



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

100/2000 BİYOMALZEME VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

DOKTORA PROGRAMI

**PROBİYOTİK BAKTERİLERDEN İZOLE EDİLEN
EKSOPOLİSAKKARİTLERİN BİYOMALZEME OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Ahmet Turan DEMİR

Danışman: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

TOKAT-2022



“Bu tez çalışması; YÖK 100/2000 Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Alanı dâhilinde 100/2000 Doktora Bursu ile YÖK tarafından desteklenmiştir.”

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Probiyotik Bakterilerden İzole Edilen Eksopolisakkaritlerin Biyomalzeme Olarak Değerlendirilmesi” adlı Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

17/11/2022

Ahmet Turan DEMİR



JÜRİ KABUL VE ONAY

Ahmet Turan DEMİR tarafından hazırlanan “**Probiyotik Bakterilerden İzole Edilen Eksopolisakkaritlerin Biyomalzeme Olarak Değerlendirilmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17/11/2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan)

Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Prof.Dr. Ramazan ERENLER
İğdır Üniversitesi

.....

Üye

Doç. Dr. Sinan EĞRİ
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Doç.Dr. Ercan ÇAÇAN
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Doç. Dr. Ahmet ALTUN
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

.....

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü
.../.../2022

İTHAF



Yaluzca Anneme...

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Tam akademiden umutlarımı kestiğim zamanda karşıma çıkan ve sadece danışmanlığımı üstlenip beni bilim dünyasının daha önce görmediğim sahalarına kanalize etmekle kalmayıp, aynı zamanda hayatıma yeni bir pencere açmama vesile olan, her zaman en güncel, en ilgi çekici konularla daha donanımlı olmamı sağlayan ve bu tez çalışmasında da çok farklı düşünceleri ile akademisyen olma hayali taşıyan bana, bir akademisyende olması gerekenlerin neler olduğunu öğreten, kendisine olan saygı ve sevgimi bu satırlara sığdıramayacağım çok kıymetli, saygıdeğer Danışmanım Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ders aşamasındayken kendisinden almış olduğum Biyomalzemeler dersi ile bana yeni ufukların kapısını açan ve eğer bir gün akademisyen olma hayalimi gerçekleştirebilirim kendisi kadar olmasa da benzer şekilde ders anlatmaya çalışacağım saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Sinan EĞRİ'ye çok teşekkür ederim. Kendisi ile tanıştığım günü milat bildiğim, bana maddi-manevi her zaman destek olan, akademik hayatımın her safhasında emeği olan, rol modelim saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bilimin ve bilim insanının her zaman yanında olan, YÖK 100/2000 Doktora Bursu ile desteklerinden dolayı YÖK'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım anneme ve aileme sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız.

Son olarak bu tez çalışması ile doğal kaynaklardan elde edilen eksopolisakkaritlerle biyonanoteknolojinin harmanlanması sonucunda konu ile ilgili literatüre farklı bir yaklaşım kazandırıldığı inancını taşıyorum. Konu ile ilgilenen herkese faydalı olması ümidi ile...

ÖZET

PROBİYOTİK BAKTERİLERDEN İZOLE EDİLEN EKSOPLİSAKKARİTLERİN BİYOMALZEME OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

DEMİR, Ahmet Turan

Doktora, Biyomühendislik ABD.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

Kasım 2022, xx + 102 sayfa

COVID-19 da dâhil olmak üzere birçok metabolik hastalıkla ilişkili olan obezite, dünya çapında bir salgın haline gelmiştir. Probiyotiklerin gastrointestinal (GI) sağlığı destekleme yeteneği yıllardır bilinmektedir. GI sistemine yapılan bir müdahale ile obeziteye karşı alternatif yaklaşımlar geliştirilebildiğinden, mevcut çalışmanın amacı, probiyotik özelliklere sahip doğal ürünlerden izole edilen eksopolisakkaritlerin (EPS) hem tek başına hem de bir anti-obezite biyomateryali olarak gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) ile kompleks halinde etkilerini belirlemektir. İlk olarak, bir fenol-sülfürik asit tekniği kullanılarak, en büyük EPS miktarı, probiyotik niteliklere sahip olduğu bilinen 10 malzeme örneğinde bulundu. Daha sonra bu seçilen EPS'nin monosakkarit bileşimi ve fonksiyonel grupları ile birlikte seçilen bu örnekteki mikroorganizmanın tanımlanması gerçekleştirildi. EPS'nin ortalama moleküler ağırlık dağılımı da araştırıldı. EPS-AgNP biyosentez optimizasyon işlemlerinden sonra EPS-AgNP'lerin optik, bileşimsel ve morfolojik analizleri yapıldı. Böylece EPS-AgNP ile EPS'nin adipogenez süreci üzerindeki etkisi 3T3 hücre hattı üzerinde gerçekleştirildi ve hücre kültürü teknikleri ile kontrol olarak $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ ile karşılaştırıldı. Uygulanan ajanların adipogeneze olan etkileri, Oil Red O boyaması ile kalitatif olarak gözlemlendi. Ayrıca, hücrelerdeki triağılgiserol (TAG) miktarı incelendi. Sonuçlar, en yüksek EPS (2.25 mM) ve EPS-AgNP (1.25 mM) konsantrasyonlarının, kontrole kıyasla adipogenezi sırasıyla %75 ve %85 oranında azalttığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Eksopolisakkarit, Probiyotik, Gümüş Nanopartikül

ABSTRACT

EVALUATION OF EXOPOLYSACCHARIDES ISOLATED FROM PROBIOTIC BACTERIA AS A BIOMATERIAL

DEMİR, Ahmet Turan

Doctorate Thesis, Department of Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

November 2022, xx + 102 pages

Obesity, which is associated with many metabolic diseases, including COVID-19, has become a worldwide epidemic. The ability of probiotics to support gastrointestinal (GI) health has been known for years. Since alternative approaches against obesity can be developed with an intervention to the GI system, the current study's objective is to determine the impacts of the exopolysaccharides (EPS)s isolated from natural products with probiotic characteristics, both alone and in complex with silver nanoparticles (AgNPs) as an anti-obesity biomaterial. First, using a phenol-sulfuric acid technique, the greatest EPS quantity was found in 10 material samples known to have probiotic qualities. Then, the identification of the microorganism in this chosen sample was performed along with the monosaccharide composition and functional groups of this chosen EPS. The average molecular weight distribution of EPS was also investigated. After the EPS-AgNP biosynthesis optimization processes, optical, compositional, and morphological analyzes of EPS-AgNPs were performed. Thus, the effect of EPS-AgNP and EPS on the adipogenesis process was performed on the 3T3 cell line and compared to control $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ by cell culture techniques. The effects of applied agents on adipogenesis were qualitatively observed with Oil Red O painting. Furthermore, the quantity of triacylglycerol (TAG) in cells was examined. The results demonstrated that the highest concentrations of EPS (2.25 mM) and EPS-AgNP (1.25 mM) decreased adipogenesis by 75% and 85%, respectively, in comparison to the control.

Keywords: Exopolysaccharide, Probiotic, Silver Nanoparticle

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
SİMGE ve KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ/GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Polisakkaritler	4
2.2. Bakteriyel Polisakkaritler	7
2.3. Eksopolisakkarit (EPS)'ler	9
2.4. Probiyotikler	17
2.4.1. LAB'leri tarafından EPS'lerin biyosentezi.....	20
2.5. EPS ile İlgili Önceki Çalışmalar.....	23
2.6. Nanoteknoloji.....	29
2.6.1. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen nanopartiküller	36
2.6.2. Metalik nanopartiküller.....	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM	45
3.1. Araştırmada Kullanılan Materyaller	45
3.1.1. Araştırma kullanılan mikroorganizmalar.....	45
3.1.2. Araştırmalarda kullanılan cihazlar.....	45
3.1.3. Araştırmalarda kullanılan kimyasallar, kitler, sarf malzemeler.....	46
3.1.4. Araştırmalarda kullanılan besiyerleri ve çözetilerin hazırlanması.....	47
3.2. Yöntem.....	49
3.2.1. EPS üretim koşullarının belirlenmesi	49
3.2.2. LAB'lerinden hücre ekstraktının hazırlanması.....	50
3.2.3. EPS'nin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	50
3.2.4. EPS saflığının kontrolü.....	50

3.2.5. Monosakkarit bileşimlerinin belirlenmesi	51
3.2.6. Fourier-Transformed Infrared (FT-IR) spektroskopisi	51
3.2.7. Molekül ağırlık tayini	52
3.2.8. EPS üretilen mikroorganizmanın identifikasyonu	52
3.2.9. EPS-AgNP'lerinin sentez ve optimizasyonu	53
3.2.10. EPS-AgNP'lerinin karakterizasyonu	54
3.2.11. Hücre kültürü araştırmaları	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	59
4.1. EPS Üretim Koşullarının Belirlenmesi	59
4.2. EPS Saflığının Kontrolü	59
4.3. Monosakkarit Bileşimlerinin Belirlenmesi	62
4.4. FT-IR Spektroskopisi	62
4.5. Molekül Ağırlık Tayini	63
4.6. EPS Üretilen Mikroorganizmanın Identifikasyonu	64
4.7. EPS-AgNP'lerinin Sentez ve Optimizasyonu	66
4.8. EPS-AgNP'lerinin Karakterizasyonu	70
4.8.1. Kolorimetrik analiz	70
4.8.2. UV-görünür spektroskopisi	70
4.8.3. Partikül boyutu dağılımı ve ζ potansiyeli ölçümü	71
4.8.4. AFM analizi	71
4.8.5. SEM analizi	73
4.8.6. XRD analizi	74
4.8.7. TG/DTA analizi	75
4.9. Hücre Kültürü Araştırmaları	77
4.9.1. Adiposit hücrelere farklılaşma	77
4.9.2. Oil Red O boyama	77
4.9.3. TAG analizi	78
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
6. KAYNAKLAR	84
7. EKLER	99
7.1. MALDI TOF MS Rapor Sonucu	99
7.2. 16S rRNA Sekans Bilgisi	100

7.3. <i>L. plantarum</i> Filogenetik Ağacı.....	101
---	-----



ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Polisakkarit formasyonu	4
Şekil 2.2. Nişasta, selüloz, glikojen, dekstran kimyasal yapıları.....	6
Şekil 2.3. 1→4 ve 1→6 glikozidik bağların etrafındaki rotasyonlar.....	6
Şekil 2.4. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen polisakkaritlerin hücresel konumları	8
Şekil 2.5. Probiyotikler ve sağlığı destekleyici etkileri	18
Şekil 2.6. LAB hücresinde HoPS'lerin biyosentezi.....	21
Şekil 2.7. HePS biyosentezinin ana hatları	22
Şekil 2.8. Doğrusal olmayan bir ölçeğe sahip malzeme-zaman ilişkisi.....	30
Şekil 2.9. AuNP biyosentezi için varsayımsal mekanizma	39
Şekil 4.1. Fenol-sülfürik asit yöntemi ile glukoz standart grafiği	60
Şekil 4.2. Bradford yöntemi ile protein standart grafiği	61
Şekil 4.3. EPS'nin HPLC kromatogramı	62
Şekil 4.4. EPS'nin FT-IR spektrumu	63
Şekil 4.5. EPS'nin jel geçirgenlik kromatografisi	64
Şekil 4.6. 7 numaralı örneğe ait tek koloniler	65
Şekil 4.7. Bioedit yazılımı ile dizi sekanslama.....	65
Şekil 4.8. Genbank Nucleotide BLAST sonuçları.....	66
Şekil 4.9. Optimizasyonda karıştırma hızının etkisi	66
Şekil 4.10. Optimizasyonda EPS konsantrasyonunun etkisi	67
Şekil 4.11. Optimizasyonda AgNO ₃ konsantrasyonunun etkisi.....	68
Şekil 4.12. Optimizasyonda inkübasyon süresinin etkisi	68
Şekil 4.13. Optimizasyonda sıcaklığın etkisi.....	69
Şekil 4.14. EPS ve EPS-AgNP kompleksine ait spektrumlar.....	69
Şekil 4.15. Renk değişiminin görsel olarak gözlemlenmesi.....	70
Şekil 4.16. EPS-AgNP'lerin partikül boyutu dağılımı ve ζ potansiyeli.....	71
Şekil 4.17. EPS-AgNP'lerin AFM mikrografları	73
Şekil 4.18. EPS-AgNP'lerin SEM görüntüleri	73
Şekil 4.19. EPS-AgNP'lerin XRD difraktogramı	75

Şekil 4.20. EPS-AgNP'lerin TGA eğrisi	76
Şekil 4.21. EPS-AgNP'lerin DTA eğrisi	76
Şekil 4.22. 3T3 hücrelerinin adiposit hücrelere farklılaşması	77
Şekil 4.23. Hücrelerin Oil Red O boyanması	78
Şekil 4.24. TAG standartlarının grafiği	78
Şekil 4.25. 3T3 hücrel TAG seviyeleri.....	79



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyofilmlerde EPS'lere atfedilen rollerden bazıları	10
Çizelge 2.2. Bakteri biyofilmleriyle ilişkili bazı insan hastalıkları	11
Çizelge 2.3. Bazı bakteriyel EPS'lerin fonksiyonel özellikleri	12
Çizelge 2.4. Ticari tıbbi uygulamaları kabul edilen mikrobiyal EPS'ler.....	16
Çizelge 2.5. Nanomalzemelerin boyutlarına göre sınıflandırılması	31
Çizelge 2.6. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen metal nanopartiküller.....	40
Çizelge 3.1. Araştırmalarda kullanılan cihazlar.....	45
Çizelge 3.2. Araştırmalarda kullanılan kimyasallar, kitler, sarf malzemeler	46
Çizelge 3.3. TAG standartlarının hazırlanması.....	58
Çizelge 4.1. Materyal örneklerinin bazı inkübasyon değerleri	59
Çizelge 4.2. Materyal örneklerindeki EPS ve protein miktarları.....	61
Çizelge 4.3. EPS'nin moleküler ağırlığı ve bağlı molekül ağırlık dağılımı.....	64
Çizelge 4.4. EPS konsantrasyonu için $\lambda_{\max}$ ve absorbens değerleri	67
Çizelge 4.5. AgNO_3 konsantrasyonu için $\lambda_{\max}$ ve absorbens değerleri.....	67
Çizelge 4.6. İnkübasyon süresi için $\lambda_{\max}$ ve absorbens değerleri	68
Çizelge 4.7. Sıcaklık için $\lambda_{\max}$ ve absorbens değerleri	69
Çizelge 4.8. d-aralığından pik indeksleme.....	74
Çizelge 4.9. EPS-AgNP'lerin fizikokimyasal verileri	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
M_w	Ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
α	Alfa
Au	Altın
Al	Alüminyum
Å	Ångström
N_2	Azot
R_{ku}	Basıklık
β	Beta
2θ	Bragg açısı
Hg	Cıva
R_{sk}	Çarpıklık
Da	Dalton
°	Derece
R^2	Determinasyon katsayısı
d_{hkl}	Düzlemler arası mesafeler
R_v	En derin vadi derinliği
R_p	En yüksek tepe yüksekliği
ΔH_{erime}	Erime entalpisi

T_f	Erimeyenin tamamlandığı sıcaklık
T_i	Erimeye başlama sıcaklığı
P	Fosfat
Φ	Fi
k	Geometrik faktör
Ag	Gümüş
$AgNO_3$	Gümüş nitrat
v/v	Hacim/hacim
Hz	Hertz
HCl	Hidroklorik asit
C_p	Isı kapasitesi
J	Joule
Cd	Kadmiyum
$CdSO_3$	Kadmiyum sülfat
CdTe	Kadmiyum tellürit
a	Kafes parametresi
CO_2	Karbondiyoksit
COO^-	Karbonil
R_q	Kök ortalama kare pürüzlülüğü
r	Kristalit yarıçapı

$\Delta H_{\text{kristal.}}$	Kristalleşme entalpisi
<	Küçüktür
w/v	Kütle/hacim
λ	Lambda
Mg^{2+}	Magnezyum katyonu
λ_{max}	Maksimum absorbansın kaydedildiği dalga boyu
$\text{M}\Omega$	Megaohm
(h k l)	Miller indisleri
N	Normal(ite)
O_2	Oksijen
R_a	Ortalama pürüzlülük
Pd	Paladyum
Pt	Platin
M_p	Pik konum molekül ağırlığı
KBr	Potasyum bromür
Ψ	Psi
R	Pürüzlülük parametresi
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
M_n	Sayica-ortalama molekül ağırlığı
$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	Sinnamik asit

Na^+	Sodyum katyonu
NaN_3	Sodyum azid
NaBr	Sodyum Bromür
NaOH	Sodyum hidroksit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
H_2SO_4	Sülfürik asit
R_{pv}	Toplam pürüzlülük
U	Ünite
V	Volt
~	Yaklaşık
%	Yüzde
ζ	Zeta
M_z	z-ortalama molekül ağırlığı
R_z	10 nokta yüksekliği
$T_{\%50}$	%50'lik kütle kaybı sıcaklığı
$T_{\%10}$	%10'luk kütle kaybı sıcaklığı

Kısaltmalar

Açıklama

Abs

Absorbans

A549	Adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücreleri
AuNP	Altın nanopartikül
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AFM	Atomik Güç Mikroskobu
AB	Avrupa Birliği
xg	Bağıl Santrifüj Kuvveti (RCF)
<i>B</i>	<i>Bifidobacterium</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DEX	Deksametazon
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dTDP	Deoksitimidin difosfat
dl	Desilitre
DMSO	Dimetil sülfoksit
D-Gal	D-galaktoz
D-Glc	D-glukoz
TGP	dTDP-glukoz pirofosfoliraz

TRS	dTDP-ramnoz sentetik enzim sistemi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EPS	Eksopolisakkarit
EPS-AgNP	Eksopolisakkarit-Gümüş nanopartikül
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EP	European Pharmacopeia
3T3	Fare embriyonik fibroblast hücreleri
FBS	Fetal Bovine Serum
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
PMI	Fosfomannoizomeraz
PMM	Fosfomannomutaz
FT-IR	Fourier-Transformed Infrared
FTF	Fruktosiltransferaz
AGS	Gastrik adenokarsinom hücreleri
GPC	Gel Permeation Chromatography
CGPM	General Conference on Weights and Measures
AgNP	Gümüş nanopartikül
BGC-823	Gastrik kanser hücreleri

GI	Gastrointestinal
GMP	GDP-mannoz pirofosfoliraz
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
GRAS	Generally Recognised as Safe
GTF	Glikosiltransferaz
GlcA	Glukuronik asit
GSH	Glutasyon
GDP	Guanozin difosfat
H22	Hepatom 22
HepG2/C3A	Hepatoselüler kanser hücre hattı
HePS	Heteropolisakkarit
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HoPS	Homopolisakkarit
IBMX	İzobütilmetilksantin
İPA	İzopropanol
JP	Japan Pharmacopeias
KPS	Kapsüler polisakkarit
kV	Kilovolt
cos	Kosinüs
Lab	Laboratuvar

<i>L</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>LLA</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LAB	Laktik asit bakteri
<i>Leuc</i>	<i>Leuconostoc</i>
Ltd	Limitet
l	Litre
L-Rha	L-ramnoz
max	Maksimum
Mlz	Malzeme
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MALDI TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MCF-7	Meme adenokarsinomu
MDI	Metilizobutilksantin Deksametazon Insulin
MEM	Mikro Elektro Mekanik
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µm ²	Mikrometre kare
mA	Miliamper

mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
GlcNAc	N-asetilglukozamin
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
NF	National Formulary
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NR	Nitrat Redüktaz
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate Buffered Saline
PES	Polietersülfon
PCR	Polymerase Chain Reaction

PDF	Powder Diffraction File
pH	Power of hydrogen
p	Probability
rpm	Revolutions Per Minute
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sa	Saat
SDM	Sakkaroz-türevli monosakkarit
San	Sanayi
sn	Saniye
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
S180	Sarkoma 180
sin	Sinüs
SCC7	Skvamöz hücreli karsinom
sp	Species
spp	Species pulural
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
<i>Strep</i>	<i>Streptococcus</i>
subsp	Subspecies
Şti	Şirket

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TG/DTA	Termogravimetrik/Diferansiyel Termal Analizi
3D	Three Dimensional
Tic	Ticaret
TOF	Time of Flight
TDP	Timidin difosfat
TLR2	Toll-like receptor2
TAG	Triasilgliserol
UGE	UDP-galaktoz 4-epimeraz
UGP	UDP-glukoz pirofosfoliraz
USP	United States Pharmacopeia
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
UDP	Üridin difosfat
vb	Ve benzeri
WHO	World Health Organization
XRD	X Işını Difraktometresi
Cu/K α	X ışını radyasyon kaynağı
YPR	Yüzey Plazmon Rezonans
yy	Yüzyıl
PGM	α -fosfoglukomutaz

1. GİRİŞ

Son yıllarda probiyotik karakteristikteki mikroorganizmalara olan artan ilgi, bilim dünyasının bu mikroorganizmalar üzerinde daha fazla mesai harcamasını tetiklemiş, bunları yalnızca biyoloji, kimya gibi temel bilimler değil aynı zamanda da tıp, mühendislik başta olmak üzere çok geniş alanlar için odak noktası haline getirmiştir. Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı şekilde konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır (WHO, 2006). Probiyotiklerin mikroskobik, genellikle bakteri olan canlı organizmalar oldukları ancak mayalar gibi organizmaların da bu çatı altında toplanabileceği belirtilmiştir (Anonim, 2019). Potansiyel olarak faydalı mikroorganizmalar, bifidobakteriler ve laktik asit bakteri (LAB)'leri, özellikle *Lactobacillus (L.) gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* ve *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella* sp., *Bifidobacterium (B.) infantis*, *B. breve*, *B. longum* ve *B. adolescentis* dâhil olmak üzere bazı bakteri ve maya türlerini içermektedir (Matsuki ve ark., 1999; Gerez ve ark., 2008; Khedid, ve ark., 2009; Onyibe ve ark., 2013). Probiyotikler çeşitli endüstriyel gıda takviyelerden ve bakteriyel fermantasyonla hazırlanmış gıdalardan alınabilmektedir. Probiyotik gıdalar arasında yoğurt, peynir, kefir, lahana turşusu, tempeh (fermente soya fasulyesi) ve kimchi (Kore yemeği)'nin bulunduğu bildirilmiştir (Asghar ve ark., 2017). Probiyotiklerin; zararlı bakterilerin bağırsak astarına yapışmasını önlemek, bağırsak mukusu oluşturmak ve enfeksiyona karşı bir bariyer görevi görmek için hücrelere sinyaller göndermek, belirli bakteriler tarafından salınan toksinlerin durdurulması, diğer iyi bakterilerin gelişimini teşvik etmek gibi son derece önemli fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Anonim, 2019). Bakterilerin yüzey kolonizasyonunda, hücreler arası bağlantılarda (cell junction), hücre-hücre, hücre-çevre etkileşimlerinde, su eksikliği gibi olumsuz çevre ortamlarında sağ kalımda, hücrenin mekanik stabilitesinin sağlanmasında, hücreye karbon, azot ve fosfor içeren bileşiklerin kaynağı olarak kullanılmasında, hücrenin enfeksiyon sırasında spesifik olmayan ve spesifik konakçı savunmalara direnç göstermesinde, bazı fagositik protozoalara karşı savunmada, hücresel metabolitlerin dönüşümünde rol oynayan ve hücre tarafından sentezlenen ve dış ortama salgılanan veya hücre duvarı enzimleri tarafından tamamen hücre dışı sentezlenen bakteriyel polisakkaritler, eksopolisakkarit (EPS)'ler olarak bilinmektedir

(Nwodo ve ark., 2012). LAB'leri tarafından üretilen EPS'ler, mikroorganizmaların gıda sınıfında olmasından dolayı "generally recognised as safe-genellikle güvenli olarak kabul edilen" (GRAS) statüsünü taşırlar ve bu da onları sentetik muadillerine kıyasla çok daha elverişli hale getirmektedir. LAB'lerinden EPS üretiminde en yaygın olarak kullanılan suşlar arasında *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis* ve *Bifidobacterium* cinsinden çeşitli türlerin bulunduğu ve bir *Lactobacillus* türünün *Bifidobacteria* suşu ile birlikte kültüre edilmesinin de pratikte yaygın olduğu rapor edilmiştir (Narvhus ve Axelsson, 2003).

Gerek bilim camiası gerekse sosyal hayatta insanlar, şu anda multidisipliner bir teknolojinin, "nanoteknoloji"nin muhteşem bir ivme ile ilerlemesine ve gelişimine tanık olmaktadır. 1 ile 100 nm arasındaki maddeyi anlamak ve manipüle etmek nanoteknoloji olarak bilinir ve burada kendine özgü dinamikler sayesinde yeni uygulamalar oluşturulabilir. Bir nanometre, metrenin 10^{-9} 'u kadardır. Bu seviyede, malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, hem münferit atomların ve moleküllerin hem de maddelerin kütle/yığın özelliklerinden temel ve değerli şekillerde farklılıklar gösterebilmektedir. Makro boyutta altın (Au), sarı renkte iken AuNP'lerin kolloidali yakut kırmızısıdır (Filipponi ve Sutherland, 2012). AuNP boyutu küçüldükçe ve yüzey alanı/hacim oranı arttıkça ferromanyetizma olasılığı da artmaktadır. Bu karakteristiğin temel nedeni de tam olarak malzeme boyutundaki düşüş ile yüzey alanı-hacim oranındaki artıştır (Theivasanthi ve Alagar, 2011). Nanoteknoloji, bu yeni özelliklerden yararlanan gelişmiş malzemeleri, cihazları ve sistemleri anlamaya ve oluşturmaya yönelik yaklaşımlar sunmaktadır. Bu yaklaşımlardan bir tanesi de bilim insanlarının dikkatini çeken mikroorganizmaların doğal, temiz, non-toksik ve çevre dostu metal nanopartikül (NP)'leri oluşturma yetenekleri olmuştur. Bu NP'lerin mikrobiyal sentezi, biyoteknoloji ve nanoteknolojiyi birbirine bağlayan nanobiyoteknoloji olarak umut verici, yeni bir araştırma alanını doğurmuştur. Tıpta nanobiyoteknoloji kullanımı da nanotıp olarak addedilebilir. Nanotıp, terapötik amaçlar doğrultusunda moleküler ölçekte son derece spesifik tıbbi müdahaleye ve hızlı izleme, hedefe yönelik kanser tedavileri, lokalize ilaç taşınımı, geliştirilmiş hücre-malzeme etkileşimleri, doku mühendisliği ve gen taşıma sistemlerinde iskeleler için tanı ve teşhislerin geliştirilmesine katkıda bulunan nanoteknolojinin bir dalıdır. Nihai olarak

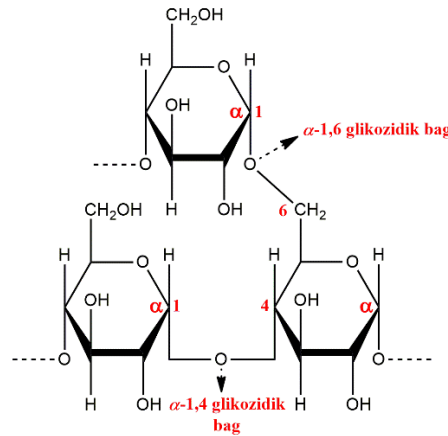
hastaların bu yeni teknolojilerden yararlanabileceği nanotıpta başarılı araştırma ve geliştirmenin, malzeme bilimi ve mühendisliği, hücresel biyoloji ve klinik translasyon araştırması dâhil olmak üzere çok sayıda disiplinin etkileşimini gerektireceği kaçınılmazdır. Birçok bilimsel ve ekonomik faaliyetin tıbbi araştırma ve geliştirmeyi hızlandırması insanlık tarihinde her zaman büyük beklentilere sahne olmuştur. Çoğu tıbbi yaklaşım mikro-nano boyutta son gelişmelerden her zaman yararlanmıştır, yararlanmaktadır ve yararlanacaktır.

Nanomalzemeler ve biyolojik yapılar yaklaşık olarak aynı boyutta olduklarından analitik, tanısal ve terapötik uygulamalar için biyolojik sistemler ve nanomalzemeler arasında benzersiz etkileşimlere izin verebileceği düşüncesinden hareket ederek biyonanoteknolojik bir yaklaşımla bu tez çalışmasında probiyotik karakteristiğe sahip doğal ürünlerden izole edilen EPS'lerin tek başına ve gümüş nanopartikül (AgNP)'lerle oluşturduğu EPS-AgNP kompleksinin konaktaki lipid metabolizmasını işlevsel olarak düzenleyip düzenleyemeyeceği *in vitro* 3T3 fare fibroblast hücrelerinin adipogenezi üzerine etkileri karşılaştırmalı değerlendirmelerle araştırılmıştır. Literatürde EPS üreten bakterilerin daha iyi probiyotik özelliklere sahip olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, izole edilmiş EPS ile EPS üreticisinin kıyaslandığı çalışmalara rastlanılmamıştır. Ayrıca NP sentezi aşamasında mevcut çalışmalar NP'lerin mikroorganizmalar tarafından sentezlendiğini gösterirken bu tez çalışmasında hücresizleştirilmiş EPS ile bir metal NP olan AgNP'lerin sentezine farklı bir yaklaşım kazandırılması amaçlanmıştır. Böylece biyoyumlu, biyobozunur bir kompleksin sentezi ile bu konuya olan güncel yaklaşımlara yeni bir boyut kazandırılacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ/GENEL BİLGİLER

2.1. Polisakkaritler

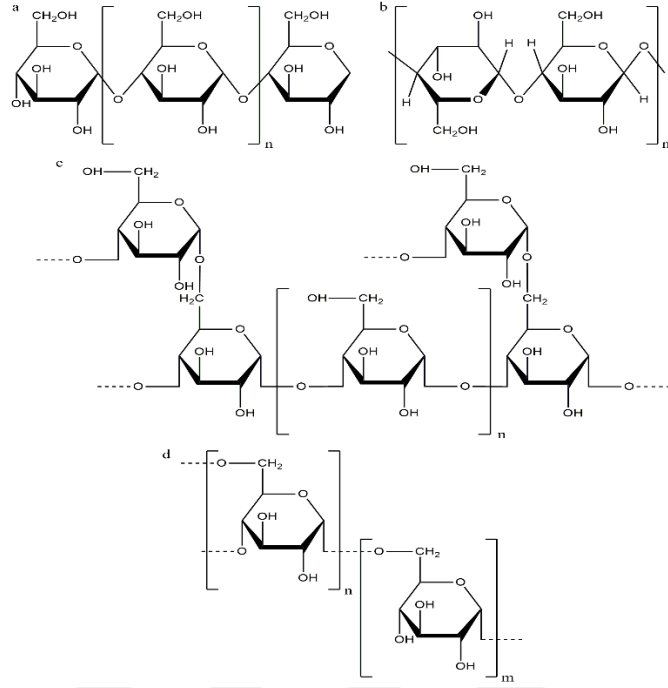
Polisakkaritler, karbohidratlar olarak bilinen genel biyomolekül sınıfına aittir. Polisakkaritler (yunanca poli-çok), yüksek moleküler ağırlığına (bir milyona kadar) sahip monosakkarit birimlerinin polimerleridir. Tabiattaki karbohidratların çoğu orta-yüksek moleküler ağırlığına sahip polimer yapıda polisakkaritler olarak bulunmaktadır (Nelson ve Cox, 2004). Polisakkaritler, glikozidik bağlarla bir arada tutulan monosakkaritlerin veya türevlerinin tekrar birimlerinden oluşur (Satyanarayana ve Chakrapani, 2013). 10'dan fazla monosakkarit birimine sahip bir polimere de polisakkarit denilmektedir. Bağ, alfa (α -) veya beta (β -) konfigürasyonuna sahip ve örneğin D-glukozun C-2, C-3, C-4 veya C-6'sındaki alkol gruplarından herhangi biri için olabilir. Zincir lineer veya dallanmış yapıdadır. Dallar; tek monosakkarit birimlerinin aynı sayıda iki veya daha fazla monosakkarit biriminin zincirleri veya değişken sayıda monosakkarit biriminin zincirleri olabilir (Robyt, 1998). Örneğin α -1,4-glikozidik bağlarla birleştirilen iki glukoz molekülü zinciri, α -1,6-glikozidik bir bağ ile bağlanarak bir dal noktası oluşturur. Böyle bir glikozidik bağ, yaklaşık olarak her 10 glukoz biriminde oluşur ve hayvansal bir polisakkarit olan glikojeni oldukça dallanmış bir molekül haline getirir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Polisakkarit formasyonu

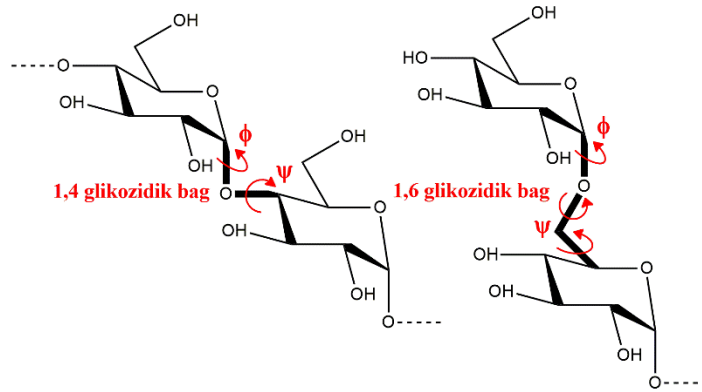
İki tip polisakkarit vardır. Bunlar; sadece bir tür monosakkarit yapı taşı içeren homopolisakkarit (HoPS)'ler ile iki veya daha fazla farklı türde monosakkarit yapı taşı içeren heteropolisakkarit (HePS)'lerdir (Berg ve ark., 2015). HoPS'ler, monosakkarit

birimlerini birleştiren glikozidik bağların tip(ler)ine göre daha da bölünebilir. Bağlantılar, tek bir konuma (herhangi bir dal bağlantısı hariç) α - veya β -konfigürasyonlu homo-bağlar olabilir. Yani, polisakkarit, α -1 $\rightarrow$ 3, α -1 $\rightarrow$ 4 ve benzeri (vb.) veya β -1 $\rightarrow$ 3, β -1 $\rightarrow$ 4 vb. bir tür bağla bağlanmış tek bir monosakkarit türüne sahip olacaktır. HoPS'ler, α - ve β -konfigürasyonlarının bir karışımı ve/veya bir pozisyon karışımı ile hetero-bağlara sahip olabilir. Yani, hetero-bağları olan HoPS'ler, α -1 $\rightarrow$ 4 ve β -1 $\rightarrow$ 4 veya α -1 $\rightarrow$ 4 ve α -1 $\rightarrow$ 6 veya α -1 $\rightarrow$ 4 ve β -1 $\rightarrow$ 6 vb. bağlantılı tek bir monosakkarit birimine sahip olacaktır. Bu nedenle, bir HoPS, değişen α -1 $\rightarrow$ 4 ve β -1 $\rightarrow$ 4 bağları ile hetero-bağlanabilir veya değişen α -1 $\rightarrow$ 6 ve α -1 $\rightarrow$ 3 bağları ile hetero-bağlanabilir veya iki α -1 $\rightarrow$ 4 bağlantı ve bir α -1 $\rightarrow$ 6 bağlantı tekrar eden bir diziye sahip olabilir. Bu nedenle, çok çeşitli yapıdaki HoPS'leri vermek için α - ve β -konfigürasyonlarının ve bağlantı konumlarının birçok farklı kombinasyonu mümkündür. HePS'ler aynı tür bağlantı çeşitliliğine sahip olabilir, ancak farklı bağlantı türleri, bir veya daha fazla farklı monosakkarit birimi türü ile ilişkilendirilebilir ve bu da HePS'lere neredeyse sonsuz bir yapı çeşitliliği derecesi kazandırır. Bu nedenle polisakkaritler, yalnızca farklı monosakkarit birimi dizilerine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda farklı glikozidik bağlantı dizilerine de sahip olabilirler. Bu monosakkarit ve bağlantı dizisi çeşitliliği üzerine bindirilmiş, yukarıda bahsedildiği gibi farklı dallanma türleri vardır. Bu, polisakkaritler ve bunların yapı-fonksiyon ilişkileri için çok yüksek derecede çeşitlilik olasılığına izin vermektedir. Ayrıca polisakkaritler; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da dâhil olmak üzere çok çeşitli türler tarafınca üretildikleri için muazzam bir yapısal çeşitlilik sergileyebilirler. Bitkilerin çoğunda D-glukozun depolanma şekli nişasta olurken hayvanlarda fazla D-glukoz, glikojen denilen büyük, dallanmış bir polisakkarit olarak depo edilmektedir. D-glukoz, bakteri ve maya özelinde dekstran adı verilen başka bir polisakkarit türü olarak depolanır. Her bir durumda bunlar besin rezervleri olduklarından organizma için gerekli durumlarda parçalanırlar ve monosakkarit ürünleri metabolize edilerek enerji elde edilir. Dünyada en bol bulunan, bitkisel hücre duvarlarının yapısına katılan selüloz ise diğer üçünden farklı olarak yapısal bir polisakkarittir. Bu dört polisakkarit, en yaygın olanlarıdır ve hepsinin tekrarlayan D-glukoz monosakkarit birim zincirleri ve bunların da bazı dallanmaları vardır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. a. Nişasta, b. selüloz, c. glikojen, d. dekstran kimyasal yapıları

Bir polisakkarit içerisindeki tek tek monosakkarit rezidülerinin birleşimi nispeten sabittir. Bununla birlikte, glikozidik bağlantı ile birleştirilen rezidüler, farklı zincir konformasyonları vermek üzere bağlar etrafında dönebilir. İkincil bir alkol grubuna glikozidik bağlantı, monosakkarit rezidülerinin etrafında dönebileceği iki bağa sahiptir ve bir birincil alkol grubuna olan glikozidik bağlantı, çevresinde monosakkarit rezidülerinin dönebileceği üç bağa sahiptir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 1→4 ve 1→6 glikozidik bağların etrafındaki rotasyonlar

Polisakkaritlerin en sık gözlenen ikincil ve üçüncül yapıları tek ve çift sarmal yapılarıdır. İkincil ve üçüncül yapılarla sonuçlanan farklı birincil yapı türleri, suda çözünürlük,

agregasyon ve kristalleşme, viskozite, jelleşme, sindirilebilirlik ve biyolojik tanıma gibi farklı türde özellikler verir. Polisakkaritlerin çeşitli biyolojik işlevleri olduğu kabul edilmektedir. Bunlardan bazıları; fotosentez sürecinde güneşten elde edilen kimyasal enerjinin depolanması, bitkilerin ve mikroorganizmaların hücre duvarları, böceklerin ve diğer eklembacaklıların dış iskeletleri için yapısal malzeme, organizmaların, özellikle mikroorganizmaların, sıcaklık, pH ve oksijen (O₂) konsantrasyonundaki değişiklikler gibi ortamdaki değişimlerden korunması (polisakkaritler, yüzeylerindeki O₂'yi absorbe eder ve geçişini engeller, böylece anaerobik bir ortam oluşturur), organizmaların belirli bir çevresel nişe adaptasyonu ve fiksasyonu, organizmaların diğer organizmalar ve virusların istilasından ve immünolojik süreç tarafından istenmeyen tahribata karşı koruma, kan koagülasyonunun veya kurumanın önlenmesi gibi arzu edilen bir durumu üretmek için biyolojik ortamların değiştirilmesi, kasların ve eklemlerin hareketinde kayganlaştırıcı olarak hareket, cilt, kıkırdak ve korneanın yapısı ve enfeksiyon-bağıışıklık, hücre-hücre etkileşimi, reseptör bağlanması ve yanıtında yer alan biyolojik tanıma olarak sıralanabilir (Robyt, 1998).

