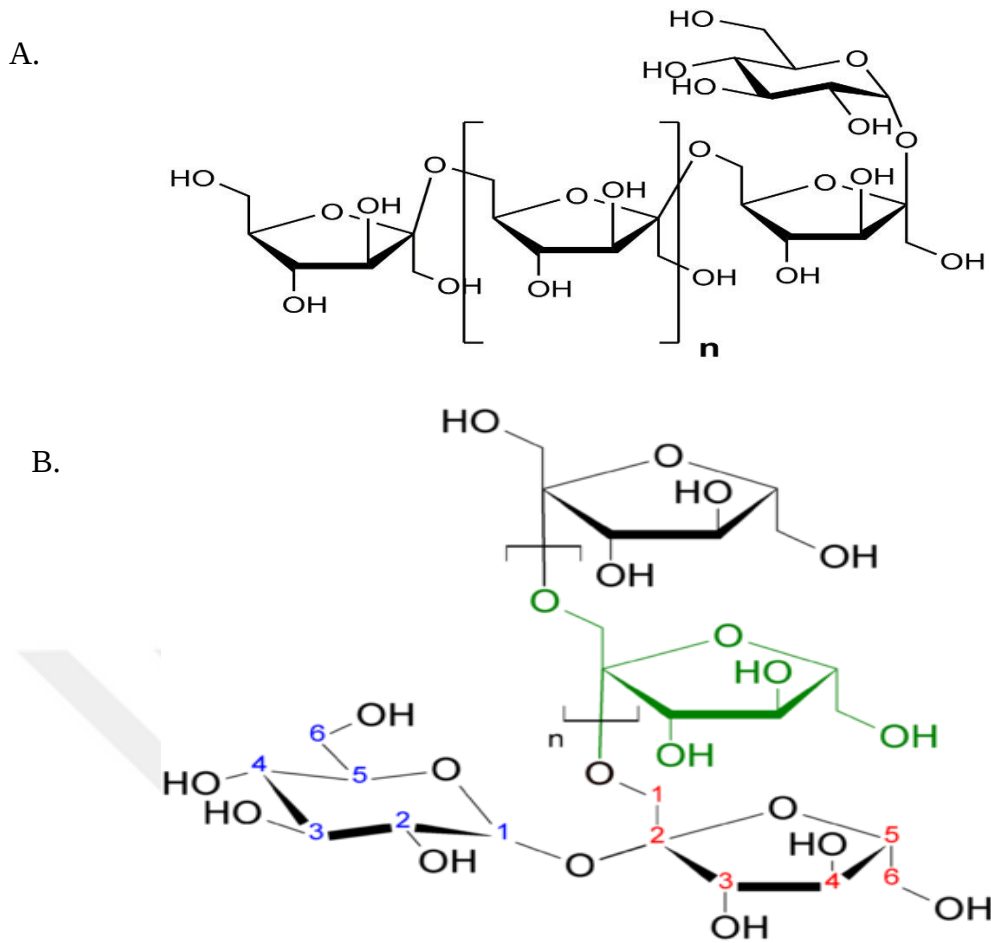


Mutan



Alternan

Şekil 1. Glukanların yapısı.



Şekil 2. Fruktanların yapısı (A. Levan, B. İnülin tipi fruktan).

Heteropolisakkaritler.

Farklı monosakkaritlerin yapısal olarak birbirini tekrarlar şekilde bulunduğu ve çoklu monomer yapılardan oluşan polimer yapılara heteropolisakkaritler denmektedir. Dallanmış veya dallanmamış üç ila sekiz monosakkarit veya monosakkarit türevlerinden meydana gelmektedirler. LAB'leri, heteropolisakkaritleri homopolisakkaritlere göre daha az miktarlarda üretmektedirler. Üretilen heteropolisakkarit miktarları 60 ile 400 mg/L arasında değişmektedir (Yang 2000, Stingle vd. 1996).

Gellan ve ksantan heteropolisakkaritlere örnek olarak verilebilecek polisakkaritlerdendir. Heteropolisakkarit yapıları oligosakkaritlerin kopyalarından oluşmaktadırlar. İki veya daha fazla monosakkaritin oluşturduğu oligosakkaritlerin üç ila yedisinin bir araya gelmesi ve farklı yapılarda bağlanması ile meydana gelmektedirler (Laws vd. 2001). Esasen doğrusal bağlanmış olan mikrobiyal ekstraselüler heteropolisakkaritler yan zincirlerle bağlanmış, uzunlukları farklı ve çok fazla karmaşık yapıya sahip olan moleküllerden oluşmaktadırlar. Ekzopolisakkaritlerin fiziksel özellikleri yapısında bulunan minor veya major yapılarına göre değişiklik göstermektedir. Yapısal ve fiziksel özelliklerinin incelenmesi bu

anlamda büyük önem taşımaktadır. Yapısında bulunan bu çeşitlilik polisakkaritin enzim duyarlılığı, lektinler ve antikorlarla etkileşimi, iyonlarla bağlanma özelliği ve kapasitesi gibi diğer biyolojik özellikler de görülmektedir. Yapılarında bulunan asetik grupların varlığı da aynı şekilde polisakkaritlerin yapısal özelliklerini değiştirmektedir. Yapısında bulunan her bir oligosakkaritin tekrar eden ünitesinde O-asetil ve pruvat eksikliği veya varlığı polisakkaritin yapısını ve özelliklerini değiştirmektedir (Sutherland 1997).

Heteropolisakkaritler mezofilik *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve *Lactococcus lactis subsp. cremoris*; termofilik *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Streptococcus thermophilus* laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedirler (Vuyst, & de Ven 1998).

Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi

Ekzopolisakkarit biyosentezi, başta laktik asit bakterisinin suşu olmak üzere, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, ortam pH'sı, karbon ve azot kaynağı gibi birçok ortam faktörüne bağlı olduğu bilinmektedir (De Vuyst, & Degeest 1999). Mikroorganizma tarafından hücre dışına kapsüler formda üretilen EPS'nin değişen ortam şartlarından hücreyi korumak için stres altındayken daha fazla ürettiği anlaşılmaktadır. Bu özelliğin tanımlanması amacıyla yapılan çalışmalarda bakterinin gelişim ortamına stres üzerinde üretimi incelemek amacıyla NaCl eklenmiş ve bakterinin aynı şartlarda stressiz ortamda üretim yapan diğer suşlarına göre karşılaştırma yapılmış ve stres altındaki suşun daha fazla EPS ürettiği gözlenmiştir (Grosu-Tudor, & Zamfir 2014). Ortamın şeker kaynağının üretim miktarına etkisi olduğu gibi aynı zamanda bakteri suşunda etkisinin yüksek olduğu bilinmektedir (Soyuçok vd. 2016). Buna bağlı olarak bakteri kombinasyonlarının da üretilen EPS üzerine etkisi bulunmaktadır (Kırma 2016). EPS'nin üretiminden sonra izolasyonunun da sağlanması gerekmektedir. İzolasyonun sağlanması için ise mineral giderme (ultrafiltrasyon, diyaliz), protein giderme (enzimatik hidroliz, iyon değişimi kromatografisi), mono-disakkarit giderme (diyaliz), kapsül EPS çıkartma (ultrasonikasyon, ısı muamelesi, kimyasal muamele), EPS sedimentasyonu (çöktürme), EPS fraksiyonları hazırlama (kurutma), EPS miktarı ölçme (HPLC, NIR, fotometrik yöntemler) aşamalarının uygulanması gerekmektedir (Mende vd. 2016).

Laktik asit bakterilerinin EPS üretebilme yetenekleri belirli bir kararlılık göstermemektedir. Oluşan bu kararsızlığın sebebi olarak ise genetik özelliklerinden kaynaklı olabilmektedir. Bazı termofilik laktik asit bakterilerinin EPS üretim yeteneği, bu yeteneğin kuvvetlenmesi ve zayıflaması genetik değişkenlikte oluşan kopmalar ve yeniden düzenlenmeler

sonucu olduğu bilinmektedir. Referans enzimlerin yokluğu da diğer bir sebep olarak gösterilmiştir (Laws vd. 2001,  spirli 2016).

Dekstran, levan ve alternan gibi bazı homopolisakkaritlerin biyosentezi hücre dışına gerçekleşmektedir. Ancak gerçekleştirilen biyosentez, üretilen homopolisakkaritin cinsine bağlı olarak spesifik bir enzim gerekliliği doğurmaktadır. Dekstranlar için dekstran s kraz, levan için ise levan s kraz buna örnek olarak gösterilebilmektedir (De Vuyst, & Degeest 1999). Dekstran sentezinde en önemli enzim olan dekstran s kraz glikozid hidrolaz s perfamilyasına ait bir glukon s krazdır. Yaklaşık ağırlığı 160 kDa'dır ve salgılandıktan sonra hücre duvarına bağlanmaktadır. Glukon transferini katalizleyen bu enzim, sakkaroz glikozidik bağının hidrolizini ve aynı aktif taraftaki iki ayrı katalitik tarafa dayanan eklenme mekanizması yoluyla gelişen kovalent bağlı glukon zincirinin katalizlenmesini sağlamaktadır. Glukoz transfer reaksiyonu için gerekli olan enerji glikozidik bağın hidrolizi ile sağlanmaktadır (Rehm 2010). Homopolisakkaritlerin izolasyonunda etanol ile muamele, diyaliz ve santrifüj ile çöktürme işlemi uygulanarak üretilen EPS'yi ayırmak mümkün olmaktadır (Cerning 1990).

Heteropolisakkarit sentezi, homopolisakkarit sentezine göre daha kompleks bir şekilde gerçekleşmektedir. Heteropolisakkaritleri oluşturan tekrarlayan birimler sitoplazma içinde şeker nükleotidlerinin  nc  moleküller gibi kullanılmasıyla sentezlenir. Bunlar glikoziltransferazlar tarafından lipit taşıyıcı üzerinde sabitlenen uzayan zincirlere şeker nükleotidlerinin ardışık dizilimi ile polimerizasyonun meydana geldiği hücre zarının diğer tarafına yer değişimini sağlar ve en sonunda EPS ortama serbest halde bırakılır (Patel vd. 2012, Ergene, & Avcı 2016, Donot vd. 2012).

Heteropolisakkaritlerin biyosentezinde ve salgılanması esnasında bu oluşumda rolü ve önemi olmayan sitoplazma içindeki  nc  maddeler, enzim ve protein birimleri de bu salgıya katılmaktadırlar. Gerçekleşen bu biyosentez esnasında şeker fosfatlarından elde edilen şeker nükleotidleri şeker aktivasyonundaki önemli rolleriyle mutlak ihtiyaç duyulan moleküller arasında yer almaktadırlar. Modifikasyon enzimleriyle birlikte bu yapıların EPS'nin temel yapısının oluşmasında önemli rolleri bulunmaktadır (Kırma 2016).

Laktik Asit Bakterilerinin Ürettikleri ve Diğer Bazı Önemli Ekzopolisakkaritler

Endüstride gıdalarda kullanılan ve GRAS olarak kabul görmüş laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler genel olarak dekstran, levan, inülin türleri, alternan, reuteran, alginat ve ksantan şeklinde sıralanabilmektedir (Ergene & Avcı 2016).

Dekstran.

Dekstranlar suda çözünebilen ve *Leuconocstoc mesenteroides* ve *Streptococcus mutans* suşları tarafından üretilen bir ekzopolisakkarittir. Sıcaklık, konsantrasyon ve molekül ağırlığına göre viskozitesi değişebilmekte ve newtonian akış sergilemektedir. Molekül ağırlıkları 10^6 ile 10^9 dalton aralığı arasında değişmektedir. Bu molekül ağırlığı sınırları dekstranın farmakolojik ve klinik uygulamalarında kullanılmasını sağlamaktadır. Düz zincirlerinde α -1,6 glikozidik bağları, dallanmalarda ise α -1,3 bağları bulunmaktadır. Substrat olarak uygulamalarda çoğunlukla sakkaroz kullanılmaktadır. Kefir üretiminde fermentasyon ve aromatik tadın oluşumunda da dekstranın rolü bulunmaktadır. Dekstran ilk mikrobiyal ürün olarak şarapta Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir (Rehm 2010, Hazal Özyurt, & Ötleş 2014, Davidović vd. 2015).

Levan.

Levan, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus reuteri* ve suşları tarafından üretilen ekzopolisakkarit türüdür. β -2,6 bağlarla bağlı olan D-fruktozil birimlerinin transferini kataliz eden levansükraz enzimi fruktozdan levanı katalize etmektedir. Ağız içi mikroflorasında LAB'dan olan *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus mutans* tarafından üretilmektedir. Yaklaşık ağırlığı 140 kDa kadardır. Sakkaroz varlığında hücre duvarına bağlı olarak salgılanır (Monsan vd. 2001).

İnülin türleri.

İnülin türleri *Lactobacillus johnsonii* ve *Lactobacillus reuteri* suşlarından üretilen bir ekzopolisakkarittir. Probiyotik özelliklere sahip olan β -2,1 glikozidik bağlar içeren fruktooligosakkaritler insanlar tarafından üst gastrointestinal bölgede sindirilemezler. Sükrozdan enzimatik sentez veya inülin polimerlerinin hidrolizinin kontrolü yolu ile elde edilmektedirler. Lifli gıdaları güçlendirmek amacıyla da kullanılmaktadırlar ve düşük kaloriye sahiptirler (Niness 1999).

Alternan.

Alternan *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus reuteri* ve suşları tarafından tercihen sakkarozla modifiyeli besi yerinde üretilebilen ekzopolisakkaritlerdendir. Bağ yapıları çeşitli α ve β bağlar içermektedir. Bu çeşitli bağları içermesi alternana yüksek çözünürlük, düşük viskozite, enzimatik hidrolize karşı dayanıklılık, mantar önleyici ve antibakteriyel özellik gibi çeşitli özellikler kazandırmaktadır (Yılmaz vd. 2020). Glisemik indeksinin düşük olmasından kaynaklı tatlandırıcı olarak şekerlemelerde kullanılmakta ve ayrıca gıdalarda prebiyotik amaç sağlamak için kullanılmaktadırlar (Côté 2009).

Reuteran.

Özellikle fırıncılık endüstrisinde kullanılan reuteran *Lactobacillus reuteri* ve suşları tarafından salgılanan bir ekzopolisakkarittir. α -1,6 glikozoidik bağlarının α -1,6 bağlanması ile oluşmaktadır. Fırıncılık ürünlerinde hamurun fermantasyonunda etkin rolü bulunmaktadır. Hamurun kazandığı viskozite ve elastikiyette olumlu etkilerine karşılık olumsuz etkisi de bulunmaktadır. Reuteranın salgılanmasına sebep olduğu asetat hacimsel büyümeye engel olurken ayrıca ekşimsi tada da sebep olmaktadır. Reuteran, üretimi esnasında substrat olarak sakkaroz kullanılan ve suda çözünebilen bir glukana çeşididir (Sandra vd. 2012).

Alginat.

Endüstriyel ölçekli ihtiyaçlarda alginat alglerden üretilerek kullanılan bir ekzopolisakkarittir. Yüksek kaliteli alginat üretimi için *Azotobacter vinelandi* ve *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve suşlarının kullanıldığı bilinmektedir. Alginatlar β -1,4 bağları ile bağlanmış D-mannuronat ve L-glukuronat'ın kısmen O-asetillenmiş lineer kopolimeridirler. Substrat olarak glukoz ve mannozu tercih etmektedirler (Yıldırım 2006, Rehm 2010).

Ksantan.

Hücre dışına sentezlenen bir heteropolisakkarit olan ksantan, *Xsanthomonas campestris*, *Xsanthomonas pelargoni*, *Xsanthomonas phaseoli* ve *Xsanthomonas malvacearum* ve suşları tarafından üretilmektedir. Uzun zincirli ve dallanmış yapıda olan ksantan β -D-glikoz birimlerinden oluşmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve yaklaşık olarak 2000 kDa ağırlığındadır. FDA tarafından herhangi bir kısıtlamaya tabi olmadan kullanılmasına izin verilen bir gıda katkı maddesidir. Organik çözücülerde genellikle çözünmeyen ancak suda çözünebilen bir polisakkarittir. Psödopolastik (anlık geri dönebilme) özellik göstermektedir. Herhangi bir toksik özellik göstermemektedir (Kandil 2019, Sutherland 1997, Becker vd. 1998).

Ekzopolisakkaritlerin Kullanıldığı Alanlar

Ekzopolisakkaritlere duyulan ihtiyacın endüstriyel olarak artmasıyla birlikte bu alanda yapılan çalışmalar da son çeyrek yüzyılda büyük hız kazanmıştır. Gıdalarda stabilizatör, emülgatör, jelleştirici veya su bağlayıcı özelliklerinden dolayı talep duyulan katkı maddeleri haline gelmişlerdir (Soyuçok vd. 2016). Dekstran ve levan, sahip oldukları ekstra özelliklerden dolayı farmasötik ve gıda alanlarında çokça yer bulmuştur. Sakkaroz oranla glisemik indeksi düşük olan fruktooligosakkaritlerin, kalorisiz ve karsinojenik olmaması, bu ekzopolisakkariti önemli ve tercih edilir kılmaktadır. İnülin ile fruktooligosakkaritler de prebiyotik özelliklere sahiptirler (Tieking, & Gänzle 2005, Franck 2002).

Russo ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada *L. plantarum* tarafından üretilen EPS'yi yulaf unu bazlı bir fermente üründe kullanarak, yeni ürünün teknolojik özelliklerini araştırmış ve EPS varlığındaki yeni ürünün raf ömrünün uzadığını ayrıca EPS'nin kalınlaştırıcı özellik kattığını ve depolama süresince de üründe B2 vitamini oranının diğer ürünlere kıyasla iki kat daha fazla bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Russo vd. 2016).

Gıda sanayinin başlıca ihtiyaçlarından biri selüloz olarak bilinmektedir. Her ne kadar bu ihtiyacı bitkisel selülozlar karşılayacak nitelikte görünse de mikrobiyal selülozların, serum lipitleri ve kolesterol düşürme etkisi daha fazla olmasından dolayı gıdalarda daha çok bakteriyel selülozlar tercih edilmektedir. Özellikle düşük kalorili tatlı, cips ve şekerleme üretiminde dolgunluk verici katkı maddesi olarak, dondurma ve salata soslarında tekstürel özelliklerin korunmasında, bunların yanında sosis ve etlerin kaplanmasında da yine bakteriyel selülozlardan faydalanılmaktadır (Arslan, & Erbaş 2014, Akoğlu vd. 2010).

Gıdalarda ekzopolisakkaritlerin kullanım amaç ve alanları Tablo 3'te verilmiştir (Yıldız 2011).

Tablo 3. *Gıdalarda Kullanılan EPS'lerin Özellikleri ve Uygulama Alanları.*

Fonksiyon	Uygulama
Yapışkan	Buzlanma ve kırağı oluşumu
Bağlayıcı madde	Hayvan yiyecekleri
Kaplama	Şekerleme
Emülsifiyer	Salata sosları
Kapsülleme	Toz halindeki tatlar
Film Formasyonu	Koruyucu tabaka, sosis muhafazaları
İnceltme	Şarap ve bira
Köpük sabitleştirici	Bira
Jelleştirici	Şekerleme, sütlü tatlılar, reçel

İnhibitör	Dondurulmuş gıdalar, pastiller ve şeker şuruplar
Sabitleyici	Dondurma, salata sosu
Şişlik maddesi	İşlenmiş et ürünleri
Pıhtılaştırıcı	Peynir, dondurulmuş gıdalar
Jel oluşumu	Sentetik et jelleri
Kıvam verici	Reçel, soslar, şuruplar

Ekzopolisakkarit Üretimini Etkileyen Faktörler

Bakteriyel EPS üretilmesi, karakterizasyonu ve saflaştırılması endüstriyel olarak birçok problemi barındırmaktadır. Öncelikle EPS üretim miktarı üretici mikroorganizmaya, gelişim koşullarına, inkübasyon sıcaklığına, substrat cinsi (mineraller, azotlar, karbonhidratlar) ve miktarına, ortam pH'sına ve üretici konumunda bulunan bakterinin genetik kodlanmasından kaynaklanan stres dayanıklılığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (De Philippis vd. 1991, Vuyst, & de Ven 1998, Yılmaz, & Çelik 2007, Lin, & Sung 2006, Moghannem vd. 2018).

Freitas ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada EPS üreticisi olarak *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 suşunu kullanmışlardır. Endüstriyel ekzopolisakkaritlere alternatif oluşturmak adına yaptıkları bu çalışmada karbon kaynağı olarak sadece gliserol kullanmışlardır. 30°C sıcaklıkta, 6,75-6,85 pH aralığında, 200 rpm'de 10 L kapasiteli olarak oluşturdukları biyoreaktör ortamında EPS üretimini gerçekleştirmişlerdir. Gliserol beslemesini biyoreaktörde kontrollü şekilde 96-144 saat arasında gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada 7-18 g/L arasında EPS üretimi elde etmişlerdir. Kontrollü üretim gerçekleştirilen çalışmanın dikkat çeken bir noktası ise bakteri lag fazındayken EPS üretimine başlamış ancak miktar açısından asıl üretimi durağan fazdayken gerçekleştirmiştir (Freitas vd. 2009).

Karbon kaynağı olarak sadece gliserolün kullanıldığı bir başka çalışmada bir *Pseudomonas* suşunun EPS üretim yeteneği araştırılmıştır. Oluşturulan biyoreaktörde 7 gün süreli bir deneme gerçekleştirilmiştir. Ortalama 2,8 g/L günlük üretim verisine ulaşarak süreç sonunda 13,3 g/L EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. 7 günlük çalışma periyodu sürecinde 3.günde biyoreaktörde koloni gelişiminin yavaşladığı görülmüştür. Bu çalışma esnasında da EPS üretiminin durağan fazda daha fazla olduğu bildirilmiştir (Hilliou vd. 2009).

Saflık derecelerine göre çeşitlendirilen 3 farklı gliserol ilavesi ile güçlendirilmiş besiyerinde *Serratia sp.* BS8'in EPS üretimi ve karakterizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada gliserolün etkisi araştırılmıştır. Saf gliserol, ham gliserol ve NaOH ile saflaştırılmış gliserol ile takviye edilen besiyerlerinde 30°C'de 6,8 pH'da 72 saat gelişim sağlanmıştır. Yapılan çalışmada saf gliserol kullanıldığında 10 g/L EPS elde edilirken, ham gliserol kullanıldığında 12,34 g/L EPS elde edilmiştir. Ancak NaOH ile muamele edilerek saflaştırılmış

gliserol kullanıldığında ise EPS veriminin yaklaşık 1,2-2,6 kat artarak 16 g/L'ye ulaştığı bildirilmiştir (Yadav vd. 2021).

Halofilik *Halomonas* suşlarından bazılarının EPS üretim yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada besiyerlerine karbon ilavesi olarak glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz, gliserol, asetat ve trisodyum sitrat ilave edilmiştir. Hazırlanan kültürler 72 saat boyunca 37°C, 180 rpm'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda yöntem esaslarına uygun olarak EPS miktarlarının ölçüldüğü bildirilmiştir. Süreç sonunda karbon kaynağına göre elde edilen EPS miktarlarının sırası ile glukoz 1,08 g/L, sükroz 1,70 g/L, maltoz 1,94 g/L, rafinoz 2,1 g/L, gliserol 0,01 g/L, asetat 0,01 g/L, trisodyum sitrat 0,01 g/L olduğu görülmüştür (Gürleyendağ 2006). Elde edilen EPS miktarları incelendiğinde elde edilen en düşük değerlerden birinin karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı denemede gerçekleştiği görülmektedir. Bu durumu, EPS üreticisi olarak seçilen mikroorganizmanın genetik dizilimi ile ilişkilendirerek açıklamak mümkün olabilmektedir. Gliserolün enzimatik yollarla parçalanması dehidrojenasyon veya fosforilasyon yoluyla gerçekleşirken, bunun dışında, bunlardan bağımsız olarak bazı bakteriler gliserolü dihidroksiasetonfosfata dönüştürerek glikolizde metabolize edebilmektedir. Gliserol kinaz (GK), trigliseritlerin ve gliserolfosfolipidlerin sentezinde görev alan bir fosfotransferaz enzimidir. GK sentezini gerçekleştirmek ancak mikroorganizmanın genetik diziliminde sahip olması gereken protein ile mümkün olmaktadır. LAB'lerinin genetik dizilimleri incelendiğinde bazı LAB'lerinin, gliserolü enzimatik yollar ile parçalamada gliseroltrifosfat oksidaz enzimine sahip olduğu anlaşılmaktadır. *Lactobacillus pentosus*'unda genetik dizilimi incelendiğinde bu enzimi sentezleyebilecek proteine sahip olduğu ve gliserolü metabolik yollar ile parçalayabilme yeteneğinin bulunduğu görülmektedir (Doi 2019). Gürleyendağ (2006) tarafından yapılan çalışmada kullanılan bakteri suşunun gliserolün enzimatik yollar ile parçalanması için gerekli enzime sahip olmadığı görülmektedir. Bu durumda karbon kaynağı olarak gliserol kullanılan denemede elde edilen düşük EPS miktarını kısmen de olsa bu enzim eksikliği ile açıklamak mümkün olmaktadır.

Halofilik bakteriler üzerine yapılan bir çalışmada *Halomaonas aquamarina* ve *Halobacillus trueperi* suşlarının farklı tuz konsantrasyonları (%5-%30 aralığı) ve çeşitli karbon (sakkaroz, glikoz, galaktoz, mannoz) kaynakları kullanılarak EPS üretimleri incelenmiş ve en yüksek üretim miktarının sakkarozlu ortamda 488 mg/L, en düşük EPS üretim miktarının ise galaktozlu ortamda 144 mg/L olduğu tespit edilmiştir (Başer, & Yüksekdağ 2019).

Pediococcus parvulus 2.6 suşu ile EPS üretimi ve biyokütlenin etkisi üzerine yapılan bir çalışmada farklı karbon kaynakları incelenmiştir (Velasco vd. 2006). Biyokütle veriminin en yüksek olduğu pH 5,2 olarak belirlenmiştir. Besiyeri bileşimlerinde 75 g/L glikoz, %4,9

(w/v) etanol, %6,6 (w/v) gliserol kullanmanın EPS üretimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Hücresel gelişim EPS üretimini etkilemediği yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Yapılan çalışmada gliserol ve etanol oranlarının arttırıldığında, EPS üretiminin olumsuz etkilendiği görülmüştür. Gliserol ve etanolün hücre membranından geçerken engellenemediği ve bu süreç sonunda hücre zarının lipidik yapısındaki değişikliklerde inhibitör olarak görev aldığı ve çeşitli fizyolojik süreçleri başlattığı ayrıca hücre zarından geçen gliserol ve etanolün hücre içinde ozmolariteyi arttırdığı artan ozmolariteden dolayı ise bakterinin stres düzeyinin yükseldiği görülmüştür. EPS üretiminin stres altında gerçekleşmesinden dolayı gliserol ve etanol konsantrasyonunun EPS üretiminde etkili olduğu anlaşılmıştır (Velasco vd. 2006, Weber, & de Bont 1996, Silveira vd. 2004).

Yapılan bir çalışmada *Pleurotus citrinopileatus*'tan EPS üretimi ve üretimde etkin faktörlerin belirlenmesi üzerine farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. Monosakkaritlerden fruktoz, galaktoz ve glukoz disakkaritlerden ise laktoz ve sükroz kullanılarak 14 günlük bir periyot belirlenmiş ve fruktoz konsantrasyonunun %4 olduğu durumda 14 günlük gelişim sonrasında en yüksek EPS eldesi 1.87 g/L olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada %2,5 maya peptonu içeren besiyeri kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda biyokütle göre en yüksek EPS miktarına karbon kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı besiyerinde ulaşılmıştır. Diğer karbon kaynakları için optimum konsantrasyon ise galaktoz %5, glikoz %4, laktoz %5 ve sükroz için ise %2 olarak belirlendiği görülmektedir. Sonuç olarak farklı karbon kaynağının EPS üretim miktarını direkt olarak etkilediği kesin olarak görülmektedir. Organik azot kaynakları ve inorganik azot kaynakları kullanıldığında ise %4 fruktoz konsantrasyonu için organik azot kaynağı olarak maya peptonu, karamine HD, hidrolize sebze proteini ve bacto pepton, inorganik azot kaynağı için ise NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır. Sonuç olarak organik azot kaynağı kullanıldığında elde edilen EPS kütlesinin daha fazla olduğu görülmüştür (Wu vd. 2008).