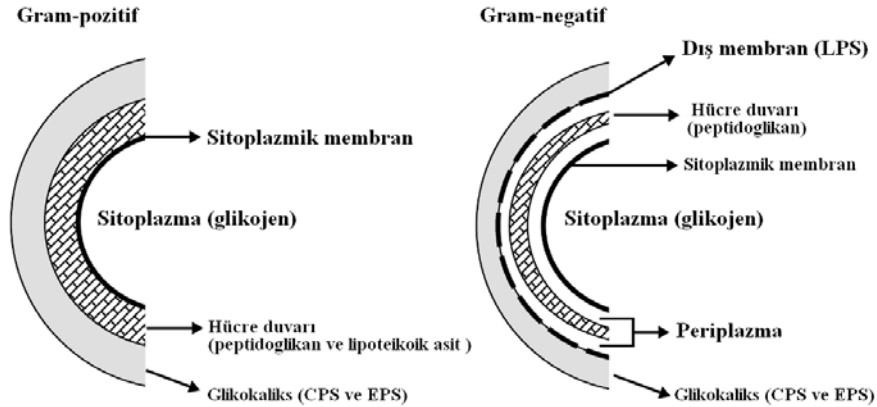
Bu tez çalışmasına konu olan özellikle mikrobiyal polisakkaritler düşünüldüğünde, doğada kelimenin tam anlamıyla yüzlerce farklı polisakkaritin bulunması gayet tabii bir durumdur. Bu anlamda, bilinen polisakkaritlerin tümünün yapısını ve işlevini tanımlamak imkânsızdır.

2.2. Bakteriyel Polisakkaritler

Bir diğer kompleks polisakkaritler de bakteriler tarafından biyosentezlenir. Bakteriler, basit aktive edilmiş monosakkarit substratların kullanımı yoluyla farklı kimyasal özelliklere sahip çok çeşitli polisakkaritler üretirler. Bu polisakkaritlerden bazıları bir dizi farklı bakteride aynı işleve sahipken, diğerleri belirli taksonlara özgüdür ve farklı biyolojik işlevlere hizmet ederler (Anderson ve ark., 1990; Rehm ve Valla, 1997). Hücresel konumlarına göre polisakkaritler hücre içi veya hücre dışı olabilirler. Hücre dışı polisakkaritlerin aralığı çok geniştir ve üç ana sınıfa ayrılabilir; kapsid, kapsüller ve EPS'ler (Cerning, 1995; Rehm, 2010). Ekstrasellüler (hücre dışı) polimerik maddeler, salgı ve mikrokapsüller polisakkaritler olarak adlandırılırlar (Sutherland, 1972). Bunlar hücre duvarında yapısal ve koruyucu amaçlara hizmet ederler. Hücrenin dışında

kovalent olarak bağılı, yapışkan bir tabaka biçimini alabilirler; kapsüler polisakkarit (KPS) olarak adlandırılır ya da çevreye tamamen salgı olarak atılabilir (Cerning, 1995; Ruas-Madiedo ve ark., 2002). Toksik olmayan yapıları nedeniyle, bu hücre dışı polisakkaritlerden bazılarının, tıbbi uygulamalarda, doku mühendisliğinde matrisler, ilaç taşınımı ve yara örtüsü olarak kullanıldığı bilinmektedir. Özellikleri ve kullanılabilirlikleri onları genellikle bitkilerden ve mikro alglerden elde edilen polisakkaritlere kıyasla daha cazip hale getirmektedir (Sutherland, 1998; Otero ve Vincenzini, 2003; Rehm, 2010).

Bakterilerin hücre duvarlarının bir parçası olarak ürettikleri çeşitli polisakkarit yapıda hücre duvarlarının ana bileşeni peptidoglikandır. Peptidoglikan, ağ tarzı bir kafes içindeki sakkarit ve amino asitlerden oluşur. Peptidoglikan yapısında bulunan sakkaritler, N-asetilglukozamin (NAG veya GlcNAc) ve N-asetilmuramik asit (NAM)'tir. Peptidoglikan, bakteri hücresinin plazma zarının dışında ağ benzeri bir tabaka oluşturur. Bilindiği gibi bakteriler hücre duvarlarının yapılarına bağlı olarak Gram-pozitif veya Gram-negatif olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları, Gram-negatif bakterilerden yaklaşık yirmi kat daha fazla peptidoglikandan oluşur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen polisakkaritlerin hücresel konumları (Ruas-Madiedo ve de los Reyes-Gavilán, 2005)

Gram-negatif bakterilerde hücre duvarı ince bir peptidoglikan tabakası ve iki membran (bir fosfolipid, protein ve lipopolisakkarit tabakası içeren bir dış membran-lipit tabakası) ve bir iç membran içerir. Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarı, teikoik asitler olarak bilinen ikinci bir polisakkarit sınıfını kovalent olarak bağlayan kalın bir

peptidoglikan katmanını içerir. Teikoik asitler, peptidoglikan tabakasının NAM'ine bağlanabilir. Bunlar lipitlere sabitlenir ve lipoteikoik asitler olarak ifade edilirken, peptidoglikan katmanına kovalent olarak bağlanan teikoik asitlere duvar teikoik asitleri denilmektedir. Teikoik asidin temel işlevi, magnezyum (Mg^{2+}) ve sodyum (Na^+) gibi katyonları çekerek hücre duvarına rijitlik sağlamaktır. Teikoik asitler genellikle D-alanin ester rezidüleri ile süstitüe edilir (Knox ve Wicken, 1973) ve moleköl zwitteriyonik özellikler verir (Garimella ve ark., 2009). Hücrenin dış yüzeyi bir salgı tabakası ile kaplanır ve sıklıkla polisakkaritlerden oluşur ve bazen bakteriyel glikokaliks olarak adlandırılır. Bu hücre dışı mukoid tabaka, hücre yüzeyine kovalent olarak bağlı bir kapsöl oluşturan KPS'lerden ve hücre yüzeyine emilim yoluyla gevşek bir şekilde tutturulmuş veya çevreye salgılanan bir salgı tabakası oluşturan EPS'lerden oluşur. Eksoselüler polisakkaritlerin üretici mikroorganizma tarafından enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmadığı genel olarak bilinmesine rağmen, bu moleküllerin fizyolojik rolü henüz belirlenmemiştir (Ruas-Madiedo ve de los Reyes-Gavilán, 2005).

2.3. Eksopolisakkarit (EPS)'ler

Sentezlenen ve dış ortama salgılanan veya hücre duvarı enzimleri tarafından tamamen hücre dışı sentezlenen bakteriyel polisakkaritler, EPS'ler olarak bilinmektedir. EPS'ler sıklıkla tekrarlanan bir oligosakkarit yapısından oluşur. Bu kimyasal yapı; işlevselliklerine, moleköl ağırlıklarına (0.5×10^6 - 2.0×10^6 Da) ve sahip oldukları bağlantı türlerine göre sınıflandırılır. Kimyasal bileşim temelinde, EPS aynı tekrarlanan monomerik birimler "HoPS'ler" veya disakkaritlerden heptasakkaritlere kadar değişen farklı tekrarlanan monomerik birimlerden "HePS'ler" oluşabilir. Ayrıca HoPS'ler dört gruba ayrılmıştır: D-glukanlar, β -D-glukanlar, fruktanlar ve poligalaktanlar (Stewart-Tull, 1980). Öte yandan HePS'ler, tekrar eden birimlerinde D-glukoz (D-Glc), D-galaktoz (D-Gal), L-ramnoz (L-Rha) ve bazı durumlarda NAG, N-asetilgalaktozamin (GalNAc) veya glukuronik asit (GlcA) monosakkaritlerinin farklı kombinasyonlarını içerir. Her heksoz, piranoz veya furanoz halka konfigürasyonunu benimseyebilir ve α -veya β -anomerik konfigürasyon ile birkaç olası pozisyonda diğer rezidülere bağlanabilir ve ayrıca fosfat, asetil, gliseröl veya piruvat gibi karbohidrat olmayan süstitüentler içerebilir (Sutherland, 1998). Polimerlerin omurgasındaki monomerik birimler arasındaki bağlar, 1,2; 1,3; 1,4; 1,6 ve aynı zamanda 1,5-bağı galaktofuranozlarda

olduğu gibi bağlanabilir. Üretilen EPS miktarı bakteri türüne göre değişiklik gösterebilir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin veriminde ortamın sıcaklığı, pH'sı, terkihi (karbon/azot kaynağı) ve inkübasyonun süresi gibi önemli fizikokimyasal faktörler rol oynamaktadır (Heumann ve ark., 1994). EPS'ler, bakterilerin agregat oluşturmalarına izin verir (bakteri toplulukları, canlı bir konakçıda polimerler salgılayarak büyür) ve bu agregatlara genellikle biyofilm denilmektedir. Vücuttaki mikrobiyal enfeksiyonların %60-80'inin bir biyofilm olarak büyüyen bakterilerden kaynaklandığı araştırmacılar tarafından tahmin edilmektedir. Dental plak dış biyofilmin tipik bir örneği iken böbrek taşı oluşumu iç biyofilmin örneklerinden biridir. EPS'nin bakteriyel biyofilmlerde oynadığı rollerin bir özeti Çizelge 2.1'de, biyofilm kaynaklı bazı insan hastalıkları Çizelge 2.2'de ve hücrel olarak sentezlenen bakteriyel EPS'lerin bazılarının moleküler ağırlıkları, temel özellikleri, uygulamaları ve bakteriyel suşları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Biyofilmlerde EPS'lere atfedilen rollerden bazıları (Nwodo ve ark., 2012)

Proses	EPS'lerin biyofilmlerle fonksiyonel ilişkisi
Adezyon	EPS'ler, yüzeylerin kolonizasyonu (abiyotik ve biyotik) ve biyofilmlerin uzun süreli bağlanmasında ilk adımlar için hazırlık yapar.
Bakteriyel hücre agregasyonu	Hücreler arasındaki köprü, EPS'ler tarafından etkinleştirilir, böylece bakteri popülasyonunu geçici olarak hareketsizleştirir, daha sonra yüksek hücre yoğunlukları ve hücre-hücre tanınması gelişir.
Su tutma	Hidrofilik EPS'ler yüksek su tutma kabiliyetine sahiptir, böylece biyofilm çevresinde hidratlı bir mikro ortam muhafaza edilir ve bu da su eksikliği olan ortamlarda kurumamanı sağ kalmasına yol açar.
Biyofilmlerin kohezyonu	Nötr ve yüklü EPS'ler, biyofilm mimarisinin mekanik stabilitesine aracılık eden (genellikle çok değerlikli katyonlarla birlikte), biyofilm mimarisini belirleyen ve hücre-hücre iletişimine izin veren hidratlı bir polimer ağı (biyofilm matrisi) oluşturur.
Besin kaynağı	EPS'ler biyofilm topluluğu tarafından kullanılmak üzere karbon, azot ve fosfor içeren bileşiklerin kaynağı olarak hizmet vermektedir.
Koruyucu bariyer	EPS'ler, enfeksiyon sırasında spesifik olmayan ve spesifik konakçı savunmalara direnç kazandırır, çeşitli antimikrobiyal ajanlara tolerans sağlar, siyanobakteriyel nitrojenazı O ₂ 'nin zararlı etkilerinden korur ve bazı fagositik protozoalara karşı koruma sağlar.

Çizelge 2.1. (Devam) Biyofilmlerde EPS'lere atfedilen rollerden bazıları (Nwodo ve ark., 2012)

Proses	EPS'lerin biyofilmlerle fonksiyonel ilişkisi
Organik bileşikler ve inorganik iyonların sorpsiyonu (soğurulması)	Yüklü ve hidrofobik EPS'ler, ortamdan besinlerin birikmesine, ksenobiyotiklerin ve inatçı maddelerin emilimine aracılık eder. İyon değişimi, mineral oluşumu ve toksik metal iyonlarının birikmesine neden olan polisakkarit jel oluşumunu teşvik ederler (böylece toplu olarak çevresel detoksifikasyona katkıda bulunurlar).
Enzimlerin bağlanması	EPS'ler ile glikolitik olmayan hücre dışı enzim etkileşimi, alıkonma stabilizasyonu ve birikmesine yol açar.
Hücre bileşenlerinin dışa aktarımı	Lipo-gliko konjugatı olan lipopolisakkaritler (izoprenoid glikozil taşıyıcı lipidler), metabolik dönüşüm sonucunda salınan hücresel malzemeye aracılık eder.
Aşırı enerji için	EPS'ler, fazla karbonu dengesiz karbon altında nitrojen oranlarına depolar.

Çizelge 2.2. Bakteri biyofilmleriyle ilişkili bazı insan hastalıkları (Nwodo ve ark., 2012)

İnsan hastalığı	Biyofilm bakterileri
Kistik fibrozis pnömonisi	<i>P. aeruginosa</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i>
Orta kulak iltihabı	<i>Haemophilus influenzae</i> (Tipik olmayan suşlar)
Periodontitis	Gram-negatif anaerobik oral bakteriler
Diş çürükleri	<i>Streptococcus</i> spp. ve diğer asidojenik Gram-pozitif koklar
Kas-iskelet sistemi enfeksiyonları	Stafilokoklar ve diğer Gram-pozitif koklar
Nekrotizan fasiit	A Grubu streptokoklar
Bakteriyel prostatit	<i>E. coli</i> ve diğer Gram-negatif bakteriler
Üriner kateter sistit	<i>E. coli</i> ve diğer Gram-negatif çubuklar
Safra yolu enfeksiyonu	<i>E. coli</i> ve diğer enterik bakteriler
Melioidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>

Çizelge 2.3. Bazı bakteriyel EPS'lerin fonksiyonel özellikleri (Nwodo ve ark., 2012)

Bakteriyel Eksopolisakkarit	Polisakkarit Bileşeni	Molekül Ağırlığı (Da)	Özellikleri	Uygulamalar	Bakteri suşları
Dekstran	Glukoz	10^6 - 10^9	İyonik olmayan, iyi stabilite Newtoniyen, sıvı davranışı	Gıdalar, ilaç endüstrisi (Kan hacmi genişletici) ve Kromatografik ortam	<i>L. mesenteriodes</i>
Aljinat	Gluronik asit ve manuronik asit	$(0.3-1.3) \times 10^6$	Jelleşme kapasitesi, film oluşturma	Gıda hidrokolloidi ve tıbbi (cerrahi yara örtüleri, yara yönetimi ve kontrollü ilaç salımı).	<i>A. vinelandii</i> ve <i>P. aeruginosa</i>
Ksantan	Glukoz, mannoz ve glukuronik asit	$(2.0-50) \times 10^6$	Yüksek viskozite, geniş sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonları aralığında kararlı	Petrol endüstrisi, kozmetik, ilaç, kozmetik, kişisel bakım ürünleri ve gıdalar	<i>Xanthomonas</i> spp.
Kurdan	Glukoz	5×10^4 - 2×10^6	Jel oluşturma kabiliyeti, suda çözünmezlik, yenilebilir ve toksik olmayan biyolojik aktivite	İlaç endüstrisi, gıdalar, ağır metal uzaklaştırma ve beton katkı maddesi	<i>Agrobacterium radiobacter</i> ve <i>Rhizobium meliloti</i>
Selüloz	Glukoz	$\sim 10^6$	Çoğu solventte çözünmezlik ve yüksek gerilme mukavemeti	Gıdalar (sindirilemez lif), biyomedikal (yara iyileşmesi, doku mühendisliği kan damarları) ve ses hoparlör diyaframları	<i>Acetobacter</i> spp.
Sukkinoglikan	Glukoz ve galaktoz	5×10^3 - 1×10^6	Yüksek viskozite ve asit stabilitesi	Gıda ve yağ geri kazanımı	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. miksojenler
Glukuronan	Glukuronik asit	6×10^4 - 6×10^5	Jelleşme ve koyulaştırma kapasitesi	Gıda ve kozmetik ürünleri	<i>Gluconacetobacter hansenii</i> ve <i>Sinorhizobium meliloti</i> M5N1CS
Kolanik asit	Fukoz, glukoz, glukuronat ve galaktoz	2×10^4 - 6×10^5	Jelleşme kapasitesi	Kozmetik ve kişisel bakım ürünleri	<i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. ve <i>E. coli</i>

Monomerik bileşimlerine rağmen, iyi bilinen bitki veya hayvansal ürünlere benzer şekilde, farklı mikrobiyal orijinli EPS'ler (bakteri ve mantarlar), kendilerine özgü özelliklerine aracılık eden çok çeşitli yapısal kombinasyonlar sergilerler. Mikrobiyal üretim, çevresel etkilerden kaynaklanan üretim parametreleri gibi bitki veya makro alg kaynaklı ürünlere ve yüksek kaliteli bir nihai ürün elde etmek için çeşitli avantajlar

sergiler. Ek olarak, bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlere kıyasla çok daha yüksek üretim titreleri elde edilebilmektedir. Kolay ulaşılabilir, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen, biyoyumlu ve görünür bir şekilde toksik olmayan mikrobiyal EPS'ler, tıbbi kullanımlarının önemli bir rol oynadığı çok geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Moscovici, 2015).

Günümüze kadar sadece birkaç mikrobiyal polisakkarit ticari uygulamalar bulmuştur. Bunlar arasında, 19. yüzyıl (yy)'ın ortalarında şarapta α -1 $\rightarrow$ 4 ve α -1 $\rightarrow$ 6 glukopiranosil bağlantılarına sahip nötr bir polimer olan dekstran keşfedilmiştir. Dekstran, farmasötik uygulamalarda kullanılan mikrobiyal EPS için ilk dikkate değer örnek olarak düşünülebilmektedir (Nwodo ve ark., 2012). 1953'ten beri yara şokunu kontrol etmek için plazma hacim genişletici olarak kullanılmıştır (Amspacher ve Curreri, 1953; United States Pharmacopeia [USP]-National Formulary [NF], 2012; European Pharmacopeia [EP], 2014).

Bir diğer mikrobiyal EPS, ilaç katkı maddeleri olarak tıbbi uygulamalarda, gıda katkı maddeleri olarak onaylandıktan sonra kullanılmıştır. Beş şeker tekrarlanan birim ve farklı miktarlarda asetat ve piruvattan oluşan bakteriyel, dallanmış anyonik HePS olan ksantan, 1950'de keşfedilmiştir. İlk olarak daha fazla yağ geri kazanımı için büyük miktarlarda kullanılmış ve daha sonra Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde (1969) Food and Agriculture Organization-Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) (1974) tarafından bir gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır. Avrupa'da, ksantan daha sonra ABD ve Avrupa Birliği (AB) ilaç kılavuzlarına dâhil edilerek E415 (1982) gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır (USP-NF, 2012; EP, 2014). Gıda ürünlerine benzer şekilde, kıvam arttırıcı ve süspansiyon stabilizörü özellikleri ile farmasötik kremlerde ve süspansiyonlarda faydalıdır ve ilaç kontrollü salım taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Morris ve Harding, 2009).

Başlangıçta deniz yosunlarından ekstraksiyon ile elde edilen aljinat, 1964 yılında bakteriyel bir ürün olarak keşfedilmiştir, sadece yosun ekstraksiyon ürününden, β -1 $\rightarrow$ 4 mannuronik ve α -1 $\rightarrow$ 4 gluronik asidin lineer yapısında asetil gruplarının bulunmasıyla ayrılmaktadır (Cyber Colloids Ltd., 2020). Bu anyonik polisakkarit, tabletlerde iyi bir parçalayıcı maddedir (nişastadan daha iyi), farmasötik süspansiyonlarda ve

emülsiyonlarda kıvam arttırıcı ve stabilize edici bir ajanın yanı sıra sodyum tuzu olarak kapsüllerde bir anti-asit mide koruyucudur. Bakteriyel aljinat ayrıca hücre mikrokapsülasyonunda, ilaç salımı için mikroküre vektörleri olarak kullanılmıştır (Nwodo ve ark., 2012). Beş aljinat, 1973 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Sodyum aljinat monografileri ABD ve AB ilaç kılavuzlarında bulunmuştur (USP-NF, 2012; EP, 2014). Dental impresyon bileşenleri aljinatın soğukta sertleşen jellerine dayanmaktadır. Aljinat fiberler, insan kullanımı için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA)’den kabul görmüş, hemostatik özelliklere sahip yara örtüleri ve bandajlar olarak kullanılabilir (Nwodo ve ark., 2012).

Gellan/Jellan, 1978’de, tekrarlayan bir α -ramnoz, iki β -D-glukoz ve β -D-glukuronat redizüsü olan bir bakteriyel anyonik doğrusal HePS olarak keşfedilmiştir. Doğal form açıl (asetil ve gliseril) sübstitüentleri içermektedir. Asetil grupları, gerektiğinde açıl içeriğini azaltmak için alkaline hidroliziyle kolayca uzaklaştırılabilir. 1993-2013 yılları arasında çok geniş bir terapötik etki spektrumuna sahip 19 oral, 16 oftalmik ve 6 nazal ilaç formülasyonuna değinilmiştir (Osmalek ve ark., 2014). Bazıları; ticari tıbbi ürünler haline gelmiştir, düşük ve yüksek açıl jellan formlarının ABD ilaç kılavuzlarına dâhil edilmesini belirlemiştir (USP-NF, 2012). Jellan, 1990 yılından bu yana gıdalarda dengeleyici ve kıvam arttırıcı olarak FDA onaylıdır. Düşük bir açıl formu; katı dozaj formülasyonlarında, anlık salımlı tabletlerde bir ayrışma ajanı olarak veya daha yüksek konsantrasyonlarda şişme davranışına bağlı olarak sürekli salımlı bir matris oluşturuca ilaç katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Fizyolojik iyon konsantrasyonlarında, *in situ* güçlü jeller oluşturmaktadır (Osmalek ve ark., 2014). Oftalmik preparasyonlarda, çekirdek jellan sakız (gum) hidrojel uzatılmış bir temas süresi (oküler rezidü) ve gelişmiş biyoyararlanım göstermiştir. Bu nedenle, ticari düşük asetil jellan içeren oftalmik kontrol salımlı anti-glokom preparatları Timoptic XE veya Blocadren depot ticari adı altında pazarlanmaktadır (Felt ve ark., 2002).

Pullulan, pazarlanan farmasötik uygulamaları ile tek ticari olarak üretilen fungal kökenli EPS gibi görünmektedir. 1938’de keşfedilmiş, ancak çoğunlukla 1959’daki tanımından sonra incelenmiştir. Bu biyopolimer, α -1 $\rightarrow$ 6 ile birleştirilen neredeyse düzenli olarak tekrarlanan α -1 $\rightarrow$ 4-maltotriosil birimlerinden (3-D-glukopiranosil) oluşan nötr doğrusal HoPS’tir. Farmasötik bir bileşen olarak mevcut uygulamaları, farklı bağlanma ve film

oluşturan özelliklerine ve ayrıca güçlü O₂ geçirimsizliğine dayanmaktadır. Bu özellikler, granülasyon ve kaplama tabletleri, hayvansal olmayan kapsüller (Plantcaps-Capsugel, Inc.), ağız ve yara bakım ürünleri için çok uygundur (örn., Listerine-Pfizer). Japonya’da (1976), ABD-FDA (2002), Avrupa’da E1204 ve Çin’de (2006) bir gıda maddesi olarak onaylanan pullulan son zamanlarda ABD, AB’ye dâhil edilmiştir (USP-NF, 2012; EP, 2014) ve Japan Pharmacopeias (Japan Pharmacopeia [JP], 2011).

Hyaluronik asit 1934’te keşfedilmiş ve kimyasal yapısı 1950’lerde belirlenmiştir. β -1→4-D-glukuronik asit ve β -1→3 N-asetil-D-glukozamin bağlı rezidülerin meydana getirdiği disakkarit birimlerinden oluşan glikozaminoglikanlara ait anyonik bir doğrusal polisakkarittir (Chong ve ark., 2005; Kogan ve ark., 2007; Necas ve ark., 2008). Sodyum hyaluronat (hyaluronan) olarak, insan vücudu da dâhil olmak üzere canlı organizmalarda önemli fizyolojik roller oynamaktadır. Şimdiye kadar sürdürülen tıp alanındaki ilk uygulaması, 1950’li yılların sonlarında göz cerrahisinde camısı protez/replasmanı olmuştur (Necas ve ark., 2008). Başlangıçta hayvan dokusu ekstraksiyonu ile özellikle horozibiğinden elde edilmiş, şimdilerde rekombinant bakteriler tarafından üretilmektedir. Bakteriyel ürün öncelikle sadece topikal sorunlar için onaylanmıştır. Bunlar; kronik, zor yara iyileşmesi, örneğin, Contipro tarafından üretilen Hyiodine (Contipro Pharma), ve kozmetik uygulamalardır. Son zamanlarda, bakteriyel hyaluronan içeren tıbbi cihazlar, osteoartritte, göz cerrahisi ve eklem içi enjeksiyonlarda kullanım için onaylanmıştır. Örneğin, 1995’te Tıbbi Cihaz Sertifikasyon-Avrupa Komisyonu tarafından onaylanmış BioLon (Altacor, 2020), Euflexxa (Ferring Pharmaceuticals, 2020), Durolane, Bioventus tarafından üretilmiştir (Bioventus, 2020). 2007 yılında Kore FDA tarafından onaylanan sodyum hyaluronat mikropartikülleri kullanılarak rekombinant insan büyüme hormonunun sürekli salımlı bir formülasyonu, haftalık olarak uygulama için geliştirilmiştir (U.S. National Library of Medicine, 2020). Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalar verimliliğini ve güvenilirliğini doğrulamıştır (Kim ve ark., 2014). Tıbbi uygulamaları dâhil olmak üzere yukarıda belirtilen EPS’ler Çizelge 2.4’te özetlenmiştir.

Bu yapısal özellikleri ile uygulamaların yanı sıra doğal bileşenlere olan talep, bakteriyel EPS’lerin son yıllarda çeşitli medikal ve farmasötik endüstrilerde immünostimülör, immünomodülör, anti-tümör, anti-viral, anti-enflamatuar ve anti-oksidan ajanlar

olarak kullanıldığı uygulamalar ilgi çekmeye devam etmektedir. Eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle, bakteriyel EPS'ler gıda endüstrisinde de viskozlaştırıcı, stabilize edici ve emülsifiye edici ajanlar olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2010).

Çizelge 2.4. Ticari tıbbi uygulamaları kabul edilen mikrobiyal EPS'ler

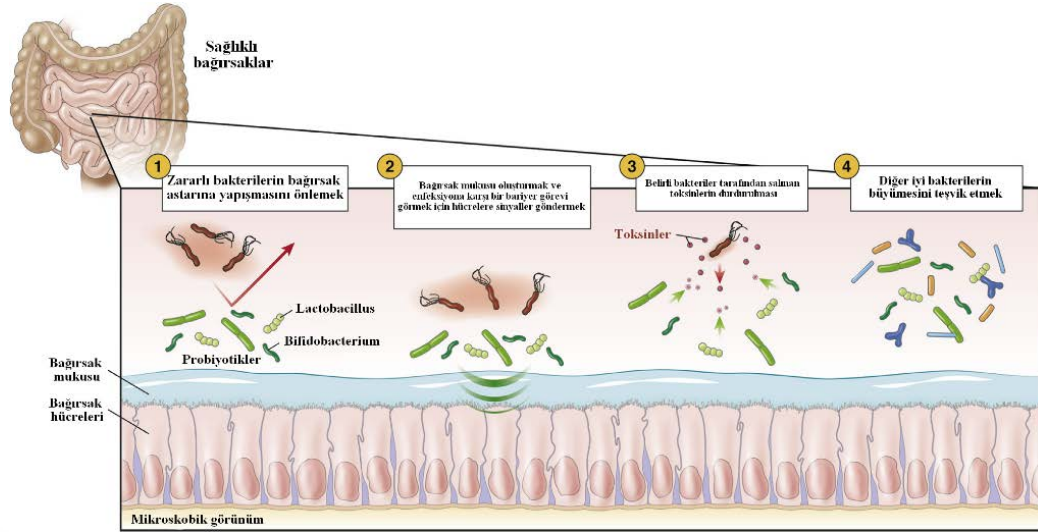
EPS	Monomer bileşimi	Üreten mikroorganizma	Uygulamalar	Referans
Bakteriyel Dekstran	Glukoz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kan plazma hacmi genişletici (yara şoku kontrolü)	Amspacher ve Curreri, 1953; Nwodo ve ark., 2012; USP-NF, 2012; EP, 2014
Ksantan	Glukoz (2), mannoz (2), glukuronik asit, asetat, piruvat	<i>Xanthomonas campestris</i>	Kıvam arttırıcı, farmasötik kremlerde ve süspansiyonlarda süspansiyon stabilizörü Kontrollü salım taşıyıcı	Morris ve Harding, 2009; USP-NF, 2012; EP, 2014
Aljinat	Mannuronik asit, glukuronik asit, asetat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	Tabletlerde parçalayıcı ajan; kıvam arttırıcı, farmasötik süspansiyonlarda ve emülsiyonlarda stabilizatör; dental impresyonları; antiasit (anti reflü) mide koruyucusu; ilaç salımı için mikroküreler; yara hemostatik sargı ve bandajlarında fiberler	Nwodo ve ark., 2012; USP-NF, 2012; EP, 2014
Jellan	Glukoz, ramnoz, glukuronik asit, gliserat, asetat	<i>Pseudomonas elodea</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Tablet parçalanması, sürekli/kontrollü salım için oral, oftalmik ve nazal ilaç formülasyonlarında yardımcı madde	Felt ve ark., 2002; USP-NF, 2012; Osmalek ve ark., 2014
Hyaluronik asit/hyaluronan	Glukuronik asit N-asetil-glukozamin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus equisimilis/zooepidemicus</i>	Kronik, zor yara iyileşmesi; osteoartrit tedavisi (eklem içi enjeksiyon); göz ameliyatı	Kogan ve ark., 2007; Necas ve ark., 2008; EP, 2014
Fungal Pullulan	Maltotrioz	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Tablet granülasyon ve kaplama, bağlayıcı ve O ₂ geçirimsiz film şekillendirme, hayvansal olmayan kapsüller, ağız ve yara bakım ürünleri	JP, 2011; USP-NF, 2012; EP, 2014

Mikrobiyal EPS'lerden birçoğu çeşitli endüstri alanlarında kullanılmaktadır. Dekstran, gellan, maya glukanolari, ksantan ve bazı aljinatlar bu mikrobiyal EPS'lerden bazılarıdır (Sutherland, 1986; Roller ve Dea., 1992; Crescenzi, 1995). Ayrıca eşsiz fizikokimyasal özelliğine bağlı olarak mikrobiyal EPS'ler; süspansiyon stabilizatörleri, flokülantlar, enkapsülasyon malzemeleri, emülgatörler, iyon değiştirici reçineler, moleküler elekler, hidrofobik moleküller için konakçılar, su absorbentleri, atık sularda ve doğal ortamlarda

ağır metallerin biyosorbentleri, vb. olarak kullanılabilirler (Gutnick ve Bach, 2000; Kachlany ve ark., 2001). EPS'lerin bakteri hücrelerini kurumadan, toksik metallerin penetrasyonundan, antibiyotikten, fagositozdan, faj saldırısından koruduğuna ve biyofilm oluşumunda rol oynadığına inanılmaktadır (Gauri ve ark., 2009; Ozturk ve ark., 2009). Son olarak mikroorganizmaların EPS üretimi için alg ve bitkiye göre daha uygun olduğunu bildirilmiştir (Freitas ve ark., 2009).