Karbon ve azot kaynakları ile *Hahella chejuensis* bakteri suşunun EPS üretim yeteneğinin incelendiği bir çalışmada üretilen EPS çeşidi EPS-R olarak belirtilmiş ve üretim şartları dizayn edilmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz ve nişasta %2 konsantrasyonda kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen en yüksek EPS-R üretimi sakkarozun kullanıldığı formda 8.5 g/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca en düşük üretimin ise laktozun kullanıldığı formda gerçekleştiği bildirilmiştir. Azot kaynağı olarak ise pepton, maya ekstraktı, malt ekstraktı, tripton, soytone, kazein, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ %5 konsantrasyonda denenmiş ve en yüksek EPS-R üretiminin triptonun kullanıldığı forma 8 g/L olduğu tespit edilmiştir. Azot kaynakları arasında NH_4Cl kullanılan

formun en az EPS üretim yeteneği olduğu sonucuna varılmıştır. Bu iki veri sonuçlarına göre oluşturulan yeni sistemde en yüksek verim elde edilen sakkaroz ve triptonun birlikte kullanıldığı yeni bir form oluşturulmuş ve EPS üretim yeteneği tekrar incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda sakkaroz/tripton oranı 2:1 (2 birim sakkaroz: 1 birim tripton) sağlandığında en yüksek verim elde edilmiştir. Aynı çalışmada NaCl'ün EPS üretimine etkisini belirlemek amacı ile %0-20 (w/v) konsantrasyon aralığında denemeler yapılmıştır. %1 NaCl konsantrasyonunda 9 g/L olarak en yüksek EPS verimini elde etmişlerdir. İnkübasyon sıcaklığının etkisi ölçüldüğünde ise en iyi verimin 20-25°C arasında olduğunu ve 30°C'nin üzerine çıkıldığında ise EPS üretiminin azaldığı sonucuna varmışlardır (Ko vd. 2000).

Süt mikrofiltratı üzerinde yapılan bir çalışmada sıcaklık, pH ve maya ekstraktının *Propionibacterium acidipropionici*'nin gelişimi ve EPS üretimine etkisi araştırılmıştır. EPS üretiminin sadece pH 5.3-6.5 aralığında gerçekleştiği görülürken, organik asit üretimi ve biyokütle gelişiminin tüm pH değerlerinde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Çalışmada kontrollü sıcaklık değerlerinde EPS üretim miktarı da incelenmiş ve en yüksek EPS üretim değerinin 23°C'de elde edildiği belirtilmiştir. Tüm şartların optimal olduğu değer olarak ise 23°C, pH 6 olarak belirlenmiştir (Gorret vd. 2001).

MRS besiyeri bileşenlerinin EPS üretimine etkisinin ve bu besiyerinde *Lactobacillus confusus* CMU198 suşunun EPS üretim yeteneğinin incelendiği bir çalışmada azaltma ve tek tek ilave etme yöntemi kullanarak besiyeri içerikleri ayarlanmıştır. Azaltma yöntemi kullanılırken maliyeti yüksek üç MRS bileşeni pepton, maya ekstraktı ve et ekstraktı azalan konsantrasyonlarda denenmiş ve en yüksek EPS üretim miktarının pepton 12,05 g/L, maya ekstraktı 2,5 g/L ve et ekstraktı 2,5 g/L oranlarında eklendiğinde elde edildiği belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre EPS üretimini yetersiz veya fazla azot konsantrasyonunun olumsuz yönde etkilediği ancak düşük azot konsantrasyonlarının EPS üretimi için daha uygun olduğu fikri öne sürülmüştür. Aynı çalışmanın azot kaynakları kullanılarak oluşturulduğu denemelerinde ise pepton 7,5 g/L, maya ekstraktı 3 g/L ve et ekstraktı 5 g/L kullanıldığında EPS üretim miktarının en üst seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Bütün koşulların optimum olarak alındığı çalışmanın sonunda EPS üretimi gerçekleştirilmiş ve miktar olarak ise 7,95 mg/L belirlenmiştir (Kuntiya vd. 2010).

Farklı fruktoz konsantrasyonu ve farklı inkübasyon sürelerinde ve Luria Bertani (LB) besiyerinde *B. sphaericus* 7055 ve *B. substilis* 1404 suşlarının EPS üretim yetenekleri incelenmiştir. İnkübasyon süreleri incelendiğinde en yüksek üretimin 48.saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. %2,5 fruktoz konsantrasyonunun ve 48 saatlik inkübasyon süresinin optimal koşul olarak belirlendiği denemede *B. sphaericus* 7055 suşunun 1170 mg/L ve *B. substilis* 1404

suşunun ise 1133 mg/L EPS üretim yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Yılmaz 2006).

Pseudomonas sp. CAM025 suşunun farklı sıcaklıklarda EPS üretimi ve üretilen EPS'nin bileşenlerinin incelendiği bir çalışmada -2°C, 10°C ve 20°C'de inkübasyon yapılmıştır. -2°C ve 10°C'de üretilen EPS miktarının 20°C'de elde edilen EPS miktarından 30 kat daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Bu düşük sıcaklıklarda elde edilen EPS içeriğindeki mannoz ve glikoz yüzdesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak galaktoz ve ramnoz bileşenleri incelendiğinde ise yüzdesel olarak 20°C'de üretilen EPS'de daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Nichols vd. 2005).

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR suşunun bacto-casitone katkılı besiyerinde ve farklı sıcaklıklarda inkübasyonu ile ürettiği EPS miktarının araştırıldığı bir çalışmada pH'nın 5, sıcaklığın 38°C olduğunda 30 g/L bacto-casitone kullanıldığında elde edilen EPS miktarının 295 mg/L olduğu anlaşılmıştır (Kimmel vd. 1998). Aynı suşun kullanıldığı benzeri bir çalışmada ise sürekli fermentörde, fermentasyon substratı değiştirilerek EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada proteini uzaklaştırılmış laktoz, kazamino asit ve amonyum klorid eklenmiş peynir altı suyu besiyeri olarak kullanılmıştır. pH, dilüsyon oranı ve besin değerine bağlı EPS üretimi incelenmiştir. Dilüsyon oranı arttıkça EPS üretim yeteneğinin arttığı pH 6.5 ve dilüsyon oranı 0.055 h⁻¹ olduğunda en yüksek 2,13 g/L EPS üretimi elde etmişlerdir. Kullanılan dilüsyon oranlarında laktozdan yararlanma oranı olarak ise %23-65 arasında olduğu belirlenmiştir. Besiyeri pH'sında düşüş gerçekleştiğinde ise EPS üretim miktarının düştüğü gözlemlenmiştir. Optimum şartlar elde edildiğinde ortama kazamino asit (4 g/L) ve amonyum klorid (0,25 g/L) eklendiğinde ise EPS üretim miktarının arttığı sonucuna varılmıştır (Gassem vd. 1997). Aynı bakterinin B3 ve G12 suşları ile *Streptococcus thermophilus* W22 suşlarının EPS üretim yeteneklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise MRS ve M17 besiyerlerinde pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. pH için 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.2, 7.0 sıcaklık için 30°C, 37°C, 42°C, 45°C inkübasyon süresi için 5, 8, 12, 32, 48 saat ve karbon kaynakları olarak sakkaroz, fruktoz ve glikoz kullanılmıştır. Glikoz konsantrasyonu ise 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 g/L olarak belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında en yüksek EPS üretiminin glikoz içeren besiyerinde elde edildiği anlaşılmıştır. Bütün koşulların optimize edildiği şartlar ise 45°C, 18 saat, pH 6.2 veya pH 6.8 ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L olarak bulunmuştur. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* W22 için en yüksek EPS üretiminin sırasıyla 236, 152 ve 120 mg/L olduğu bildirilmiştir (Aslim vd. 2005).

Şekerli buğday suyu, şekerli ve şekersiz soya suyunun besiyeri olarak kullanıldığı ve 11 farklı suşun EPS üretim yeteneklerinin ve üretim miktarlarının incelendiği bir çalışmada, en yüksek EPS üretiminin şekerli soya suyunda elde edildiği gözlenmiştir. Şekerli soya suyunun şekersiz soya suyuna göre de üstünlüğü ortaya konmuştur. Soya ve buğday suyunun arasında oluşan bu farkın soyada bulunan yağ oranının fazlalığından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Soyada yapılan denemelerde en yüksek EPS miktarını *Weissella confusa* verirken (1,21 g/L), buğdayda ise en yüksek EPS miktarını *Streptococcus macedonicus* tarafından (0,5 g/L) üretildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bunun sebebinin ise mikroorganizmaların kendilerine özgü olan gelişme ortamı ve yaşamsal ihtiyaçlarından kaynaklandığı belirtilmiştir (Kırma 2016).

Tarhanadan izole edilen laktik asit bakterilerinin EPS üretim yeteneklerinin incelendiği bir çalışmada sakkaroz ve maltoz varlığında Brain Heart Infusion (BHI) besiyeri kullanarak denemeler gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriler arasında *Lactobacillus plantarum* suşlarının izole edilen diğer laktik asit bakterileri ve diğer bakteri suşlarına kıyasla daha fazla EPS üretebilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. EPS'lerde saflaştırma sonrası yaptıkları analizler ise asidik ortamda viskozitenin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Üretilen EPS'nin glukoz, galaktoz ve fruktoz birimlerinden oluştuğu da varılan sonuçlardandır (Zehir 2017).

Çevresel sorunlara çözüm olmak amacıyla yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda toksik boya (Remazol Blue) bulunan ortamda *Micrococcus sp.* suşunun konsantrasyon ve pH değişikliği ile EPS üretim yeteneği incelenmiştir. Ortam pH'sının 6, inkübasyon sıcaklığının 40°C, Remazol Blue konsantrasyonunun ise 100 mg/L olduğu 48 saatlik gelişim süresi sonunda üretilen EPS miktarının en yüksek 257,2 mg/L olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak ortam pH ve substrat ve inkübasyon süresinin EPS üretim miktarını doğrudan etkilediği kanısına varmışlardır (Kılıç, & Dönmez 2019).

Angel ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada *Bacillus licheniformis* WSF-1 suşunun EPS üretim yeteneğinin optimizasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada ortam şartları 37°C 200 rpm ve 120 saat olarak belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak sükroz, glikoz, laktoz, maltoz, ksiloz ve fruktoz kullanılmıştır. En yüksek EPS veriminin %25 sükroz konsantrasyonunda 2,9 g/mL EPS olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın dikkat çeken bir diğer noktası ise inoküle edilen kültürün pasaj süresinin belirlenmesinde oluşturulan optimizasyon modeli olduğu anlaşılmaktadır. İnoküle edilen kültürün 18, 24 ve 48 saatlik gelişimlerinden sonra inoküle edilerek, kullanılan mikroorganizmanın EPS üretim yeteneği araştırılmıştır. 18 saat geliştirilerek besiyerine %8 oranında inoküle edilen kültürden elde edilen EPS miktarı 0,9 g/mL bulunurken, 24 saat geliştirilerek besiyerine %8 oranında inoküle edilen

kültürden 1,25 g/mL EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. 1,45 g/mL EPS verimi ile en yüksek değer ise 48 saatlik gelişim sonrası inoküle edilen kültürden elde edilmiştir. EPS üretimine birçok faktörün etkin olmasına rağmen baskın faktörün kullanılan karbon kaynağı olduğu, yaptıkları optimizasyon sonucunda bildirilmiştir (Angel vd. 2018).

İmran ve ark. (2016) gerçekleştirdiği bir çalışmada farklı süt kaynaklarından izole ettikleri 27 LAB suşunun tanımlanması biyokimyasal olarak karakterize edilmesi ve bu izolatların EPS üretim yeteneklerinin belirlendikten sonra istatistiksel olarak optimizasyonun gerçekleştirilerek en yüksek EPS veriminin ve üretim şartlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen kültürlerden ekim yapılarak EPS üretimi gerçekleştirilmiş ve bu kültürlerden *Lactobacillus plantarum* NTMI05 ve NTMI20 olarak belirlenen iki suş ile EPS üretiminin optimizasyonu araştırılmıştır. Ön koşulları belirlemek amacıyla karbon kaynağı olarak laktoz, glikoz, sükroz ve galaktoz, inkübasyon süresi olarak 24, 48, 72, 96 ve 120 saat ve inorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum klorür, tri-amonyum sitrat, sodyum nitrit ve potasyum nitrat kullanılmıştır. Bu şartlara uygun EPS üretimi gerçekleştirildikten sonra elde edilen veriler Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ile istatistiksel olarak kıyaslanmış ve deneysel veri olarak en yüksek verimin besi yeri olarak maya peptonu, inorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı şartlarda sağlanacağı sonucuna ulaşılmıştır. Box-Behnken deney matrisi ile alınan yanıtlara göre bağımsız değişkenler kıyaslanmış ve 20 çalışma modeli belirlenmiştir. Tasarımın ANOVA analizi deneysel tahminine göre en uygun ortamın 2 g amonyum sülfat, 20 g maya peptonu ve 20 g glikozun kullanıldığı besi yerinde üretim gerçekleştirildiğinde 0,891 g/L EPS elde edileceği görülmüştür. Belirlenen şartlar kullanılarak elde edilen veriler kıyaslanmış ve optimum değer 22,49 g/L glikoz, 23 g/L maya peptonu ve 2,64 g/L amonyum sülfatın kullanıldığı durumda üretilen EPS miktarının 0,956 g/L olduğu görülerek deneysel veri ile gerçek verinin uyum sağladığı anlaşılmıştır (İmran vd. 2016).

Mevzu bahis bu çalışmada gliserol ve sükroz kullanılarak, belirlenen bakterinin EPS üretim miktarında meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve bu değişikliklere göre uygulanan proses için şartlar ve koşulların belirlenmesi ve optimizasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada, sucuk kaynaklı *L. pentosus* KS27 suşu Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

Kullanılan besiyeri.

Bakterilerin geliştirme ve EPS üretimlerini sağlamak amacıyla standart besiyeri olarak de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) sıvı besi-yeri (Merck-110661) kullanılmıştır.

Bakterilerin muhafazası.

Çalışma süresi boyunca kullanılan kültür stokları, 1 ml' lik tüplerde %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Kullanılan çözelti, besi yerleri ve malzemelerin sterilizasyonu.

Çalışmada kullanılan cam malzemeler, besiyerleri ve solüsyonlar 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Yöntem

EPS üretimi.