2.4. Probiyotikler

Etimolojik olarak, probiyotik kelimesi Latince'deki pro edatı “için” ya da “destek” ve Yunancadaki bios isminden “yaşam” türeyen sıfat (biyotik)'in birleşimi olup “hayat için” “yaşam desteği” anlamındadır. 1965 yılında Lilley ve Stillwell probiyotiği, bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve bir diğerinin büyümesini uyaran madde olarak tanımlamışlardır. Bu nedenle antibiyotiğin tam tersi anlamına gelir (Fuller, 1992). 1974 yılında Parker ise bağırsağın mikrobiyal dengesine katkı sağlayan organizma ve madde olarak probiyotiği tanımlamıştır. DSÖ'nün Ekim 2001 tarihli bir raporu, probiyotikleri “yeterli miktarda uygulandığında, konakçıya sağlık faydası” sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadır (WHO, 2006). Probiyotikler; mikroskobik, genellikle bakteri olan canlı organizmalardır. Ancak mayalar gibi organizmalar da olabilirler. Probiyotiklerin potansiyel olumlu etkileri, gastrointestinal (GI) sağlığa yardımcı olma yetenekleri üzerine odaklanmaktadır. Şu anda piyasada bulunan probiyotikler, gıdalar veya diyet takviyeleridir ve bu ajanların kullanımının bağırsak mikrobiyomunu değiştirerek zararlı bakterilerin bağırsak astarına yapışmasını ve orada büyümesini durdurmak, bağırsaklardaki mukusu oluşturmak ve enfeksiyona karşı bir bariyer görevi görmesine yardımcı olmak için hücrelere sinyal göndermek, kişiyi hasta edebilecek belirli bakteriler tarafından salınan toksinleri durdurmak, sağlığı destekleyebilecek diğer bakterilerin büyümesini teşvik etmek gibi bazı durumlarda yararlı olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Probiyotikler ve sağlığı destekleyici etkileri (Anonim, 2019)

Birçok bakteri türü probiyotik olabilmektedir. Onlar hakkında daha fazlasını öğrenmek için halen araştırmalar yapılmaktadır. Esasen probiyotik olarak kullanılan ana bakteri türü LAB'leridir. LAB'leri tarafından üretilen EPS'ler, mikroorganizmaların gıda sınıfında olmasından dolayı GRAS statüsünü taşırlar ve bu da onları sentetik muadillerine kıyasla çok daha elverişli hale getirmektedir. LAB'lerinden gelen EPS'ler iki gruba ayrılabilir. Birincisi dört alt gruptan oluşan HoPS'lerdir ki bunlar; α -D-glukan'lar, yani dekstran'lar, temel olarak farklı derecelerde dallanma (suşa özgü) olan α -1,6-bağlı glukoz rezidülerinden oluşur. Pozisyon 3 ve daha az sıklıkla pozisyon 2 ve 4'te ve alternan (*Leuc. mesenteroides*) ve mutan'lar [*Streptococcus (Strep.) mutans* ve *Strep. sobrinus*], her ikisi de α -1,3- ve α -1,6-bağlarından oluşur. *Pediococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. tarafından üretilen β -1,2- dallarına sahip β -1,3-bağlı glukoz moleküllerinden oluşan β -D-glukan'lar, O1 bölgesinden (*Strep. salivarius*) bazı β -2,1 dallarına sahip levan gibi esas olarak β -2,6-bağlı D-fruktoz moleküllerinden oluşan fruktanlar, poligalaktan gibi, farklı glikozidik bağlara sahip yapısal olarak aynı tekrarlayan birimlerden oluşan diğerleri ve mezofilik [*Lactococcus lactis* (LLA.) subsp. *lactis*, LLA. subsp. *cremoris*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. rhamnosus*, vb.] ve termofilik (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Strep. thermophilus*) LAB suşları tarafından üretilen HePS'lerdir. (De Vuyst ve Degeest, 1999). *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. parasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *L. casei* gibi birçok *Lactobacillus* türü, gıdalardaki ve

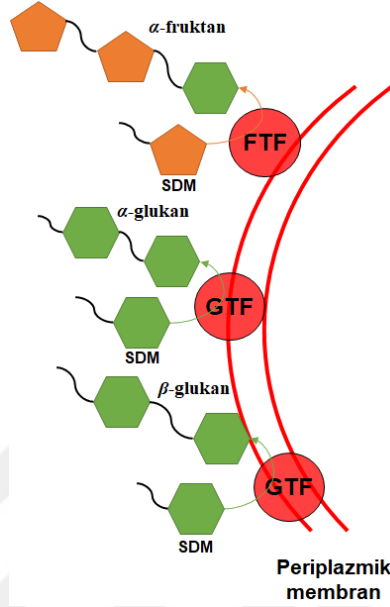
daha doğrusu süt ürünlerindeki probiyotik potansiyelleri için incelenmiştir (Badel ve ark., 2011). Ek olarak, bazı LAB EPS'leri prebiyotiktir. Prebiyotikler, bağırsakta bazı yararlı bakterilerin büyümesini uyaran sindirilemeyen oligosakkaritlerdir (Blaut, 2002; Badel ve ark., 2011). Bifidojenik etki sergileyen *Weissella cibaria* A2 başta olmak üzere LAB'leri tarafından üretilen EPS'lerin prebiyotik özelliği bildirilmiştir (Hongpattarakere ve ark., 2012). Ama, yine de çok çeşitli bakteri sistemleri kompleks polisakkaritler üretebilmektedir. Probiyotik preparasyonlar tek bir suştan oluşabilir veya bir formülasyon en fazla sekiz suş içerebilir. En yaygın olarak kullanılan suşlar arasında *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis* ve *Bifidobacterium* cinsinden çeşitli türler bulunur. Bir *Lactobacillus* türünün *Bifidobacteria* suşu ile birlikte kültüre edilmesi de yaygındır. Bununla birlikte, *Bifidobacterium* cinsinin genellikle LAB grubunun bir üyesi olarak kabul edildiğine dikkat edilmelidir, ancak *Bifidobacteria*, LAB'leri ile filogenetik olarak akraba değildir ve ayrıca belirli cinslerine özgü bir şeker fermentasyon yolunu kullanmaları bakımından fizyolojik olarak da farklılık gösterirler (Narvhus ve Axelsson, 2003). Probiyotik suşlar insan kaynaklı olmalı, güvenli, GI sistemde yaşayabilir, asit ve safraya stabil olmalı, klinik olarak yararlı olduğu ve mukozaya yapışabileceği gösterilmelidir (Culligan, ve ark., 2009). Probiyotiklerin şimdiye kadar faydalı yönleri üzerinde bilimsel kanıtlar, hayvan modellerinden veya *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçların yanı sıra insanlarda küçük ölçekli klinik çalışmalar da bulunmaktadır. Genellikle güvenli olarak kabul edilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria*'dan suşlar, probiyotik endüstrisi için en alakalı olanlardır. Çok sayıda mukus adezyon çalışmasına konu olmuşlardır ve EPS'leri kommensallerde en çok çalışılanlardır (Marcobal ve ark., 2013). Çeşitli çalışmalar, bazı probiyotiklerin kan şekeri ve kolesterol seviyelerini kontrol etme ve oksidatif stresi önleme üzerinde yararlı etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Bordoni ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014; Shehata ve ark., 2016). Evvie ve çalışma grubunun 2017'de yapmış olduğu bir araştırmada LAB suşlarının sağlık yararları sağladığı ve immünomodülatör rol oynadığı iddiasını destekleyen çeşitli mekanizma ve mekanizmaya dayalı olmayan çalışmalar incelenmiştir. LAB'lerin obezite ve tip-2 diyabet gibi global sıkıntılar üzerindeki probiyotik uygulamaları ve ayrıca çeşitli faydalı LAB suşlarını taşımak için yoğurt ve dondurmanın önemli araçlar olarak kullanımı tartışılmıştır. Probiyotik ve simbiyotik süt ürünlerinin en yakın gelecekte çeşitli sağlık bozukluklarını tedavi etmek için kullanılabileceği

vurgulanmıştır. Mevcut çalışmalar, LAB'lerin konakçılarında anti-obezite ve anti-diyabetik eğilimlere sahip olduğunu ve bu nedenle insan sağlığını korumada önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Dondurmanın reolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra uygulamalarındaki araştırmalar da artmaktadır (Evivie ve ark., 2017). Bu uygulamalar, daha az gelişmiş ülkeler için teknoloji dâhil olmak üzere bazı engellerle karşı karşıyadır. Yeni fonksiyonel gıdaların tüketici tarafından kabul edilebilirliği kültür, etik veya dinden etkilenebilir. Probiyotik özellikler için genetik temel üzerinde, yeni manipülasyon becerileri, beslenme ve sağlık sektörlerinde uygulanabilirliği hakkında daha fazla anlayış sağlayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Probiyotik LAB'lerin gıda kaynaklı ve diğer patojenlerin yayılmasını azaltmada doğrudan etkilerini doğrulayan daha fazla çalışma da beklenmektedir.

2.4.1. LAB'leri tarafından EPS'lerin biyosentezi

Ancak çok sayıda enzim ve düzenleyici proteinlerin kompleks bir süreçten geçmesi ile bakteriyel EPS'ler biyosentezlenmektedir (Patel ve ark., 2012). EPS biyosentezi; (i) bir karbon substratın asimilasyonu, (ii) polisakkaritlerin hücre içi sentezi ve (iii) hücreden EPS eksüdasyonu olmak üzere üç ana aşamaya ayrılabilir (Donot ve ark., 2012). LAB'lerinde EPS'lerin biyosentezi, şekerin sitoplazmaya taşınması, şeker-1P'nin sentezi, tekrarlanan birim öncüllerinin polimerizasyonu ve son olarak EPS'lerin hücre dışına taşınması ile başlayan dört ana adımdan oluşmaktadır (Becker, 2015). HoPS'ler, hücre dışında spesifik glikosiltransferaz (GTF) veya fruktosiltransferaz (FTF) enzimleri (genellikle glukon-sükrazlar veya fruktan-sükrazlar olarak adlandırılır) tarafından sentezlenir. HoPS üreten LAB'leri, sakkarozdan yüksek moleküler kütleli α -glukon'ları sentezlemek için ekstraselüler GTF enzimlerini de kullanır. GTF enzimleri, yüksek derecede benzerliğe sahip olsa da, *Lactobacillus*'lar α -1,6 bağlantıya sahip dekstran polimerleri, α -1,3 bağlantıya sahip mutan polimerleri ve hem α -1,6 hem de α -1,4 bağlantıya sahip alternan polimerleri de dâhil olmak üzere geniş bir glukon spektrumu üretirler (Kralj ve ark., 2004). HoPS'lerin biyosentezi, spesifik bir substrat olarak sakkarozu kullanır ve proses için gereken enerji sakkarozun hidrolizinden karşılanır. EPS üretimi için enzim biyosentezi dışında herhangi bir enerji gereksinimi yoktur çünkü GTF veya FTF ile EPS sentezi aktif taşıma proseslerini veya aktiveleştirilmiş karbohidrat öncüllerinin kullanımını gerektirmez. Bu nedenle, büyük miktarlarda sakkaroz kolaylıkla

EPS'ye dönüştürülebilir. *L. sanfranciscensis*'in 47 g/l sakkaroz ve 20 g/l fruktoz varlığında fruktozdan oluşan bir HoPS ürettiği rapor edilmiştir (Korakli ve ark., 2002). HoPS'lerin biyosentezi, HePS'lerinkine nispeten daha basit bir prosestir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. LAB hücresinde HoPS'lerin biyosentezi (Ryan ve ark., 2014)
SDM: sakkaroz-türevli monosakkarit

HePS'ler, sitoplazmada oluşturulan tekrarlanan birim öncüllerin polimerizasyonu ile elde edilir (Cerning 1990, 1995). Bunlar, büyük olasılıkla bir lipit taşıyıcıya sabitlenmiş büyüyen tekrarlanan birime, aktive edilmiş şekerlerin (şeker nükleotitleri veya nükleozit difosfat şekerleri) sıralı eklenmesiyle membranda birleştirilmektedir. Bir HePS, tekrarlama ünitesinin tamamlanmasından sonra, hücre membranından dışarı aktarılır ve nihai bir HePS'e polimerize oluyor gibi görünmektedir. Bu nedenle, HePS oluşumuna özgü olması gerekmeyen HePS'in biyosentezinde ve salgılanmasında çeşitli enzimler ve/veya proteinler yer almaktadır (Şekil 2.7).

2.5. EPS ile İlgili Önceki Çalışmalar

Polisakkarit esaslı malzemeler; biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük maliyet gibi biyomedikal uygulama için önemli özelliklerinden dolayı ilgi çekmektedir (Khan ve Ahmad, 2013). Hücre proliferasyonunu ve adezyonunu artırma kabiliyetine sahiptirler. Ortaya çıkan teknoloji, bu amaçla birçok potansiyel yeni biyomalzeme formunu araştırmış ve araştırmaktadır. Polisakkaritler ve aralarında EPS, “akıllı ilaç salım sistemleri” veya “akıllı terapötikler” alanında oldukça ümit vaat eden malzemeler haline gelmiştir (Caldorera-Moore ve Peppas, 2009). Bu tür hidrofilik polimerlerin çapraz bağlı 3D ağ yapıları çözünmez kalırken büyük miktarda su tutabilen hidrojeller oluşturabilme yeteneği, onları ilaç taşıyıcıları olarak çok yararlı hale getirmektedir. Dolayısıyla, makro ve özellikle NP’ler olarak, bu jeller ilaçları veya biyomolekülleri iç yapılarına sıkıştırabilir ve/veya terapötik molekülleri dış yüzeylerine adsorbe edebilir ve hedef organlara ulaşmak için hücrelere ve doku boşluklarına nüfuz edebilirler. Onlara ulaşıldığında, ilaç salım sistemleri biyolojik yapışma/biyoadezyon, biyobozunurluk, pH, iyon ve/veya sıcaklık hassasiyeti gibi çeşitli özelliklerinden dolayı farklı ilaç salım özellikleri gösterebilirler. Bu şekilde, ilaç rezidüsünü ve dolayısıyla terapötik olarak kullanılabilir fraksiyonunu uzatabilir, böylece biyoyararlanımını arttırabilir ve sonuç olarak azaltılmış toksik etkilerle daha düşük dozlara izin verebilirler (Liu ve ark., 2008).

Termo, pH ve katyona duyarlı ilaç salım özelliklerine sahip hidrojellerle ilgili yapılan bir çalışmada pullulan, özellikle kimyasal türevlendirme için özel bir mevcudiyet sağlayan tekrar eden ünite üzerindeki dokuz hidroksil grubu ile nötr doğası nedeniyle, farmasötikte bir ilaç taşıyıcı olarak yoğun bir şekilde incelenmiştir. Omurgaya çapraz bağlanma ve aşılama ile poli-(N-izopropil-akrilamid)-ko-akrilamid ve eter süksinik karboksil grupları, termo ve pH’ya duyarlı mikroküreler elde edilmiştir. Protein ilaç modeli olarak lizozim ile hem basit hem de elektrostatik (iyonik) tuzaklanma ve pH/termo duyarlı salım sağlanmıştır (Fundueanu ve ark., 2008). Yine termo ve pH’ya duyarlı hidrojeller ile ilgili bir diğer araştırmada hidrojellere çapraz bağlı karboksimetil pullulan içeren polimerler, yavaş yavaş antioksidan biyomoleküller-lutein ve α -tokoferol’ü muhafaza etmiş ve süpürücü aktivite göstermiştir (Mocanu ve ark., 2012). Bir başka araştırmada pullulan/AgNP’lerin kontrollü küresel yapıya sahip kompozit nanokürelerin antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2012).

Hidrofobik segmentlerin hidrofilik polimerik omurgaya aşılması, iç hidrofobik bir çekirdeğe sahip, kendiliğinden birleşen termodinamik olarak kararlı nanojel yapıları oluşturan amfifilik polimerlere yol açmaktadır. Zaman içinde boyut olarak stabil olan bu polimerik miseller, umut verici ilaç taşıyıcıları olarak kabul edilmişlerdir; hidrofobik çekirdek kabuk yapısı, hidrofobik ilaçları tutabilmektedir (Liu ve ark., 2008; Bataille ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2013). Bu bağlamda, kontrollü salım sistemleri olarak amfifilik EPS ile ilgili en çok atıfta bulunulan bildiri, gelecekteki perspektif ilaç salım kompleksleri için başlangıç noktasını temsil eden stabil hidrojel NP'ler oluşturan kolesterol taşıyan pullulanın kendi kendine montajı üzerine yapılan çalışmadır (Bataille ve ark., 2011).

İlaç hedeflemeye yönelik yapılan araştırmalar; farklı hidrofobikleştirme derecelerine sahip polisakkarit konjugatların, özellikle amfifilik olanların, umut verici ilaç hedefleme taşıyıcıları olarak görünen hücresel reseptörlere özel bağlanma ve nüfuz edici özellikler sergilediklerini göstermiştir. Kolesterol-pullulan NP'leri β -amiloidin β oligomer formları ile hidrofobik olarak etkileşime girebildiği, toksik etkisini önemli ölçüde azaltabildiği, bunun da nörolojik bozukluklarda olası bir tamamlayıcı yaklaşım olarak ortaya çıkabileceği-örneğin Alzheimer hastalığında gösterilmiştir (Boridy ve ark., 2009). Antikanser ilaç hedefleme noktasında yapılan bir çalışmada antikanser epirubisin ile fiziksel olarak yüklenmiş, deoksikolik rezidüel tarafından hidrofobikleştirilen, bilinen bir β -1 $\rightarrow$ 3 glukanın kendiliğinden oluşan karboksimetil kurdan NP'leri, tümör taşıyan farelerde ilaç alımını arttırmış ve böbrek ve kalpte azaltmış, sürekli bir salım modeli ile tümör hacmini %70 azaltmıştır (Gao ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada hidrofobize polisakkarit-safra asidi konjugatı (hyaluronik-kolanik asit) NP'leri, murin karsinom SCC7 hücrelerinde reseptör aracılı *in vitro* ve *in vivo* tercihli birikim göstermiştir (Choi ve ark., 2009). Hyaluronik asit kaplı katı liyofilize lipit NP'ler, *in vitro* ve *in vivo* olarak reseptör aracılı, sürekli ve hedeflenmiş antikanser vorinostatın (suberanilohidroksamik asit) SCC7 karsinomuna, insan meme adenokarsinomuna (MCF-7) ve insan akciğer epitelyal adenokarsinomuna yol açtığı belirlenmiştir (Tran ve ark., 2014). Antikanser ve antiinflamatuvar ilaçların hedef iletimini sağlamak için, aynı anda suda az çözünen iki ilacı (fiziksel olarak tutulan paklitaksel ve kimyasal olarak bağlı prednizolon) aynı anda taşımak için yeni bir jellan nanohidrojel sistemi geliştirilmiştir. İlgili çalışmada üç tür

kanser hücresi üzerinde sinerjik etkilerinin neden olduğu *in vitro* sonuçların fark edildiği görülmüştür (D'Arrigo ve ark., 2014). Transdermal ilaç verilmesi cilt hastalıklarında ilaç hedeflemesi için önemli bir farmasötik alternatiftir. Hyaluronik asit nanoemülsiyonları, keloid dermal tümörlerin bir inhibitörü olan metilen-dioksikamptotesinin *in vitro* ve *in vivo* kontrollü salımını etkili bir şekilde göstermiştir (Gao ve ark., 2014). Ksantan-bitki galaktomannan karışımının kurkumin yüklü hidrojel­leri, cilt hastalıklarında, cilt kanseri ve sedef hastalığının tedavisinde ümit verici bir alternatif olarak önerilebilecek antiinflamatuar ve antioksidan ilaçlar olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Koop ve ark., 2015). Biyolabil ön ilaç bileşik­leri (ilacın dekstran, pullulan ve aljinatlardan seçilen jellerin mikro-enzimatik glikozidaz hidrolizi ile serbest bırakılması) veya çapraz bağlı dekstran hidrojel­leri kolon-spesifik ilaç taşınımı göstermiştir (Vandamme ve ark., 2002). Bir başka ön ilaç konjugatı, bir antiinflamatuar madde olan hyaluronik asit-metotreksat, ratlarda *in vivo* etki gösteren osteoartrit tedavisini optimize etmiştir (Homma ve ark., 2010).

Yara iyileştirici, cilt onarımı üzerine geliştirilen bakteriyel selüloz ile ilgili araştırmalarda bakteriyel selülozun, suş seçimi veya yetiştirme parametrelerine dayalı olarak kontrol edilebilir 3D yapıya sahip bakteriyel fermantasyonla üretilebileceği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2013). Bakteriyel selüloz uygulamaları, yara iyileştirici cilt onarımı, sızıntıların (eksüda) yanı sıra geçirgen malzeme emici olarak kullanılabilir. Bitki selülozu ile karşılaştırıldığında, bakteriyel selüloz yüksek bir kristallığe, yüksek bir su absorplama kapasitesine ve ayrıca mikrobiyal veya enzimatik bozunmaya karşı yüksek dirence sahiptir. Bir yara iyileşmesi ve doku mühendisliği taraması olarak özellikleri, kimyasal türevler veya diğer sentetik, mineral (örneğin hidroksiapatit) maddelerin, biyopolimerlerin (örneğin; hyaluronan, aljinat, jellan, karagenan, kitosan, kolajen, jelatin, elastin) veya hücre büyüme faktörleri ile birleştirilmesiyle çeşitlendirilebilir ve geliştirilebilirler (Torres ve ark., 2012; Fu ve ark., 2013). Akut ve kronik yaralar (örneğin diyabetik ayak ülserleri) üzerinde bakteriyel selüloz yara örtüleri ile yapılan klinik çalışmalar, bitki-selüloz benzeri yara örtülerinden daha üstün sonuçlar göstermiştir (Fu ve ark., 2013). Klinik olarak kanıtlanmış nemlendirme etkisine sahip bakteriyel selüloz-gliserin membranları, sedef hastalığı ve

atopik dermatit gibi cilt hastalıklarının neden olduğu kuruluk için uygun olabilmektedir (Almeida ve ark., 2014).

Doku mühendisliği yaklaşımları özellikle kalp dokusu mühendisliği, enfarktüsün neden olduğu gibi, zarar görmüş veya hastalıklı miyokardiyal dokuların işlevini desteklemek, onarmak, değiştirmek veya geliştirmek için yapılar tasarlamayı amaçlamaktadır. Bu bağlamda aljinat, pullulan, dekstran, hyaluronan yoğun bir şekilde incelenmiştir (Silva ve ark., 2015). Bir diğer çalışmada akrilatlarla kovalent bağlanma ile morfolojik olarak modifiye edilen poli(propilen) fumaratlı aljinat bazlı hibrid kopolimerler, geliştirilmiş mekanik özellikler kazanmıştır. Bunlardan birinin kardiyomiyoblast büyümesini teşvik ettiği ve kardiyak doku mühendisliğindeki potansiyel uygulamalar için önerildiği açıklanmıştır (Thankam ve Muthu, 2014). Oksitlenmiş dekstran (aldehit) ve poli-L-lizin arasındaki Schiff-baz oluşumu, cerrahide potansiyel bir biyoyapışkanlığa yol açmıştır (Matsumura ve ark., 2014). Karboksimetil pullulan-heparin konjugatları doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilmiş ve incelenmiştir (Mishra ve ark., 2011).

L. rhamnosus GG (LGG)'den izole edilmiş EPS'lerin, farelerde insan immün sisteminde rol oynayan biyomoleküllerden biri olan toll-like receptor/toll-benzeri reseptör 2 (TLR2)'nin aracılık ettiği adipogenezi azalttığını gösteren bir çalışmada 3T3-L1'in fibroblast hücre hattı, hayvan lipid metabolizmalarının iyileştirilmesinde probiyotik bileşenlerin fizibilitesi ve değerlendirilmesi için bir hücre modeli olarak kullanılmıştır. 12 *Lactobacillus* suşundan elde edilen ekstraktlar, ancak 3T3-L1 adipositlerinde ciddi inflamasyon indüksiyonu ile triaçilgliserol (TAG) birikimini önemli ölçüde azaltmıştır. İlginç bir şekilde LGG'den EPS'ler, herhangi bir inflamasyon olmaksızın TAG birikimini önemli ölçüde azaltmıştır. EPS'nin anti-obezite etkisi, yüksek yağlı diyetlerle beslenen farelerde doğrulanmıştır. İki hafta boyunca iki günde bir EPS (50 mg/kg) enjekte edilen farelerin yağ pedleri, emsallerine kıyasla çok daha küçük adipositlerle önemli ölçüde azalmıştır. EPS enjekte edilen farelerde karaciğerdeki TAG ve kolesterol esterinin yanı sıra serum TAG seviyeleri azalmıştır. Ek olarak, yağ dokusu ve karaciğerde aşağı-düzenlenmiş (down-regüle) inflamasyon gözlenmiştir. Yağ dokusu ve 3T3-L1 hücrelerinde TLR2 ekspresyonu EPS ilavesi ile önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, EPS varlığında TLR2'nin 3T3-L1 yıkımında TAG birikiminin aksine, EPS'nin adipogenez üzerindeki inhibisyon etkisine TLR2'nin

aracılık ettiğini doğrulamıştır. LGG'den EPS'nin, memelilerde lipit metabolik bozukluklara müdahale etmek için terapötik gelişme potansiyeline sahip olduğu vurgulanmıştır (Zhang ve ark. 2016).

Durian (*Durio zibethinus*) meyvesinin posasından üretilen fonksiyonel bir Malezya gıdası (asit fermente bir çeşni) olan tempoyak'tan izole edilen EPS üreten *Lactobacillus* suşlarının probiyotik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada 44 tane izolattan yedi izolat (DUR2, DUR4, DUR5, DUR8, DUR12, DUR18 ve DUR20) EPS üretilen ve *L. rhamnosus* (ATCC53103) ve *L. plantarum* (ATCC8014) referans suşlarına kıyasla asit ve safra tuzuna direnç göstermişlerdir. Yedi izole edilmiş suş, API 50 CHL ve 16S rRNA gen dizileri (Polimeraz zincir reaksiyonu, PCR bazlı) kullanılarak tanımlanmış beş farklı *L. pentosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. crispatus* türüne ait olduğu bulunmuştur. Yedi suş farklı EPS üretme kabiliyeti göstermiştir (100-850 mg/L). İzolatlar, asit (pH 3.0), safra tuzları (%0.3) ve GI sistem modelinde (<%70) yüksek bir sağkalım sergilemiştir. Sonuçlar, oto-agregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobikliğinin sırasıyla %39.98 ile %60.09 ve %50.80 ile %80.53 arasında değiştiğini gösterirken, *Pseudomonas aeruginosa* ile *L. fermentum* (DUR8) tarafından en yüksek ko-agregasyon değerinin (%66.44) gözlemlendiğini belirlenmiştir. İzolatlar, test edilen patojenlere karşı iyi inhibitör aktivite, yüksek antioksidan aktivite (%32.29 ile %73.36) ve kolesterolü azaltma kabiliyeti (%22.55 ile %75.15) göstermiştir. Bu nedenle mevcut çalışmada, test edilen yedi suşun probiyotik olarak değere sahip olduğu belirlenmiştir (Khalil ve ark. 2018).

Amao ve ark. (2019)'da, ekvatoryal iklimlerde kolayca yetişen odunsu bir bitki olan Manyok kabuğu yığınlarından bazı EPS üreten bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Manyok kabuğu yığın numunelerinden 80 tane bakteriyel izolat, modifiye edilmiş bir kristal viyole yöntemi kullanılarak biyofilm üretme yetenekleri açısından test edilmiş ve 13 tane güçlü ve orta biyofilm oluşturuca tarafından üretilen EPS'lerin toplam karbohidrat içeriği, fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir. EPS'nin 0.67 g/l glukoz eşdeğerini oluşturan pozitif kontrol (*Staphylococcus epidermidis*) ile karşılaştırıldığında farklı izolatlar tarafından üretilen EPS'lerin karbohidrat değerlerinde anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda (12.76 g/l) izolat J47, ardından 10.95 g/l'lik konsantrasyonda J1 ve

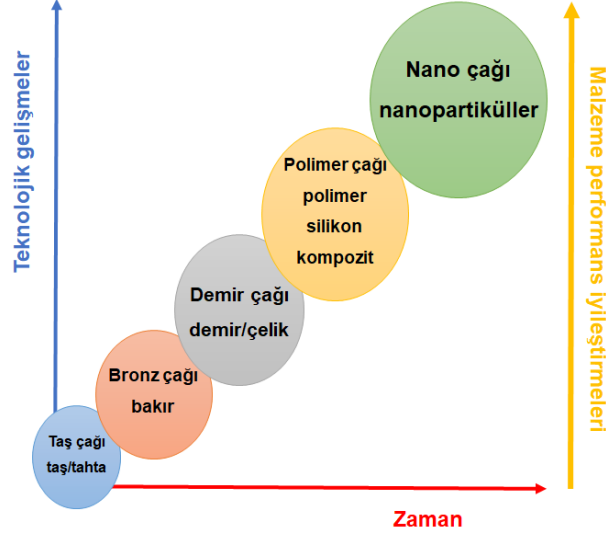
son olarak da 10.37 g/l ile J2 EPS'yi üretmiştir. En düşük EPS miktarı (0.13 g/l) da izolat J30 ile üretilmiştir. İzolatın EPS üretme kabiliyetindeki bu farklılığın, söz konusu bakteri suşlarına ve büyüme ortamına bağlı olabileceği vurgulanmıştır. Elde edilen bakteriyel izolatların üçünün *Bacillus* cinsine ait olduğu, birinin *L. plantarum* olarak tanımlandığı ve izolatların dördünün de *Klebsiella pneumoniae* olduğu belirlenmiştir. Dört izolat iyi EPS miktarı üretmiştir, EPS üreticilerinin çoğu *Bacillus* cinsindendir.

Bakteriyel kökenli EPS ile yapılan bir diğer çalışmada *Pediococcus parvulus* 2,6 ve rekombinant bir *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir 2-süstitüe β -1 $\rightarrow$ 3-D-glukan, *in vitro* insan makrofaj aktivasyonu ile immünomodülasyon göstermiş, bu da antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik etmiştir (Notararigo ve ark., 2014). Benzer bir etki, probiyotik ajan (intestinal mukozaya iyi uyumlu) bir *in vitro* çalışmada bir *L. paraplantarum* suşu tarafından üretilen nötr bir HePS (glukoz, ramnoz, galaktoz) ile fark edilmiştir (Nikolic ve ark., 2012). Deniz balıklarının GI kanalından izole edilen diğer LAB türlerinin (örneğin *Weissella cibaria*) EPS'si, probiyotikleri uyaran bir prebiyotik *in vitro* aktivite göstermiştir (örneğin *Bifidobacteria*) (Hongpattarakere ve ark., 2012). Bir β -1 $\rightarrow$ 4 D ile β -1 $\rightarrow$ 6 D- 1:2 dallı glukandan üretilen, izole bir Çin *Rhizobium* sarkom 180 (S180), hepatom 22 (H22) ve Ehrlich asit karsinomu olan farelerde immüno-güçlendirici ve antitümör aktiviteleri göstermiştir (Zhao ve ark., 2010). Ksantanın bir NaOCl/NaBr/TEMPO katalizörü C-6 oksidasyonu ile elde edilen ksantoronan, *in vitro* antioksidan aktivite sergilemiştir (Delattre ve ark., 2015). Fukoz, glukoz, galaktoz, glukuronik asit, piruvat, süksinat, asetattan oluşan doğadan izole edilmiş *Enterobacter bacteria* suşları tip-2 diyabetik farelerde hipoglisemik ve hipolipidemik aktiviteler göstermiştir (Freitas ve ark., 2011; Huang ve ark., 2015). *Halomonas smyrnensis* suşu tarafından üretilen levan, özellikle oksitlenmiş (aldehit) türevi, insan akciğer (A549), karaciğer (Hep G2/C3A), gastrik (AGS), meme (MCF-7) kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* antikanser aktivitesi göstermiştir (Sarilmiser ve Oner, 2014). Bir *Paenibacillus polymyxa* suşu tarafından üretilen levan EPS'nin asetil, fosforil ve benzil esterleri, *in vitro* insan gastrik kanser hücrelerine (BGC-823) karşı antioksidan ve anti-proliferatif aktiviteler sergilemiştir (Liu ve ark., 2012; Zong ve ark., 2012). *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen levan, alloksan kaynaklı diyabetik ratlarda temel organları koruyan hipoglisemik ve antioksidan aktiviteler, enzimatik

savunmayı arttırmıştır (Dahech ve ark., 2011). Baldan izole edilmiş *Bacillus subtilis* suşları tarafından üretilen levan, kuş gribi ve tip 40 adenovirus üzerinde antiviral aktivite göstermiştir (Esawy ve ark., 2012). Levanın anti-AIDS aktivitesi de fark edilmiştir (Srikanth ve ark., 2015). Bakteriyel EPS'lerin sülfatlama ile arttırılan antiviral aktivitesi, viral bağlanma ve hücrelerin penetrasyonu/enfeksiyonu ile etkileşime bağlı olarak, muhtemelen viral zarf glikoproteinleri ile etkileşime girerek, çok daha önce fark edilmiştir (Matsuda ve ark., 1999; Laroche ve Michaud, 2007). Yüzey plazmonu tepki teknolojisi ile elde edilen son sonuçlar, etkileşimi teyit etmiş, kurdan sülfat, rekombinant insan hepatit B viral proteinini bağlamış ve sülfatlama derecesine doğru orantılı bir artış göstermiştir (Li ve ark., 2014). *L. plantarum* BR2 tarafından üretilen EPS'lerin antidiyabetik ve kolesterol düşürücü özelliklerini araştıran Sasikumar ve araştırma grubu, EPS'nin normal hücreler için toksik olmadığı sonucuna ulaşmışlardır (Sasikumar ve ark., 2017). Benzer şekilde, *L. plantarum* MTCC 9510 tarafından üretilen EPS'nin antioksidan, antitümör özelliği incelenmiş ve EPS'nin antitümör özelliklere sahip olduğu ve ayrıca normal hücreler için toksik olmadığı tespit edilmiştir (Ismail ve Nampoothiri, 2013).

2.6. Nanoteknoloji

Tarihsel konjonktürde toplumların gelişmesi üzerine en başından beri malzemeler, her zaman önemli bir paya sahip olmuştur. Tarih öncesi çağlar, genel olarak o dönemde kullanılan malzemelere göre adlandırılmıştır. Taş, bronz ve demir çağlarının, uygarlıkların gelişmesi noktasında malzemelerin önemini yansıttığı açıkça görülmektedir. Her zaman hayranlık uyandıran günümüz teknolojik gelişmeleri düşünüldüğünde Şekil 2.8'de temsil edilmeye çalışıldığı gibi yy'ımızı, tasarlanmış nano malzemelerdeki gelişimler paralelinde “nano çağı” olarak nitelemek mümkündür.



Şekil 2.8. Doğrusal olmayan bir ölçeğe sahip malzeme-zaman ilişkisi

Dünya, özellikle son yıllarda bir multidisipliner teknolojinin, “nanoteknoloji”nin ilerlemesine ve gelişimine tanık olmaktadır. Nanoteknolojinin ilk tohumlarını aslında 1959’da ABD’li ünlü fizikçi Richard Feynman konuşmasında atmıştır. Feynman NP’lerin önemini “Altta çok yer var” diyerek vurguladığında nano malzemeler işte tam da o zaman dikkat çekmeye başlamıştır. Bu konuşmasıyla bir gün atom seviyesinde bir şeyler yapılacağını öngörmüştür. Bu küçük şeyler yukarı doğru birikeceğinden, onların daha hassas hale getirilebileceğinden ve ne istenirse yapmalarının kontrol edilebileceğinden bahsetmiştir (Feynman, 1960). Ancak o dönemlerde karakterizasyon araçları mikron altı sistemleri inceleyecek kadar güçlü olmadığından teknolojik gelişmelerin nano boyutlu malzemeleri incelemesine izin verene kadar Feynman’ın beklemesi gerekiyordu. O, ilk günlerde “nanoteknoloji” terimini kullanmadan nanoteknolojinin, makro ölçekli ürünlerin üretimi için atomlar ve moleküllerin doğrudan manipülasyonu yoluyla sentez olasılığına atıfta bulunmuştur. 1986’da ABD’li bilim insanları K. Eric Drexler ve M. Minsky, birkaç nanometre genişliğindeki molekül ölçeğinde makine ve cihazları bir araya getirmeyi önerdikleri “Yaratılış Motorları Nanoteknolojinin Yaklaşan Çağı” adlı kitaplarında “nanoteknoloji” kelimesini kullanmışlardır (Anonim, 2021a). Daha sonra nanoteknolojinin kabul gören bir kavram haline gelmesiyle birlikte kelimenin anlamı, nanometre ölçeğinde her türlü malzeme, yapı ve aygıtın yapılmasıyla ilgili teknolojileri kapsayacak şekilde değişmiştir. Nanoteknolojiyi; nano ölçekte sistemler, malzemeler ve cihazlar üretmek ve bunların

çeşitli alanlardaki uygulamalarını oluşturmak için atomları ve molekülleri manipüle etme sanatı ve bilimdir şeklinde tanımlamak mümkündür. Teknoloji ve mühendislik disiplinlerini bünyesinde barındıran nano ölçekli bu bilim, nano skalasında maddenin görüntülenmesini, ölçülmesini, modellenmesini ve manipülasyonunu içerir. Terminolojik olarak nanoteknoloji terimindeki “nano” ön eki, cüce anlamına gelen yunanca “nanos” (Latince “nanus”) kelimesinden türetilmiştir. Ağırlıklar ve Ölçüler Genel Konferansı (General Conference on Weights and Measures-CGPM), 1960 yılında “nano”nun standart bir örnek olarak kullanımını resmen onaylamıştır. Bir ölçü biriminden başka bir şey için ön ek olarak kullanıldığında (örneğin “nanobilim” gibi kelimelerde olduğu gibi), “nano”, nanoteknolojiye atıfta bulunur veya “nanometre ölçeğinde” anlamına gelir (Anonim, 2021b). Uluslararası Birimler (SI) Sisteminde, “nano” ön eki milyarda bir veya 10^{-9} metre (m) anlamındadır. Yani bir nanometrenin (nm), bir m’nin milyarda birine denk geldiği söylenebilir. Bu skalanın çok çok küçük olduğunu hayal etmek zor olduğu için şu örnekler verilebilir. Bir yaprak kâğıt yaklaşık 100 000 nm kalınlığındadır. Bir insan DNA ipliğinin çapı 2.5 nm’dir. Tek bir Au atomunun çapı yaklaşık 1 nm’nin 1/3’i kadardır (Anonim, 2021c).

Bir nanomalzeme, nano ölçekte bir veya daha fazla dış boyutu olan veya nano yapıları bir malzeme olarak tanımlanmaktadır. Bu, NP’leri, nanoçubukları, nanotüpleri, nanotelleri vb. kapsamaktadır (Ramsden, 2009). Nanomalzemeler, Çizelge 2.5’te gösterildiği gibi boyutlarına göre kategorize edilebilmektedir (Filipponi ve Sutherland, 2012).

Çizelge 2.5. Nanomalzemelerin boyutlarına göre sınıflandırılması

Nanomalzeme boyutu	Türü
Üç boyutun tümü <100 nm	Nanopartikül, kuantum noktaları (dots), nanoshell, nanoring ve mikro kapsüller
İki boyut <100 nm	Nanotüpler, lifler, nanoteller
Bir boyut <100	İnce filmler, katmanlar ve kaplamalar

Nanobilim ve nanoteknolojiler, maddenin nano ölçekteki olağanüstü özelliklerine bağlıdır. Bu bağlamda, “nano” sadece “mikro”dan 1000 kat daha küçük anlamına gelmez ve nanoteknolojiler sadece mikro teknolojilerin daha küçük bir ölçekte uzantısı değildir. Nanobilim ve nanoteknolojilerin malzeme, mühendislik ve ilgili bilimlerde bu kadar umut verici olmasının çeşitli nedenleri vardır. İlk olarak, nanometre ölçeğinde,

maddenin enerji gibi özellikleri değişir. Bu, fiziksel anlamda kuantum etkileri olarak açıklanan küçük boyutlu nanomalzemelerin doğrudan bir sonucudur. Sonuç olarak, nano boyutlu bir formdayken bir malzemenin (örneğin bir metal) aynı malzemenin kütle/yığın halde olduğundan çok farklı özelliklere sahip olmasıdır. Örneğin, kütle/yığın gümüş (Ag) toksik değildir, oysa AgNP'ler temas halinde virusları öldürme yeteneğine sahiptir. Nano ölçekli seviyeye ulaşıldığında elektrik iletkenliği, renk, mukavemet ve ağırlık değişimi gibi özellikler nano ölçekli düzeyde bir yarı iletken veya yalıtkan haline gelebilir. Son olarak, nanomalzemeler kütle/yığın malzemelere kıyasla artan bir yüzey-hacim oranına sahiptir. Bunun, kataliz ve algılama gibi bir malzemenin yüzeyinde meydana gelen tüm prosesler için önemli sonuçları vardır. Malzemenin boyutu küçüldüğünde ve nano ölçekli seviyeye ulaşıldığında, aynı malzemenin tamamen farklı özellikler (farklı erime noktası, iletkenlik vb.) göstermesi mümkündür. Bunun nedeni, nano ölçekteki maddenin artık Newtonian fiziğini değil, kuantum mekaniğini takip etmesidir. Başka bir deyişle, malzemelerin özellikleri boyuta bağlı olabilir. Boyut, normalde kilit bir faktör olarak belirtilmez. Büyük veya küçük olmasına rağmen, muhtemelen bir Au parçasının altın renginde olması beklenir. Bu, makro ve mikro ölçekte doğrudur, ancak nano ölçekte, kuantum etkileri nedeniyle işler çarpıcı biçimde değişmeye başlar. Aslında, Au en iyi örnek olarak kullanılabilir, AuNP'lerin bir kolloidi artık altın değil, yakut kırmızısı renklidir (Filipponi ve Sutherland, 2012).

Nanomalzemelerin ikinci istisnai özelliği, bottom-up (aşağıdan yukarıya) denilen bir prosesle atom tarafından üretilbilmeleridir. Nano kaplama (nanocoating) gibi nanomalzeme, atomik veya moleküler öncüllerden başlayarak ve istenen yapı oluşana kadar kademeli olarak bir araya getirilerek elde edilir. Yöntem Lego® parçalarını kurmaya benzer. Yani, atom-atom veya molekül-molekül mühendisliği yoluyla nanoyapılar inşa edilebilmektedir. Genellikle, atomik katman biriktirme gibi ıslak-kimyasal veya buhar fazlı işleme yolları gerektirir. Bazı durumlarda optik, elektriksel veya mekanik nanoprobler aracılığıyla atomik veya moleküler manipülasyon uygulanır. Gaz fazı birikimi ile karbon nanotüpler, gaz fazı biriktirme ile metal, metaloksit, seramik ve hatta polimer türünden yapılmış nanoteller, kuantum noktaları (dots), kendi kendine montaj, moleküler ve biyoyapılar ile nanotıp bottom-up yöntemi için tipik örnekler teşkil etmektedir. Bir diğer nanomalzeme sentez yöntemi olan top-down

(yukarıdan aşağıya) yöntemini tanımlamanın basit bir yolu, büyük bir mermer bloktan bir heykel yapmayı düşünmektir. Baskı (printing) yöntemleri de bu kategoriye aittir. Bottom-up (aşağıdan yukarıya) yöntemleri ters yönde çalışır. Bu yöntem ile nanoyapılar ve cihazlar, ölçeklendirme ve minyatürleştirme yoluyla yapılır. Genellikle litografik örüntüleme, kabartma veya baskı teknikleri ile nano ölçeğe kadar hassas mühendislik gerektirir. Mikro ve nanoelektronik, Mikro Elektro Mekanik (MEM)'ler, MEM sistemler, katalitik yüzeyler ve membranlar gibi nanoyapılar, güneş pilleri, elektrospinning ile nanolifler, eksfoliasyon ile nanoklay trombositler ve tüpler yöntemin tipik örnekleridir. Her iki yöntemde de iki temel koşul vardır. Elektron ışınının enerjisi gibi üretim koşullarının ve toz, kontaminantların varlığı, vb. gibi ortam koşullarının kontrolüdür (Filipponi ve Sutherland, 2012).

NP'ler; kimyasal, fiziksel, elektriksel, optik, elektronik, mekanik, manyetik, dielektrik, biyolojik ve termal birçok eşsiz, karakteristik özelliklere sahiptir (Sundari, 2016). Nanomalzemelerin nano ölçekteki fiziksel ve kimyasal özellikleri, kütle/yığın boyutundakilerden çok farklıdır, bu da yüzey atomlarının büyük bir kısmı, yüksek yüzey enerjisi, uzaysal sınırlama ve azaltılmış kusurlarla sonuçlanan malzemelerin nanometre boyutundan kaynaklanmaktadır (Yang, 2019). Bu nedenle NP'ler, yeni nesil optoelektronik, elektronik ve çeşitli kimyasal ve biyokimyasal sensörlerin yapı taşları olarak kabul görmektedir (Jebali ve ark., 2011). Nanoteknolojide önemli bir araştırma alanı, farklı kimyasal bileşimlere, boyutlara, biçimlere ve kontrollü dağılımlara sahip NP'lerin sentezidir (Ahmad ve ark., 2003a). Nanoteknolojinin önemli bir yönü, bir dizi kimyasal bileşim, boyut ve yüksek monodispersite üzerinde nanomalzemelerin sentezi için güvenilir deneysel protokollerin geliştirilmesiyle ilgilidir (Sastry ve ark., 2003). Tekniklerin çoğu aşırı sermaye gerektirdiği gibi malzeme ve enerji kullanımında da verimsiz olabilmektedir. Farklı türde NP'leri sentezlemek için çok sayıda fiziksel, kimyasal, biyolojik ve hibrit yöntem mevcuttur (Mohanpuria ve ark., 2008; Liu ve ark., 2011). Monodispers NP'ler üretmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmasına rağmen, toksik kimyasalların stabilitesi ve kullanımı en büyük endişe konusudur. Sentez prosedüründe NP'lerin ve non-polar çözücülerin yüzeyinde toksik kimyasalların kullanılması, klinik alanlardaki uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, NP sentezi için temiz, biyouyumlu, non-toksik ve çevre dostu yöntemlerin

geliştirilmesi liyakati hak etmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Sonuç olarak, NP kurgu ve sentezi alanındaki araştırmacılar, üretim için biyolojik sistemlere yönelmişlerdir. Farklı NP'lerin üretimi için potansiyel gösteren biyolojik sistemler; bitkiler (Shankar ve ark., 2004), bakteriler (Klaus-Joerger ve ark., 2001), mantarlar ve aktinomisetler (Sastry ve ark., 2003) gibi çeşitli mikroorganizmalar ile diğer tek hücreli ve çok hücreli organizmalardır. Örneğin, manyetotaktik bakteriler gibi tek hücreli organizmalar manyetit NP'ler üretir (Lovley ve ark., 1987; Spring ve Schleifer 1995; Dickson, 1999) ve diatomlar silisli malzemeleri sentezler (Mann, 1993; Oliver ve ark., 1995; Kröger ve ark., 1999). Çok hücreli organizmalar, kompleks bir yapı oluşturmak için inorganik malzemeleri kullanarak kemikler, kabuklar ve spiküller gibi sert inorganik-organik kompozit malzemeler üretirler (Lowenstam, 1981). Bu biyomineraller, kompozit malzemelerdir ve inorganik bir bileşenden ve inorganik bileşiğin morfolojisini kontrol eden özel bir organik matristen (proteinler, lipidler veya polisakaritler) oluşur. Yüzey tabakası bakterileri, alçı ve kalsiyum karbonat katmanları üretir (Pum ve Sleytr 1999; Sleytr ve ark., 1999). Bilim insanlarının dikkatini çeken mikroorganizmaların doğal, temiz, toksik olmayan ve çevre dostu metal NP'leri oluşturma yetenekleri, nanobiyoteknolojinin geliştirilmesinde özellikle önemli bir yer tutmaktadır. Metaller ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler, biyoremediasyon, biyomineralizasyon, biyoliç ve biyokorozyon (Klaus-Joerger ve ark., 2001) alanlarında çeşitli biyolojik uygulamalar için kullanılmış ve NP'lerin mikrobiyal sentezi, biyoteknoloji ve nanoteknolojiyi birbirine bağlayan nanobiyoteknoloji çatısında umut verici bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Biyojenik enzimatik bir işlemle üretilen NP'ler, kimyasal yöntemlerle üretilen partiküllerden birkaç yönden çok daha üstündür. Kimyasal yöntemler, nispeten kısa sürede belirli bir boyut ve şekle sahip büyük miktarlarda NP üretebilse de, kompleks, modası geçmiş, maliyetli ve verimsizdir ve yalnızca çevreye değil aynı zamanda insan sağlığına da zararlı olan tehlikeli toksik atıklar üretir. Biyolojik yöntemlerle pahalı kimyasalların kullanımı ortadan kalkar; kimyasal yöntem kadar enerji yoğun değildir ve aynı zamanda çevre dostudur. “Biyojenik” yaklaşım, mikroorganizmaların çoğunluğunun değişen sıcaklık, pH ve basınçtaki ortam koşullarında yaşadığı gerçeğiyle de desteklenmektedir. Biyolojik yaklaşımları kullanan partiküller, mikrobiyal taşıyıcı matris nedeniyle daha yüksek katalitik reaktiviteye, daha büyük spesifik yüzey alanına

ve enzim ile metal tuzu arasında iyileştirilmiş teması sahiptir (Bhattacharya ve Mukherjee, 2008). NP'lerin mikrobiyal sentezi sırasında mikroorganizmalar, hedef iyonları çevrelerinden alır ve daha sonra hücre içi ve hücre dışı sentez olarak iki tipte sınıflandırılabilir (Mann, 2001). Hücre içi yöntem, enzimlerin varlığında NP'ler oluşturmak için iyonların mikrobiyal hücreye taşınmasından oluşur. NP'lerin hücre dışı sentezi, metal iyonlarının hücre yüzeyinde tutulmasını ve enzimlerin varlığında iyonların indirgenmesini içerir (Zhang ve ark., 2011). Biyosentezlenmiş NP'ler, hedefe yönelik dağıtım için ilaç taşıyıcıları, kanser tedavisi, gen tedavisi ve DNA analizi, antibakteriyel ajanlar, biyosensörler, reaksiyon hızlarını artırma, ayırma bilimi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) dâhil olmak üzere çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır (Li ve ark., 2011).

Nanoteknoloji ile mikro ve nano düzeye kadar minyatürleştirme, yalnızca seri üretime uygun daha küçük ürünler ve daha düşük maliyetler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda makro düzeyde elde edilemeyen tamamen yeni işlevselliklere kapı aralamaktadır. Yeni fonksiyonlar, küçük boyutların fiziksel ve kimyasal etkileri, yeni atomik yapılar üretebilme yeteneği, çok küçük hacimlerin işlenmesi ve doğal çevre üzerindeki etkileri ile kazanılır. Yenilikçi ürünler ve yeni pazar potansiyelleri için içinde bulunduğumuz yy'ın kilit teknolojisi nanoteknoloji alanıdır. Nanoteknoloji alanı, bilim ve teknolojinin farklı alanlarındaki oldukça kapsamlı uygulamalarının bir sonucu olarak inanılmaz hızla gelişen bir alandır. Kataliz, optik, biyomedikal bilimler, mekanik, manyetik, elektrik-elektronik ve enerji bilimi gibi alanlarda her geçen gün önem kazanmaktadır. Nanoteknoloji, hemen hemen tüm endüstriyel ve sosyal alanlar üzerinde önemli etkilere sahip olduğu için genel amaçlı bir teknoloji olarak da değerlendirilebilir. Nanoteknolojinin hemen hemen tüm teknolojik sektörleri etkinleştirme gibi bir gücü olduğunu söylemek, gerçekten çok da ütöpik görünmemektedir. Bu anlamda nanoteknolojiden tıp ve sağlık, malzeme bilimi, bilgi ve iletişim teknolojisi, enerji üretimi ve depolama, ulaşım, araçlar ve altyapı, tarım, gıda, su ve çevre, güvenlik ve genel olarak endüstri için daha iyi inşa edilmiş, daha uzun ömürlü, daha temiz, daha güvenli ve daha akıllı ürünler sunması beklenmektedir. Multidisipliner bir karakteristiğe

sahip olduğundan kimya, malzeme bilimi ve bazı durumlarda tıp, biyoloji, moleküler biyoloji ve genetik nano ölçekte malzemelerin yeni özelliklerini oluşturmak için entegre edilebilmektedir. Ancak, pazar gereksinimi ve fırsatlarını elde etmek için mühendislik ilkelerinden de yararlanmak son derece önem arz etmektedir.

Günümüz teknoloji çağında nanoteknoloji çok güçlü bir inovasyon itici gücü olarak kabul gördüğünden gelecekteki global ekonomi için, nanoteknolojiyi stratejik bir teknoloji olarak görmek gerekmektedir. Bu algı, şu an küresel olarak mevcuttur ve birçok ülke yüksek beklentilere sahip gerek ulusal ve gerekse uluslararası nanoteknoloji programları aracılığıyla nanoteknolojiye dev yatırımlar yapmaktadırlar. İnsan hayatını ve refahını güvence altına almak ve optimize etmek için insan merkezli sistemler geliştirilmektedir. Sistemler, insanın kendi çevresinde izleme ve geri bildirim fonksiyonlarının yanı sıra koruma ve destek araçları sağlamaktadır. Bu yaklaşım en iyi tıbbi bakım, ilk müdahale ekipleri, validasyon, spor, güvenlik alanlarında kendisini göstermektedir. Örneğin insan yaşamına dair tedavi, onarım ve iyileştirmede büyük adımların atılabileceği, yüksek beklentilerin olduğu içerisinde bulunduğumuz bu anda akıllı implantlar, nano-tıp, rejeneratif-tıp en yenilikçi yaklaşımlar olarak göze çarpmaktadır. Bir vücut fonksiyonunu onarmak veya geliştirmek için algılanabilen ve harekete geçebilen biyoyumlu implantlar, yan etki profili veya insan stimülasyonu olmadan hızlı tedavi için tıbbi olarak işlevselleştirilmiş NP'ler tarafından hedeflenen ilaç taşınımı, hızlı ve efektif yara iyileşmesi, organların ve diğer vücut parçalarının yeniden inşası için DNA programlı doku mühendisliği bu yaklaşımlardan bazılarıdır.

2.6.1. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen nanopartiküller

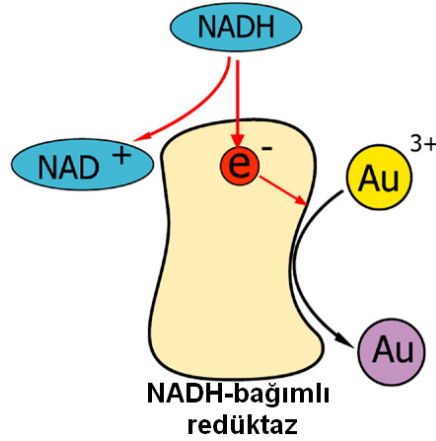
NP'lerin kimyasal bileşimleri önemli olmakla birlikte, NP'lerin morfolojisi (boyut ve şekil) ve yüzey/kolloidal özellikleri eşit derecede önemlidir. Örneğin, çok daha küçük boyuta sahip NP'lerin, daha büyük boyutlu NP'lerden çok daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Chwalibog ve ark., 2010). İlaç taşınımı ile ilgili olarak, NP ne kadar küçükse, dolaşım sisteminde o kadar uzun süre kalacak ve bu nedenle hedef bölgeler arasında dağılma şansı daha yüksek olacaktır (Gaumet ve ark., 2008). NP'ler genelde sentetik olarak oluşturulabilir veya çevre içinde doğal olarak (örneğin mikrobiyal biyosentez yoluyla) oluşabilir. Her iki durumda da, ortaya çıkan

NP'lerin morfolojisindeki varyasyonlar yaygındır. NP'ler; nanoküreler, nanoçubuklar, nanoküpler, nanolevhalar, nanobeltler, nanotetrapodlar ve nanoprizmalar olarak bulunabilir. Bunlar yüz merkezli kübik, küpoktahedron, ikosahedronlar, düzenli dekahedronlar, yıldız dekahedronlar, marks dekahedronlar ve yuvarlak dekahedronlar şeklinde gruplandırılabilir (Yacamán ve ark., 2001). NP'lerin morfolojilerine ek olarak son derece önemli bir başka yönü de bileşimleridir. Örneğin, metal iyonları içeren NP'ler, yeni teknoloji ve proseslerde giderek daha yaygın hale gelen birçok faydalı özelliğe sahiptir. Örneğin, AgNP'ler üzerine yapılan bir inceleme, AgNP'lerin gıda depolama, fotonik, bilgi depolama, elektronik ve optik algılama sistemleri, terapötikler, teşhisler, fotovoltaiıklar ve katalizörler dâhil olmak üzere çok çeşitli uygulamalarda kullanımını kapsamaktadır (Sweet ve Singleton 2011). Bununla birlikte, NP'lerin Ag gibi metallerle oluşturulmasının önemli avantajlarına rağmen, metal NP'lerin şeklini sentetik olarak kontrol etme zorluğu değişken başarı ile karşılaşmıştır. Nanometre ölçeğinde, Ag gibi metaller şüphesiz yüzey merkezli kübik şekiller halinde oluşur ve çekirdeklenme ve ikiz haline gelme eğilimindedir ve ikiz parçacıkları, yüzeyleri en düşük enerji yüzeyleriyle sınırlanmış şekilde çoğaltarak, belirli bir boyut ve/veya metal NP şekline yönelik manipülasyonu zorlaştırmaktadır (Allpress ve Sanders, 1967).

NP'leri sentezleyebilen mikroorganizmalar, özellikle kara ve deniz ekosistemlerinin yaygın mikrofloralarıdır. Mikroorganizmaların, çökeltme (biyomineralizasyon), ayrışma (biyo-parçalanma) ve bozunma (biyokorozyon) gibi işlemlerde metallerin biyojeokimyasal döngülerinde yer aldığı iyi bilinmektedir. Her ekolojik prosesin merkezinde, metal spesifikasyonunu ve nihayetinde toksisiteyi yöneten mobilizasyon, dağıtım ve kimyasal modifikasyon yer almaktadır. Bu ekolojik proseslerin bir sonucu olarak, mikroorganizmalar genellikle, yönetilmedikleri takdirde hücre ölümüne neden olabilecek toksik seviyelerde ağır metallere maruz kalırlar (Gadd, 2010). Örneğin, Ag toksisitesi, solunumla ilgili enzimler dâhil olmak üzere membrana bağlı proteinlerin tiyol grupları ile etkileşim yoluyla meydana gelebilir, bu da hücresel membranların bozulmasına yol açar ve ardından bir proton gradyanının korunamaması yoluyla proton hareket kuvvetinin bozulmasına neden olur. Bunun, elektron taşınmasının bozulması nedeniyle solunum zincirinin oksidatif fosforilasyondan ayrılmasını teşvik ettiği düşünülmektedir (Holt ve Bard, 2005). Kontrolsüz solunum, süperoksit ve hidroksil

radikal oluşumunu teşvik ederek SOS yanıtının indüklenmesine ve nihayetinde hücre ölümüne yol açmaktadır. Benzer metal toksisite tepkileri, örneğin, Cd gibi diğer metallerle de gözlenmektedir ve NP biyosentezi, metal direncinin ortak bir yan ürünü gibi görünmektedir (Ahmad ve ark., 2002). Metal NP'lerin mikroorganizmalar tarafından biyosentezi, toksik ağır metallerin toksik olmayan türlere dönüştürüldüğü ve nano ölçekli boyut ve tanımlanmış şekilde metal kümeleri olarak çökeltildiği ağır metal toksisite direnç mekanizmalarının bir fonksiyonudur (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Direnç mekanizmaları, toksik metal iyonlarını inert formlara dönüştüren redoks enzimlerinden, proteini bağlayan yapısal proteinlerden (Gadd, 2010) veya metal iyonlarını proton hareket kuvveti, kemiozmotik gradyanlar veya ATP hidrolizi ile taşıyan dışa akış proteinlerinin kullanımı yoluyla değişmektedir (Nies, 2003). Bu tür mekanizmaların, sentezi koordine etmek için çalıştığı öne sürülmektedir.

Mikrobiyal sistem ve bununla ilişkili metabolizmaların doğası gereği karmaşık olduğu düşünüldüğünden, büyüme sırasında NP'lerin hücre içi veya hücre dışı olarak sentezlendiği bildirilmiştir (Mandal ve ark., 2006; Ghorbani ve ark., 2011). Hücre içi sentez durumunda NP'ler, hücre duvarının indirgeyici yolları ile bakteri hücrelerinin içinde üretilir ve hücrenin periplazmik boşluğunda birikir. NP'ler, hücre duvarı indirgeyici enzimler veya çözünür salgılanan enzimler hücre dışında ekstrakte edildiğinde ve metal iyonlarının indirgeme işlemine dâhil olduğunda hücre dışı olarak üretilir. Metal NP'lerin biyosentezinde yer alan enzimlerden biri, metal iyonlarını (Me^{1+}) metalik forma (Me^0) indirgeyen nitrat redüktazdır. Bu enzim, NADH ve NADPH'ye bağımlı bir enzimdir. He ve ark. (2007), *Rhodopseudomonas capsulate* tarafından gerçekleştirilen AuNP biyosentezi için varsayımsal mekanizmayı tanımlamıştır. Bu bakterilerin, Au^{3+} 'nın Au^0 'a biyolojik olarak indirgenmesinden ve ardından AuNP'lerin oluşumundan sorumlu olabilen kofaktör NADH- ve NADH-bağımlı enzimler salgıladıkları bilinmektedir (Şekil 2.9). Bu indirgeme, Au^{3+} iyonlarının elektron kazandığı ve dolayısıyla Au^0 'a indirgendiği elektron taşıyıcısı olarak NADH'ye bağımlı redüktaz tarafından NADH'den elektron transferi ile başlatılır.



Şekil 2.9. AuNP biyosentezi için varsayımsal mekanizma (He ve ark., 2007)

2.6.2. Metalik nanopartiküller

Metalik NP'ler, bir yy'dan fazla bir süredir bilim insanlarını büyülemiştir ve şu anda biyomedikal bilimler ve mühendislikte yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Nanoteknolojideki büyük potansiyelleri nedeniyle ilgi odağıdır (Mody ve ark., 2010). Metalik NP'ler; elektronik, kozmetik, kaplama, ambalaj ve biyoteknoloji gibi çeşitli alanlarda olası uygulamalara sahiptir (Manivasagan ve ark., 2015). Örneğin, NP'ler nispeten daha düşük sıcaklıklarda genellikle erimeden, bir katı halinde birleşmeye indüklenebilir. Bu da elektronik uygulamalar için geliştirilmiş ve oluşturulması kolay kaplamalara yol açabilmektedir. Tipik olarak, NP'ler ışığın kritik dalga boyunun altında bir dalga boyuna sahiptir. Bu, onları kozmetik, kaplama ve ambalaj uygulamaları için çok yararlı kılan bir özellik olan şeffaf hale getirmektedir. Metalik NP'ler, tek DNA iplikçiklerine tahribatsız olarak eklenebilir. Bu, tıbbi teşhis uygulamaları için yollar açabilir. NP'ler damar sisteminden geçebilir ve herhangi bir hedef organı lokalize edebilir. Bu potansiyel yeni terapötik, görüntüleme ve biyomedikal uygulamalara yol açabilir (Thakkar ve ark., 2009). Günümüzde bu malzemeler, antikorlar, ligandlar ve ilgili ilaçlarla konjuge olmalarını sağlayan çeşitli kimyasal fonksiyonel gruplarla sentezlenebilir ve modifiye edilebilir. Böylece biyoteknoloji, manyetik ayırma ve hedef analitlerin pre-konsantrasyonunda hedeflenen ilaç taşınımı ve gen-ilac taşınımı için araçlar ve daha da önemlisi tanısal görüntüleme çok çeşitli potansiyel uygulamalara yol açılabilir (Mody ve ark., 2010). Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı tipik metal NP'ler Çizelge 2.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen metal nanopartiküller

Mikroorganizma	Nanopartikül tipi	Boyut (nm)	Şekil	Referans
Bakteri				
<i>Actinobacter</i> spp.	Manyetit	10-40	Küresel	Bharde ve ark., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ag	Ortalama 50	-	Kalimuthu ve ark., 2008
<i>Bacillus cereus</i>	Ag	4-5	Küresel	Babu ve Gunasekaran, 2009
<i>Brevibacterium casei</i>	Ag, Au	10-50	Küresel	Kalishwaralal ve ark., 2010
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pd	Ortalama 50	Küresel	Lloyd ve ark., 1998
<i>Enterobacter</i> sp.	Hg	2-5	Küresel	Sinha ve Khare, 2011
<i>Escherichia coli</i>	CdSO ₃	2-5	Küresel, eliptik	Sweeney ve ark., 2004
<i>Escherichia coli</i>	Ag	Ortalama 50	Küresel	Gurunathan ve ark., 2009
<i>Escherichia coli</i>	CdTe	~2-3	Küresel	Bao ve ark., 2010
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ag	5-15	Küresel, üçgen	Ahmad ve ark., 2003c
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Au	35-65	Küresel	Malarkodi ve ark., 2013
<i>Lactobacillus</i> spp.	Au, Ag	20-50	Üçgen, altıgen	Nair ve Pradeep, 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Au	15-30	-	Husseiny ve ark., 2007
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ag	200	Üçgen, altıgen	Klaus ve ark., 1999
<i>Rhodococcus</i> sp.	Au	5-15	Küresel	Ahmad ve ark., 2003b
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Au	10-20	Küresel	He ve ark., 2007
<i>Shewanella algae</i>	Au	10-20	Üçgen	Konishi ve ark., 2007a
	Pt	~5	-	Konishi ve ark., 2007b
<i>Shewanella oneidensis</i>	Au	~2-50	Küresel	Suresh ve ark., 2011
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Ag	10-100	Küresel	Juibari ve ark., 2011
Fungus				
<i>Aspergillus flavus</i>	Ag	8-9	Küresel	Vigneshwaran ve ark., 2007

Çizelge 2.6. (Devam) Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen metal nanopartiküller

Mikroorganizma	Nanopartikül tipi	Boyut (nm)	Şekil	Referans
Fungus				
<i>Fusarium oxysporum</i>	Silika	5-15	Yarı-küresel	Bansal ve ark., 2005
	Titanya	6-13	Küresel	
<i>Neurospora crassa</i>	Ag, Au	Ortalama 11, 32	Küresel	Castro-Longoria ve ark., 2011
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ag	~50-200	Piramidal, küresel	Vigneshwaran ve ark., 2006
<i>Trichoderma viride</i>	Ag	5-40	Küresel	Fayaz ve ark., 2010
<i>Verticillium luteoalbum</i>	Au	~100	Küresel, üçgen	Gericke ve Pinches, 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Au	15	Üçgen	Agnihotri ve ark., 2009
Alg				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au	9-20	Üçgen, altıgen	Xie ve ark., 2007
<i>Oscillatoria willei</i>	Ag	100-200	Küresel	Mubarak-Ali ve ark., 2011
<i>Plectonema boryanum</i>	Au	10-6µm	Oktahedral	Lengke ve ark., 2006a
		<10-25	Kübik	Lengke ve ark., 2006b
<i>Sargassum wightii</i>	Au	8-12	Küresel	Singaravelu ve ark., 2007
<i>Spirulina platensis</i>	Ag	Ortalama 11.6	Küresel	Mahdih ve ark., 2012
<i>Pterocladia capillacea</i>	Ag	7	Küresel	El-Rafie ve ark., 2013
<i>Jania rubens</i>		12		
<i>Ulva fasciata</i>		7		
<i>Colpomenia sinuosa</i>		20		

Gümüş nanopartiküller

AgNP'lerin, *Staphylococcus aureus* gibi metisiline çok dirençli suşların bulunduğu pek çok Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler için yüksek antimikrobiyal ve bakterisidal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Panáček ve ark., 2006). Mikroorganizmalar tarafından AgNP sentezi, onların savunma mekanizmalarının bir sonucudur. Mikroorganizmanın ortamdaki Ag iyonlarına karşı oluşturduğu direnç, NP sentezinden sorumludur. Doğadaki Ag iyonları mikroorganizmalar için oldukça toksiktir. Bir savunma mekanizması olarak mikroorganizma, reaktif Ag iyonlarını kararlı Ag atomlarına dönüştürmek için hücrel mekanizmasını kullanır. Sıcaklık ve pH gibi parametreler üretimlerinde önemli rol oynamaktadır. Alkali koşullar altında asidik koşullar altında olduğundan daha fazla NP sentezlendiği bildirilmiştir (Saklani ve ark., 2012).

Ag⁺'nın sulu çözeltilerde mikroorganizmalar tarafından kolloidal Ag'ye indirgenmesi aşamalı bir süreçtir. İlk olarak Ag⁺'nin çeşitli kompleksleri metalik Ag atomlarına (Ag⁰) indirgenir. Bunu Ag⁰'ın oligomerik kümeler halinde aglomerasyonu takip eder (Sharma ve ark., 2009). Sonuçta kolloidal AgNP'lerin oluşumuna yol açan bu kümelerdir (Kapoor ve ark., 1994; Sharma ve ark., 2009).