EPS üretimi için seçilen suş ön geliştirme amacıyla 1 ml'lik MRS broth içeren tüplere alınarak bir gece aerobik ortamda geliştirmiştir. Genç ve aktif kültürler kullanmak için işlem 24 saatlik inkübasyon işleminden sonra tekrarlanmıştır. İşlemi takiben 50 ml'lik MRS besiyerine, kültürlerden %1 oranında inoküle edilmiştir. 37°C aerobik ortamda 48 saat geliştirilen kültür, EPS izolasyonu için $5000 \times g$ (4°C, 10 dakika)'de santrifüj işlemine tabi tutularak bakteriyel çökeltiden süpernatantın ayrılması sağlanmıştır. Çökeltiden ayrılan süpernatanta, miktarınca eşit soğuk etanol ilave edilerek 4°C'de bir gece bekletilerek EPS'nin çökmesi sağlanmıştır. Bekleme süresinin ardından $5000 \times g$ 'de 4°C'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanarak EPS çöktürülmüş ve süpernatant ayrılmıştır. Çöktürülen EPS toplanarak distile su eklenmiş ve 50°C su banyosunda bir süre bekletildikten sonra suda çözünmesi sağlanmıştır. Sulu çözelti halinde bulunan EPS üzerine ortamda bulunan protein gibi safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla %80'lik Trikloroasetik asit (TCA) hazırlanıp son

konsantrasyon %4 olacak şekilde ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 3-4 saat arası ortalama düzeyde çalkalamaya bırakılmıştır. Süre sonunda EPS'yi ayırmak amacıyla $5000 \times g$ 'de $4^{\circ}C$ 15 dakika süreli santrifüj işlemi yapılmış ve protein gibi safsızlıkların süpernatanttan ayrılması sağlanmıştır. Elde süpernatantın pH'sı 7.0'ye ayarlandıktan sonra üzerine süpernatantın 3 katı kadar soğuk etanol ilave edilmiş ve $4^{\circ}C$ 'de bir gece bırakılmıştır. Süre sonunda $5000 \times g$ $4^{\circ}C$ 10 dakikalık santrifüj işlemi uygulanmış ve EPS'nin çöktürülmesi sağlanmıştır. Çöktürülen EPS üzerine sonraki analizlerde kullanmak üzere distile su ilave edilmiş ve $-20^{\circ}C$ 'de saklanmıştır (Dertli vd. 2016).

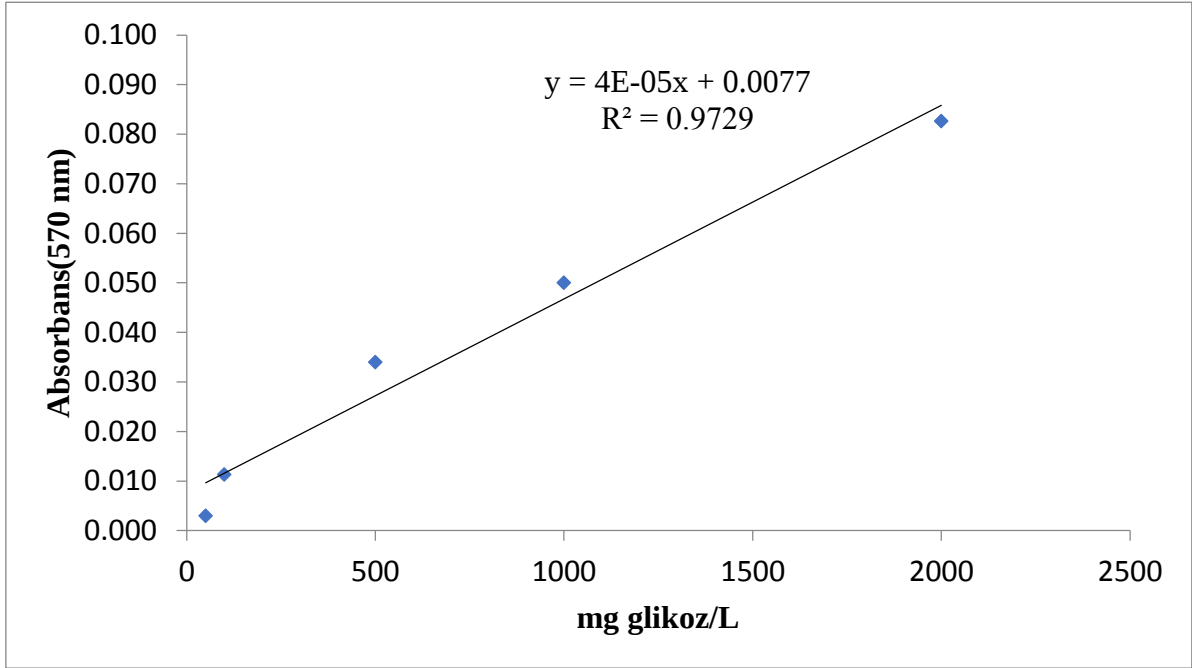
DNS yöntemi ile EPS'lerde toplam şeker analizi.

Üretilen EPS'de toplam şeker miktarını belirlemek amacıyla değiştirilmiş DNS yöntemi uygulanmıştır (Forouchi, & Gunn 1983). Toplam şeker tayini, 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) kullanılarak, glikoz eşdeğeri indirgen şeker olarak, spektrofotometrede belirlenmiştir.

Hidrolizasyon işlemi için 200 μl örnek üzerine 218 μl %70'lik perklorik asit eklenerek $80^{\circ}C$ su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Hidrolize olan örnekler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra üzerine 500 μl 5M KOH ilave edilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Nötralizasyon işleminde oluşan tuzların çökertilmesi amacıyla $4^{\circ}C$ 'de 5 dakika $1200 \times g$ 'de santrifüj işlemi yapılmıştır.

Elde edilen süpernatant yeteri oranda seyreltildikten sonra üzerine 100 μl DNS çözeltisi (%1 DNS, %1 NaOH, %0,16 fenol) ilave edilip 1 dakika süreyle vortekslenmiştir. Elde edilen karışım $90^{\circ}C$ su banyosunda 15 dakika tutulmuştur. 5 dakikalık soğutma işlemi yapıldıktan sonra üzerine 100 μl Rachele tuzu çözeltisi (%40 sodyum-potasyum tartarat) eklenip tekrar vortekslenmiş ve soğuk suda 5 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri alınmıştır.

Aynı şart ve koşullar sağlanarak 0-2 g/L aralığında hazırlanmış ve seri glikoz çözeltileri yardımıyla standart eğri çizilerek elde edilen örneklerdeki toplam şeker içeriğinin hesaplanması yapılmıştır.



Şekil 4. Glikoz standardı eğrisi.

Deneme planı.

Yapılan çalışmada *L. pentosus* KS27 suşunun EPS üretiminde kültür koşullarının optimize edilmesinde Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ‘nin kullanılarak, deney süresini kısaltmak ve test sayısını azaltmak amaçlanmıştır. Bu amaçla EPS üretimin düzeyinin, üretim parametreleri ile ilişkisini veren istatistiksel formülün tespiti gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı ve istatistiksel analizler Design Expert 12 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında; bağımsız değişkenler olarak sükröz konsantrasyonu (% w/v), gliserol konsantrasyonu (% w/v), sıcaklık (°C) ve süre (saat) ‘nin, yanıt olarak EPS üretim düzeyi (ppm glikoz) üzerine olan etkilerinin belirlenmesinde Box-Behnken yöntemi kullanılmıştır. Çoklu Regresyon analizlerinde aşağıda yer alan eşitlik 1’ de verilen polinomal quadratik model ve regresyon katsayıları kullanılmıştır. Bu eşitlikte “Y”, yanıt olarak EPS üretim miktarını, “X”, değerleri bağımsız değişkenleri (sükröz konsantrasyonu, gliserol konsantrasyonu, sıcaklık ve süre) ifade ederken, β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} değerleri ise regresyon katsayılarını belirtmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

EPS üretim sürecinin optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenlerin alt ve üst sınır değerleri Tablo 4’te verilmiştir

Tablo 4. *Bağımsız Değişkenlerin Alt ve Üst Sınır Değerleri.*

Bağımsız		Sükroz	Gliserol	Sıcaklık	Süre
Değişkenler		konsantrasyonu	konsantrasyonu		
Birim		%	%	°C	saat
Sembol		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
	Kodlanmış	Gerçek			
Faktör	-1	0	0	25	24
Seviyesi					
	0	7,5	7,5	35	36
	+1	15	15	45	48

Yapılan çalışmada kullanılan deney tasarımı Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. *Box-Behnken Deney Tasarımı.*

Bağımsız değişkenler				
Deney No	Sükroz kons. (%)	Gliserol kons. (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)
1	7,5	15	35	48
2	7,5	7,5	35	36
3	0	7,5	35	48
4	15	0	35	36
5	7,5	0	35	24
6	15	15	35	36
7	7,5	7,5	25	24
8	7,5	15	45	36
9	7,5	0	35	48
10	7,5	15	25	36
11	7,5	7,5	35	36
12	7,5	7,5	35	36
13	15	7,5	45	36
14	0	7,5	25	36
15	7,5	7,5	45	48
16	15	7,5	35	48
17	7,5	0	45	36

18	0	0	35	36
19	15	7,5	35	24
20	0	7,5	35	24
21	7,5	15	35	24
22	0	7,5	45	36
23	15	7,5	25	36
24	7,5	0	25	36
25	7,5	7,5	25	48
26	7,5	7,5	45	24
27	0	15	35	36

Bu çalışmada, yanıt (EPS üretimi) için karekök transformasyonuna ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla modelleme süreci öncesinde üs transformasyonu uygulanmıştır. Kullanılan üs transformasyonu eşitlik 2' de gösterilmiştir. “y” ifadesi, yanıt olarak değerlendirilmektedir.

$$y' = (y + k)^{\Delta} \quad (2)$$

Modelleme sırasında, elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ile gidilen optimizasyon işlemi, istenilirlik derecesi (D) hesaplanmıştır. EPS üretimini maksimize edildiği, D=1 olduğu koşullarda bağımsız değişkenlerin seviyeleri belirlenmiştir. Empirik veriler analiz edilerek modellenmesi, optimize edilmesi ve 3D grafiklerin sağlanmasında Design-Expert yazılımı (Stat-Ease Inc. Version 12.0 Minneapolis, USA) kullanılmıştır.

EPS üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi.

İnkübasyon sürelerinin EPS üretimindeki etkisini görmek amacıyla 24,36 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri denenmiştir. Bu aşamaların etkisini görmek amacıyla -80°C'den alınan kültürler 37°C'de MRS sıvı besiyerinde 24 saatlik süreyle iki kez pasajlandıktan sonra 50 mL MRS sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilerek 25°C, 35°C ve 45°C'de üç farklı süre boyunca inkübe edilmiştir.

MRS bileşiminde normal olarak bulunan karbon kaynakları haricinde süzkroz %7,5-15 ve gliserol %7,5-15 olmak üzere iki farklı karbon kaynağı ilave edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine aktiveleştirilmiş kültürlerden %1 oranında aşılama yapılmış ve belirlenen süre ve sıcaklıklarda ayrı ayrı paralelli olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda sıvı besiyerindeki protein, hücre çöktürme yapılmış ve sonrasında üretilen EPS elde edilerek, şeker içeriği DNS yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve üretilen EPS miktarı mg/L olarak belirtilmiştir.

Çözünürlük değerinin belirlenmesi.

L. pentosus KS27’den elde EPS’nin çözünürlüğünü incelemek amacıyla saf su, metanol, etanol, kloroform ve aseton izopropanol çözücü olarak kullanılmıştır. Belirlenen çözücüler içerisine bir miktar EPS konularak 1,5 ml’lik deney tüplerinde hazırlanmış ve vortex cihazı ile karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında $8.000 \times g$ ’de 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra kalan çökelti tüp içerisinde kurutulmuştur.

$$\text{Çözünürlük \%} = (X + mEPS) - (Y + mEPS) \div (mEPS) \quad (3)$$

Bu eşitlikte “X” ilk tüp ağırlığı, “Y” son tüp ağırlığı ve “mEPS” tüpe konulan EPS miktarı olarak belirlenmiştir (Mohammed vd. 2021).

Yağ / su alma kapasitesinin belirlenmesi.

Üretilen EPS’nin su alma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla elde edilen EPS’den 50 mg alınarak deney tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 ml su ilave edikten sonra karıştırılmıştır. İşlemden sonra tüp oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika orta düzeyde karışması sağlanmış ve sonrasında $2600 \times g$ ’de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan çökelti tartılmış ve ölçümler kaydedilmiştir. Aynı işlemler tekrarlı olarak yağ alma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla su yerine yağ kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Su alımı \%} = A \div B \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Yağ alımı \%} = A \div B \times 100 \quad (5)$$

4. eşitlikte “A” su bağlamış ağırlık, “B” ilk ağırlık olarak, 5. Eşitlikte “A” yağ bağlamış ağırlık, “B” il ağırlık olarak belirlenmiştir (Saleem vd. 2021).

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).

Elde edilen ekzopolisakkaritin yapısal karakteri ve organik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi FTIR (Perkin Elmer Spectrum) cihazı ile belirlenmiştir. Bu bileşenlerin belirlenmesinde orta boylu kızılötesi aralığı olan $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki spektrumlar kullanılmıştır (Sandt vd. 2003, Santos vd. 2010).

Differansiyel tarama kalorimetre (DTK) analizi.

EPS örneğinin termal özellikleri Perkin Elmer DSC8000 diferansiyel taramalı kalorimetre (Perkin Elmer Inc., Hollanda) ile belirlenmiştir. Alüminyum DTK kabı şahit olarak

kullanılmıştır. Yaklaşık 10 mg örnek alüminyum kaplara tartılarak erime ve kristalizasyon işlemleri için 10°C/dakika hızda ve 0°C-400°C aralığında gerçekleştirilmiştir (Huang vd. 2021).

Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi.

Üretilen EPS’de ¹H (NMR) analizleri JEOL ECZ500R (500MHz) kullanılarak belirlenmiştir. ¹H NMR spektrumları 25°C’de alınmış ve ppm düzeyinde ifade edilmiştir.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme aktivitesinin tayini.

100 µl ekstrakt içerisine 2 ml 0,02 mM DPPH çözeltisi (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır) eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Kör olarak örnek yerine su kullanılmıştır ve 517 nm’de saf metanole karşı okuma yapılmıştır. Su kullanılan örneğe kıyasla gerçekleşen absorbans değişimi % inhibisyon olarak tespit edilmiştir (Pisoschi, & Negulescu 2011).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Yapılan bu çalışmada, EPS üreticisi olarak seçilen *L. pentosus* 'un EPS üretiminde farklı sıcaklık, süre ve karbon kaynaklarının etkisi incelenerek optimum sonucu belirlendikten sonra incelemelerin yapılması amaçlanmıştır. Tablo 5'te verilen Box-Behnken deney matrisi ile sağlanan deney tasarımına göre elde edilen sonuçlar Tablo 6'da gösterildiği şekilde belirlenmiştir.

Tablo 6. Box-Behnken Deney Matrisi ile Elde Edilen Sonuçlar.

Bağımsız değişkenler					YANIT
Deney No	Sükroz kons. (%)	Gliserol kons. (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	EPS üretimi (mg/L)
1	7,5	15	35	48	913,75
2	7,5	7,5	35	36	1490
3	0	7,5	35	48	1470
4	15	0	35	36	901,25
5	7,5	0	35	24	376,25
6	15	15	35	36	1445
7	7,5	7,5	25	24	745
8	7,5	15	45	36	913,75
9	7,5	0	35	48	863,75
10	7,5	15	25	36	1770
11	7,5	7,5	35	36	1576,25
12	7,5	7,5	35	36	1413,75
13	15	7,5	45	36	1012,75
14	0	7,5	25	36	1201,25
15	7,5	7,5	45	48	288,75
16	15	7,5	35	48	1695
17	7,5	0	45	36	220

18	0	0	35	36	476,25
19	15	7,5	35	24	1807,5
20	0	7,5	35	24	1070
21	7,5	15	35	24	782,5
22	0	7,5	45	36	1645
23	15	7,5	25	36	1495
24	7,5	0	25	36	213,75
25	7,5	7,5	25	48	1913,75
26	7,5	7,5	45	24	738,75
27	0	15	35	36	1120

Tablo 6’da verilen Box-Behnken deney matrisi ile sağlanan yanıtlar kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Modelleme aşamasında bazı modellere ait yanıt yüzey metodu istatistik ve anova sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. EPS Üretim Miktarına Ait YYY Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi.

Model	Standart sapma	p-değeri	R2	R2 düzeltilmiş	R2 tahminlenmiş	LOF F değeri	LOF p-değeri	press	
Lineer	7,67	0,0563	0,3303	0,4502	0,2634	38,68	0,0014	0,4872	önerilen
2FI	7,95	0,6176	0,4775	3463	-0,3864	49,25	0,0009	0,9169	
Quadratic	5,13	0,0047	0,837	0,5588	-0,2606	36,01	0,0018	0,8337	önerilen
Kübik	2,48	0,0519	0,9873	0,9863	0,924	0,4137	0,6866	0,0503	aliased
Kaynak	Tahmini katsayı		Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F değeri	P değeri		
Model (Kubik(backward*))	38,63		1858,4	17	0,0386	80,58	<0,0001	Önemli	
X1 (Sükroz konsantrasyonu)	3,17		80,51	1	0,0004	0,9342	0,3545		
X2 (Gliserol konsantrasyonu)	3,63		105,49	1	0,0198	41,26	<0,0001		
X3 (Sıcaklık)	-6,72		180,48	1	0,1262	263,44	<0,0001		
X4 (Süre)	1,9		43,31	1	0,0001	0,2547	0,6237		
X1*X3	-3,19		40,58	1	0,0212	44,18	<0,0001		
X2*X3	-3,01		36,33	1	0,0104	21,72	0,0007		
X3*X4	-6,66		177,41	1	0,0002	0,4427	0,5195		
X ₁ ²	2,5		33,3	1	0,0346	72,3	<0,0001		
X ₂ ²	-8,96		428,56	1	0,0056	11,65	0,0058		
X ₃ ²	-5,14		140,8	1	0,0559	116,67	<0,0001		
X ₄ ²	-3,35		60,02	1	0,0118	24,68	0,0004		
X ₁ ² X ₂	6,48		84,02	1	0,015	31,31	0,0002		
X ₂ ² X ₃	3,81		29,02	1	0,0216	45,03	<0,0001		
X ₁ X ₃ ²	-4,35		50,5	1	0,0663	138,46	<0,0001		
X ₂ X ₃ ²	7,08		133,69	1	0,0118	24,61	0,0004		
Kalıntı				11	0,0005				
Uyum eksikliği	74,49			7	0,0004	1,31	0,42	N.S.	
Hata	2,21			4					
Cor total	1935,1			28					

Ortalama	31,99
% C.V.	8,26
Yeterli Hassasiyet	15,5966
R ²	0,9604
Düzeltilmiş R ²	0,9063
Tahminlenmiş R ²	0,5482

Tablo 6’da EPS üretiminin belirlendiği test koşulları için belirlenen deneysel tasarım düzeni yer almaktadır. Deney tasarım düzeninde kullanılan koşullar sükröz konsantrasyonu %0-15, gliserol konsantrasyonu %0-15, sıcaklık 25-45 C° ve süre 24-48 saat aralığında değişmektedir. Farklı denemeler ile bağımsız değişkenlerin EPS üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Deneme 24’te sükröz içeriğinin %7,5 gliserol içeriğinin %0, sıcaklığın 25 °C ve inkübasyon süresin 36 saat olduğu koşullarda en düşük EPS üretimi (213,75mg/L) tespit edilirken, en yüksek EPS üretimi Deneme 25’te sükröz konsantrasyonun %7,5, gliserol konsantrasyonunun %7,5, sıcaklığın 25 °C ve inkübasyon süresinin 48 saat olduğu koşullarda tespit edilmiştir. Tablo 7’de deney tasarımına ait ANOVA ve YYY model istatistikleri yer almaktadır. İstatistiki veriler değerlendirildiğinde kübik modelin, lineer, 2FI ve Quadratik modellere kıyasla en yüksek determinasyon katsayısına sahip olduğu görülmektedir. Fakat yazılımın EPS üretim miktarı yanıtı için önerdiği model quadratik model olmuştur. Kübik model ise aliased model olarak gösterilmiştir. Bu nedenle aliased olan bu modelin değerlendirilmesi amacı ile modelde yer alan parametrelerin “backward analizi” ile $p>0,1$, $p>0,01$ ve $p>0,05$ düzeyinde önemsiz olanlarının ayrıştırması sağlanmıştır. Elde edilen indirgenmiş (reduced) kübik model kullanılarak EPS üretimi için elde edilen denklem eşitlik 5’te verilmiştir.

$$Y(\text{EPS üretim miktarı})^{0,5}$$

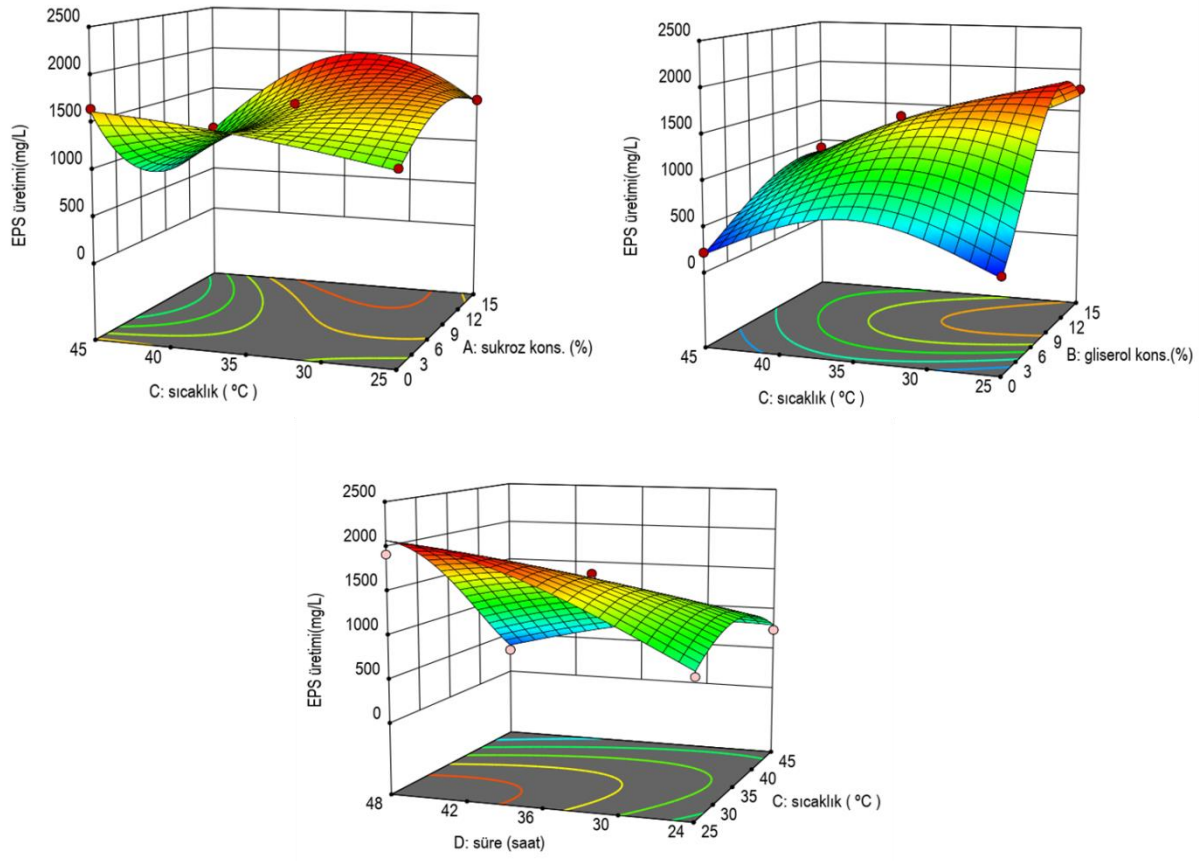
$$= 38,63 + 3,17X_1 + 3,63X_2 - 6,72X_3 - 1,90X_4 - 3,19X_1 * X_3 - 3,01X_2 * X_3 - 6,66X_3 * X_4 + 2,50X_1^2 - 8,96X_2^2 - 5,14X_3^2 - 3,35X_4^2 + 6,48X_1^2 * X_2 + 4,35X_3^2 * X_1 + 3,81X_3 * X_2^2 + 7,08X_2 * X_3^2 \quad \text{Eşitlik (5)}$$

Laktik asit bakterileri ile EPS üretiminin farklı kültür bileşimi koşullarında optimizasyonunda quadratik modelin tercih edildiği çalışmalar oldukça yaygındır (Seesuriyachan vd. 2014, Arora vd. 2010, Imran vd. 2016). Yapılan bu çalışmada çalışmaların aksine indirgenmiş kübik model EPS üretimi için daha uygun bulunmuştur. Bu farklılığa bağımsız değişken sayısının ve bağımsız değişkenlerin EPS üretimi üzerine etkilerinin sebep olduğu söylenebilir.

Model değerlendirildiğinde Tablo 7’de verilen ANOVA değerleri modelin ($p<0,0001$) önemli olduğunu gösterirken, uyum eksikliği (lack of fit) ($p=0,1223$) önemsiz olarak belirlenmiştir. Tablo 3’te de görüldüğü gibi, lineer parametrelerden X_1 , X_2 , X_3 , X_4 interaksiyonlar terimlerinden $X_1 X_3$, $X_2 X_3$, $X_3 X_4$ quadratik terimlerden X_2^2 , X_3^2 ve X_4^2 kübik parametrelerden ise $X_1^2 X_3$, $X_1 X_3^2$, $X_2 X_3^2$ önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Şekil 5'te verilen 3 boyutlu ve kontur grafikleri bağımsız değişkenlerin etkilerini göstermektedir. Sükroz konsantrasyonunun EPS üretimi üzerine etkisi irdelendiğinde sıcaklığın 35-25 °C arasında olduğu koşullarda sükroz konsantrasyonu arttıkça EPS üretiminin de arttığı görülmektedir. Gliserol konsantrasyonunun ise düşük sıcaklıklarda artması, EPS üretimini de arttırmaktadır. Süre ve sıcaklık interaksiyonuna dikkat edildiğinde uzun süre ve düşük sıcaklığın EPS üretimi üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir.

Bağımsız değişkenlerin optimizasyonunda istenilirlik (desirability) değeri dikkate alınmıştır. Bu amaçla Design. expert programı tarafından D=1 değerine sahip sükroz konsantrasyonu %0,004-14,980, gliserol konsantrasyonu %6,381-13,664, sıcaklık 25.00-44,98°C ve süre 26,34-48 saat arasında değişen 100 çözüm sunulmuştur.

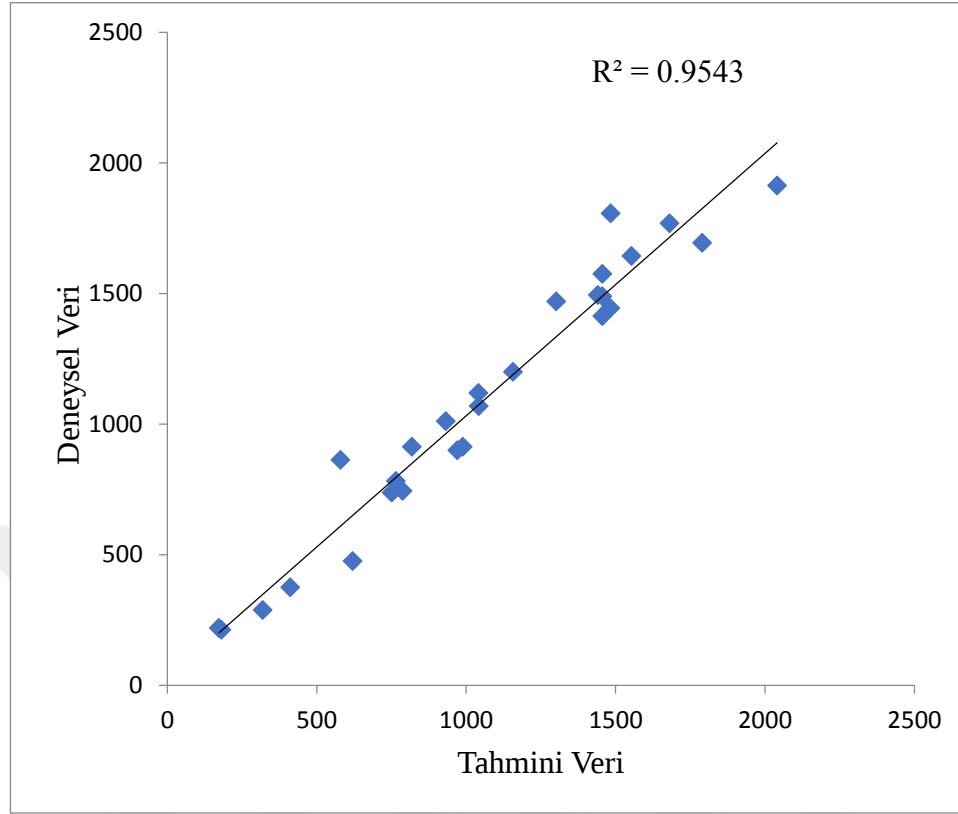


Şekil 5. Sükroz konsantrasyonu, gliserol konsantrasyonu, sıcaklık ve sürenin EPS üretimi üzerine etkisini gösteren 3D plot ve kontür grafikleri.

Modelin Doğrulanması

Sükroz, gliserol, sıcaklık ve sürenin *L. pentosus* KS 27 izolatının EPS üretimi üzerine etkisinin irdelendiği, üretim koşullarının optimizasyonundan elde edilen model kullanılarak deney tasarım ile sağlanan deneysel verilerin uyumluluğu Şekil 6'da yer alan grafikte

gösterilmektedir. Deneysel veriler ile tahmini verilere ait modelin R^2 değeri 1'e oldukça yakındır.



Şekil 6. Optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu.