Düşük moleküler ağırlıklı peptit, glutatyon (GSH) ve metallotioneinler ve fitoşelatinler gibi proteinler, oksidoredüktazlar, NADH'ye bağımlı redüktazlar, nitroredüktazlar, NADH'ye bağımlı nitrat redüktaz (NR)'lar ve sistein desülfhidrazlar gibi enzimlerin maya, bakteri ve mantarlarda nanokristal oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmaların, çoğu küresel partiküller olduğu bilinen AgNP'ler oluşturmak üzere Ag⁺ iyonlarını redüklediği bilinmektedir (Mukherjee ve ark., 2001; Ahmad ve ark., 2003c; Fayaz ve ark., 2010). Bu teknolojiye en eski çalışmalardan birinde, Slawson ve ark. (1992), Ag madenlerinden izole edilen Ag'ye dirençli bir bakteri suşunun, *Pseudomonas stutzeri* AG259'un, periplazmik boşluk içinde AgNP'leri biriktirdiğini bulmuştur. Partikül boyutunun da 35 ile 46 nm arasında olduğu rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde, Klaus ve ark. (1999), bu bakterinin konsantre sulu çözeltiye (50 mM) yerleştirildiğinde, daha büyük boyutta (200 nm) partiküllerin oluştuğunu gözlemlemiştir. Klaus ve ark. (1999), partikül boyutundaki farkı Slawson ve ark. (1992), raporuna kıyasla hücre büyümesi ve metal inkübasyon koşullarındaki farklılıklara bağlamıştır. Klaus ve ark. (1999), bir Ag madeninden izole edilen *Pseudomonas stutzeri* AG259 bakterisinin, konsantre bir sulu gümüş nitrat (AgNO₃) çözeltisine yerleştirildiğinde, Ag⁺ iyonlarının redüksiyonunda ve bakterilerin periplazmik boşluk içinde iyi tanımlanmış boyut ve farklı topografyada AgNP'lerin oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Böyle bir bakterinin önemli bir uygulaması endüstriyel Ag'nin geri kazanımında olacaktır. Şaşırtıcı bir şekilde, bu bakteri tarafından AgNP sentezinin tam mekanizmaları halâ belirsizdir. Bununla birlikte, bir böcek midgut izolatu olan *Morganella* sp. RP-42'den AgNP'lerin biyokimyasal sentezinin moleküler temelde *Morganella* sp. RP-42'nin AgNO₃'e maruz kaldığında 20±5 nm boyutlarda hücre dışı kristal AgNP'ler ürettiği gözlemlenmiştir. Ag'ye dirençli *Morganella* sp.'de üç gen homoloğu (*silE*, *silP* ve *silS*) tanımlanmıştır. *silE*'nin *Morganella* sp.'den homoloğu, periplazmik Ag bağlayıcı bir proteini kodlayan

daha önce bildirilen *silE* geni ile %99 nükleotit dizi benzerliği göstermiştir (Parikh ve ark., 2008). Bu, sentez mekanizmasıyla bağlantılı olabilecek bakterilerde Ag direncinin moleküler kanıtını açıklayan tek rapordur. Başka bir çalışmada, Nair ve Pradeep (2002), iyi tanımlanmış morfolojiye sahip mikroskobik Au, Ag ve Au-Ag alaşım kristalleri üretmek için ayıranda bulunan yaygın *Lactobacillus* suşlarını büyük metal iyon konsantrasyonlarına maruz bırakmıştır. Bakteriler, bunları hücre içi olarak üretmiş ve dikkat çekici bir şekilde hücreler kristal büyümesinden sonra bile canlılıklarını korumuşlardır. Özellikle, siyanobakterilerin bile AgNP'ler ürettiği gözlemlenmiştir. Örneğin, AgNP'lerin biyosentezi, filamentli bir siyanobakteri olan *Plectonema boryanum* UTEX 485 kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir (Lengke ve ark., 2007). Araştırma grubu, siyanobakteriler aracılığıyla AgNP'lerin üretim mekanizmalarının 25°C'de nitrat kullanımından ve/veya 25°C ile 100°C'de ölü siyanobakterilerden salınan organiklerin kullanımından metabolik süreçleri içerebileceğini öne sürmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda AgNP'lerinin bir film şeklinde sentezlendiği, çözelti içinde üretildiği veya mantarların hücre yüzeyinde toplandığı, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* veya *Aspergillus flavus* kullanılarak rapor edilmiştir (Mukherjee ve ark., 2001; Senapati ve ark., 2004; Bhainsa ve D'Souza 2006; Vigneshwaran ve ark., 2007; Jain ve ark., 2011). Mukherjee ve ark. (2001), *Verticillium* fungusunu kullanarak hücre içi AgNP'lerin sentezini incelemiştir. Yazarlar, fungus biyokütlesinin sulu Ag⁺ iyonlarına maruz kalmasının, metal iyonlarının hücre içi redüksiyonuna ve 25±12 nm AgNP'lerin oluşumuna yol açtığını gözlemlemiştir. Yalnız bu yapılan çalışmanın bir eksikliği, metalik NP'lerin hücre içi sentezlenmesidir. Gerçekten de, NP sentezinin yeri hücre içi olduğunda, istenilen ürünün hücre kütesinden ayrılarak saflaştırılması zorlaşacak ve çoğu zaman basit ve ucuz bir proses geliştirme amacını kaybedecektir. Bu bağlamda, Bhainsa ve D'Souza (2006), filamentli mantar *Aspergillus fumigatus* kullanarak AgNP'lerin hücre dışı biyosentezini ve sentez sürecinin hızlı olduğunu bildirmiştir. AgNP'ler, Ag iyonunun hücre filtratı ile temas etmesinden birkaç dakika (dk) sonra oluşmuştur. Ag⁺ iyonu içeren sulu ortamın ultraviyole görünür (UV-Vis) spektrumu, AgNP'lerin plazmon absorpsiyonuna karşılık gelen 420 nm'de bir pik göstermiştir. Kristalin AgNP'ler 5-25 nm aralığında iyi dağılmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, sulu ortamda bulunan NP'lerin, 25°C'de 4 aya kadar inkübasyonda bile stabilitesini koruduğu rapor edilmiştir. Mukherjee ve ark. (2008), non-patojenik ve tarımsal açıdan

önemli bir mantar olan *Trichoderma asperellum* tarafından yüksek düzeyde stabilize edilmiş nanokristalin AgNP'lerin yeşil sentezini göstermiştir. Bu çalışmanın ilginç bir yönü, AgNP'lerin oluşum mekanizmasıdır. NP'lerin geliştirilmesi işlemi, AgNP'ler üretmek için AgNO₃'ün biyo-redüksiyonunun ardından uygun bir başlık (cap) maddesi ile stabilizasyonu ve/veya kapsüllenmesinin takip ettiği iki temel adımdan oluşmaktadır. Transmission Electron Microscope-Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve X-ray Diffraction- X Işını Kristalografisi (XRD) çalışmaları kullanılarak AgNP'lerin boyutunun 13-18 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu NP'lerin oldukça stabil olduğu ve 6 aydan fazla uzun süreli depolamadan sonra bile önemli bir agregasyon göstermedikleri tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Materyaller

3.1.1. Araştırma kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada probiyotik özellikleri bilinen on adet mikroorganizma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Mikroorganizmalar MRS broth içerisinde 37°C’de 48 saat (sa) inkübe edilerek aktive edildikten sonra, çalışmalarda kullanılmıştır. Mikroorganizmalar tekrar kullanılabilecek kadar +4°C’de en fazla 10 gün saklanmıştır.

3.1.2. Araştırmalarda kullanılan cihazlar

Çizelge 3.1. Araştırmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka
Otoklav	Hirayama HV-110
pH metre	mrc PL-600
Orbital karıştırıcılı inkübatör	Lab Companion SI-600/SI-300R
Sonik su banyosu	mrc ACP-120H
Santrifüj cihazı	Tehtnica Centric 400R
Liyofilizatör	SCANVAC
-80 Ultra derin dondurucu	Haier BIO-MEDICAL
Su banyosu	memmert
Ultra saf su cihazı	Millipore Alpha-Q Water Purification System
Vortex	IKA 2
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan FC
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1260
Fourier-Transformed Infrared(FT-IR) spektroskopisi	Tensor II BRUKER
Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)	Malvern VISCOTEK

Çizelge 3.1. (Devam) Araştırmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka
MALDI TOF MS	Bruker Biotyper ID
DNA sekans analiz cihazı	ABI 3500 XL
UV-görünür (UV-Vis) spektrofotometresi	Shimadzu UV-2600
Zetasizer	Malvern Nano ZS
Atomik güç mikroskobu (AFM)	Park Systems XE-100E
Altın kaplama cihazı	Quorum Q150R ES coater
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	TESCAN MIRA3
X-ışını difraktometresi (XRD)	Bruker D8 ADVANCE
Termogravimetrik/diferansiyel termal analizi (TG/DTA)	PERKIN ELMER DIAMOND
Laminar Flow (Steril Kabin)	Bilser
Karbondioksit inkübatörü [37°C, %5 CO _{2(g)}]	NüveEC160

3.1.3. Araştırmalarda kullanılan kimyasallar, kitler, sarf malzemeler

Çizelge 3.2. Araştırmalarda kullanılan kimyasallar, kitler, sarf malzemeler

Adı	Firma
MRS agar	MERCK 110660
MRS broth	Oxoid CM0359
1-bütanol (C ₄ H ₁₀ O)	MERCK 101988
Kloroform (CHCl ₃)	MERCK 102445
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	MERCK 100983
Fenol (C ₆ H ₆ O)	MERCK 100206
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	MERCK 100731
Glukoz standardı	MERCK 108337
Sodyum azid (NaN ₃)	MERCK 106688
Gümüş nitrat (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich 209139

Çizelge 3.2. (Devam) Araştırmalarda kullanılan kimyasallar, kitler, sarf malzemeler

Adı	Firma
Potasyum bromür (KBr)	PerkinElmer 04977043
Sinamik asit ($C_9H_8O_2$)	MERCK 800235
Fetal Bovine Serum (FBS)	gibco 16000044
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen 10055154
Metil izobutil ksantin (M)	Sigma-Aldrich I5879
Deksametazon (D)	Thermo Scientific Acros 230302500
İnsülin (I)	Biological Industries 41-975-100
Formaldehit	Sigma-Aldrich 252549
Oil Red O boyası	Sigma-Aldrich O0625
İzopropanol (İPA)	Sigma-Aldrich W292907
Polietersülfon şırınga filtre	ISOLAB
Diyaliz membran	Spectra/Por
Coomassie (Bradford) Protein Test Kiti	ThermoFisher Scientific 23200
TAG analiz kiti	Cayman Chemical trigliserit analiz kit 10010303
Ultrahidrojel™ lineer kolon (7.8×300 mm)	Waters
Well-plate	costar/SARSTEDT
T25-T75 flask	Nunc/SARSTEDT

3.1.4. Araştırmalarda kullanılan besiyerleri ve çözetilerin hazırlanması

MRS agar

LAB'lerin üretilmesinde kullanılan besiyeri 68.2 g MRS agar tozu 1 l saf suda hazırlanıp, sıcak su içinde ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. 121°C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra petri kaplarına alınmış ve kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

MRS broth

EPS üretiminden önce LAB'lerinin ön zenginleştirme işleminde kullanılan besiyeri 52 g MRS broth tozunun 1 l saf su içerisinde karıştırılarak tamamen çözündürülmesi ile hazırlanmış, otoklavlandıktan sonra da gerek test tüpleri gerekse erlenlerde ağzı kapalı bir şekilde kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sevag reaktifi

EPS ekstraktlarından proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılacak sevag reaktifi, 1:4 (v/v) nihai konsantrasyon için 4 ml fenol, 16 ml kloroform alınarak karıştırılmış ve 20 ml'lik hacimde sevag reaktifi elde edilmiştir.

%5 (v/v) fenol çözeltisi

EPS'lere ait toplam karbohidrat miktarlarının fenol-sülfürik asit yöntemi ile tayininde kullanılacak fenol çözeltisi için saf haldeki stok fenolden 5 ml alınarak hacim milliQ su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

% (w/v) EPS çözeltileri

0.50, 1.00, 1.50, 2.00 ve 2.50 mg EPS analitik terazide tartılarak 1 ml milliQ içerisinde tamamen çözündürülmüştür. EPS-AgNP kompleks sentezinde her bir konsantrasyon için 5'er ml'lik çözeltiler hazırlanmıştır.

Farklı konsantrasyonlardaki AgNO_{3(aq)} çözeltileri

Her bir farklı konsantrasyonun 5'er ml'lik çözeltilerini hazırlamak adına 0.05 mM için 0.05 mg, 0.125 mM için 0.11 mg, 0.250 mM için 0.21 mg, 0.500 mM için 0.42 mg ve 1.000 mM için de 0.84 mg AgNO_{3(k)} analitik terazide tartılarak her biri için hacim 5 ml'ye milliQ su ile tamamlanmıştır. Balon jojelerin ağzı kapatılarak çözeltiler alt-üst edilip homojenizasyon sağlanmıştır. Kullanılana kadar da alüminyum folyo ile kaplanarak karanlık ortamda muhafaza edilmişlerdir.

MDI indüksiyon ve insülin ortamları

MDI indüksiyon ve insülin ortamlarının hazırlanması aşamaları da tamamen aseptik koşullar altında, laminar flow içerisinde gerçekleştirilmiştir. abcam protokol yönergeleri

dikkate alınarak MDI indüksiyon ortamı ve insülin ortamı deney öncesi taze hazırlanmıştır. MDI indüksiyon ortamının hazırlanması aşamasında ilk olarak 5'şer ml DMSO'da 50 mM metilizobutilksantin (M) ve 1 mM deksametazon (D) stok çözeltileri hazırlanmıştır. 50 mM metilizobutilksantin (M) stok çözeltisi için 55.56 mg saf metilizobutilksantin, 1 mM deksametazon (D) stok çözeltisi için de 1.96 mg saf deksametazon tamamen çözündürülmüştür. DMEM'e, 100 ml ortam başına 1 ml metilizobutilksantin (M) stok çözeltisinden ve yine 100 ml ortam başına 100 µl deksametazon (D) stok çözeltisinden eklenmiştir. Son olarak da 10 µg/ml final konsantrasyona kadar insülin (I) (yani 100 ml ortam başına 1.00 mg) eklenmiştir. Tek başına insülin ortamının hazırlanması aşamasında ise yine DMEM'e, 10 µg/ml'lik final konsantrasyona kadar insülin eklenerek farklılaşma protokolü için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır.

Oil Red O çalışma (dilüsyon) çözeltisi

%0.5 Oil Red O boyasını hazırlamak için ~0.35 g boya, %100 izopropanol (İPA) ile tamamen çözündürülmüş ve kahverengi şişede ağzı kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir. Elde edilen stok Oil Red O boya çözeltisi, 3:2 oranında ddH₂O ile 15 ml'lik falcon tüpe dilüe edilmiş (6 ml stok Oil Red O boya çözeltisi + 4 ml ddH₂O) ve alüminyum folyo ile kaplanarak laboratuvar sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. 50 ml'lik falcon tüp içerisine Oil Red O dilüsyon çözeltisi, 0.2 µm şırınga filtre yardımı ile filtre edilmiş, tüpün ağzı hemen kapatılmış yine alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Burada boya çözeltisinin her seferinde stok çözeltiden taze hazırlanması koşuluna dikkat edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. EPS üretim koşullarının belirlenmesi

EPS üretiminin fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilendiği iyi bilinmektedir (Tallon ve ark., 2003). Bu anlamda en iyi hücresel gelişimin ve böylece en iyi EPS üretiminin sağlandığı sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu on materyalden her biri için aynı işlemler 3'er kez bağımsız şekilde yinelenmiştir. Deneylerde kullanılan kimyasal, besiyeri ve sarf malzemeler 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.2. LAB'lerinden hücre ekstraktının hazırlanması

37°C sıcaklık, 48 sa inkübasyon süresince MRS agar içerisinde kültüre edilmiş LAB'lerinden tek koloniler steril bir öze ile alınarak, içerisinde 80 ml MRS broth bulunan 100 ml'lik erlenlere inoküle edilmiştir. Çizelge 4.1'deki sıcaklık, pH ve inkübasyon sürelerini tamamlayan erlenlerde oluşan tortu veya bulanıklıktan 2 ml steril pipet uçları kullanılarak alınıp, 10 ml damıtılmış su içinde resüspanse edilerek bir sonik su banyosunda homojen hücre ekstraktları için 40 Watt (W), 50 kez 10 saniye (sn) aralıklarla 5 sn sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Süspansiyon, 4°C'de 15 dk boyunca 12 000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Oluşan süpernatantlar, 0.45 µm polietersülfon (PES) filtreden süzülerek sterilize edilmiş, liyofilize edilerek kullanılabilecek kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir (Park ve ark., 2013).

3.2.3. EPS'nin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

EPS, filtre edilmiş süpernatanta dosiflow ve serum seti yardımı ile 24 sa boyunca 10 ml'lik her bir örnek için %75 (v/v) 20 ml'lik soğuk etanol yavaş yavaş ilave edilerek çöktürülmüştür. Çöken EPS, 12 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek ekstrakte edilmiştir. EPS ekstraktı, 150 ml milliQ suda çözülerek saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla EPS ekstraktındaki proteinleri uzaklaştırmak için 50 ml örnek, 20 ml sevag reaktifi içerisinde 2 saat boyunca 125 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Çökelen proteinler, 5 000xg'de 20 dk süreyle santrifüjleme yoluyla uzaklaştırılmıştır. Santrifüjlemeden sonra EPS içeren çözelti, moleküler ağırlık geçirimi 3 000 Da olan bir diyaliz membranda günde üç kez su değişimi ile 2 gün boyunca 5 l distile suya karşı diyaliz edilmiştir.

3.2.4. EPS saflığının kontrolü

Üretilen EPS'nin toplam karbohidrat miktarı, fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir (Dubois ve ark., 1956). Diyaliz işlemini takiben kısa süreli bir spin santrifüj ile bakteri hücrelerinin geri kazanılmasından sonra süpernatantdan alınan 1 ml'lik bir alikvota, 1 ml %5'lik fenol, 5 ml konsantre sülfürik asit [$H_2SO_{4(s)}$] eklenmiş ve karışım hemen vortexlenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildikten sonra bir spektrofotometrede 490 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için ölçülen bu absorbanslar, standart olarak glukoz absorbans değerleri ile değişkenler

arasındaki ilişkinin araştırılması için regresyon analizi yapılmıştır. Glukoz standardı hazırlanarak reaktifler yukarıdaki gibi ilave edilmiştir. EPS'nin toplam karbohidrat miktarı absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen regresyon denkleminde tahmin edilmiştir. EPS'nin toplam protein miktarı ise 595 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile Bradford tekniğini takiben belirlenmiştir (Bradford, 1976). Protein konsantrasyonu standardı olarak Bovine Serum Albumin-sığır serum albümini (BSA) Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit içeriğindeki ampüller kullanılmıştır. Üretici protokolüne göre gerçekleştirilen absorbans ölçümleri ile standart protein grafiği ve denklemi oluşturulmuş ve örneklerdeki olası protein içeriği tahmin edilmiştir. Deneyler bağımsız, 3 tekrarlı olacak şekilde yinelenmiştir.

3.2.5. Monosakkarit bileşimlerinin belirlenmesi

Bölüm 4.2'de belirtildiği gibi yapılan analizler neticesinde en yüksek EPS değeri, 7 numaralı örnekten elde edildiğinden bundan sonraki ileri araştırmalar sadece bu örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir. 7 numaralı örnekteki EPS'nin monosakkarit bileşimi, refraktif indeks dedektörü ile donatılmış Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ve cihaz ile entegre Agilent ChemStation yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. EPS, hidrolize edildikten ve metanol ile çözüldükten sonra, sakkarit bileşimi için HPLC ile analiz edilmiştir. 20 µl enjeksiyon hacminde, 25°C kolon sıcaklığında hareketli faz olarak su kullanılmıştır. Akış hızı dk'da 1.0 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekteki fruktoz, glukoz, galaktoz ve maltoz içerikleri aynı analiz koşullarında her bir sakkarit için alıkonma süreleri standart ile karşılaştırılarak verilmiştir.

3.2.6. Fourier-Transformed Infrared (FT-IR) spektroskopisi

FT-IR spektroskopisinin, biyopolimerlerin yapısal değişimlerini izlemek için yararlı bir araç olduğu rapor edilmiştir (Wilson ve ark., 1988). Saflaştırılmış EPS'de bulunan fonksiyonel gruplar, bir Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve cihaz ile entegre OPUS yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. Bunun için ~1-2 mg EPS, 200 mg potasyum bromür (KBr) tozu ile homojen bir şekilde karıştırılarak pelletlere preslenmiştir. FT-IR ölçümü, 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Molekül ağırlık tayini

Saflaştırılmış EPS'nin ortalama molekül ağırlık dağılımı, Cui ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile küçük değişikliklerle belirlenmiştir (Cui ve ark., 2015). Dekstran standardı, gözenek büyüklüğü 45Å olan bir Ultrahidrojel™ lineer kolondan geçirilmiş ve %0.02 (w/v) sodyum azid (NaN_3) ile 0.6 ml/dk akış hızında elüte edilmiştir. Elüsyon hacimleri, ilgili molekül ağırlığının logaritmasına karşı çizilmiştir. EPS'nin moleküler ağırlığını belirlemek için, dengelenmiş aynı kolona 5 ml %0.02 (w/v) NaN_3 içerisinde 5 mg EPS uygulanmış ve elüsyon hacmi aynı grafikte çizilmiştir.

3.2.8. EPS üretilen mikroorganizmanın identifikasyonu

En yüksek EPS miktarına sahip olduğu belirlenen 7 numaralı örnekteki bakterinin tanımlanması işlemi için ilk olarak Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS) cihazından yararlanılmıştır. Alt kültürlerinden tek kolonilerin elde edildiği örnek, steril bir kürdan ucu kullanılarak target plate'e alınmıştır. Matris çözeltisi olarak 1µl sinnamik asit ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$) ile örnek kaplanarak hava ile kurutulmuştur. Yüklenen target plate, cihaza yerleştirilerek kısa lazer darbelerine maruz bırakılmış ve böylece lazer enerjisi ile plate'teki identifikasyonu gerçekleştirilen mikroorganizma ile matrisin buharlaşması sağlanmıştır. Bu sayede mikroorganizmanın ribozomal proteinleri de iyonlaştırılmıştır. Cihaz yazılımı ile 20 kilovolt (kV)'luk bir potansiyelin oluşturduğu elektromanyetik alan sayesinde iyonların uçuş tüpüne girmeden evvel hızlandırılması sağlanmıştır. Uçuş tüpünün sonunda konumlandırılmış dedektöre-ki bu dedektör bir kütle spektrometresidir-olan uçuş süresi (TOF) ölçülmüş ve bu TOF bilgisine dayanarak da örneğe ait kütle spektrumunun cihazın veri tabanındaki spektrumlar ile eşleştirilmesi üzerinden mikroorganizma tanımlaması gerçekleştirilmiştir.

Aynı örneğe ait mikroorganizma tanımlaması 16S rRNA analizi ile de Ankara Atlas Biyoteknoloji Lab Mlz San Tic Ltd Şti'nde gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak MRS agarda alt kültüre edilmiş tek koloniler, MRS broth ortamda ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuştur. 37°C'de 48 sa inkübasyon sonucunda tüplerde oluşan

bulanık/bulutumsu yapıdan alınan alikotlar, eppendorf tüplerde 10 000 rpm’de 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Böylece biomass pelletlenerek aynı işleme birkaç kez devam edilerek en son pellet üzerine taze MRS broth eklenip analiz için ilgili biyoteknoloji şirketine kargolanmıştır. Şirket tarafından DNA izolasyonu, PCR işlemleri ve PCR ürünlerinin saflaştırılması ilgili kitler kullanılarak kit protokollerine uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından DNA sekans analiz cihazı ile DNA dizi analizi işlemi gerçekleştirilerek “ab1.” uzantılı cihaz çıktıları tarafımıza raporları ile iletilmiştir.

3.2.9. EPS-AgNP’lerinin sentez ve optimizasyonu

EPS-AgNP biyosentez prosedürü, Saravanan ve araştırma grubunun 2017’deki çalışmaları modifiye edilerek uygulanmıştır (Saravanan ve ark., 2017). EPS-AgNP’lerin yeşil sentezi, EPS sulu çözeltisinin indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ag tuzu (AgNO_3) molar çözeltisi ile reaksiyona giren EPS’nin % (w/v) konsantrasyonu, karıştırma hızı (rpm), kullanılan AgNO_3 konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi farklı parametrelerin EPS-AgNP sentezi üzerindeki etkisini araştırmak için optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bundan sonraki analizler optimale en yakın olan koşullar altında sentezlenmiş EPS-AgNP’ler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Kısmen saflaştırılmış, -80°C ’de muhafaza edilen liyofilize EPS ile ideal bir dağılım oluşturmak üzere milliQ su ve EPS-AgNP kompleks oluşumu için de $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ çözeltisi kullanılmıştır. EPS-AgNP’lerin sentezi üzerinde karıştırma hızının etkisini araştırmak için tamamen statik bir durum ve orbital bir karıştırıcıda 250 rpm karıştırma hızı altında deney setleri oluşturulmuştur. EPS konsantrasyonunun EPS-AgNP oluşumu üzerine etkisi araştırılırken % (w/v) EPS konsantrasyonu 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 ve 2.50 mg/ml olacak şekilde deney setleri oluşturulmuş, ardından absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sentez için kullanılan $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ konsantrasyonunun EPS-AgNP oluşumu üzerine etkisi araştırılırken 0.050, 0.125, 0.250, 0.500 ve 1.000 mM $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ çözeltileri hazırlanarak oluşturulan deney setleri için absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. EPS-AgNP sentezi için gerekli inkübasyon süresi 4, 9, 14, 19 ve 24 sa aralıklarla gözlemlenirken son olarak sıcaklık varyasyonu 5, 10, 15, 20 ve 25°C ’lik değişimlerle test edilmiştir. Optimizasyon işlemlerinden sonra EPS-AgNP’ler (0.5 ml), 2.5 ml ultra saf su ile seyreltilmiş, 6 000

rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar uzaklaştırılmış ve EPS-AgNP'ler hava ile kurutulduktan sonra ileri analizler için muhafaza edilmiştir.

3.2.10. EPS-AgNP'lerinin karakterizasyonu

Sentezlenen EPS-AgNP'lerin optik, bileşimsel ve morfolojik analizleri UV-görünür (UV-Vis) spektrofotometresi, atomik güç mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını difraktometresi (XRD) ve termogravimetrik/diferansiyel termal analizi (TG/DTA) ile gerçekleştirilmiştir.

Kolorimetrik analiz

EPS-AgNP, kolorimetrik olarak kahverengi renk değişiminin gözlemlenmesine kadar AgNO₃'ın fotoaktivasyonunu en aza indirmek için karanlık ortamda inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı inkübasyon işlemleri kontrol grubuna da uygulanarak işlem sonunda renk karşılaştırılması yapılmıştır.

UV-görünür spektroskopisi

EPS'nin sulu çözeltisi ile sentezlenen EPS-AgNP'lerin ön karakterizasyonu; hızlı tarama modunda, 350-600 nm dalga boyu aralığında, yarık genişliğinin 2.0 olduğu ölçüm özelliklerinde çift ışın yollu UV-görünür spektrofotometre kullanılarak analiz edilmiştir. Bunun için renk değişimini takiben hem kontrol hem de deney gruplarından 2 ml'lik alikotlar alınmış ve UV-görünür spektrofotometrede absorbanslar belirlenmiştir.

Partikül boyutu dağılımı ve zeta (ζ) potansiyeli ölçümü

EPS-AgNP'lerin partikül boyutu dağılımı ve elektriksel yükü, ölçümler alınmadan önce uygun bir saçılma yoğunluğu elde etmek amacı ile ultra saf su kullanılarak seyreltme işleminden sonra 25°C, 3.4 volt (V) elektrot voltajı, 90° deteksiyon açısında Zetasizer kullanılarak belirlenmiştir. İncelenen parçacık boyutu, 3 bağımsız ölçümün ortalaması hesaplanarak elde edilmiştir.

Atomik güç mikroskobu (AFM) analizi

AFM, yüzey topografyasını ve pürüzlülüğü tanımlayan uzamsal parametreler gibi parametreleri değerlendirmeye yardımcı olduğundan EPS-AgNP kompleksinin

mikrografları bir AFM ile elde edilmiştir. EPS-AgNP kompleksini içeren kolloidal çözelti 10 000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet uygun koşullarda kurutularak silikon wafer üzerine yayılarak AFM analizi gerçekleştirilmiştir. AFM görüntülerinden malzeme yüzeyinin topoğrafik morfolojisi, pürüzlülüğü hakkında bilgiler edinilmiş ve ek olarak 3 boyutlu görüntüleri de alınmıştır. Görüntüler; $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ alan içerisinde, kontakt modda, prob ucu-örnek mesafesinin $<0,5 \text{ nm}$, prob ucu voltajının 1V, serbest titreşim genliğinin 200 milivolt (mV) ve tarama hızının 1.0 hertz (Hz) olduğu ölçüm özellikleri ile kaydedilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

EPS-AgNP’lerin taramalı elektron mikroskobik görüntüsü, numunenin Au ile püskürtmeli kaplanmasıyla kaydedilmiştir. Numunenin ilk olarak alüminyum (Al) stub üzerinde altın kaplama cihazı kullanılarak Au ile kaplanmasının ardından görüntüler bir SEM ile 10.0 kV hızlanma voltajında, 9.60 mm çalışma mesafesinde elde edilmiştir.

X-ışını difraktometresi (XRD)

EPS-AgNP’lerin kristalografik özelliklerinin belirlenmesi $\text{Cu/K}\alpha$ radyasyonu $\lambda=1.54060 \text{ Å}$ ile 40 kV, 30 miliamper (mA)’de çalıştırılan 2θ Bragg açısı aralığında XRD aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Termogravimetrik/diferansiyel termal analizi (TG/DTA)

Sıcaklık değişimi ile EPS-AgNP’lerin fizikokimyasal özelliklerini karakterize etmek için TG/DTA gerçekleştirilmiştir. EPS-AgNP’leri, N_2 atmosferi altında 0-650°C’lik bir sıcaklık aralığına tabi tutulmuş ve karşılık gelen kütle kaybı belirlenmiştir.

3.2.11. Hücre kültürü araştırmaları

Araştırmada kullanılacak 3T3 hücre hattı, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı ŞAP Enstitüsü’nden 3T3 An1 Swiss albino mouse fibroblasts (fare) 950217 HÜKÜK kayıt nolu T25 flask’ta temin edilmiştir. 3T3 pre-adipositleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomisin içeren yüksek glukozlu Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)’de sub-konflüent kültürlerde muhafaza edilmiştir. Hücreler, %5 CO_2 ’de tutulan nemli bir atmosferde 37°C’de T75 flask’larda geliştirilmiştir. Hücreler, büyüme hızına bağlı olarak haftada 2 veya 3 kez alt-kültüre

edilmiştir. İleri araştırmalar için hücreler, 6 kuyucuklu well-plate'lere alınmış diğer flask'lardakiler tekrarlı deneyler için dondurularak stoklanmıştır. Üzerinde çalışma yapılacak well plate'lerden hücre kültür ortamı (medium) aspire edilmiş ve hücreler, 2 ml önceden ısıtılmış %0.05'lik Trypsin/EDTA uygulanmadan önce 10 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanmıştır. Hücreler, CO₂'li inkübatörde, 37°C'de 3 dk inkübe edilmiştir. Well-plate'e hafifçe vurulmuş ve tripsini nötralize etmek için 10 ml %10 (v/v) FBS içeren önceden ısıtılmış DMEM ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu, steril 50 ml'lik falcon tüpe dekante edilmiş ve 1 000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Pellet, taze hücre kültür ortamında yavaşça re-süspanse edilmiş ve böylece uygun bir seyreltme ile alt-kültürler oluşturulmuştur.

Hücreler ayrıca sıvı nitrojen içinde (-196°C'de) saklanmak üzere tripsinize edildikten sonra önceden tarif edildiği gibi pelletlenmiştir. Pelletler, bu kez %10 (v/v) Dimetil sülfoksit, %90 FBS içeren dondurma vasatında re-süspanse edilmiştir. 1 ml hücre alikotları; kriyojenik tüplere alınmış, sırası ile -20 ve -80°C'lerde 1'er gece bekletildikten sonra sıvı nitrojen buharında stoklanmıştır. Kriyo tüpteki hücre final konsantrasyonu ml'de 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ayarlanmıştır.

Adiposit hücrelere farklılaşma

3T3 hücrelerinin adiposit hücrelere farklılaşması için abcam'in protokolü uygulanmıştır (Reed ve Lane, 1980). İlk olarak cm² başına 3.0×10^3 hücre yoğunluğunda 6 kuyucuklu well- plate'e hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Ortam 2-3 günde bir değiştirilerek, konfluensiye (%70 hücre yoğunluğu) ulaşılan kadar hücrelerin DMEM'de gelişimi sağlanmıştır. Farklılaşmayı başlatmak için 2 günlük konflüent hücrelerden DMEM uzaklaştırılmış ve kuyucuk başına 2-3 ml metilizobutilksantin (M), deksametazon (D), insülin (I) "MDI" indüksiyon ortamı eklenmiştir (0. gün). Hücrelerin önceden belirtilen inkübasyon koşullarındaki 3. gününde, MDI indüksiyon ortamı aspire edilmiş ve ortam 2-3 ml insülin ortamı ile değiştirilmiştir. Inkübasyonu takiben 6. günde bu kez de hücrelerden insülin ortamı aspire edilmiş ve taze DMEM eklenmiştir. 10. günde tamamen farklılaşmış adiposit hücreleri elde edilmiştir. 3T3 hücrelerinin adipogenezi üzerine EPS ve EPS-AgNP kompleksinin etkileri, protokolün 0. günü işleme tabi tutularak kaydedilmiştir.

Oil Red O boyama

Adiposit hücrelere farklılaşma, lipit birikimi için Oil Red O boyaması ile izlenmiştir. Bunun için ilk olarak hücre kültür ortamı aspire edilmiş ve hücreler, ~1-1.5 ml PBS ile 2 kez hafifçe yıkanmıştır. Hücreler, daha sonra laboratuvar sıcaklığında 15 dk boyunca PBS içinde 1 ml %10 formaldehit ile fikse edilmiştir. Well-plate hafifçe sallanıp kapağı kapatılarak 10 dk süre ile laboratuvar sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, kuyucuk başına yine aynı miktarda ama bu kez ddH₂O ile 2 kez hafifçe yıkanmıştır. Hücrelere Oil Red O çalışma çözeltisinden (dilüsyon çözeltisi) 1 ml kadar eklenmiştir. Hücrelerin tamamen ve eşit şekilde kaplanması için plate hafifçe dairesel olarak sallanıp ve 10-20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda Oil Red O çalışma çözeltisi aspire edilmiş ve fazla boya artık görünmeyene kadar ddH₂O ile 2-3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler, mikroskop altında incelerken ddH₂O ile kaplı tutulmuştur.

Triasilgliserol (TAG) analizi

Hücrel TAG seviyesi tespiti için Cayman Chemical trigliserit analiz kit protokolü kullanılmıştır. Analiz için lipitlerin daha önce tarif edildiği gibi 6 günlük diferansiye 3T3 adiposit hücrelerinden ekstresi gereklidir. Bu anlamda ilk olarak TAG analizi için hücre lizatının hazırlanması aşamasında hücre kültür ortamı uzaklaştırılmış, 6 kuyucuklu well-plate için kuyucuk başına 2.5 ml PBS eklenerek hücreler yıkanmıştır. Proteolitik enzim kullanılmadan hücre kazıcı (cell scaper) ve pipetaj yardımı ile her bir kuyucuktaki hücrelerin kalkması sağlanmış ve ~ 18×10^6 hücre 15 ml'lik falcon tüpte toplanmıştır. 4°C'de 10 dk boyunca 1 000-2 000xg'de santrifüje edildikten sonra süpernatant aspire edilmiş, hücre pelleti kit bileşenlerinden 1-2 ml soğuk seyreltilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktif (Item No. 700732) içerisinde re-süspanse edilmiştir. Ardından hücre süspansiyonu 4°C'de 10 dk boyunca 10 000xg'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant aspire edilerek buz üzerinde 40 dk süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca 4-6 kez vortexlenen süpernatant bir kez de ultra spin santrifüj tüpüne alınarak 4°C'de 20 dk boyunca 27 000xg'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası hücre lizatı süpernatant olarak toplanmış ve aynı gün test yapıldığında analizden önce 1:3 oranında dilüe edilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktif ile dilüe edilmiştir. Aynı gün analiz

yapılmayacaksa da kullanıma kadar protokol yönergelerine uygun bir şekilde -80°C’de dondurularak 1 ay süre ile muhafaza edilmiştir.