Optimum Noktanın Belirlenmesi

Optimizasyon çalışması sonucunda istenilirlik derecesi 1 olan 100 koşul belirlenmiştir. sükröz konsantrasyonunun %5,31, gliserol konsantrasyonunun %10,92, sıcaklığın 26°C ve işlem süresinin 46,14 saat olduğu koşullarda EPS üretimi 4 tekrarla gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında gerçekleştirilen üretim sonucunda model 2158 mg glikoz/L EPS üretimi tahminlerken, elde edilen ortalama EPS üretim düzeyi 2178 mg glikoz/L tespit edilmiştir. Deneysel ve tahmini değerler uyum göstermiştir.

Optimum nokta belirlenirken hazırlanan deneme planı sonucunda elde edilen EPS miktarları göz önünde bulundurulmuştur. En yüksek verimin elde edildiği sonuçlara bakıldığında kullanılan sükröz ve gliserol birbirine kıyaslandığında gliserolun miktarca daha fazla olduğu durumda üretilen EPS miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum LAB'nin gelişim süreci esnasında ihtiyaç duyduğu kaynaklar, EPS üretmek için ihtiyaç duyduğu kaynaklar, indirgen şekerler ve fermantasyon birimleriyle açıklanabilirliği öngörülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin gelişim ve koloni oluşturma sürecinde indirgen şeker içeriğindeki azalma gelişme sürecinde, fermente olabilen şekerlerin tüketimiyle açıklanabilmektedir. Bir disakkarit olan sükroz indirgen olmayışından kaynaklı olarak bakteri tarafından öncelikli tüketilebilir karbon kaynağı olarak görülmemektedir (Imran vd. 2016, Arora vd. 2010). Ancak bu durum ortamda bulunan gliserolün tamamının tüketilmesi ve sonrasında sükroz tüketimine geçilmesi anlamına gelmemektedir. Ortamda bulunan gliserol moleküllerinin 500 Dalton'dan küçük olduğu düşünüldüğünde gliserolün hücre membranından kolayca geçebileceği de anlaşılmaktadır. Bu durumda LAB'nin öncelikli olarak tüketme sırasına aldığı gliserol aynı zamanda hücre membranından geçerek hücrenin ozmotik dengesinin de bozulmasına neden olmaktadır. Bu durumda strese giren bakteri hücre çeperine ekzopolisakkarit salgılayarak kendini korumaya almaya çalıştığı ve bu durumda ise ekzopolisakkarit üretimi içinde sükroza ihtiyaç duyulduğu kanısı ortaya çıkmaktadır (Velasco vd. 2006, Weber, & de Bont 1996, Garai-Ibabe vd. 2008, Sauvageot vd. 2002).

Çözünürlük Değerinin Belirlenmesi

L. pentosus KS27 suşundan elde edilen EPS'nin çözünürlük faktörleri distile su, etanol, metanol, kloroform ve aseton izopropanol ile test edilmiştir. 1 mL çözücü içinde 5 mg çözünen madde (EPS) kullanarak yapılan analizler sonucunda, EPS'nin organik çözücülerde çözünmediği görülmüştür (Castellane vd. 2015, Mohammed vd. 2021, Seveiri vd. 2020) benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Organik çözücüler içerisinde metanolde $16 \pm 0,1$ oranında çözünürken etanol ve kloroformda $2 \pm 0,01$ oranında, asetonda ise $6 \pm 0,02$ oranında çözünmüştür. Bunlara karşılık ise üretilen EPS su içerisinde $98 \pm 0,01$ oranında çözünmüştür. Bu durum *L. pentosus* KS27'den elde edilen EPS'nin gıda ürünlerde kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Yağ Bağlama / Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

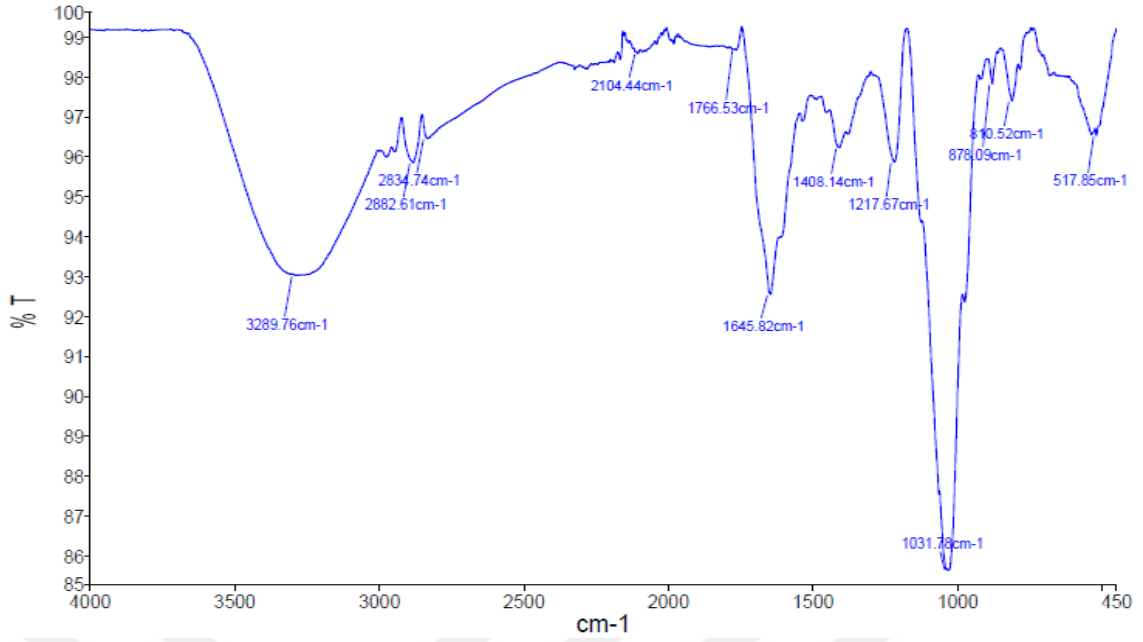
Elde edilen EPS'nin suda çözünürlüğünün ($98 \pm 0,01$) çok yüksek olduğu gibi, su alma kapasitesinde yüksek olduğu belirlenmiştir. *L. pentosus* KS27'den elde edilen EPS'nin su alma kapasitesi $1970 \pm 0,1$ oranında tespit edilmiştir. Saleem ve ark. yaptıkları bir çalışmada *L. plantarum* S123 suşundan elde ettikleri EPS'de yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri EPS'nin su tutma kapasitesini 326 , yağ bağlama kapasitesini ise 995 bularak bu oranların iyi seviyelerde olduğunu ve elde edilen EPS'nin fermente gıda ürünlerinde etkili olabileceği görüşünü bildirmişlerdir (Saleem vd. 2021). Bu durum bize geçirgenliği yüksek olan bir polimer zincire sahip olduğunu da göstermektedir. Yağ bağlama kapasitesi $1617,4 \pm 0,02$ bulunarak etkili bir sonuç vermiştir. Rajoka ve ark. ise *Lactobacillus reuteri* SHA101'den elde

ettikleri EPS üzerinde yaptıkları bir çalışmada sus tutma kapasitesini $525,6 \pm 1,2$ olarak bu değerlerin su tutma kapasitesi açısından önemli değerler arasında bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Rajoka vd. 2019).

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR sonuçları Şekil 7’de verilmiştir. *L. pentosus* KS27 suşu için belirlenen optimal koşullar sonucunda elde edilen EPS’nin FTIR analizi sonrası fonksiyonel grupları belirlenmiştir. Spektrumda görülen pik noktaları daha önceden belirlenen standart değerler kıyaslanarak yorumlanmıştır. EPS’nin analiz sonucunda tepe pik değerleri 3289, 2882, 2834, 2104, 1766, 1645, 1408, 1217, 1031, 878, 810 ve 517 cm^{-1} olarak belirlenmiştir.

Spektrumda 3289 cm^{-1} dalga boyunda görünen geniş pik değeri karbonhidrat hidroksil gruplarının C-H gerilme bandı olarak belirtilmiştir (Karadeniz vd. 2021). 2882 cm^{-1} ve 2834 cm^{-1} değerlerinde görülen pik değerleri ise metilen gruplarının simetrik gerilmesi C-H ile açıklanmaktadır (Lin vd. 2005). 2220-2000 cm^{-1} değerleri arasında görünen pik değerleri asimetrik NH_3^+ gerilme bantları olarak bilinmektedir. 2104 cm^{-1} de görülen pik değerini de asimetrik NH_3^+ gerilme piki olarak değerlendirmek mümkün olmaktadır. Bu bölgede muhtemel protein, nişasta, yağ ve selüloz moleküllerinin absorpsiyonlarını belirlemek mümkün olmaktadır (Ergin vd. 2013). 1766 cm^{-1} değerinde alınan pik noktası ise esterlerin karbonil gruplarının spektrumda görülen önemli bir absorpsiyon zirvesi olarak tanımlamak mümkün olmaktadır (Tjeerdma, & Militz 2005). 1645 cm^{-1} de görülen pik değeri genellikle amid I bandı olarak anılmaktadır ayrıca olefinik ve aromatik bileşiklerin C-C uzantılarında içeren proteinlerle ilişkili gerilme bandı olduğu daha önceki çalışmalara dayanarak söylenebilmektedir (Kansız vd. 1999). 1408 cm^{-1} de gördüğümüz pik noktası simetrik karboksilat COO^- ve asimetrik C-O $^-$ gruplarının varlığını gösteren nokta olarak verilebilmektedir (Haxaire vd. 2003). 1217 cm^{-1} değerinde görülen pik noktası kritik bir tanımlama ve içerdiği şekerleri belirleme noktası olarak gösterilebilmektedir (Saleem vd. 2021). 800 cm^{-1} ve 1200 cm^{-1} arasında görülen spektral bölge pik değerleri ise polisakkaritlerin tipik “parmak izi” bölgesi olarak bilinmekte ve bakteri suşuna özgü bilgi vermektedir (Lin vd. 2005). Bu bölgenin varlığı C-O-C ve C-O uzamasını gösteren 1031 cm^{-1} ’ deki güçlü bantın varlığı, elde edilen yapının bir polisakkarit olduğunu doğrulamaktadır (İspirli vd. 2019).



Şekil 7. 400-4000 cm^{-1} aralığında, sentezlenen EPS'nin FTIR spektrum görüntüsü.

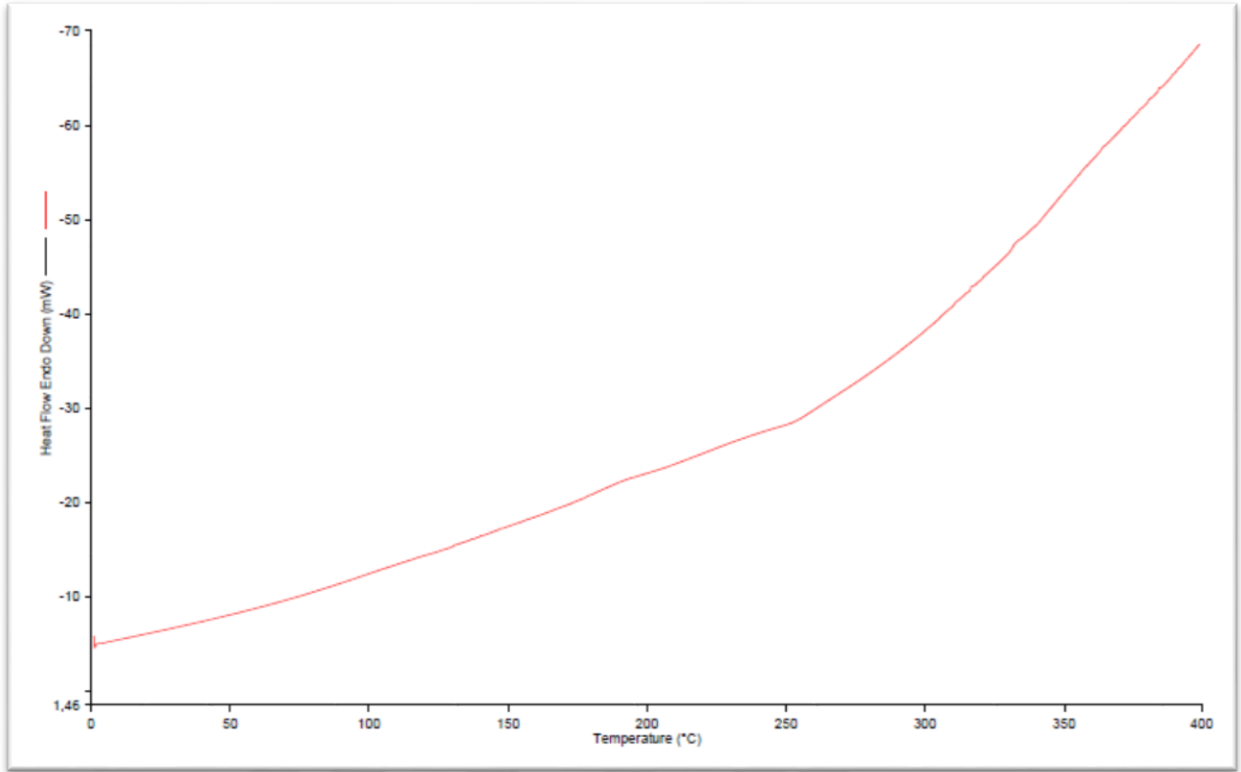
Differansiyel Tarama Kalorimetre (DTK) Analizi

DTK analizinde *L. pentosus* KS27 suşundan elde edilen EPS'nin termal kararlılığı test edilmiştir. Bu değerler ile de üretilen EPS'nin gıdalarda uygulanabilirliği literatürde yapılan çalışmalar ile kıyaslanarak belirlenmiştir (Kırma 2016). Literatür üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde genel anlamda endotermik ve ekzotermik olarak iki pikin varlığından söz etmek mümkündür. Endotermik pik incelendiğinde ise kendi içinde iki ayrı pikten söz etmek mümkündür. Bunlardan birisi pikin gerçekleştiği sıcaklıkta kristalin geçişini diğeri ise erime noktasını göstermektedir. Ekzotermik olarak gösterilen pik değerinde ise kristalleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Genç 2020). Ancak EPS üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde ekzotermik pikin görüldüğü bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu da üretilen EPS'lerin kristalleşmediğini göstermektedir. Erime noktasından sonra görünen endotermik pik varlığı ise oksidasyonu ifade etmektedir. Üretilen EPS'lerde yapılan bazı DTK analiz sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalardaki Üretilen EPS'lerde DTK Analiz Sonuçları.