Analize geçmeden önce standardın hazırlanması aşamasında standart eğrinin eldesi için seyreltilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktifi kullanılmıştır. 8 steril test tüpü A-H olarak etiketlenmiştir. B-H tüplerine 200 µl seyreltilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktifi eklenmiştir. Tüp A’ya 300 µl seyreltilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktifi ve 100 µl Triglicerid Standardı (Item No. 10010509) eklenerek ve iyice karıştırılmıştır. A tüpünün konsantrasyonu 200 mg/dl’dir (2.26 mmol/l). A tüpünden 200 µl standart mix alınıp B tüpüne, daha sonrada B tüpünden 200 µl alıp C tüpüne eklenerek seri dilüsyon işlemine geçilmiştir. Her defasında mix her bir tüp için iyice karıştırılmıştır. D-G tüpleri için de bu işlem tekrar edilmiş, H tüpünde yalnızca seyreltilmiş Standart Dilüent Analiz Reaktifi bırakılmıştır. Böylece seri dilüsyonlarla TAG konsantrasyonları Çizelge 3.3’deki gibi elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. TAG standartlarının hazırlanması

Tüp	A	B	C	D	E	F	G	H
TAG Konsantrasyonu (mg/dl)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	0

Analizi gerçekleştirme aşamasında da ilk olarak TAG standart kuyucuklarına (tüp A-H) 10 µl standart eklenirken, 2 veya 3 örnek kuyucuğuna kontrol olarak AgNO_{3(aq)}, anti-obezite ajanı olarak araştırılan EPS ve EPS-AgNP’den 10 µl eklenmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa kit içeriğindeki dilüe edilmiş Enzim Mix (Item No. 10010511) solüsyonundan 150 µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Plate kapağı kapatılarak karışımın homojenizasyonu için birkaç saniye hafifçe sallanmıştır. Ardından plate 37°C’de 30 dk boyunca inkübe edilmiş ve bir plate okuyucu kullanılarak 550 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. EPS Üretim Koşullarının Belirlenmesi

EPS üretiminde kullanılan on adet materyal örneğinin inkübasyonuna ait sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi gibi parametreler belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Materyal örneklerinin bazı inkübasyon değerleri

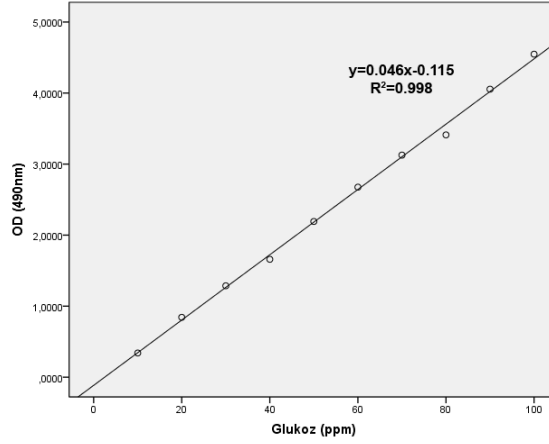
Materyal	Sıcaklık/°C	pH	İnkübasyon süresi/sa
1	37	4.61±0.01	48
2	37	4.59±0.03	48
3	37	4.37±0.00	48
4	32	4.13±0.04	72
5	32	3.92±0.05	72
6	32	3.94±0.02	72
7	37	4.54±0.01	48
8	37	4.81±0.06	48
9	37	4.69±0.03	48
10	37	4.96±0.04	48

0.1N HCl ve NaOH ile inkübasyon ortamı çizelgeden de görüleceği üzere bu pH değerlerine sabitlendiğinde en iyi hücresel gelişim gözlemlenmiştir. İlk 24 sa'lik inkübasyon süresince materyallerde herhangi bir hücresel gelişim gözlemlenmediğinden inkübasyona bir 24 sa daha devam edilmiştir. 48 sa'lik inkübasyon diliminde 1, 2, 3, 7, 8, 9 ve 10.'uncu materyaller, +24 sa'lik bir inkübasyon sonucunda da 4, 5 ve 6.'ncı materyallerden elde edilen hücre kültürleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık parametresi de değerlendirilirken sadece 4, 5 ve 6.'ncı materyallerin inkübasyonundan elde edilen hücresel gelişim 32°C'de gerçekleşirken, diğer materyallerden elde edilen hücresel gelişim hep 37°C'de kaydedilmiştir.

4.2. EPS Saflığının Kontrolü

Fenol-sülfürik asit yöntemi ile örneklerdeki EPS miktarları tahmin edilmiştir. Bunun için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM) programı versiyon 23 üzerinden regresyon ve ANOVA (varyans) analizleri yapılmıştır. Programdan alınan

veriler doğrultusunda Şekil 4.1'deki determinasyon katsayısı $R^2=0.998$ olması modelin uyum iyiliğinin çok yüksek olduğunu göstermektedir.



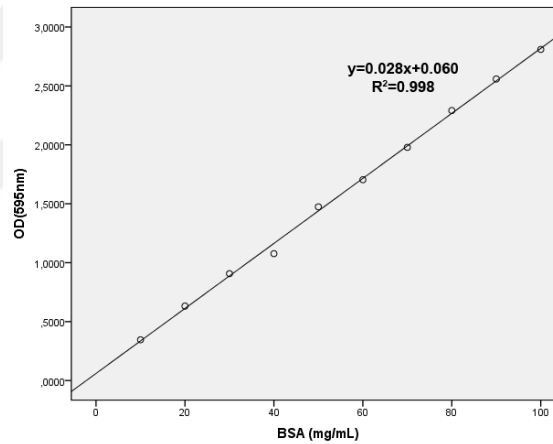
Şekil 4.1. Fenol-sülfürik asit yöntemi ile glukoz standart grafiği

Yukarıdaki grafikten OD ve glukoz değerleri arasında doğrusal bir ilişkinin var olduğu söylenebilir. $y=ax+b$ şeklinde bulunan doğrusal ilişki denkleminin parametreleri tahmin edilmiştir. Regresyon denklemi $y=0.046x-0.115$ yani $OD= 0.046(EPS)-0.115$ şeklinde yazılır. a parametresinin pozitif olması; glukoz ile OD arasında doğru yönlü ilişki olduğu, yani bu iki değişkenden birisinin artması/azalması halinde diğerinin de artacağı/azalacağı anlamına gelmektedir. Denkleme göre, glukoz bir birim arttığında, OD miktarı 0.046 birim artacaktır. Model katsayılarının önemli olup olmadığını test etmek için kullanılan t testinin significance (anlamlılık) değerlerine bakıldığında a parametresi için anlamlılık değerinin ($p=0.000<0,05$) 0.05'ten küçük olması a parametresinin önemli olduğunu, b parametresi için anlamlılık değerinin de ($p=0.037<0.05$) 0.05'ten küçük olması b parametresinin de önemli olduğunu göstermiştir. En yüksek EPS değeri 7 numaralı örnekten elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Bundan sonraki ileri araştırmalar sadece bu örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Bradford yöntemi ile örneklerdeki protein miktarları tahmin edilmiştir. Bunun için SPSS programı versiyon 23 kullanılarak regresyon ve ANOVA analizleri yapılmıştır. Programdan alınan veriler doğrultusunda Şekil 4.2'teki determinasyon katsayısının $R^2=0.998$ olması modelin uyum iyiliğinin çok yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. Materyal örneklerindeki EPS ve protein miktarları

Materyal	EPS (ppm)	Protein (mg/ml)
1	9.95±0.04	0.0028±0.0002
2	61.12±0.28	0.0016±0.0002
3	72.31±0.87	0.0015±0.0004
4	51.98±1.36	0.0017±0.0006
5	33.26±0.58	0.0022±0.0003
6	82.95±0.51	0.0014±0.0001
7	103.39±0.38	0.0011±0.0001
8	76.59±0.53	0.0014±0.0003
9	38.45±0.73	0.0019±0.0002
10	21.81±0.21	0,0025±0.0001



Şekil 4.2. Bradford yöntemi ile protein standart grafiği

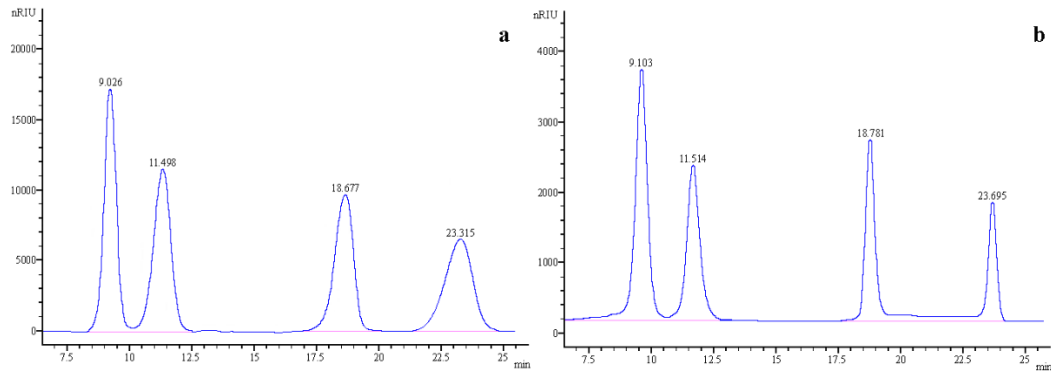
Yukarıdaki grafikten OD ve protein (BSA) değerleri arasında doğrusal bir ilişkinin var olduğu söylenebilir. Regresyon denklemi $y=0.028x+0.060$ yani $OD=0.028(\text{protein içeriği})+0.060$ şeklinde yazılır. a parametresinin pozitif olması protein ile OD arasında doğru yönlü ilişki olduğu, yani bu iki değişkenden birisinin artması/azalması halinde diğerinin de artacağı/azalacağı anlamına gelmektedir. Denkleme göre, protein bir birim arttığında, OD miktarı 0.028 birim artacaktır. Model katsayılarının önemli olup olmadığını test etmek için kullanılan t testinin significance değerlerine bakıldığında a parametresi için significance değeri ($p=0.000<0.05$) 0.05'ten küçük olduğundan a

parametresi önemlidir. b parametresi için significance değeri ($p=0.043<0.05$) 0.05'ten küçük olduğundan b parametresi de önemlidir.

Hem fenol-sülfürik asit yöntemi ile toplam karbohidrat içeriği hem de Bradford yöntemi ile protein içeriği bakımından test örnekleri taranmış ve örneklerin kısmen saf olduklarına karar verilmiştir. Çizelge 4.2'den de görüldüğü üzere test materyallerinde protein kontaminantına neredeyse rastlanılmamıştır.

4.3. Monosakkarit Bileşimlerinin Belirlenmesi

Elde edilen fraksiyonlar, standart ile teyit edilmiş olan HPLC sistemi ile analiz edilmiş, alıkonma süreleri ile bağımsız pikler elde edilmiştir. Analizde standart olarak fruktoz, glukoz, galaktoz ve maltozun HPLC kromatogramı incelendiğinde sırası ile 9.026, 11.498, 18.677 ve 23.315 dk'dan sonra tespit edildiği gözlemlenirken EPS'deki bileşimin içeriğinde yine, fruktoz, glukoz, galaktoz ve maltozun HPLC kromatogramı incelendiğinde sırası 9.103, 11.514, 18.781 ve 23.695 dk'dan sonra tespit edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).

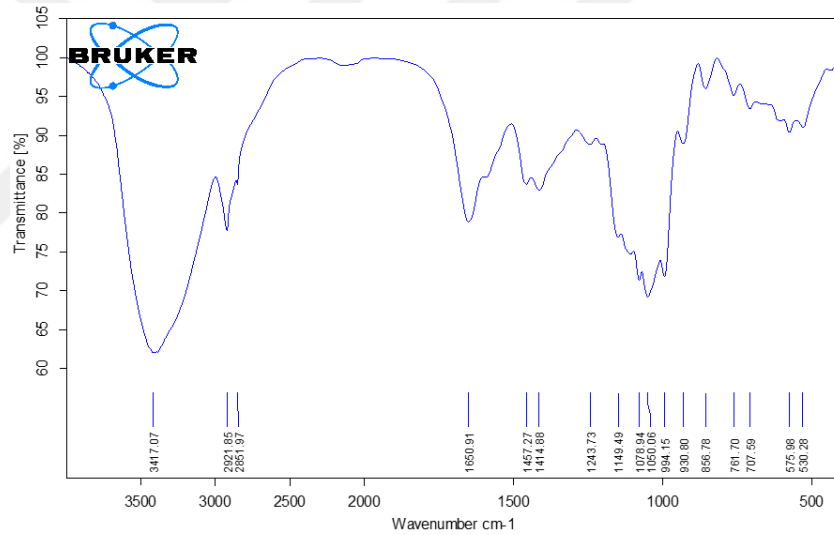


Şekil 4.3. EPS'nin HPLC kromatogramı
a. Standart kromatogramı, b. Örnek kromatogramı

4.4. FT-IR Spektroskopisi

EPS'nin FT-IR spektrumları, Şekil 4.4'de gösterildiği gibi polisakkaritlerin çeşitli tipik absorpsiyon piklerini sergilemiştir. 3417 cm^{-1} 'de görülen yoğun geniş gerilme piki, önemli sayıda hidroksil grubu ihtiva ettiğini göstermektedir. Bu bölgedeki absorpsiyon, hidroksil gruplarına özgü yuvarlak özelliklere sahiptir (Howe ve ark., 2002). Bu da örneğin bir polisakkarit olduğunu düşündürmektedir. EPS'nin FT-IR spektrumları, metil

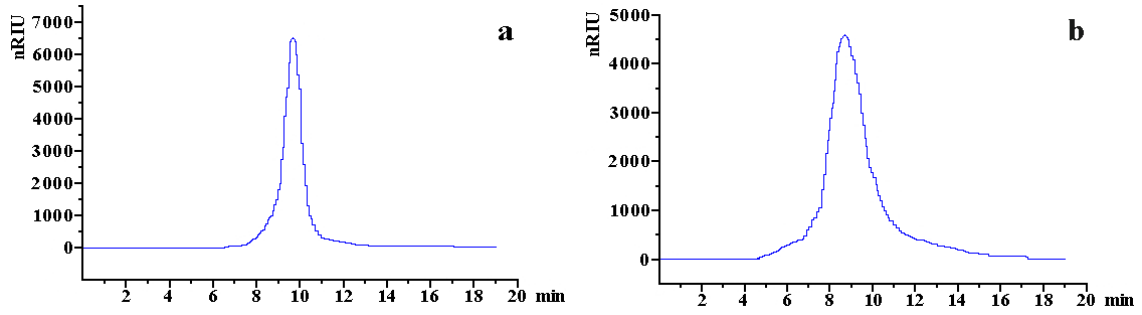
ve metilen gruplarına karşılık gelen 2 921 ve 2 851 cm^{-1} 'de iki zayıf C-H gerilme pik noktaları fonksiyonel karakteristikleri ortaya çıkartmıştır. 1 650 cm^{-1} 'de gözlenen güçlü absorpsiyon, karbonil gerilmesine karşılık gelirken 1 414 cm^{-1} 'deki pik, COO^- gruplarının $>\text{C}=\text{O}$ gerilmesine ve COO^- gruplarından C-O bağına atfedilebilir (Haxaire ve ark., 2003; Salah ve ark., 2011). Üretilen EPS'de glukuronik asit veya diaçil esterler için parmak izi bölgesi kabul edilen 1 775-1 700 cm^{-1} dalga sayısı aralığında pik varlığının olmayışı, örnekte bu bileşimlere rastlanılmadığını kanıtlamıştır. 1 650 cm^{-1} civarındaki pik, literatürde bildirilen sonuçlarla tutarlı olan C-O grubunun varlığını göstermektedir (Haxaire ve ark., 2003). 1 200-1 000 cm^{-1} 'de geniş bir C-O-C, C-O gerginliği gözlenmiştir ve bu da karbohidratların varlığı düşündürmektedir (Bremer ve Geesey, 1991). Genel olarak FT-IR sonuçlarının literatürde rastlanılan bağ gerilmeleri ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür (Jindal ve ark., 2013; Chen ve ark., 2017).



Şekil 4.4. EPS'nin FT-IR spektrumu

4.5. Molekül Ağırlık Tayini

EPS'nin ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı (M_w) GPC ile analiz edilmiştir. Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, standarda karşı 7 numaralı örnekten saflaştırılmış EPS'nin refractive index database'leri karşılaştırıldığında EPS'nin homojen olduğunu gösteren sadece tek bir simetrik pik mevcuttur. Bu pik aynı zamanda bölüm 3.2.4'de anlatılan EPS saflığının kontrolü aşamasında Bradford Yöntemi ile tespit edilen protein kontaminantının olmadığı sonucunu da doğrulamaktadır.



Şekil 4.5. EPS'nin jel geçirgenlik kromatografisi
a. Standart kromatogramı, b. Örnek kromatogramı

1.00'e yaklaşan M_w/M_n oranı 1.174 polidispersitesi ile EPS'nin dar bir dağılım örneği olduğu ve bağlı molekül ağırlık dağılımının homojen olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir (Çizelge 4.3). Ayrıca bu değer, örneğin biyolojik kökenli, biyolojik kaynaklı olduğunu da ifade etmektedir.

Çizelge 4.3. EPS'nin moleküler ağırlığı ve bağlı molekül ağırlık dağılımı

Molar kütle momentleri (g.mol ⁻¹)				Polidispersite	
M_n^a	M_p^b	M_w^c	M_z^d	M_w/M_n	M_z/M_n
188 956±0.02	192 720±0.01	221 860±0.006	315 608±0.01	1.174±0.01	1.670±0.01

^a Sayıca-ortalama molekül ağırlığı

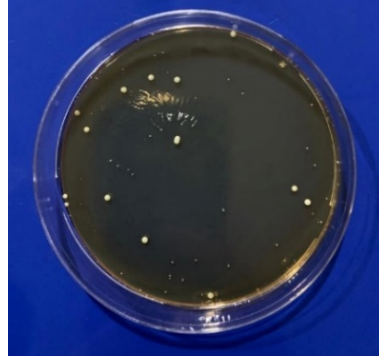
^b Pik konum molekül ağırlığı

^c Ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı

^d z-ortalama molekül ağırlığı

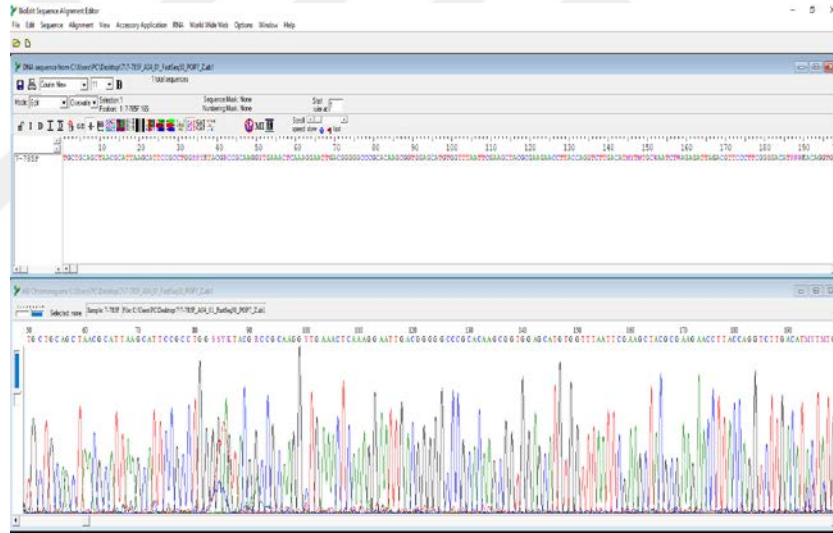
4.6. EPS Üretilen Mikroorganizmanın Identifikasyonu

Şekil 4.6'da gösterilen 7 numaralı örneğe ait tek kolonileri için MALDI TOF MS Biotyper ID cihazından gözlemlenen ve cihaz veri tabanında depolanmış spektrumlar arasındaki benzerliklere dayalı olarak cihaz yazılımı tarafından bir sayısal skor değeri üretilmiştir. Bu sayısal skor değerinin 2'nin üzerinde olduğu identifikasyon sonuçlarının ilgili türler için literatürde yüksek doğrulukla kabul edildiği kanıtlanmıştır (Wieser ve ark., 2012). Analiz sonucu bu skor değerinin 7 numaralı örneğe ait mikroorganizma için de 2'nin üzerinde olduğu ve mikroorganizma türünün *Lactobacillus (L.) plantarum* olduğu cihazdan alınan raporda da görülmektedir (bkz. Ekler 7.1).



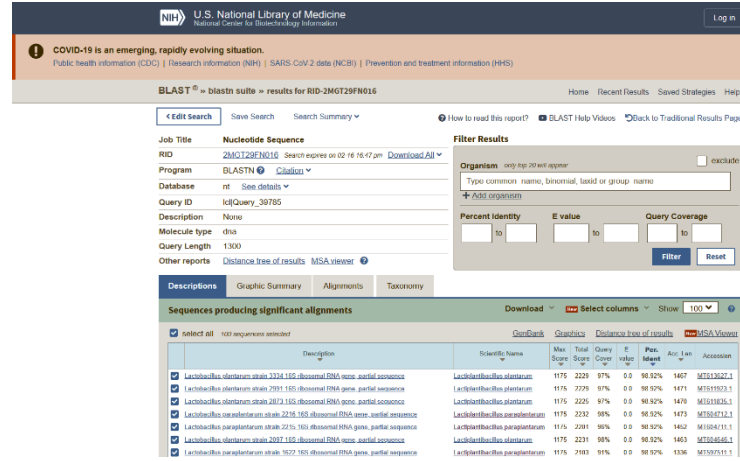
Şekil 4.6. 7 numaralı örneğe ait tek koloniler

7 numaralı örneğe ait mikroorganizma tanımlanmasının 16S rRNA analizi ile gerçekleştirilmesi için başvuru şirketin tarafımıza ilettiği ileri ve geri olmak üzere “ab1.” uzantılı dosyalar üzerinden dizi analizi Bioedit Sequence Alignment Editor yazılımı ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Bioedit yazılımı ile dizi sekanslama

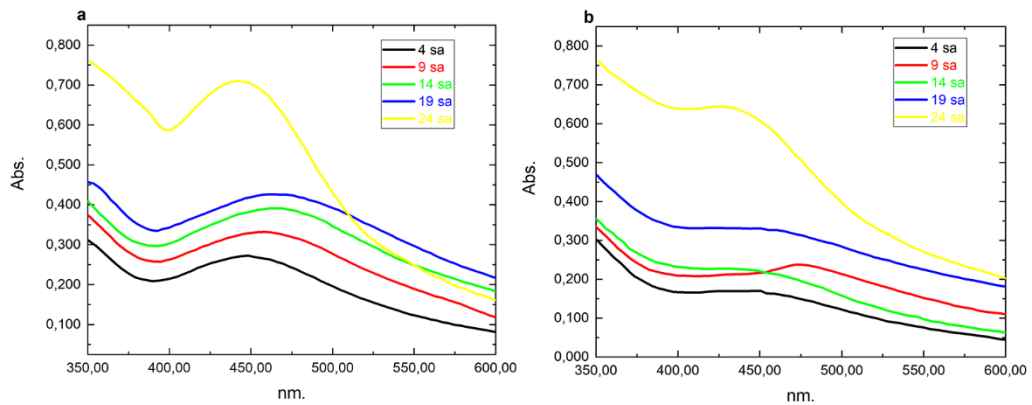
Elde edilen dizi (bkz. Ekler 7.2), Online Genbank veri tabanında Nucleotide BLAST hizalama arama motorunda taratılmış ve örneğe ait mikroorganizmanın veri tabanındaki kayıtlı dizilerle olan benzerliği araştırılmıştır. 98.92’lik bir yüzde ile en yüksek benzerliğe sahip *L. plantarum*’un 100 farklı suşu ile evrimsel uzaklığa sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.8). Ayrıca bu evrimsel uzaklığa sahip filogenetik ağacı da oluşturulmuştur (bkz. Ekler 7.3). Buradan elde edilen sonucun MALDI TOF MS’den alınan sonuç ile uyum içerisinde olduğu da görülmüştür.



Şekil 4.8. Genbank Nucleotide BLAST sonuçları

4.7. EPS-AgNP'lerinin Sentez ve Optimizasyonu

Statik ve sürekli karıştırma durumundaki deney setlerinden 5'şer sa düzenli aralıklarla 24 sa inkübasyon süreleri sonrasında alınan 2 ml'lik alikotlar, kuvars küvetler içerisinde çift ışın yollu bir UV-görünür spektrofotometrede absorbans ölçümü izlenerek bu iki farklı deney seti karşılaştırılmıştır. Statik ve sürekli karıştırma durumlarında sırası ile 0.7597 ve 0.7604 maksimum (max) absorbans değerleri kaydedilmiştir. Spektrofotometrik analiz sonucunda bu iki farklı deney setine ait absorbans değerleri arasında belirgin bir fark gözlenemediğinden karıştırma hızının EPS-AgNP sentezi üzerine efektif bir etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.9). Bu nedenle sonraki optimizasyon ve karakterizasyon araştırmalarında EPS-AgNP sentezi statik koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

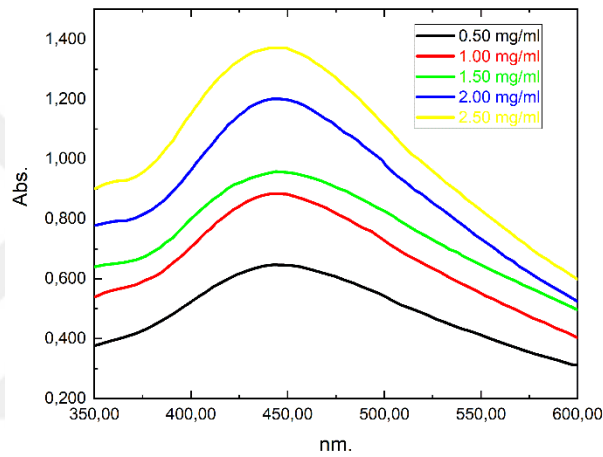


Şekil 4.9. Optimizasyonda karıştırma hızının etkisi
 a. Statik durum, b. 250 rpm karıştırma altında

UV-görünür spektrumları, artan konsantrasyon için absorbans yükselmesi ile farklı EPS konsantrasyonlarında ölçülmüştür. EPS-AgNP'ler için %(w/v) EPS konsantrasyonuna bağlı en yüksek absorbans değerleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. EPS konsantrasyonu için $\lambda_{\max}$ ve absorbans değerleri

0.50 mg/ml		1.00 mg/ml		1.50 mg/ml		2.00 mg/ml		2.50 mg/ml	
$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs
442.78	0.647	445.42	0.885	443.90	0.958	446.01	1.201	441.20	1.371

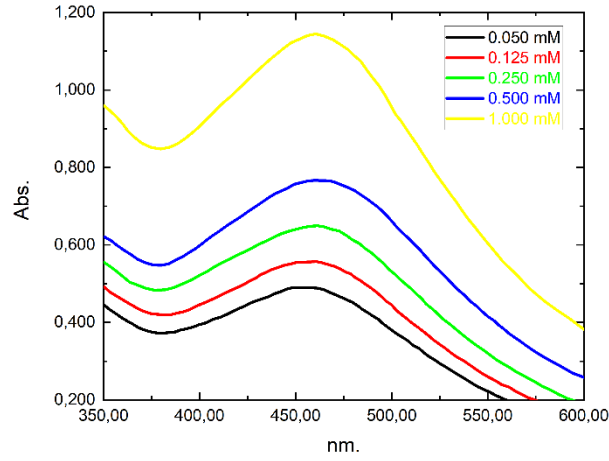


Şekil 4.10. Optimizasyonda EPS konsantrasyonunun etkisi

EPS-AgNP biyosentezini etkileyen bir diğer optimizasyon parametresi olan AgNO_3 konsantrasyonu araştırılmıştır. 5 farklı konsantrasyon değeri için yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Artan AgNO_3 konsantrasyonuna bağlı olarak absorbansta da artış gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. AgNO_3 konsantrasyonu için $\lambda_{\max}$ ve absorbans değerleri

0.050 mM		0.125 mM		0.250 mM		0.500 mM		1.000 mM	
$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs
458.00	0.490	460.67	0.557	461.52	0.650	459.87	0.766	460.44	1.144

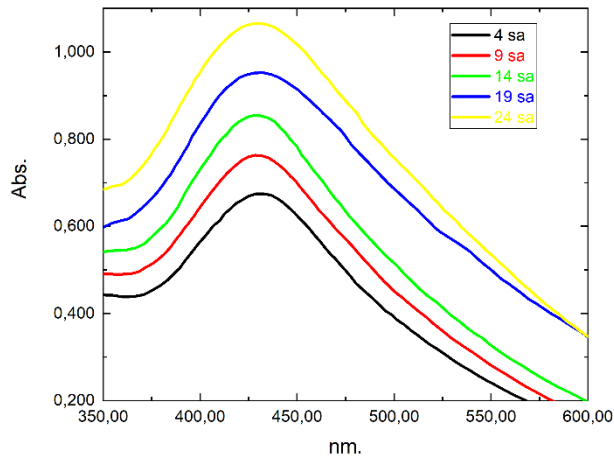


Şekil 4.11. Optimizasyonda AgNO_3 konsantrasyonunun etkisi

Optimizasyon testlerinde araştırılan inkübasyon süresinin EPS-AgNP formasyonuna etkisi Çizelge 4.6 ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Sürenin artması ile absorbans değerinin de arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.6. İnkübasyon süresi için λ_{max} ve absorbans değerleri

4 sa		9 sa		14 sa		19 sa		24 sa	
λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs
428.81	0.675	428.36	0.763	427.68	0.855	432.50	0.953	428.59	1.066



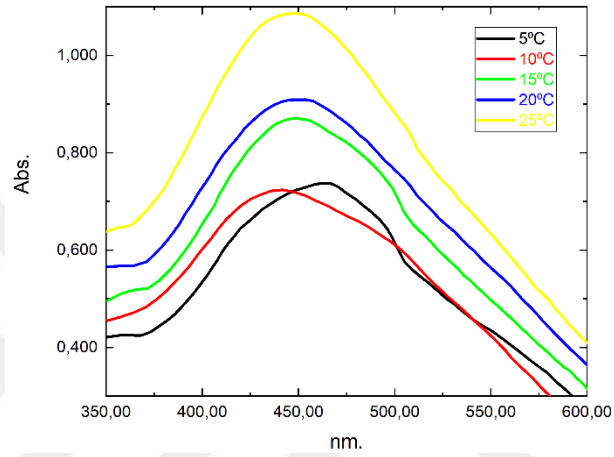
Şekil 4.12. Optimizasyonda inkübasyon süresinin etkisi

Optimizasyon testlerinde araştırılan bir diğer değişken olan sıcaklığın EPS-AgNP formasyonuna etkisi Çizelge 4.7 ve Şekil 4.13’te gösterilmiştir. 5 ve 10°C dışındaki

sıcaklıklarda ölçülen absorbands değerleri için sıcaklığın artması ile absorbands değerinin de arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

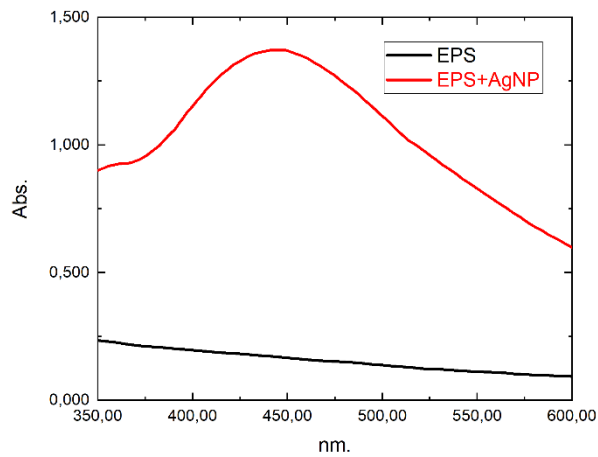
Çizelge 4.7. Sıcaklık için $\lambda_{\max}$ ve absorbands değerleri

5°C		10°C		15°C		20°C		25°C	
$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs	$\lambda_{\max}$	Abs
463.16	0.737	441.80	0.724	447.13	0.871	446.31	0.909	449.58	1.086



Şekil 4.13. Optimizasyonda sıcaklığın etkisi

Tek başına EPS'ye ait herhangi bir absorbands piki, 350-600 nm dalga boyu aralığında gözlenmezken EPS-AgNP kompleksinde yüzey plazmon rezonansı (YPR)'na bağlı olarak absorbands piki gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. EPS ve EPS-AgNP kompleksine ait spektrumlar

4.8. EPS-AgNP'lerinin Karakterizasyonu

4.8.1. Kolorimetrik analiz

EPS'nin sulu çözeltisi ile $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ çözeltisinin karanlıkta laboratuvar ortamında 24 sa inkübasyonu sonucu renk değişiminin gözlemlenmesi kolorimetrik olarak EPS-AgNP biyosentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 4.15). Renk değişiminin, metal NP'ler için YPR uyarımı tarafından yönetildiği bilinmektedir (Santhosh ve ark., 2015; Patil ve Kumbhar, 2017).



Şekil 4.15. Renk değişiminin görsel olarak gözlemlenmesi

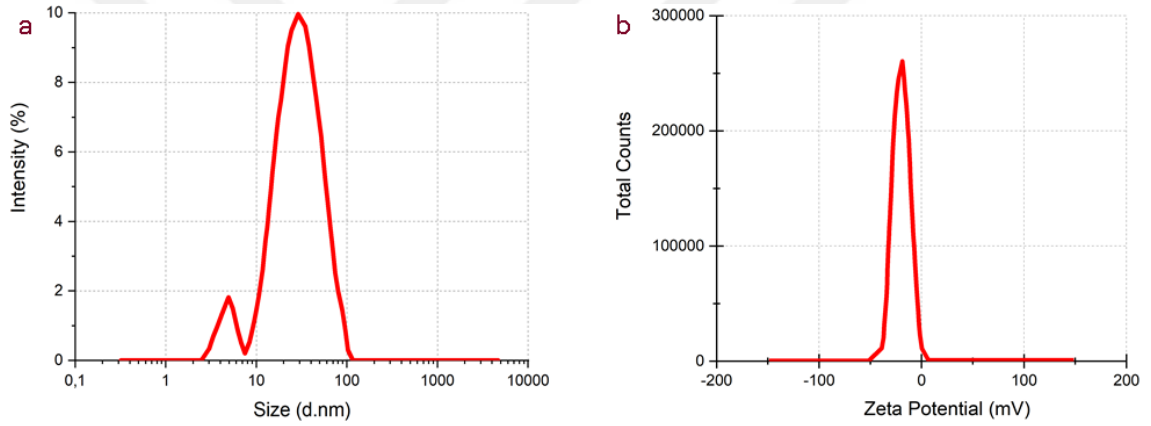
4.8.2. UV-görünür spektroskopisi

UV-görünür spektroskopisi, hazırlanan malzemenin NP'ler olduğunu doğrulayabilen en önemli tekniklerden biridir (Mahadevan ve ark., 2017). Açık sarıdan kahverengiye renk değişiminin görsel olarak tespit edilmesinden sonra UV-görünür spektroskopisi üzerinde analiz gerçekleştirildiğinde yapılan tüm varyasyonlar değişken YPR pikleri üretmiştir. EPS-AgNP'leri için elde edilen YPR pikleri, tüm optimizasyon parametreleri için değişken şekillere sahip farklı pikler göstermiştir (Şekil 4.9-14). Tüm optimizasyon parametrelerindeki absorbans yoğunluğundaki genel artış, EPS metabolitlerinin varlığında Ag^+ 'nın Ag^0 'a indirgenmesinin bir göstergesi olduğu sonucunu doğurmuştur. EPS-AgNP'leri, partikül elektronunun ışık dalgaları ile birlikte rezonans davranışında kolektif salınımlarının etkisi ile YPR absorpsiyon bandı veren serbest elektrona sahip olduğundan, yani EPS-AgNP'leri ile YPR uyarımı nedeniyle EPS-AgNP kolloidal çözeltisinin renk değişimi ortaya çıkmıştır. EPS-AgNP'lerinin kabaca 400-550 nm

arasında geniş bir YPR absorpsiyon bandı oluşturmaları sonucu, daha önceki raporlar ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir (Kanmani ve Lim, 2013; Ashokkumar ve ark., 2014).

4.8.3. Partikül boyutu dağılımı ve ζ potansiyeli ölçümü

Parçacık boyutu dağılım eğrisi, elde edilen EPS-AgNP'leri doğasının polidisperse olduğunu, ortalama boyutun da 37 ± 0.6 nm ve karşılık gelen ortalama ζ potansiyel değerinin -34.8 ± 3.0 mV olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.16). Yüksek negatif potansiyel değerinin, negatif-negatif itme nedeniyle uzun vadeli stabiliteyi, iyi kolloidal doğayı ve biyosentezlenmiş EPS-AgNP'lerin yüksek dağılımını desteklediği bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2014).



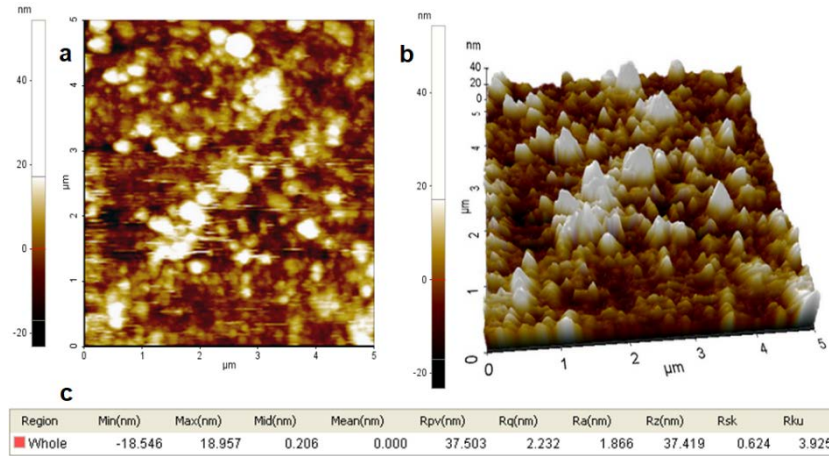
Şekil 4.16. EPS-AgNP'lerin partikül boyutu dağılımı ve ζ potansiyeli

4.8.4. AFM analizi

EPS-AgNP'leri, morfolojik özellikler açısından AFM aracılığıyla analiz edilmiş ve EPS-AgNP'lerin AFM görüntüleri; hem yanal hem de dikey nanometre aralığında kalitatif, morfolojinin daha derin bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır. Şekil 4.17a ve b'deki AFM görüntüleri, sentezlenen EPS-AgNP'lerinin küresel morfolojisini dikkate değer bir dağılımla doğrulamakta ve münferit partiküllerin yanı sıra aglomerasyonu da göstermektedir.

Yüzey morfolojisini; pürüzlülük parametreleri, genlik veya yükseklik parametreleri, fonksiyonel veya istatistiksel parametreler ve uzamsal parametreler açısından tanımlayan birçok parametre vardır. Pürüzlülük durumunda en önemli parametreler

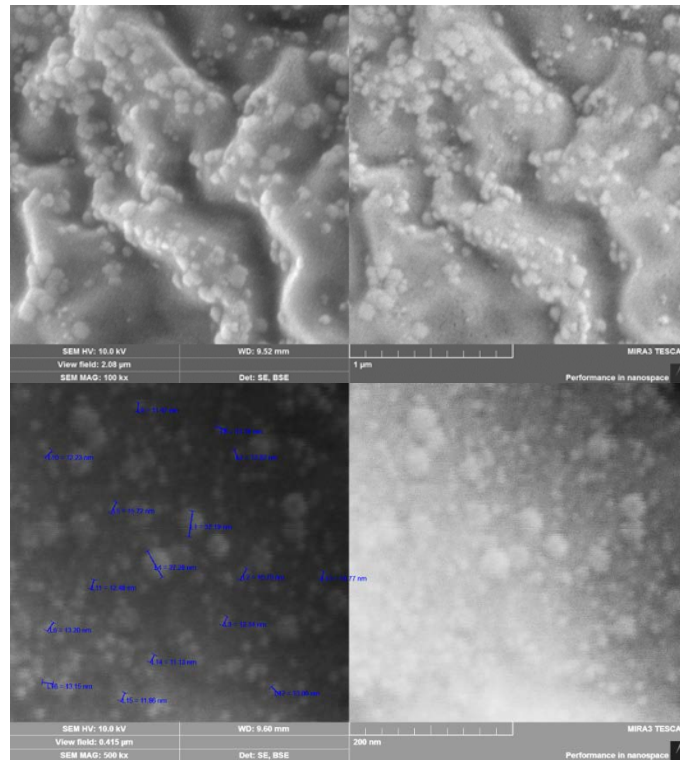
yükseklik parametreleridir (R). Yükseklikteki sapmayı veren ortalama pürüzlülük (R_a) ve yüzey yüksekliklerinin standart sapmasını temsil eden kök ortalama kare pürüzlülüğü (R_q), yükseklik varyasyonlarının genel tanımını sağlayan, yoğun olarak kullanılan yükseklik parametreleridir (Maksumov ve ark., 2004). EPS-AgNP kompleksine ait ortalama pürüzlülük (R_a) değeri 1.866 nm iken kök ortalama kare pürüzlülüğü (R_q) değeri 2.232 nm'ye karşılık gelmiştir. Bu durum cihaz yazılımı tarafından gerçekleştirilen R_q 'nın istatistiksel hesaplamasındaki genliğin karesinin alınmasından dolayı ortalama pürüzlülüğün (R_a) daha yüksek tepelere ve çukurlara duyarlı olmasından kaynaklanmıştır. EPS-AgNP yüzey profilindeki ortalama çizginin üzerindeki en yüksek tepenin yüksekliği [$R_p/\text{Max (nm)}$] 18.957 nm iken ortalama çizginin altındaki en derin vadinin derinliği ise [$R_v/\text{Min (nm)}$] -18.546 nm olarak belirlenmiştir. Böylece toplam pürüzlülük R_{pv} , R_p ve R_v değerlerinin mutlak değer toplamı olan 37.503 nm olarak tespit edilmiştir. Cihazın istatistiksel çıktılarından alınan verilere göre profilin değerlendirilme uzunluğu boyunca en yüksek 5 tepe noktası ile en düşük 5 vadi derinliği arasındaki ortalama yükseklik farkı da 10 nokta yüksekliği olarak değerlendirilen (R_z) 37.419 nm'dir. Bir yüzey profilinin değerlendirilmesinde pürüzlülük kadar önemli olan bir diğer parametre de çarpıklık (R_{sk}) ve basıklıktır (R_{ku}). Profil genlik olasılık yoğunluğu fonksiyonunun üçüncü momenti olan (R_{sk}) ortalama çizgi etrafında profil simetrisini ölçmek için kullanılan bir parametredir. Yükseklik dağılımı simetrik olduğunda R_{sk} sifıra eşittir. Dağılım asimetrik ise ve yüzey, vadiler daha fazla tepe noktasına sahipse çarpıklık momenti $R_{sk}>0$ 'dır. EPS-AgNP kompleks yüzey profilinin de 0.624'lük değer ile asimetrik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Son olarak profil genlik olasılık yoğunluğu fonksiyonunun dördüncü momenti olan (R_{ku}) bir tür yüzey keskinliği ölçüsüne karşılık gelmektedir. R_{ku} , 3.0 değerinde ise profil Gauss genlik dağılımı gösterir ve yüzey mezokurtik olarak değerlendirilir. $R_{ku}<3$ olduğu durumda yüzey düz olarak kabul edilir ve platykurtik profil baskındır. $R_{ku}>3$ olduğunda ise yüzey, vadilerden daha fazla tepe noktasına sahiptir ki 3.925 R_{ku} değeri ile EPS-AgNP kompleks profilinin bu karakteristikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17c).



Şekil 4.17. EPS-AgNP'lerin AFM mikrografları

4.8.5. SEM analizi

EPS-AgNP'lerin mikroyapısal analizi SEM ile gerçekleştirilmiştir. AFM ile uyumlu olarak sentezlenen EPS-AgNP'lerin, SEM analizinden de gözlendiği gibi, yaklaşık 10.77-37.28 nm arasında değişen boyutlarda sferik morfolojiler sergiledikleri SEM ile doğrulanmıştır (Şekil 4.18). Ayrıca bu değer aralığının ζ potansiyel ölçümündeki 37 ± 0.6 nm'lik ortalama boyut ile de uyum içinde olduğu görülmüştür.



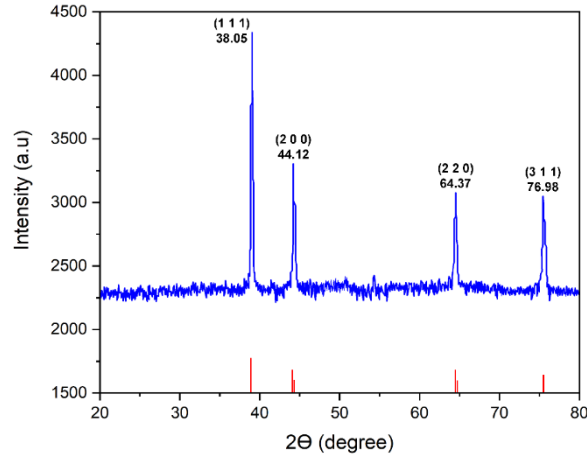
Şekil 4.18. EPS-AgNP'lerin SEM görüntüleri

4.8.6. XRD analizi

EPS-AgNP'leri için kırınım modelinde ilk olarak cihaza entegre XRD Evaluation yazılımı ile, kırınım paterninin indeksleme işlemi yapılmış ve her bir pik için Miller İndisleri (h k l) tayin edilmiştir. Bunun için Bragg Yasası, $\lambda=2d_{hkl}\sin\theta$ kullanılmıştır ve düzlemler arası mesafeler (d_{hkl}) tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Yüzey merkezli kübik kristal yapının (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) ve (3 1 1) düzlemlerine indekslenebilen 38.05°, 44.12°, 64.37° ve 76.98°deki kırınım piklerinin, American Mineralogist Crystal Structure Database'den alınan, yazılıma yüklü Ag standart PDF paterni ile eşleştiği görülmüştür. Yüzey merkezli kübik Ag'nin (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) ve (3 1 1) yansımalarına karşılık gelen bir dizi güçlü Bragg yansıması görülebilir (Şekil 4.19). Yüzey merkezli kübik malzemeler için yüksek yoğun pik, numunede gözlenen genel olarak (1 1 1) yansımasıdır. Ayrıca arbitrary unit biriminde piklerin yoğunluğu, EPS-AgNP'lerinin yüksek derecede kristalliğini yansıtmıştır (Newman ve Wenslow, 2019).

Çizelge 4.8. d-aralığından pik indeksleme

2 θ	θ	d				Kafes parametresi	Kristalit	
(°)	(°)	(Å)	1/d ²	1/d ² =Z	h k l	(a)	β	boyutu (nm)
38.05	19.03	2.3630	0.1791	3	1 1 1	4.09	0.0043	34.1
44.12	22.06	2.0510	0.2377	4	2 0 0	4.10	0.0046	32.5
64.37	32.19	1.4462	0.4781	8	2 2 0	4.09	0.0039	42
76.98	38.49	1.2377	0.6528	11	3 1 1	4.10	0.0033	53.7



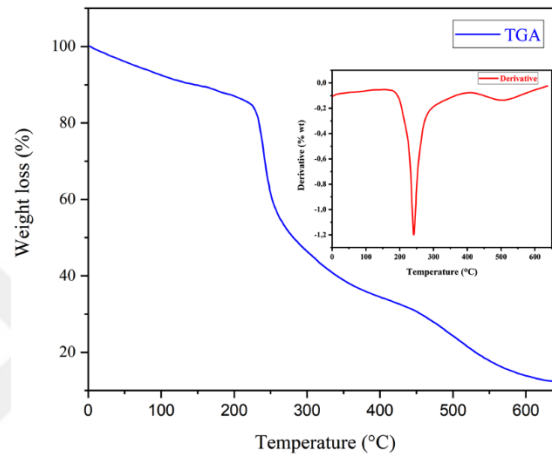
Şekil 4.19. EPS-AgNP’lerin XRD difraktogramı

Yine Bragg denkleminin düzenlenmiş $a = d_{hkl}\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$ formatı kullanılarak kafes parametreleri tespit edilmiştir. Bu değerlerin birbirlerine olan uyumu da EPS-AgNP kristalitinin yüzey merkezli kübik yapıya sahip olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca EPS-AgNP’lerin kristal yapısı, Çizelge 4.7’de verilen pikin max. yarı yoğunluktaki tam genliği değerleri kullanılarak Debye-Scherrer $D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$ denklemi ile hesaplanan EPS-AgNP’lerin 40.5 nm tahmini ortalama kristalit boyutu ile ortaya çıkarılmıştır. Son olarak yüzey merkezli kübik kafes yapısında kafes/örgü parametresi kullanılarak $4r = \sqrt{2}a$ olacağından kristalit yarıçaplarının da 1.45 nm olduğu tespit edilmiştir.

4.8.7. TG/DTA analizi

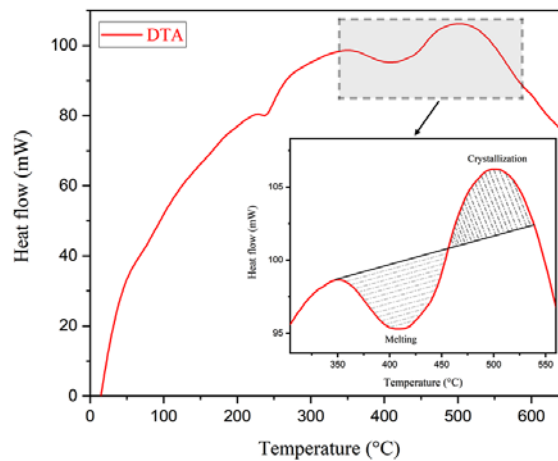
EPS-AgNP’lerin termal analizinde sıcaklığa karşı kütle kaybı ve ısı akışı değerlendirilmiştir. TGA termogram eğrisinin başlangıcında 161.44°C’deki ($T_{\%10}$) %10.67’lik kütle kaybı olası biyomalzemedan absorplanan ve yüzey H_2O ’nun eliminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sıcaklığa kadarki ilk kütle kaybı, EPS-AgNP’lerde hapsolmuş nem içeriğine veya çözücü olarak kullanılan H_2O ’ya da atfedilebilir (Ahmed ve ark., 2013). Bu durum, malzemede bulunan EPS’nin literatürdeki yüksek su tutma kabiliyetini doğrular niteliktedir. Bu özelliğin her karboksil grubunun bir H_2O molekülüne bağlı olmasından, çok sayıda karboksil grubunun varlığına da işaret ettiği düşünülebilir (Kumar ve ark., 2004). TGA eğrisinin 1. dereceden türevi alındığında yani kütle yüzdesinin türevi ile, EPS-AgNP’lere ait

endotermik bir pik şeklinde bozunma sıcaklığının 241.41°C olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte %50 kütle kaybı 280.05°C’de ($T_{\%50}$) gözlemlenirken son olarak 637.83°C’de ($T_{637.83}$) olası biyomalzemenin ayrıştığı ve gözlemlenen rezidüel kütlenin de %9.18 olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.20). Rezidüel kütle ile ilgili elde edilen sonucun da literatür ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir (Abdul kareem ve Anu kaliani, 2011; Khan ve ark., 2011).



Şekil 4.20. EPS-AgNP’lerin TGA eğrisi

EPS-AgNP’lerin Diferansiyel Termal Analizinde (DTA) 410°C’de gözlenen endotermik pik biyomalzemenin bu sıcaklıkta erime davranışı sergilediğini, 502.35°C’deki ekzotermik pik ise malzemede kristalizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.21). Yapılan diferansiyel analizler sonucunda EPS-AgNP’lere ait çeşitli fizikokimyasal veriler elde edilmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.21. EPS-AgNP’lerin DTA eğrisi

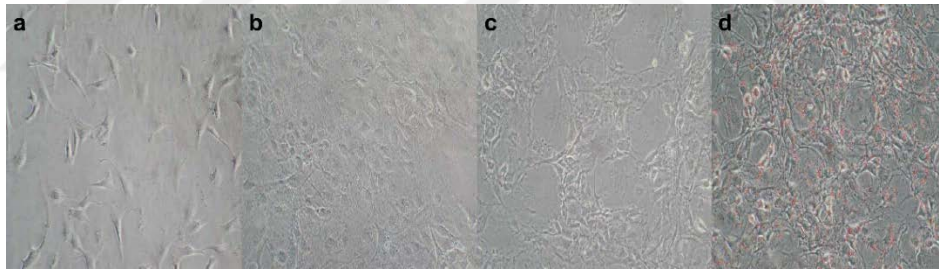
Çizelge 4.9. EPS-AgNP’lerin fizikokimyasal verileri

EPS-AgNP’nin erime aralığı		EPS-AgNP’nin erime entalpisi	EPS-AgNP’nin özgül ısı kapasitesi	EPS-AgNP’nin kristalleşme entalpisi
T_i (°C)	T_f (°C)	ΔH_{erime} (J/g)	C_p (J/g°C)	$\Delta H_{\text{kristal.}}$ (J/g)
354.06	456.75	182.48	98.80	533.31

4.9. Hücre Kültürü Araştırmaları

4.9.1. Adiposit hücelere farklılaşma

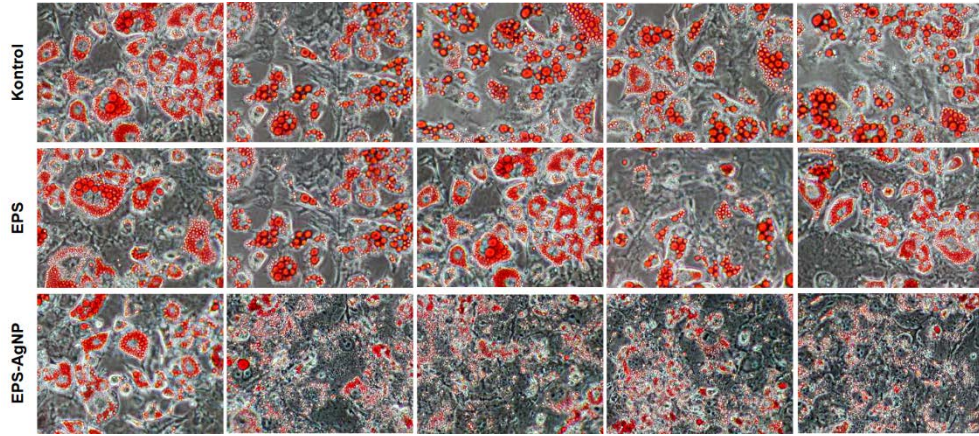
3T3 hücrelerinin gelişme fazı sırasında fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olduğu görüntülenmiştir (Şekil 4.22a). MDI indüksiyon ortamının ilavesinden 24 saat sonra hücrelerin iç-şekli halde morfolojileri değişmeye başlamıştır (Şekil 4.22b). Farklılaşma protokolünü takiben lipid dropletlerin oluşumu ile 3T3-preadipositlerden adiposit hücelere farklılaşmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.22c-d).



Şekil 4.22. 3T3 hücrelerinin adiposit hücelere farklılaşması

4.9.2. Oil Red O boyama

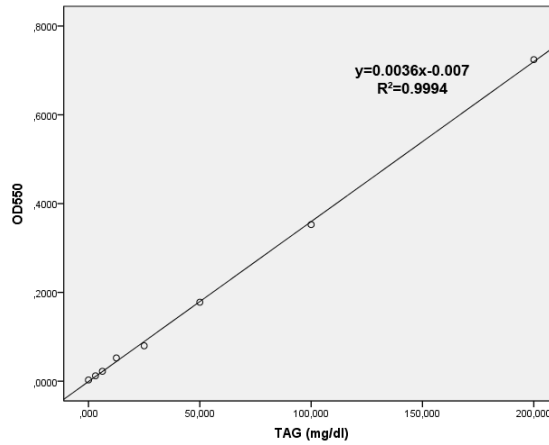
Farklılaşmanın bir göstergesi olarak, farklılaşmanın indüklenmesinden sonra hücrelerin Oil Red O ile boyanmasıyla lipid birikimi değerlendirilmiştir. Burada kontrol olarak 0.05, 0.125, 0.250, 0.500 ve 1.00 mM $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ çözeltileri kullanılmıştır. Hücelere uygulanan EPS konsantrasyonları sırası ile 0.45, 0.90, 1.35, 1.80 ve 2.25 mM iken EPS-AgNP konsantrasyonları 0.25, 0.45, 0.70, 0.95 ve 1.25 mM’dır. Kalitatif olarak yapılan değerlendirmede kontrole kıyasla hem EPS hem de EPS-AgNP ajan profillerinde konsantrasyonla orantılı bir lipid birikimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Hücrelerin Oil Red O boyanması

4.9.3. TAG analizi

Üç tekrarlı ölçülen TAG standartlarının absorpsiyon ortalamaları regresyon analizine tabi tutulmuş ve determinasyon katsayısının $R^2=0.9994$ değeri ile çok yüksek uyum iyiliği modelinde $y=0.0036x-0.007$ regresyon denkleminde sahip Şekil 4.24'teki doğru grafiği elde edilmiştir.

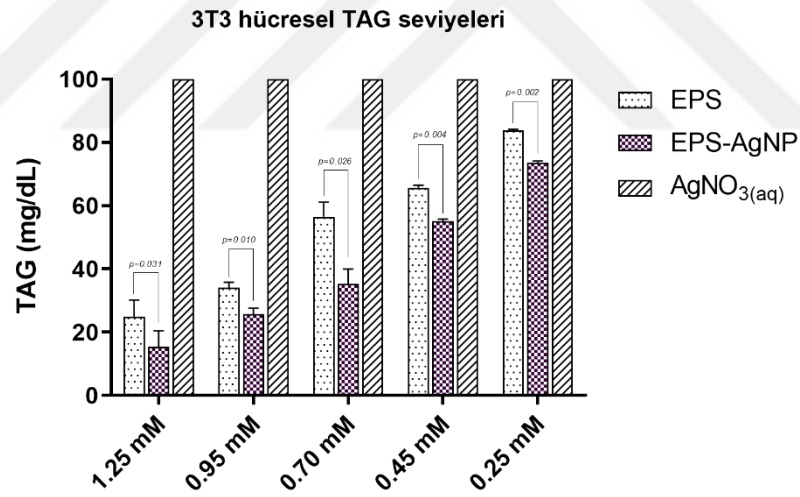


Şekil 4.24. TAG standartlarının grafiği

Yukarıdaki grafikten OD₅₅₀ ile TAG (mg/dl) değerleri arasında doğrusal bir ilişkinin var olduğu söylenebilir. $y=ax+b$ şeklinde bulunan doğrusal ilişki denkleminin parametreleri tahmin edilmiştir. Regresyon denklemi $y=0.0036x-0.007$ yani $OD=0.0036(TAG)-0.007$ şeklinde yazılır. a parametresinin pozitif olması TAG ile OD₅₅₀ arasında doğru yönlü ilişki olduğu, yani bu iki değişkenden birisinin artması/azalması halinde diğ erinin de artacağı/azalacağı anlamına gelmektedir. Denkleme göre, TAG bir

birim arttığında, OD₅₅₀ miktarı 0.0036 birim artacaktır. Model katsayılarının önemli olup olmadığını test etmek için kullanılan t testinin significance değerlerine bakıldığında a ve b parametreleri için significance değeri 0.05'ten küçük olduğundan her iki parametre de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.032<0.05$).

Hücrelere uygulanan kontrol AgNO_{3(aq)}, EPS ve EPS-AgNP ajanlarının her biri için ölçülen absorbans değerleri bu denklemde değerlendirilerek hücre TAG seviyelerine olan etkileri araştırılmıştır. Tek başına AgNO_{3(aq)} uygulaması için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken hem EPS hem de EPS-AgNP uygulamalarının kontrolle aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca EPS ile EPS-AgNP'nin her bir farklı konsantrasyon uygulamaları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Böylece artan konsantrasyona bağlı TAG seviyelerindeki düşüş, kantitatif olarak da kanıtlanmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. 3T3 hücresel TAG seviyeleri

EPS'nin 2.25 ve EPS-AgNP'nin 1.25 mM'lık en yüksek konsantrasyon değerlerinde kontrolün yüzdesine göre sırası ile %75 ve %85, en düşük 0.45 ve 0.25 mM'lık konsantrasyonlarda ise %17 ve %26 adipogenezi inhibe ettikleri sonucuna ulaşılmıştır.

Saklani ve araştırma grubunun 2012'de yapmış oldukları bir araştırmada alkali koşullar altında sentezlenen NP'lerin, asidik koşullar altında sentezlenen NP'lerden daha fazla sentezlendiğine dair elde ettikleri sonuca yapılan literatür araştırmalarında

rastlanılmıştır (Saklani ve ark., 2012). Bu tez çalışmasına konu olan özellikle LAB'lerinin kültür ortamının asidik olduğu dikkate alınırsa *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen EPS'lerin farklı konsantrasyonlardaki sulu çözeltileri ile optimizasyon çalışmalarında da detaylıca ele alınan yine farklı konsantrasyonlardaki $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ 'nun çözeltilerinin inkübasyonu ile elde edilen EPS-AgNP'lerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Yani asidik bir ortamda geliştirilen bir bakteri hücrelerinden elde edilen EPS ile de başarılı bir şekilde NP üretimi gerçekleştirilebilmektedir.

Ayrıca NP'lerle ilgili literatür taraması gerçekleştirildiğinde NP'lerin hücre içi veya hücre dışı olarak sentezlendiğine dair bilgilere de rastlanılmıştır (Mandal ve ark., 2006; Ghorbani ve ark., 2011). Yapılan bu tez çalışmasında probiyotik karakteri bilinen, canlı bir mikroorganizmanın (*Lactobacillus plantarum*) kültürü sonrası süpernatanta salınan EPS'nin %75 (v/v) soğuk etanol ile çöktürülmesinin ardından saflaştırma işlemleri ile hücre komponentlerinden izole edilmesini takiben başarılı bir şekilde EPS-AgNP kompleksine dönüşmesinin bu alanda literatüre yeni bir yaklaşım kazandıracağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında probiyotik karakteri bilinen 10 farklı doğal ev yapımı ürünlerden elde edilen bakteri kültürleri üzerinde gerçekleştirilen EPS ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda 103.39 ± 0.38 ppm en yüksek EPS miktarıyla 7 numaralı materyal örneğinde karşılaşılmıştır. Bu örnek üzerinden gerçekleştirilen karakterizasyon işlemlerinde EPS'nin fruktoz, glukoz, galaktoz ve maltoz içeriğine sahip olduğu HPLC analizi ile, FT-IR spektrumları ile çeşitli bağ gerilmelerinin varlığı, GPC analizi ile $221\ 860 \pm 0.006$ g mol⁻¹ ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığına sahip olduğu ve polidispersite indeksinin 1.0'e yakın bir değer (1.174 ± 0.01) ile EPS'nin biyolojik kökenli olduğu, yapılan MALDI TOF MS ve 16S rRNA dizi analizi ile de EPS'nin ekstrakte edildiği mikroorganizmanın *Lactobacillus plantarum* olduğu açığa kavuşturulmuştur. Bütün bu karakterizasyon basamaklarını takiben EPS-AgNP biyosentezinin optimizasyonunda EPS'nin konsantrasyonu, karıştırma hızı, kullanılan AgNO₃ konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi farklı parametrelerin varyasyonları test edilmiş ve optimale en yakın koşullarda sentez gerçekleştirilmiştir. NP'lerin karakterizasyonunda ise UV-görünür spektroskopik ölçümler ile kabaca 400-550 nm arasında geniş bir YPR absorpsiyon bandının gözlemlenmesi, daha önceki raporlar ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir (Kanmani ve Lim, 2013; Ashokkumar ve ark., 2014). ζ potansiyel değerinin -34.8 ± 3.0 mV olarak ölçüldüğü partikül boyut dağılımı analizinde ortalama boyutun 37 ± 0.6 nm olduğu tespit edilmiştir. ζ potansiyel değerinin, negatif-negatif itme nedeniyle uzun vadeli stabiliteyi, iyi kolloidal doğayı ve biyosentezlenmiş EPS-AgNP'lerin yüksek dağılımını desteklediği sonucuna kanaat getirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2014). AFM ile EPS-AgNP'lerin morfolojik özellikleri araştırılmış ve yüzeyin pürüzlü bir karakteristikte olduğu sonucuna ulaşılrken, münferit NP'ler ile AgNP'lerin doğası gereği aglomere NP'lere de rastlanılmıştır (Kapoor ve ark., 1994; Sharma ve ark., 2009). EPS-AgNP'lerin mikroyapısal analizi SEM ile araştırılırken, yaklaşık 10.77-37.28 nm arasında değişen boyutlarda, sferik morfoloji sergiledikleri gözlemlenmiştir. SEM'den alınan bu sonuçların da AFM'den alınan sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. XRD analizi ile EPS-AgNP'lerin yüzey merkezli kübik kristal yapıda olduğu, kristalitlerin ~ 40.5 nm ortalama boyuta sahip olduğu ve kristalit yarıçaplarının da 1.45 nm olduğu tespit edilmiştir. Yapılan TGA ile elde edilen

termogram eğrisinden T_{10} 'un 161.44°C 'de, T_{50} 'nin 280.05°C 'de gerçekleştiği, 637.83°C 'de malzemenin ayrıştığı ve rezidüel kütlenin de %9.18 olduğu belirlenmiştir. Sonucun literatürdeki sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür (Abdul kareem ve Anu kaliani, 2011; Khan ve ark., 2011). DTA ile EPS-AgNP'lerin erime aralığının kabaca $354-457^{\circ}\text{C}$ arasında, erime entalpisinin 182.48 J/g , özgül ısı kapasitesinin $98.80 \text{ J/g}^{\circ}\text{C}$ ve kristalleşme entalpisinin 533.31 J/g olduğu belirlenmiştir. 3T3 hücrelerinin adipositlere indüklendiği bir *in vitro* hücre kültürü teknikleri ile yapılan araştırmada hem EPS hem de EPS-AgNP'lerin $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ kontrolüne kıyasla adipogenez üzerine olası etkileri araştırılmış ve 5 farklı konsantrasyon değerleri için Oil Red O boyaması ile konsantrasyona bağlı lipid droplet oluşumu tespit edilmiştir. Kontrolün hemen her farklı konsantrasyonunda belirgin bir fark gözlenmezken hem EPS'nin hem de EPS-AgNP'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak daha az sayıda lipid dropletler gözlemlenmiştir. Oil Red O tekniği ile kalitatif olarak incelenen bu 5 farklı konsantrasyona sahip uygulamalar, 3T3 hücrel TAG seviyelerinde de kantitatif olarak araştırılmıştır. Adipogeneze olan etkileri araştırılan ajanların artan konsantrasyonlarında çok daha etkili oldukları görülürken EPS'nin 2.25 ve EPS-AgNP'nin 1.25 mM'lık en yüksek konsantrasyon değerlerinde kontrolün yüzdesine göre sırası ile %75 ve %85, en düşük 0.45 ve 0.25 mM'lık konsantrasyonlarında ise %17 ve %26 adipogenezi inhibe ettikleri sonucuna ulaşılmıştır. Kontrol $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ 'nun tek başına uygulanmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Elde edilen sonuçların, Oil Red O tekniğinden elde edilen sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Bu çalışma; biyoloji, kimya ve farmakoloji gibi birçok temel alanın birlikte ele alındığı ve güncel biyoteknolojik bir yaklaşımla obezite gibi önemli bir sağlık soruna yanıt arayan inovatif bir tez çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada sentezlenen EPS, AgNP'ler kullanılarak hedefli hale getirilmiş ve biyoyararlanımı anlamlı şekilde artırılmıştır. Tarafımızdan yapılan *in vitro* çalışmalar da; sentezlediğimiz EPS-AgNP'lerin hücrelerin adipozite dönüşümünü azalttığını göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar çok değerli olmasına rağmen bir sonraki adımda bu obezite önleyici etkinin mekanizmasını hücre yolakları düzeyinde, özellikle de $\text{PPAR}\gamma$, ap2 , ve $\text{C/EBP}\alpha$ gibi adipogenezde önemli proteinler üzerinden, gen transkripsiyon seviyelerinin ölçülmesi ve aynı zamanda western-blot gibi yöntemlerle protein

seviyelerinin verifiye edilmesi planlanmaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılmasının ardından da EPS-AgNP'lerimizin transgenik obez hayvanlar üzerinde deneyerek *in vivo* etkinliğinin de ortaya konması planlanmakta ve önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abdul kareem, T. ve Anu kaliani, A. 2011. Synthesis and thermal study of octahedral silver nano-plates in polyvinyl alcohol (PVA). *Arabian Journal of Chemistry*, 4 (3), 325-331.
- Agnihotri, M., Joshi, S., Kumar, A.R., Zinjarde, S. ve Kulkarni, S. 2009. Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters*, 63 (15), 1231-1234.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R. ve Sastry, M. 2002. Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, *Fusarium oxysporum*. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (41), 12108-12109.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R. ve Sastry, M. 2003a. Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles by a Novel Extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir*, 19 (8), 3550-3553.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V. ve Sastry, M. 2003b. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology*, 14 (7), 824-828.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan M.I., Kumar, R. ve Sastry, M. 2003c. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28 (4), 313-318.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A. ve Khan, S.T. 2013. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir Part II. *Food Hydrocoll*, 30 (1), 343-350.
- Allpress, J.G. ve Sanders, J.V. 1967. The structure and orientation of crystals in deposits of metals on mica. *Surface Science*, 7 (1), 1-25.
- Almeida, I.F., Pereira, T., Silva, N.H., Gomes, F.P., Silvestre, A.J., Freire, C.S., Sousa Lobo, J.M. ve Costa, P.C. 2014. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study. *Eur J Pharm Biopharm*, 86 (3), 332-336.
- Altacor.2020. ALTACOR BioLon, [http://www.altacorpharma.com/product/viscoelastic-devices/biolon-\(05.02.2020\)](http://www.altacorpharma.com/product/viscoelastic-devices/biolon-(05.02.2020)).
- Amao, J.A., Omojasola, P.F. ve Barooah, M. 2019. Isolation and characterization of some exopolysaccharide producing bacteria from cassava peel heaps. *Scientific African*, 4, 1-11.
- Amspacher, W.H. ve Curreri, A.R. 1953. Use of dextran in control of shock resulting from war wounds. *AMA Archives Surgery*, 66 (6), 730-740.
- Anderson, A.J., Haywood, G.W. ve Dawes, E.A. 1990. Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *Int J Biol Macromol*, 12 (2), 102-105.
- Anonim, 2019. Probiotics. AGA Patient Education Section. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17, xxv.
- Anonim, 2021a. Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. [https://en.wikipedia.org/wiki/Engines_of_Creation-\(12.08.2021\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Engines_of_Creation-(12.08.2021)).
- Anonim, 2021b. Nano-. [https://en.wikipedia.org/wiki/Nano-\(16.08.2021\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Nano-(16.08.2021)).
- Anonim, 2021c. Size of the Nanoscale. National Nanotechnology Initiative, [https://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size-\(16.08.2021\)](https://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size-(16.08.2021)).
- Asghar, F. Ali, S., Goraya, A., Javaid, I. ve Hussain, Z. 2017. A Review on the Role of Fermented Foods as Health Promoters. *IJSRST*, 3 (4), 141-148.