Mikroorganizma	Kristalleşme sıcaklığı (°C) ve entalpisi (Kj/g)	Erime sıcaklığı (°C) ve entalpisi (Kj/g)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LPL061 (Han vd. 2015)	173,79-37,88	224,09-80,43
<i>Bacillus sp.</i> CP912 (Singh vd. 2011)	128,7	50,864
<i>L. reuteri</i> E81 (İspirli vd. 2019)	178,4	290-86,35
<i>L. plantarum</i> Tibet kefir (Chen vd. 2015)		131,46-209,6
<i>Enterococcus faecalis</i> (Venkatesh vd. 2016)	167	270
<i>Bacillus licheniformis</i> (Singh vd. 2011)	223,64-538,51	295,05-61,79
<i>Amphidinium carterae</i> (Mandai vd. 2011)	116,51-2042,58	214,17-120,62
<i>Weisella confusa</i> (Kavitate vd. 2016)		274,65-74,33
<i>L. plantarum</i> YW11 (Wang vd. 2015)		143,6-217,8
<i>L. plantarum</i> KF5 (Wang vd. 2010, Nambiar vd. 2018)		86,35-133,5

L. pentosus KS27 suşundan elde ettiğimiz EPS'nin termal özelliklerini belirlemek için yaptığımız DTK analizinde (Şekil 8) görüleceği üzere 250°C civarına kadar sıcaklık artışını takip eden yavaş bir bozulma görülmektedir ve 400°C'ye kadar da kademeli bir bozunma takip etmektedir. Elde edilen EPS'nin gösterdiği bu termal kararlılık bize yüksek sıcaklık uygulamalarının gerektirdiği gıda ürünlerinde, elde ettiğimiz EPS'nin kullanılabilir olduğunu ve stabilitesini koruyabileceğini göstermektedir.



Şekil 8. *L. pentosus* KS27 suşuna ait EPS'nin DTK analiz görüntüsü.

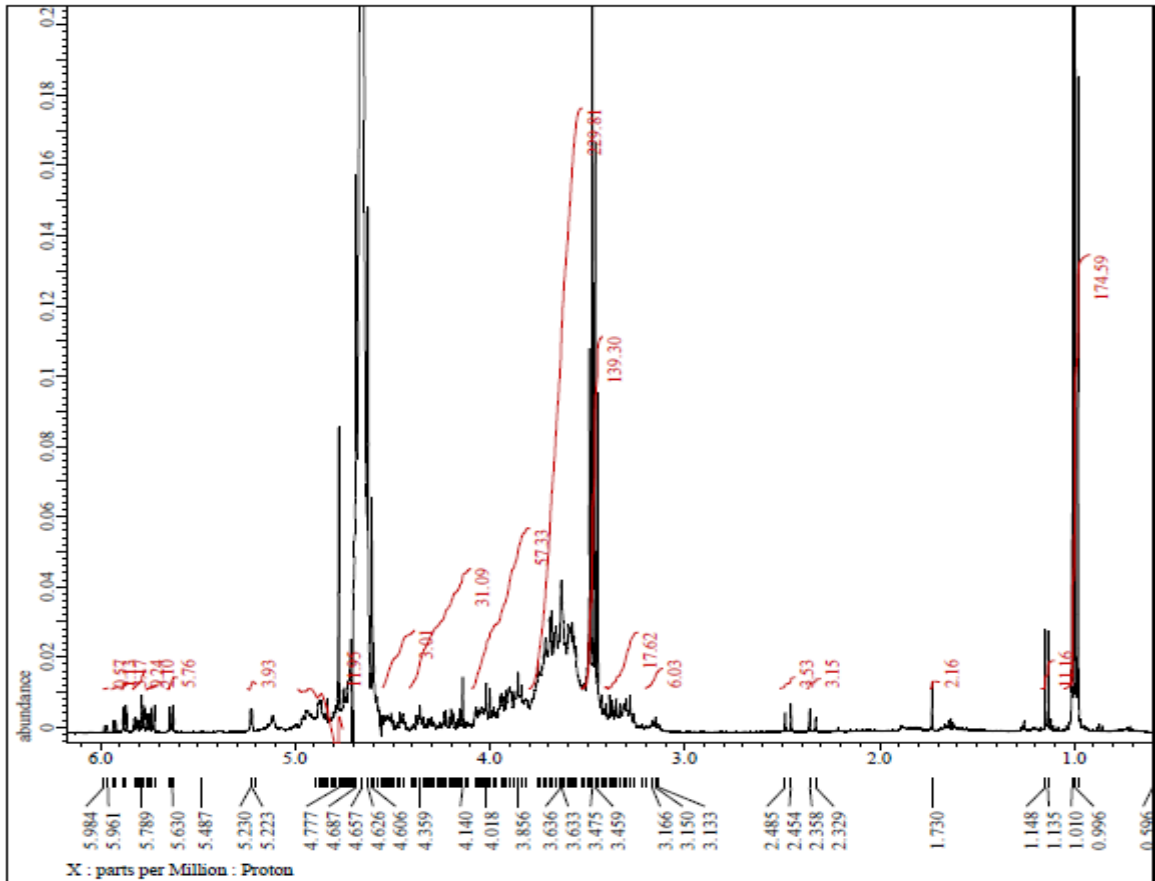
1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikali Süpürme Aktivitesinin Tayini

Stabil bir serbest radikal olmasından dolayı DPPH radikali antioksidanların serbest radikal süpürme aktivitelerini belirlemek için uygulanan yöntemdir. Yöntem esasına göre de DPPH'nin mor renginin antioksidan varlığı karşısında daha sarımsı bir renge dönüşmesi ve bu renk değişiminin absorbans değerlerinin ölçülmesi ile belirlenmektedir (Imran vd. 2016). Ancak *L. pentosus* KS27'den elde ettiğimiz EPS üzerinde yaptığımız DPPH analizinde herhangi bir antioksidan aktivite sergilemediği görülmektedir.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi

KS27 suşundan elde ettiğimiz EPS için ¹H ve ¹³C NMR analizini incelendiğinde (Şekil 9.) çoklu karmaşık sinyal pikleri görülmektedir. Bu durum zaten EPS'lerin heterojen yapılarına uygun olmakla beraber 1,5-1 ppm düzeyinde piklerin alınması da bu kanıyı doğrulamaktadır (Saleem vd. 2021). NMR spektrumunu üç ayrı bölge ile tanımlamak daha kolay bir çözümleme sağlamaktadır. 5,4-4,4 ppm aralığında aldığımız sinyal pikleri anomerik bölgeyi işaret ederken, 4,4-3,1 ppm aralığındaki pikler C2-C6'ya bağlı protonlara karşılık gelmekte ve üçüncü olarak ise 1,4-1,2 ppm aralığındaki pikler ise alkollerin varlığını göstermektedir (Nambiar vd. 2018). Şekil 9'da spektrum incelendiğinde 4,3-4,6-4,7-5,2-5,4 ppm'de alınan sinyaller EPS'lerin tipik karakteristik özelliği olan α -(1-6) zincirlerinin anomerik sinyalleri olduğunu söylemek

mümkün olmaktadır. 3,9-4,6 ppm arasında aldığımız 4,01-4,14-4,35-4,6 ppm sinyal pikleri anomerik bölgeler olarak görülmektedir (Min vd. 2019). 3,4 ppm’de görülen yüksek pik ise analizde kullanılan çözücü maddenin varlığından kaynaklanan pik olarak gösterilmektedir. 1,5-1,0 ppm aralığında alınan pikler için ise EPS’lerin heterojen yapısına bağlı kimyasal kaymaların varlığını gösteren pikler olarak belirtilmektedir (Saleem vd. 2021). Şekil 9’da görülen spektrumu incelediğimizde 174,59 ppm ve 229,81 ppm’de gördüğümüz pikler yapısal grup olarak amidler ve karboksil gruplarını, ana bileşik olarak ise protein, peptidoglikan ve yağ asitleri varlığı ile açıklanabilmektedir. 139,3 ppm’de görüğümüz pik ise yapısal olarak aromatik olefinik karbona işaret ederken ana bileşik olarak ise protein ve nükleik asitlerin varlığı ile açıklanabilmektedir. 0-45 ppm arasında yoğunca görülen piklerde yapısal olarak alifatik karbonu işaret ederken ana bileşik olarak ise proteinler ve yağ asitlerini belirten pikler olarak yorumlanabilmektedir. Bu sinyaller arasında 5 ppm civarında bir çok pik noktası göze çarpmaktadır bu pikler α -(1-3) bağlı bir çok dallanmanın varlığına işaret etmektedir (Mao vd. 2007, Min vd. 2019, Ye vd. 2018).



Şekil 9. *L. pentosus* KS27’den elde edilen EPS’e ait NMR spektrumu.

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuçlar

Bu tez çalışma kapsamında *L. pentosus* KS27'nin optimum koşullarda EPS üretmesi sağlanmıştır. EPS üretiminde optimum koşulları sağlamak amacıyla belirlenen değişken parametreler (sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon kaynakları) yapılan denemeler sonucunda optimize edilerek EPS üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen EPS'nin karakterizasyonu yapılmış ve uyumluluk testleri gerçekleştirildikten sonra bu kapsamda elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi bulunmuştur.

1. Standart besiyeri kullanılarak EPS üretimi gerçekleştirildiğinde ulaşılan miktar 400-500 mg/L seviyelerinde olduğu gözlenirken, besiyeri ortamına ilave edilen sükroz ve gliserolün etkisi ile bu miktar 2178 mg/L'ye kadar yükseltilmiştir.
2. En yüksek EPS verimi sükroz konsantrasyonu %5,31, gliserol konsantrasyonu, 10,92, inkübasyon sıcaklığı 26°C ve inkübasyon süresinin 46,14 saat olduğunda elde edilmiştir.
3. Yapılan analizler sonucunda sıcaklığa karşı dayanımı incelendiğinde üretilen EPS'nin termal kararlılığa sahip olması yüksek ısı işlem gerektiren gıda uygulamalarında 250°C'ye kadar herhangi bir bozulmaya uğramadan kalabileceğini göstermiştir.
4. Suda yüksek çözünürlüğe sahip olmasından dolayı gıda uygulamalarında homojen yapıyı bozmayacağı ve çözünerek etkili olacağını göstermiştir.
5. Yapılan FTIR analizinde 800 cm⁻¹ ve 1200 cm⁻¹ arasında pikler gözlenmesi ile üretilen EPS'nin tipik polisakkarit olduğu anlaşılmıştır

Sonuç olarak sucuktan izole edilmiş olan *Lactobacillus pentosus* KS27'nin üretmiş olduğu ekzopolisakkaritin fizikokimyasal özellikleri, bu ekzopolisakkariti gıda endüstrisindeki uygulamalar için potansiyel bir madde haline getirebileceği söylenebilir.

Kaynakça

- Akepaer, M. (2015). *Bazı enterococcus lactococcus ve pediococcus bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 392702)
- Akkaya, A. & Pazarlıoğlu, N. (2012). 21. yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1, 22-33.
- Akoğlu, A., Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L. & Çakır, İ. (2010). Bakteriyel selülozun özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı. *GIDA*, 35, 127-134.
- Angel, S. J., Vidyadharani, G., Santhosh, S. & Dhandapani, R. (2018). Optimization and characterisation of thermo stable exopolysaccharide produced from *Bacillus licheniformis* WSF-1 strain. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 3824-3833.
- Arora, S., Jood, S. & Khetarpaul, N. (2010). Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures. *Food Chemistry*, 119, 779-784.
- Arslan, S. & Erbaş, M. (2014) Selüloz ve Selüloz Türevi Diyet Liflerin Özellikleri ve Fırın Ürünlerinde Kullanım İmkanları. *GIDA/The Journal of FOOD*, 39.
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. & Mercan, N. (2005). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 673-677.
- Auld, W. E. (2010) *Survival and Exopolysaccharide Production of Lactic Acid Bacteria Grown on Grape Pomace*, University of Missouri-Columbia.
- Badel, S., Bernardi, T. & Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 29, 54-66.
- Barcelos, M. C., Vespermann, K. A., Pelissari, F. M. & Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60, 1475-1495.
- Başer, H. & Yüksekdağ, Z. (2019). Exopolysaccharide (EPS) production of halophilic bacteria. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2, 84-89.
- Becker, A., Katzen, F., Pühler, A. & Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 50, 145-152.
- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. & Quesada, E. (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of biotechnology*, 61, 135-141.
- Bhaskar, P. & Bhosle, N. B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, 45-53.
- Borlaug, N. E. (2000). Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant physiology*, 124, 487-490.
- Broadbent, J. R., McMahon, D.J., Oberg, C. J. & Welker, D. L. (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11, 433-439.
- Castellane, T. C. L., Persona, M.R., Campanharo, J. C. & De Macedo Lemos, E. G. (2015). Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and

- bioremediation applications. *International journal of biological macromolecules*, 74, 515-522.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 7, 113-130.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y. & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15-21.
- Côté, G. L. (2009). Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. *Carbohydrate research*, 344, 187-190.
- D'ayala, G. G., Malinconico, M. & Laurienzo, P. (2008) Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*, 13, 2069-2106.
- Dağbaşı, S. & Göksungur, Y. (2013). Mikrobiyal Yolla Üretilen Polisakkaritler Ve Gıda Sanayinde Kullanımı. *Akademik Gıda*, 3, 32-37.
- Davidović, S. Z., Miljković, M. G., Antonović, D. G., Rajilić-Stojanović, M. D. & Dimitrijević-Branković, S. I. (2015). Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijska industrija*, 69, 595-604.
- De Philippis, R., Sili, C., Tassinato, G., Vincenzini, M. & Materassi, R. (1991). Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. *Bioresource Technology*, 38, 101-104.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. & Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 687-707.
- De Vuyst, L. & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23, 153-177.
- De Vuyst, L. & Marshall, V. (2001). Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: from Fundamentals to Applications.
- Deepak, V., Ramachandran, S., Balahmar, R. M., Pandian, S. R. K., Sivasubramaniam, S. D., Nellaiah, H. & Sundar, K. (2016). In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52, 163-173.
- Degeest, B. & De Vuyst, L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2863-2870.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. & Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124.
- Diñçer, E., Kıvanç, M. & Karaca, H. (2010). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri. *GIDA*, 35, 1-8.
- Doğan, M. (2017). *Bazı Gıdalardan İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 477627)
- Doi, Y. (2019). Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5079-5093.

- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951-962.
- Erbil, N. İ. (2012). *Homofermantatif ve/veya heterofermantatif laktik asit bakterileri inokulantların Macar fiğı-buğday karışımı silajların fermentasyon ve aerobik stabilite özellikleri üzerine etkileri*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 309923)
- Ergene, E. & Avcı, A. (2016). Microbial exopolisaccharides. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20, 193-202.
- Ergin, Ç., İlkit, M., Gök, Y., Özel, M. Z., Çon, A. H., Kabay, N., Söyleyici, S. & Döğen, A. (2013). Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant Trichophyton species. *Journal of Microbiological Methods*, 93, 218-223.
- Farag, M. M., Moghannem, S. A., Shehabeldine, A. M. & Azab, M. S. (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycoides*. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103947.
- Forouchi, E. & Gunn, D. (1983). Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 1905-1911.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British journal of nutrition*, 87, S287-S291.
- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R. & Reis, M. A. (2009). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78, 549-556.
- Freitas, F., Alves, V. D. & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *TRENDS in Biotechnology*, 29, 388-398.
- Garai-Ibabe, G., Ibarburu, I., Berregi, I., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Irastorza, A. & Dueñas, M. (2008). Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International journal of food microbiology*, 121, 253-261.
- Gassem, M. A., Sims, K. A. & Frank, J. F. (1997). Extracellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR in a Continuous Fermentor. *LWT-Food Science and Technology*, 30, 273-278.
- Geçer, B. Y. (2006). *Pastörize ve UHT sütlerde antibiyotik kalıntılarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 192111)
- Genç, B. (2020). *Termofilik anoxybacillus pushchinoensis g11den üretilen ekzopolisakkaritin karakterizasyonu*. (Doktora tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 623508)
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. & Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of radiation research and applied Sciences*, 7, 222-229.
- Gorret, N., Maubois, J., Engasser, J. & Ghoul, M. (2001). Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 788-796.

- Gökalp, H. Y., Certel, M. & Nas, S. (1992). *Biyokimya: “Temel yapılar ve kavramlar”*. Pamukkale Üniversitesi Müh. Fak. Ders Kitapları Yayın No:001, Denizli, 380 s.
- Grosu-Tudor, S.-S. & Zamfir, M. (2014). Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. *Sci. Bull. Ser. Biotechnol*, 107-114.
- Gürleyendağ, B. (2006). *Polisakkarit üreten ekstremofillerin belirlenmesi ve ekzopolisakkarit üretimi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi’nden edinilmiştir. (Tez No. 185238)
- Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., Wu, R. & Li, P. (2015). Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers*, 115, 230-237.
- Haxaire, K., Marechal, Y., Milas, M. & Rinaudo, M. (2003). Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 72, 10-20.
- Hazal Özyurt, V. & Ötleş, S. (2014). Prebiyotikler: Metabolizma İçin Önemli Bir Gıda Bileşeni. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12.
- Hilliou, L., Freitas, F., Oliveira, R., Reis, M. A., Lespineux, D., Grandfils, C. & Alves, V. D. (2009). Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source. *Carbohydrate Polymers*, 78, 526-532.
- Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and microbial technology*, 26, 87-107.
- Huang, C.-M. C., Su, S.-F., Lin, K.-J., Chang, W.-C., Yang, C.-F. & Li, Y.-C. M. (2021). Metrology based on transient heat transfer theory for evaluating phase change materials with differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 179111.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A.P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N. S. & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International journal of biological macromolecules*, 93, 731-745.
- İspirli, H. (2016). *Erzincan Tulum peynirinden laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, moleküler metotlarla tanımlanması ve ekzopolisakkarit (EPS) üretim potansiyellerinin genetik olarak belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi’nden edinilmiştir. (Tez No. 430239)
- İspirli, H., Sagdic, O., Yılmaz, M. T. & Dertli, E. (2019). Physicochemical characterisation of an α -glucan from *Lactobacillus reuteri* E81 as a potential exopolysaccharide suitable for food applications. *Process Biochemistry*, 79, 91-96.
- Jani, G. K., Shah, D. P., Prajapati, V. D. & Jain, V.C. (2009). Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci*, 4, 309-323.
- Kandil, M. (2019). *Bazı probiyotik bakterilerin gelişmesi üzerine ksantan gamin etkisi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi’nden edinilmiştir. (Tez No. 593296)
- Kandil, M., Ersan, L. Y., Özcan, T. & Akpınar-Bayızıt, A. (2017). Gamların prebiyotik özellikleri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 18-26.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J. & Mcnaughton, D. (1999). Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry*, 52, 407-417.

- Karadeniz, D. G., Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Tok, K. C., Gumustas, M. & Karaaslan, C. (2021). Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its antiquorum sensing activity. *Archives of Microbiology*, 1-9.
- Kavitake, D., Devi, P. B., Singh, S. P. & Shetty, P. H. (2016). Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International journal of biological macromolecules*, 86, 681-689.
- Kılıç, N. K. & Dönmez, G. (2019). Farklı ortam koşullarının *Micrococcus* sp. ekzopolisakkarit üretimine etkisi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 19, 40-46.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F. & Ziegler, G. R. (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 659-664.
- Kırma, İ. (2016). *Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Ekzopolisakkarit Üretimi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 439472)
- Ko, S. H., Lee, H. S., Park, S. H. & Lee, H. K. (2000). Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5, 181.
- Korcz, E., Kerényi, Z. & Varga, L. (2018). Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food & function*, 9, 3057-3068.
- Korolenko, T. A., Bgatova, N. P. & Vetricka, V. (2019). Glucan and mannan-two peas in a pod. *International journal of molecular sciences*, 20, 3189.
- Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K. & Seesuriyachan, P. (2010). Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4, 318-330.
- Laws, A., Gu, Y. & Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 19, 597-625.
- Levander, F., Svensson, M. & Rådström, P. (2002) Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 784-790.
- Lin, E. S. & Sung, S. C. (2006). Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *International journal of food microbiology*, 108, 182-187.
- Lin, M., Al-Holy, M., Chang, S. S., Huang, Y., Cavinato, A. G., Kang, D. H. & Rasco, B. A. (2005). Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International journal of food microbiology*, 105, 369-376.
- Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H. & Pan, T. M. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2284-2291.
- Mandai, S. K., Singh, R. P. & Patel, V. (2011). Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial Ecology*, 62, 518-527.

- Mao, J., Cory, R. M., Mcknight, D. M. & Schmidt-Rohr, K. (2007). Characterization of a nitrogen-rich fulvic acid and its precursor algae from solid state NMR. *Organic Geochemistry*, 38, 1277-1292.
- Mcgloughlin, M. (1999). Ten reasons why biotechnology will be important to the developing world. *Ethical issues in biotechnology*, 161-173.
- Mende, S., Rohm, H. & Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- Milci, S. & Yaygın, H. (2005). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *GIDA*, 30.
- Min, W. H., Fang, X. B., Wu, T., Fang, L., Liu, C. L. & Wang, J. (2019). Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127, 758-766.
- Moghannem, S. A., Farag, M., Shehab, A. M. & Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 452-462.
- Mohammed, Y. M., Saad, M. M. & Abdelgaleil, S. A. (2021). Production, characterization and bio-emulsifying application of exopolysaccharides from *Rhodotorula mucilaginosa* YMM19. *3 Biotech*, 11, 1-12.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 675-685.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van Der Meulen, R., Moreno, M. R. F., De Valdez, G. F. & De Vuyst, L. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4431-4435.
- Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., Perumal, A. B., Sadiku, E. R., Phiri, G. & Jayaramudu, J. (2018). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*, 73, 15-22.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 7, 167-178.
- Nichols, C. M., Bowman, J. P. & 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, 3519-3523.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *The Journal of nutrition*, 129, 1402S-1406S.
- Novak, M. & Vetvicka, V. (2008) β -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of immunotoxicology*, 5, 47-57.
- Nwodo, U. U., Green, E. & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, 13, 14002-14015.
- Oral, H. (2015). *Farklı kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 392705)
- Özden, A. (2005). Gastrointestinal sistem ve prebiyotik-synbiyotik. *Güncel Gastroenteroloji* 2005; 9; 124-33.

- Özkaya, T., Bayrak, D., Dali, G. M. A. & Sağdıç, D. O. (2017). Düzlemsel Homotetik Hareketler Altındat. C.
- Patel, S., Majumder, A. & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian journal of microbiology*, 52, 3-12.
- Pektaş, S. (2014). *Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretim yeteneklerinin araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 367783)
- Pettitt, D. J. (2020). Xanthan gum. In: *Food hydrocolloids*, pp. 127-149. CRC Press.
- Pigman, W. & Horton, D. (1957). Introduction, structure and stereochemistry of the monosaccharides. *The carbohydrates. Academic Press, Inc., New York*, 1-76.
- Pisoschi, A. M. & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1, 106.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A. & Shi, J. (2019). Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin Lactobacilli. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 1132-1142.
- Rehm, B. H. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 578-592.
- Ruas-Madiedo, P. & De Los Reyes-Gavilán, C. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 88, 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Russo, P., De Chiara, M. L. V., Capozzi, V., Arena, M. P., Amodio, M. L., Rascón, A., Dueñas, M.T., López, P. & Spano, G. (2016). Lactobacillus plantarum strains for multifunctional oat-based foods. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 288-294.
- Saleem, M., Malik, S., Mehwish, H. M., Ali, M. W., Hussain, N., Khurshid, M., Rajoka, M. S. R. & Chen, Y. (2021). Isolation and functional characterization of exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum S123 isolated from traditional Chinese cheese. *Archives of Microbiology*, 1-10.
- Sandra, G., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M. & Arendt, E. (2012). Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread. *Journal of Cereal Science*, 56, 531-537.
- Sandt, C., Sockalingum, G., Aubert, D., Lèpan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Leon, A., Pinon, J., Manfait, M. & Toubas, D. (2003). Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of Candida albicans strains isolated in intensive care units. *Journal of clinical microbiology*, 41, 954-959.
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z. & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in microbiology*, 161, 168-175.
- Sauvageot, N., Pichereau, V., Louarme, L., Hartke, A., Auffray, Y. & Laplace, J.M. (2002). Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of Lactobacillus collinoides. *European journal of biochemistry*, 269, 5731-5737.

- Sayiner, S. (2016). Carbohydrate metabolism. Clinical chemistry in diagnosis and treatment. 6TH edition. Glasgow, Barth: Colourbooks, 195-222.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Chaityaso, T., Hanmoungjai, P., Leksawasdi, N. & Techapun, C. (2014). Enhancement and optimization of exopolysaccharide production by *Weissella confusa* TISTR 1498 in pH controlled submerged fermentation under high salinity stress. *Chiang Mai Journal of Science*, 41, 503-512.
- Sengupta, S. & Dey, S. (2019). Microbial exo-polysaccharides (EPS): role in agriculture and environment.
- Seveiri, R. M., Hamidi, M., Delattre, C., Sedighian, H., Pierre, G., Rahmani, B., Darzi, S., Brasselet, C., Karimitabar, F. & Razaghpoor, A. (2020). Characterization and prospective applications of the exopolysaccharides produced by *Rhodospiridium babjevae*. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 10, 254.
- Silveira, M. G., Baumgärtner, M., Rombouts, F. M. & Abee, T. (2004). Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2748-2755.
- Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. & Jha, B. (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1019-1026.
- Singha, T. K. (2012). Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. *IOSR J Pharm*, 2, 271-281.
- Soyuçok, A., Teslime, E. & Kiliç, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332-344.
- Stingle, F., Neeser, J. R. & Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, 178, 1680-1690.
- Suresh Kumar, A., Mody, K. & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of basic microbiology*, 47, 103-117.
- Sutherland, I. W. (1997). Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemistry*, 69, 1911-1918.
- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 663-674.
- Tieking, M. & Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 79-84.
- Tjeerdma, B. & Militz, H. (2005). Chemical changes in hydrothermal treated wood: FTIR analysis of combined hydrothermal and dry heat-treated wood. *Holz als roh-und Werkstoff*, 63, 102-111.
- Tükenmez, Ü. & Aslım, B. (2018). Probiyotik Kaynaklı, Muhtemel Prebiyotik Özelliğe Sahip Ekzopolisakkarit (EPS)'lerin Biyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 25.
- Türköz, B. K. & Akpınar, D. D. (2019). Probiyotik-İnsan Bağışıklık Sistemi Etkileşimleri. *Food and Health*, 5, 265-280.
- Ulvskov, P. & Harholt, J. (2018). A New Polysaccharide with a Long Evolutionary History. *The Plant Cell*, 30, 1165-1166.

- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H. & Prestegard, J. H. (2015). *Essentials of Glycobiology*.
- Velasco, S., Årsköld, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Rådström, P. & Van Niel, E. (2006). Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International journal of food microbiology*, 111, 252-258.
- Venkatesh, P., Balraj, M., Ayyanna, R., Ankaiah, D. & Arul, V. (2016). Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis*. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 606-614.
- Vuyst, D. & De Ven, V. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1059-1068.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P. & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82, 895-903.
- Weber, F. J. & De Bont, J. A. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1286, 225-245.
- Welman, A. D. & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 269-274.
- Wu, C., Liang, Z., Lu, C. & Wu, S. (2008). Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16, 61.
- Yadav, B., Yellapu, S. K., Adjallé, K., Drogui, P. & Tyagi, R. D. (2021). Comparative study on production and characterisation of extracellular polymeric substances (EPS) using activated sludge fortified with crude glycerol from different biodiesel companies. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1, 208-222.
- Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: their structures and properties.
- Ye, G., Chen, Y., Wang, C., Yang, R. & Bin, X. (2018). Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1315-1321.
- Yıldırım, H., Kılıç, G. B. & Karahan, A. G. (2017). Probiotic yeasts and their properties. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5, 1148-1155.
- Yıldırım, T. (2007). *Laktik asit bakterilerine (LAB) ait bazı türlerin AFLP (çoğaltılan parça boy farklılaşması) yöntemi ile parmak izi analizleri*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 213833)
- Yıldırım, U. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik varlığında biofilm ve alginat üretiminin araştırılması.
- Yıldız, S. Y. (2011). Investigation of exopolysaccharide production capacity of thermophilic microorganisms isolated from Turkey.
- Yılmaz, M. (2006). *Bazı Bacillus Türlerinin Ekzopolisakkarit (Eps) Üretimi*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 182621)

- Yılmaz, M. & Çelik, G. Y. (2007). Bakteriyel ekstraselüler polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 7-13.
- Yılmaz, M. T. (2014). Ekzopolisakkarit (EPS) üreten laktik asit bakterilerinin bazı gıdaların tekstürel, reolojik ve mikroyapısal özelliklerine etkisi.
- Yılmaz, M. T., İspirli, H., Taylan, O. & Dertli, E. (2020). Synthesis and characterisation of alternan-stabilised silver nanoparticles and determination of their antibacterial and antifungal activities against foodborne pathogens and fungi. *LWT*, 128, 109497.
- Zehir, D. (2017). *Tarhanadan izole edilen bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin karakterizasyonu*. (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 474183)

ÖZGEÇMİŞ

....., yılında ilinde dünyaya geldi. Lise eğitimini yılında Lisesi (Y. D. A)' da tamamladıktan sonra bazı özel firmalarda çalıştı ve-.... yılları arasında askerlik görevini yerine getirdi. yılına kadar çeşitli alanlarda ticari girişimlerde bulunduktan sonra eğitim hayatına yılı ayında tekrar döndü. yılında Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başladığı öğrenimini yılında tamamlayarak mezun oldu. Aynı yıl Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsünde yüksek lisansa başladı.