- Ashokkumar, S., Ravi, S., Kathiravan, V. ve Velmurugan, S. 2014. Synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Tribulus terrestris* leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 88-93.
- Babu, M.M.G. ve Gunasekaran, P. 2009. Production and structural characterization of crystalline silver nanoparticles from *Bacillus cereus* isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74 (1), 191-195.
- Badel, S., Bernardi, T. ve Michauda, P. 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29 (1), 54-66.
- Bansal, V., Rautaray, D., Bharde, A., Ahire, K., Sanyal, A., Ahmad, A. ve Sastry, M. 2005. Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. *Journal of Materials Chemistry*, 15 (26), 2583-2589.
- Bao, H., Lu, Z., Cui, X., Qiao, Y., Guo, J., Anderson, J.M. ve Li, C.M. 2010. Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomaterialia*, 6 (9), 3534-3541.
- Bataille, I., Meddahi-Pellé, A., Le Visage, C., Letourneur, D., ve Chaubet, F. 2011. Pullulan for biomedical uses. *Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications*, 145-182.
- Becker, A. 2015. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology*, 6 (687), 1-8.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, Jr. G.J. ve Stryer, L. 2015. *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, 324 p, New York, USA.
- Bhainsa, K.C. ve D'Souza, S.F. 2006. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47 (2), 160-164.
- Bharde, A., Wani, A., Shouche, Y., Pattayil, A., Bhagavatula, L. ve Sastry, M. 2005. Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (26), 9326-9327.
- Bhattacharya, R. ve Mukherjee, P. 2008. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (11), 1289-1306.
- Bioventus, 2020. Bioventus DUROLANE-Hyaluronic Acid, Stabilized Single Injection, <https://www.bioventusglobal.com/bioventus-receives-us-fda-approval-durolane/> (05.02.2020).
- Blaut, M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41 (1), 1-6.
- Bordoni, A., Amaretti, A., Leonardi, A., Boschetti, E., Danesi, F., Matteuzzi, D., Roncaglia, L., Raimondi, S. ve Rossi, M. 2013. Cholesterol-lowering probiotics: *in-vitro* selection and *in vivo* testing of bifidobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 (18), 8273-8281.
- Boridy, S., Takahashi, H., Akiyoshi, K. ve Maysinger, D. 2009. The binding of pullulan modified cholesteryl nanogels to Abeta oligomers and their suppression of cytotoxicity. *Biomaterials*, 30 (29), 5583-5591.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Bremer, P.J. ve Geesey, G.G. 1991. An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling*, 3 (2), 89-100.
- Caldorera-Moore, M. ve Peppas, N.A. 2009. Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 61 (15), 1391-1401.
- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A.R. ve Avalos-Borja, M. 2011. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83 (1), 42-48.
- Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7, (1-2), 113-130.
- Cerning, J. 1995. Production of expolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75 (4-5), 463-472.
- Chen, G., Wang, J., Su, Y., Zhu, Y., Zhang, G., Zhao, H., Liu, H., Yang, Y., Nian, R., Zhang, H., Wei, Y. ve Xian, M. 2017. Pullulan production from synthetic medium by a new mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Prep Biochem Biotechnol.*, 47 (10), 963-969.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H. ve Chen, W. 2014. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35 (1), 65-72.
- Choi, K.Y., Min, K.H., Na, J.H., Choi, K., Kim, K., Park, J.H., Kwona, I.C. ve Jeongb, S.Y. 2009. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and *in vivo* biodistribution. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (24), 4029-4280.
- Chong, B.F., Blank, L.M., Mclaughlin, R. ve Nielsen, L.K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66 (4), 341-351.
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., Grodzik, M., Orlowski, P. ve Sokolowska, A. 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 1085-1094.
- Crescenzi, V. 1995. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol Prog.*, 11 (3), 251-259.
- Cui, J., Gu, X., Wang, F., Ouyang, J. ve Wang, J. 2015. Purification and structural characterization of an α -glucosidase inhibitory polysaccharide from apricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam.) pulp. *Carbohydr. Polym*, 121, 309-314.
- Culligan, E.P., Hill, C. ve Sleator, R.D. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens*, 1 (19), 1-12.
- Cyber Colloids Ltd. 2020. The History of Alginate Chemistry-Structure, [http://www.cybercolloids.net/information/technical-articles/history-alginate-chemistry-structure-\(05.02.2020\)](http://www.cybercolloids.net/information/technical-articles/history-alginate-chemistry-structure-(05.02.2020)).
- Dahech, I., Belghith, K.S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H. ve Mejdoub, H. 2011. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *Int J Biol Macromol*, 49 (4), 742-746.
- D'Arrigo, G., Navarro, G., Di Meo, C., Matricardi, P. ve Torchilin, V. 2014. Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: a multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*, 87 (1), 208-216.

- De Vuyst, L. ve Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (2), 153-177.
- Delattre, C., Pierre, G., Gardarin, C., Traikia, M., Elboutachfai, R., Isogai, A. ve Michaud, P. 2015. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydr Polym*, 116, 34-41.
- Dickson, D.P.E. 1999. Nanostructured magnetism in living systems. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 203 (1-3), 46-49.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C. ve Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87 (2), 951-962.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28 (3), 350-356.
- El-Rafie, H.M., El-Rafie, M.H. ve Zahran, M.K. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae. *Carbohydrate Polymers*, 96 (2), 403-410.
- Esawy, M.A., Ahmed, E.F., Helmy, W.A., Mansour, N.M., El-Senousy, W.M. ve El-Safty, M.M. 2012. Antiviral levans from *Bacillus* spp. isolated from honey. *The Complex World of Polysaccharides-InTech*, 195-214.
- European Pharmacopeia [EP]. 2014. 1506, 0999, 1000, 1001(dextran), 1277 (xanthan), 0625 (sodiumalginate), 1472 (sodiumhyaluronate), 2603 (pullulan), 8th Edn. Strasbourg: Pharmacopeia Commission-European Directorate for the Quality of Medicines and Health care of the Council of Europe.
- Evivie, S.E., Huo, G.C., Igene, J.O. ve Bian, X. 2017. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food Nutr Res*, 61 (1), 1318034, 1-16.
- Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T. ve Venketesan, R. 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (1), 103-109.
- Felt, O., Einmahl, S., Furrer, P., Baeyens, V. ve Gurny, R. 2002. Polymeric Systems for Ophthalmic Drug Delivery. *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, 377-421 p, New York, USA.
- Ferring Pharmaceuticals, 2020. EUFLEXXA, [https://www.ferring.com/en/media/press-releases/btg/-\(05.02.2020\)](https://www.ferring.com/en/media/press-releases/btg/-(05.02.2020)).
- Feynman, R.P. 1960. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 23 (5), 1-13.
- Filipponi, L. ve Sutherland, D. 2012. NANOTECHNOLOGIES: Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities. Edited by the European Commission Directorate-General for Research and Innovation Industrial technologies (NMP) programme, 20-137 p, European Union, Luxemburg.
- Freitas, F., Alves, V.D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira ve R., Reis M.A.M. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresour Technol.*, 100 (2), 859-865.

- Freitas, F., Alves, V.D., Torres, C.A.V., Cruz, M., Sousa, I., Melo, M.J., Ramos, A.M. ve Reis, M.A.M. 2011. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydrate Polymers*, 83 (1), 159-165.
- Fu, L., Zhang, J. ve Yang, G. 2013. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr Polym*, 92 (2), 1432-1442.
- Fuller, R. 1992. Probiotics. History and development of probiotics. Chapman & Hall, 13 p, London, UK.
- Fundueanu, G., Constantin, M. ve Ascenzi, P. 2008. Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials*, 29 (18), 2767-2775.
- Gadd, G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156 (3), 609-643.
- Gao, F., Li, L., Zhang, H., Yang, W., Chen, H., Zhou, J., Zhou, Z., Wang, Y., Cai, Y., Li, X., Liu, L. ve Zhang, Q. 2010. Deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugate as a novel carrier of epirubicin: *in-vitro* and *in vivo* studies. *Int J Pharm*, 392 (1-2), 254-260.
- Gao, Y., Cheng, X., Wang, Z., Wang, J., Gao, T., Li, P., Kong, M. ve Chen, X. 2014. Transdermal delivery of 10,11-methylenedioxycamptothecin by hyaluronic acid based nanoemulsion for inhibition of keloid fibroblast. *Carbohydr Polym*, 112, 376-386.
- Garimella, R., Halye, J.L., Harrison, W., Klebba, P.E. ve Rice, C.V. 2009. Conformation of the phosphate D-alanine zwitterions in bacterial teichoic acid from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 48 (39), 9242-9249.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. ve Delie, F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (1), 1-9.
- Gauri, S.S., Mandal, S.M., Mondal, K.C., Dey, S. ve Pati, B.R., 2009. Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresour. Technol.*, 100 (18), 4240-4243.
- Gerez, C.L., Font de Valdez, G. ve Rollán, G.C. 2008. Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (5), 427-432.
- Gericke, M. ve Pinches, A. 2006. Microbial Production of Gold Nanoparticles. *Gold Bulletin*, 39 (1), 22-28.
- Ghorbani, H.R., Safekordi, A.A., Attar, H. ve Rezayat Sorkhabadi, S.M. 2011. Biological and Non-biological Methods for Silver Nanoparticles Synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25 (3), 317-326.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S.R.K., Muniyandi, J., Hariharan, N. ve Eom, S.H. 2009. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74 (1), 328-335.

- Gutnick, D.L. ve Bach, H. 2000. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (4), 451-460.
- Harutoshi, T. 2013. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Intechopen, 515-538 p, London, UK.
- Haxaire, K., Maréchal, Y., Milas, M. ve Rinaudo, M. 2003. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. *Biopolymers*, 72 (1), 10-20.
- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J. ve Gu, N. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61 (18), 3984-3987.
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M.P. ve Tomasz, A. 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun*, 62 (7), 2715-2721.
- Holt, K.B. ve Bard, A.J. 2005. Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺. *Biochemistry*, 44 (39), 13214-13223.
- Homma, A., Sato, H., Tamura, T., Okamachi, A., Emura, T., Ishizawa, T., Kato, T., Matsuura, T., Sato, S., Higuchi, Y., Watanabe, T., Kitamura, H., Asanuma, K., Yamazaki, T., Ikemi, M., Kitagawa, H., Morikawa, T., Ikeya, H., Maeda, K., Takahashi, K., Nohmi, K., Izutani, N., Kanda, M. ve Suzuki, R. 2010. Synthesis and optimization of hyaluronic acid-methotrexate conjugates to maximize benefit in the treatment of osteoarthritis. *Bioorg Med Chem*, 18 (3), 1062-1075.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. ve Rastall, R.A. 2012. *In-vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1), 846-852.
- Howe, K.J., Ishida, K.P. ve Clark, M.M. 2002. Use of ATR/FTIR spectrometry to study fouling of microfiltration membranes by natural waters. *Desalination*, 147 (1-3), 251-255.
- Huang, M., Wang, F., Zhou, X., Yang, H. ve Wang, Y. 2015. Hypoglycemic and hypolipidemic properties of polysaccharides from *Enterobacter cloacae* Z0206 in KKAY mice. *Carbohydr Polym*, 117, 91-98.
- Husseiny, M.I., Abd El-Aziz, M., Badr, Y. ve Mahmoud, M.A. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A*, 67 (3-4), 1003-1006.
- Ismail, B. ve Nampoothiri, K.M. 2013. Exposition of antitumour activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Biologia*, 68 (6), 1041-1047.
- Jain, N., Bhargava, A., Majumdar, S., Tarafdar, J.C. ve Panwar, J. 2011. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale*, 3 (2), 635-641.
- Japan Pharmacopeia [JP]. 2011. Pullulan, 16th Edn. Tokyo: Ministry of Health, Labor and Welfare, 1320-1321.
- Jebali, A., Ramezani, F. ve Kazemi, B. 2011. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Geotricum* sp. *Journal of Cluster Science*, 22 (2), 225-232.

- Jiang, L., Li, X., Liu, L. ve Zhang, Q. 2013. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 8, 1825-1834.
- Jindal, N., Singh, D.P. ve Khattar, J.S. 2013. Optimization, characterization, and flow properties of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Lyngbya stagnina*. *J. Basic Microbiol.*, 53 (11), 902-912.
- Juibari, M.M., Abbasalizadeh, S., Jouzani, G.S. ve Noruzi, M. 2011. Intensified biosynthesis of silver nanoparticles using a native extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain. *Materials Letters*, 65 (6), 1014-1017.
- Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W. ve Ghiorse, W.C. 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ Microbiol.*, 3 (12), 774-784.
- Kalimuthu, K., Babu, R.S., Venkataraman, D., Bilal, M. ve Gurunathan, S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65 (1), 150-153.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian S.R.K., Kottaisamy, M., BarathmaniKanth, S., Kartikeyan, B. ve Gurunathan, S. 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77, (2), 257-262.
- Kanmani, P., ve Lim, S.T. 2013. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens, *Process Biochem*, 48 (7), 1099-1106.
- Kapoor, S., Lawless, D., Kennepohl, P., Meisel, D. ve Serpone, N. 1994. Reduction and Aggregation of Silver Ions in Aqueous Gelatin Solutions. *Langmuir*, 10 (9), 3018-3022.
- Khalil, E.S., Abd Manap, M.Y., Mustafa, S., Alhelli, A.M. ve Shokryazdan, P. 2018. Probiotic Properties of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus* Strains Isolated from Tempoyak. *Molecules*, 23 (2), 1-20.
- Khan F. ve Ahmad, S.R. 2013. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromol. Biosci*, 13 (4), 395-421.
- Khan, M.A.M., Kumar, S., Ahamed, M., Alrokayan, S.A. ve AlSalhi, M.S. 2011. Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films. *Nanoscale Res Lett.*, 6 (1), 434, 1-8.
- Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. ve Zinedine, A. 2009. Characterisation of lactic acid bacteria from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*, 164 (1), 81-91.
- Kim, Y., Hong, J.W., Chung, Y.S., Kim, S.W., Cho, Y.W., Kim, J.H., Kim, B.J. ve Lee, E.J. 2014. Efficacy and safety of sustained-release recombinant human growth hormone in Korean adults with growth hormone deficiency. *Yonsei Med J*, 55 (4), 1042-1048.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E. ve Granqvist, C.G. 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (24), 13611-13614.
- Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E. ve Granqvist, C.G. 2001. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol*, 19 (1), 15-20.

- Knox, K.W. ve Wicken, A.J. 1973. Immunological properties of teichoic acids. *Bacteriol Rev*, 37 (2), 215-257.
- Kogan, G., Soltés, L., Stern, R. ve Gemeiner, P. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 29 (1), 17-25.
- Konishi, Y., Tsukiyama, T., Tachimi, T., Saitoh, N., Nomura, T. ve Nagamine, S. 2007a. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*. *Electrochimica Acta*, 53 (1), 186-192.
- Konishi, Y., Ohno, K., Saitoh, N., Nomura, T., Nagamine, S., Hishida, H., Takahashi, Y. ve Uruga, T. 2007b. Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella algae*. *Journal of Biotechnology*, 128 (3), 648-653.
- Koop, H.S., de Freitas, R.A., de Souza, M.M., Savi Jr, R. ve Silveira, J.L.M. 2015. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. *Carbohydr Polym*, 116, 229-236.
- Korakli, M., Gänzle, M.G. ve Vogel, R.F. 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (5), 958-965.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M.G., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J.E.C. ve Dijkhuizen, L. 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology*, 150 (11), 3681-3690.
- Kröger, N., Deutzmann, R. ve Sumper, M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286 (5442), 1129-1132.
- Kumar, C.G., Joo, H.S., Choi, J.W., Koo, Y.M., Chang, C.S. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (7), 673-681.
- Kumar, D., Saini, N., Pandit, V. ve Ali, S. 2012. An insight to pullulan: a biopolymer in pharmaceutical approaches. *Int. J. Basic Appl. Sci*, 1 (3), 202-219.
- Laroche, C. ve Michaud, P. 2007. New developments and prospective applications for β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1 (1), 59-73.
- Lengke, M.F., Ravel, B., Fleet, M.E., Wanger, G., Gordon, R.A. ve Southam, G. 2006a. Mechanisms of Gold Bioaccumulation by Filamentous Cyanobacteria from Gold(III)-Chloride Complex. *Environ. Sci. Technol.*, 40 (20), 6304-6309.
- Lengke, M.F., Fleet, M.E. ve Southam, G. 2006b. Morphology of Gold Nanoparticles Synthesized by Filamentous Cyanobacteria from Gold(I)-Thiosulfate and Gold(III)-Chloride Complexes. *Langmuir*, 22 (6), 2780-2787.
- Lengke, M.F., Fleet, M.E. ve Southam, G. 2007. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver(I) nitrate complex. *Langmuir*, 23 (5), 2694-2699.
- Li, P., Tan, H., Xu, D., Yin, F., Cheng, Y., Zhang, X., Liu, Y. ve Wang, F. 2014. Effect and mechanisms of curdlan sulfate on inhibiting HBV infection and acting as an HB vaccine adjuvant. *Carbohydr Polym*, 110, 446-455.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.S. ve Chen, G. 2011. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-16.

- Lin, S-P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J-R., Demirci, A. ve Cheng, K-C. 2013. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20 (5), 2191-2219.
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. ve Xiao, M. 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 101 (14), 5528-5533.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H. ve Zeng, X. 2012. Preparation, antioxidant and antitumor activities in-vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem Toxicol*, 50 (3-4), 767-772.
- Liu, J., Qiao, S.Z., Hu, Q.H. ve Lu, G.Q. 2011. Magnetic Nanocomposites with Mesoporous Structures: Synthesis and Applications. *Small*, 7 (4), 425-443.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. ve Zhang, Z. 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (15), 1650-1662.
- Lloyd, J.R., Yong, P. ve Macaskie, L.E. 1998. Enzymatic Recovery of Elemental Palladium by Using Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, (11), 4607-4609.
- Lovley, D.R., Stolz, J.F., Nord Jr, G.L. ve Philips, E.J.P. 1987. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330 (6145), 252-254.
- Lowenstam, H.A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science*, 211 (4487), 1126-1131.
- Mahadevan, S., Vijayakumar, S. ve Arulmozhi, P. 2017. Green synthesis of silver nano particles from *Atalantia monophylla* (L) Correa leaf extract, their antimicrobial activity and sensing capability of H₂O₂. *Microbial Pathogenesis*, 113, 445-450.
- Mahdieh, M., Zolanvari, A., Azimee, A.S. ve Mahdieh, M. 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis*. *Scientia Iranica*, 19 (3), 926-929.
- Maksumov, A., Vidu, R., Palazoglu, A. ve Stroeve, P. 2004. Enhanced feature analysis using wavelets for scanning probe microscopy images of surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 272 (2), 365-377.
- Malarkodi, C., Rajeshkumar, S., Vanaja, M., Paulkumar, K., Gnanajobitha, G. ve Annadurai, G. 2013. Eco-friendly synthesis and characterization of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae*. *Journal Of Nanostructure in Chemistry*, 3 (30), 1-7.
- Mandal, D., Bolander, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G. ve Mukherjee, P. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (5), 485-492.
- Manivasagan, P., Nam, S.Y. ve Oh, J. 2015. Marine microorganisms as potential biofactories for synthesis of metallic nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*, 42 (6), 1007-1019.
- Mann, S. 1993. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, 365 (6446), 499-505.
- Mann, S. 2001. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Marcobal, A., Southwick, A.M., Earle, K.A. ve Sonnenburg, J.L. 2013. A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology*, 23 (9), 1038-1046.
- Matsuda, M., Shigeta, S.H.ve Okutani, K. 1999. Antiviral Activities of Marine *Pseudomonas* Polysaccharides and Their Oversulfated Derivatives. *Marine Biotechnology*, 1 (1), 68-73.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. ve Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4506-4512.
- Matsumura, K., Nakajima, N., Sugai, H. ve Hyon, S.H. 2014. Self-degradation of tissue adhesive based on oxidized dextran and poly-L-lysine. *Carbohydr Polym*, 113, 32-38.
- Mishra, B., Vuppu, S. ve Rath, K. 2011. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (6), 45-50.
- Mocanu, G., Souguir, Z., Picton, L. ve Le Cerf, D. 2012. Multi-responsive carboxymethyl polysaccharide crosslinked hydrogels containing Jeffamine side-chains. *Carbohydr Polym*, 89 (2), 578-585.
- Mody, V.V., Siwale, R., Singh, A. ve Mody, H.R. 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2 (4), 282-289.
- Mohanpuria, P., Rana, N.K. ve Yadav, S.K. 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10 (3), 507-517.
- Morris, G. ve Harding, S.E. 2009. Polysaccharides, Microbial. *Applied Microbiology: Industrial*. Elsevier, 482-494.
- Moscovici, M. 2015. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol*, 6 (1012), 1-11.
- Mubarak-Ali, D., Sasikala, M., Gunasekaran, M. ve Thajuddin, N. 2011. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* NDM01. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6 (2), 385-390.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S.R., Khan, M.I., Parishcha, R., Ajaykumar, P.V., Alam, M., Kumar, R. ve Sastry, M. 2001. Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters*, 1 (10), 515-519.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B.P., Dey, G.K., Mukherjee, P.K., Ghatak, J., Tyagi, A.K. ve Kale, S.P. 2008. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*, 19 (7), 075103, 1-7.
- Mukherjee, S., Chowdhury, D., Kotcherlakota, R., Patra, S., Vinothkumar, B., Bhadra, M.P., Sreedhar, B. ve Patra, C.R. 2014. Potential Theranostics Application of Bio-Synthesized Silver Nanoparticles (4-in-1 System). *Theranostics*, 4 (3), 316-335.

- Nair, B. ve Pradeep, T. 2002. Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by *Lactobacillus* Strains. *Crystal Growth & Design*, 2 (4), 293-298.
- Narayanan, K.B. ve Sakthive, N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156 (1-2), 1-13.
- Narvhus, J.A. ve Axelsson, L. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Lactic acid bacteria*. Academic Press, 3465-3472 p, Baltimore, Maryland USA.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., ve Kolar, J. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53 (8), 397-411.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, 247 p, New York, USA.
- Newman, A. ve Wenslow, R. 2019. *Solid-state Characterization Techniques. Pharmaceutical Crystals: Science and Engineering*, 89-121p, Wiley, New York, USA.
- Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (2-3), 313-339.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N. ve Ruas-Madiedo, P. 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 158 (2), 155-162.
- Notararigo, S., de Las Casas-Engel, M., de Palencia, P.F., Corbí, A.L. ve López, P. 2014. Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)- β -D-glucan from *P. parvulus* 2.6. *Carbohydr Polym*, 112, 109-113.
- Nwodo, U.U., Green, E. ve Okoh, A.I. 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int J Mol Sci*, 13 (11), 14002-14015.
- Oliver, S., Kupermann, A., Coombs, N., Lough, A. ve Ozin, G.A. 1995. Lamellar aluminophosphates with surface patterns that mimic diatom and radiolarian microskeletons. *Nature*, 378 (6552), 47-50.
- Onyibe, J.E., Oluwole, O.B., Ogunbanwo, S.T ve Sanni, A.I. 2013. Antibiotic susceptibility profile and survival of *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium catenulatum* of human and avian origin in stored yogurt. *Nigerian Food Journal*, 31 (2), 73-83.
- Osmalek, T., Froelich, A. ve Tasarek, S. 2014. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm*, 466 (1-2), 328-340.
- Otero, A. ve Vincenzini, M. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. *J Biotechnol*, 102 (2), 143-152.
- Ozturk, S., Aslim, B. ve Suludere, Z., 2009. Evaluation of chromium (VI) removal behavior by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology*, 100 (23), 5588-5593.
- Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevěčná, T. ve Zbořil, R. 2006. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (33), 16248-16253.

- Parikh, R.Y., Singh, S., Prasad, B.L.V., Patole, M.S., Sastry, M. ve Shouche, Y.S. 2008. Extracellular Synthesis of Crystalline Silver Nanoparticles and Molecular Evidence of Silver Resistance from *Morganella* sp.: Towards Understanding Biochemical Synthesis Mechanism. *ChemBioChem*, 9 (9), 1415-1422.
- Park, J.E., Oh, S.H. ve Cha, Y.S. 2013. *Lactobacillus plantarum* LG42 isolated from gajami sik-hae inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte. *Biomed. Res. Int*, 2013, 460927.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
- Patel S., Majumder, A. ve Goyal, A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol*, 52 (1), 3-12.
- Patil, S.P. ve Kumbhar, S.T. 2017. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of *Lantana camara* L. leaves. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 76-81.
- Pum, D. ve Sleytr, U.B. 1999. The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 17 (1), 8-12.
- Ramsden, J. 2009. *Essentials of Nanotechnology*. Ventus Publishing ApS, 22 p, Frederiksberg, Denmark.
- Rehm, B.H.A. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (8), 578-592.
- Rehm, B.H.A. ve Valla, S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48 (3), 281-288.
- Robyt, J.F. 1998. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Springer Science+Business Media, 157-160 p, New York, USA.
- Roller, S. ve Dea, C.M. 1992. Biotechnology in the Production and Modification of Biopolymers for Foods. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (3), 261-277.
- Ruas-Madiedo, P. ve de los Reyes-Gavilán, C.G. 2005. Invited Review: Methods for the screening, Isolation and characterization of Exopolysaccharides produced by Lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 88 (3), 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. ve Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acidbacteria. *International Dairy Journal*, 12 (2-3), 163-171.
- Ryan, P.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Caplice, N.M. ve Stanton, C. 2014. Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6 (3), 679-693.
- Saklani, V., Suman ve Jain, V.K. 2012. Microbial Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 13 (007), 1-3.
- Salah, R.B., Jaouadi, B., Bouaziz, A., Chaari, K., Blecker, C., Derrouane, C., Attia, H. ve Besbes, S. 2011. Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466™: Purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4), 1026-1034.
- Santhosh, S.B., Ragavendran, C. ve Natarajan, D. 2015. Spectral and HRTEM analyses of *Annona muricata* leaf extract mediated silver nanoparticles and its Larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 184-190.

- Saravanan, C., Rajesh, R., Kaviarasan, T., Muthukumar, K., Kavitha, D. ve Shetty, P.H. 2017. Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, 15, 33-40.
- Sarilmiser, H.K. ve Oner, E.T. 2014. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 28-34.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D.K., Devendra, L. ve Nampoothiri, K.M. 2017. An exopolysaccharides (EPS) from *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156.
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M.I. ve Kumar, R. 2003. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*, 85 (2), 162-170.
- Satyanarayana, U. ve Chakrapani, U. 2013. *Biochemistry*. Elsevier, 20 p, New Delhi, India.
- Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S.R., Khan, M.I., Parishcha, R., Ajaykumar, P.V., Alam, M., Kumar, R. ve Sastry, M. 2004. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles: a novel biological approach. *Indian Journal of Physics*, 78, 101-105.
- Shankar, S.S., Rai, A., Ankamwar, B., Singh, A., Ahmad, A. ve Sastry, M. 2004. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Materials*, 3 (7), 482-488.
- Sharma, V.K., Yngard, R.A. ve Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1-2), 83-96.
- Shehata, M.G., El Sohaimy, S.A., El-Sahn, M.K., ve Youssef, M.M. 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*, 61 (1), 65-75.
- Silva, A.K.A., Juenet, M., Meddahi-Pellé, A. ve Letourneur, D. 2015. Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering. *Carbohydr Polym*, 116, 267-277.
- Singaravelu, G., Arockiamary, J.S., Kumar, V.G. ve Govindaraju, K. 2007. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57 (1), 97-101.
- Sinha, A. ve Khare, S.K. 2011. Mercury bioaccumulation and simultaneous nanoparticle synthesis by *Enterobacter* sp. cells. *Bioresource Technology*, 102 (5), 4281-4284.
- Slawson, R.M., Van Dyke, M.I., Lee, H. ve Trevors, J.T. 1992. Germanium and silver resistance, accumulation and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 27 (1), 72-79.
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D. ve Sára, M. 1999. Crystalline bacterial cell surface layers (s layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 38 (8), 1034-1054.
- Spring, S. ve Schleifer, K.H. 1995. Diversity of Magnetotactic Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18 (2), 147-153.
- Srikanth, R., Reddy, C.H., Siddartha, G., Ramaiah, M.J. ve Uppuluri, K.B. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym*, 120, 102-114.

- Stewart-Tull, D.E.S. 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Annu Rev Microbiol*, 34, 311-340.
- Sundari, J.J. 2016. Plant extract mediated Synthesis of Nano particles and its antibacterial activity. *International Journal of Nano Corrosion Science and Engineering*, 3 (4), 1-6.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Broich, M.L., Moon, J.W., Gu, B., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J. ve Doktycz, M.J. 2011. Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomaterialia*, 7 (5), 2148-2152.
- Sutherland, I.W. 1972. Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8, 143-213.
- Sutherland, I.W. 1986. Industrially useful microbial polysaccharides. *Microbiol. Sci.*, 3 (1), 5-9.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol*, 16 (1), 41-46.
- Sweeney, R.Y., Mao, C., Gao, X., Burt, J.L., Belcher, A.M., Georgiou, G. ve Iverson, B.L. 2004. Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. *Chemistry & Biology*, 11 (11), 1553-1559.
- Sweet, M.J. ve Singleton, I. 2011. Silver nanoparticles: a microbial perspective. *Advances in Applied Microbiology*, 77, 115-133.
- Tallon, R., Bressollier, P. ve Urdaci, M. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154 (10), 705-712.
- Thakkar, K.N., Mhatre, S.S. ve Parikh, R.Y. 2009. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (2), 257-262.
- Thankam, G.F. ve Muthu, J. 2014. Alginate based hybrid copolymer hydrogels- influence of pore morphology on cell-material interaction. *Carbohydr Polym.*, 112, 235-244.
- Theivasanthi, T. ve Alagar, M. 2011. Studies of Copper Nanoparticles Effects on Micro-organisms. *Annals of Biological Research*, 2 (3), 368-373.
- Torres, F.G., Commeaux, S. ve Troncoso, O.P. 2012. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J Funct Biomater*, 3 (4), 864-878.
- Tran, T.H., Choi, J.Y., Ramasamy, T., Truong, D.H., Nguyen, C.N., Choi, H.G., Yong, C.S. ve Kim, J.O. 2014. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. *Carbohydr Polym*, 114, 407-415.
- U.S. National Library of Medicine. 2020. Safety and Efficacy of SR-hGH (Sustained-release Human Growth Hormone, Declage Inj.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01605331/-/05.02.2020>.
- United States Pharmacopeia [USP] 35th Edn-National Formulary [NF] 30th Edn. 2012. (dextran), 2017 (xanthan), 1950 (sodiumalginate), 1328 (gellan), 1938 (pullulan). Rockville MD: United States Pharmacopeial Convention, 2851-2853.
- Vandamme, Th. F., Lennoury, A., Charrueau, C. ve Chaumeil, J-C. 2002. The use of polysaccharides to target drugs to colon. *Carbohydrate Polymers*, 48 (3), 219-231.

- Vigneshwaran, N., Kathe, A.A., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P. ve Balasubramanya, R.H. 2006. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 53 (1) 55-59.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N.M., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P., Paralikar, K.M. ve Balasubramanya, R.H. 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. Materials Letters, 61 (6), 1413-1418.
- WHO, 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO and WHO, Rome, 1-56.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. ve Schubert, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Applied Microbiology and Biotechnology, 93 (3), 965-974.
- Wilson, R.H., Goodfellow, B.J. ve Belton, P.S. 1988. Fourier transform infrared spectroscopy for the study of food biopolymers. Food Hydrocolloids, 2 (2), 169-178.
- Xie, J., Lee, J.Y., Wang, D.I.C. ve Ting, Y.P. 2007. Identification of Active Biomolecules in the High-Yield Synthesis of Single-Crystalline Gold Nanoplates in Algal Solutions. Small, 3 (4), 672-682.
- Yacamán, M.J., Ascencio, J.A., Liu, H.B. ve Gardea-Torresdey, J. 2001. Structure shape and stability of nanometric sized particles. Journal of Vacuum Science & Technology B, 19 (4), 1091-1103.
- Yang, Z. 2019. Nanomaterials. Material Modeling in Finite Element Analysis. CRC Press, 6 p, Boca Raton, USA.
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R.D. ve Surampalli, R.Y. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. Chemosphere, 82 (4), 489-494.
- Zhang, Z., Zhou, Z., Li, Y., Zhou, L. Ding, Q. ve Xu, L. 2016. Isolated exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice. Scientific Reports, 6, 36083, 1-14.
- Zhao, L., Chen, Y., Ren, S., Han, Y. ve Cheng, H. 2010. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. Carbohydr Res, 345 (5), 637-643.
- Zong, A., Cao, H. ve Wang, F. 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. Carbohydr Polym, 90 (4), 1395-1410.

7. EKLER

7.1. MALDI TOF MS Rapor Sonucu

SPECIMEN LAB REPORT - PRELIMINARY		
20/10/2020 14:59:32 Sivas Cumhuriyet Universitesi Uygulama ve Arastirma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		Page 1/1 EpiCenter Version: V7.00A / V6.81A
Patient Name: Birth Date: Ordering Physician: Unspecified User Name: BD		Patient ID: Patient Sex:
Accession #: ahmet Specimen Type: Unspecified Hospital Service: Unspecified Body Site: Unspecified Collection Date: 20/10/2020 12:55:41 Antimicrobial Therapy: Kolonisi Sayisi: Unspecified		Receipt Date: 20/10/2020 12:55:41
Isolate Number: 1		Preliminary
Organism Name: Lactobacillus plantarum Isolate Classification: Significant / Unknown		
Test Types: ID		
Test Name: MALDI Biotyper ID		Test Status: Complete
Sequence Number:		Start Date/Time: 20/10/2020 04:14:47
Location:		Result Date/Time: 20/10/2020 12:55:41
Organism Name: Lactobacillus plantarum		
Quantity:		Comments: A: Species Consistency ID for Research Use Only - Not For Diagnostic Use
Instrument ID Results		
	Probability Score	Quality
Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.22095540	++
Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.22085170	++
Lactobacillus plantarum DSM 12028 DSM	2.20662940	++
Lactobacillus plantarum DSM 2648 DSM	2.18855450	++
Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.18543450	++
Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	2.03373020	++
Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365T DSM	2.00228260	++
Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.98753740	+
Lactobacillus paraplantarum DSM 10667T DSM	1.96975280	+
Lactobacillus pentosus	1.91739250	+

7.2. 16S rRNA Sekans Bilgisi

TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGSSYKTACGRCCGCAAGGYTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATMYTMTGCWAATCTWAGAG
ATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATRRWKACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGT
TGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGAYGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGRGTAAAGCTAATCTCTTAAA
GCCATTCTCWKTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTYGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
CGCCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTYT
AGGAACCAGCCGCCTAAGGKGGGACARATGATTAGGGKGAAGYCCGWAACAAA
GATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGA
GGTAACGGCTCACCAWGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTT
TCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTAAAGAAGAACATATYTGAGAGTAACTGTTTCAG
GYATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGG
AACTGGGARACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGYATGGGTAGCRAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATACCGTAAACGAWGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT

7.3. *L. plantarum* Filogenetik Ağacı

