

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE SULARINA AİT SİYANOBAKTERİ
TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN (EPS)
KARAKTERİZASYONU VE KOZMETİK
SEKTÖRÜNDE KULLANILMA
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Simge BULUT

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU

II. Danışman: Doç. Dr. Füsun AKGÜL

BURDUR, 2023

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Türkiye Sularına Ait Siyanobakteri Türlerinden İzole Edilen Ekzopolisakkaritlerin (EPS) Karakterizasyonu ve Kozmetik Sektöründe Kullanılma Potansiyelinin Araştırılması”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/07/2023

(İmza)

Simge BULUT

ÖNSÖZ

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU ve II. Danışman Hocam Doç. Dr. Füsun AKGÜL'e teşekkürlerimi sunarım. Deneylerimi yapmam için laboratuvarlarını bana açan ve araştırmalarımnda hiçbir yardımı esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Rıza AKGÜL'e teşekkür ederim.

Ekzopolisakkaritlerin karakterizasyon analizleri, ekzopolisakkaritlerin miktar belirleme analizi, antioksidan analizleri ve antimikrobiyal analizleri için hiçbir desteğini eksik etmeyen Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY, Öğr. Gör. Dilek Bengü YAMAN ACAY, Dr. Öğr. Üyesi Seyit YÜZÜAK ve Öğr. Gör. Orhan YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

2021-YL-0801 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Temmuz, 2023

Simge BULUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Siyanobakteriler	4
2.1.1. Genel Özellikleri ve Ekolojileri	4
2.1.2. Morfolojik Özellikleri ve Sınıflandırmaları	7
2.1.3. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları	9
2.1.3.1. Tarımda Siyanobakteriler	10
2.1.3.2. Biyoyakıt Üretiminde Siyanobakteriler	11
2.1.3.3. Gıda Sektöründe Siyanobakteriler	11
2.1.3.4. Çevresel Uygulamalarda Siyanobakteriler	12
2.1.3.5. Tıbbi Uygulamalarda ve Kozmetik Sektöründe Siyanobakteriler.....	13
2.2. Ekzopolisakkaritler (EPS'ler)	14
2.2.1. Siyanobakteri EPS'leri	16
2.2.2. Siyanobakteriyel EPS Üretim Mekanizması.....	17
2.2.3. Siyanobakteriyel EPS'lerinin Kullanım Alanları.....	19
2.2.4. Siyanobakteri EPS'lerinin Kozmetik Sektöründe Kullanım Potansiyelleri.....	19
2.2.4.1. UV Koruması.....	20
2.2.4.2. Nemlendirici	21
2.2.4.3. Antioksidan.....	22
2.2.4.4. Anti-inflamatuar.....	22
2.2.4.5. Beyazlatma.....	23
2.3. Kaynak Özetleri	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	26
3.2. Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar	27
3.3. Yöntem.....	28
3.3.1. Siyanobakterilerin Aktifleştirilmesi ve Gelişme Ortamları	28
3.3.1.1. Kültür Büyüme Parametreleri.....	29
3.3.1.1.1. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi (OD)	29
3.3.1.1.2. Kuru Biyokütle Ağırlık Tespiti	30
3.3.1.1.3. Klorofil-a Miktarının Tespiti.....	31
3.3.2. Siyanobakterilerden Ekzopolisakkarit (EPS) İzolasyonu ve EPS'lerin Liyofilizasyonu	32

3.3.3.	EPS Miktar Tayini	32
3.3.4.	Seçilen Siyanobakteri Suşlarının Moleküler Tayini	33
3.3.5.	Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu	34
3.3.5.1.	Monosakkarit Kompozisyonlarının Araştırılması	34
3.3.5.2.	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR).....	34
3.3.5.3.	X-ışını Difraktometresi (XRD).....	34
3.3.6.	Liyofilize EPS'nin Çözünürlüğü.....	35
3.3.7.	Liyofilize EPS'lerin Fonksiyonel Özellikleri	35
3.3.7.1.	Antioksidan Potansiyeli	35
3.3.7.2.	Antimikrobiyal Aktivitesi	36
3.3.8.	Liyofilize EPS'lerin Nem Emilim ve Nem Tutma Kapasitesi	37
3.3.8.1.	Nem Emilimi.....	37
3.3.8.2.	Nem Tutma	38
3.3.9.	EPS'nin Tirozinaz İnhibisyon (Beyazlatma) Aktivitesi.....	38
3.3.10.	İstatistiksel analizler	39
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1.	Kültür Büyüme Parametreleri	40
4.2.	EPS Miktar Tayini	43
4.3.	Mikroskopik Görüntüler	45
4.4.	Siyanobakteri Suşlarının Moleküler Tayini	47
4.5.	Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu	48
4.5.1.	Monosakkarit Kompozisyonları.....	48
4.5.2.	FT-IR.....	51
4.5.3.	XRD	54
4.6.	Liyofilize EPS'nin Çözünürlüğü.....	55
4.7.	Liyofilize EPS'lerin Fonksiyonel Özellikleri	56
4.7.1.	Antioksidan Potansiyeli	56
4.7.2.	EPS'nin Antimikrobiyal Aktivitesi	59
4.8.	Liyofilize EPS'lerin Nem Emilim ve Nem Tutma Kapasitesi	62
4.9.	EPS'nin Tirozinaz İnhibisyon (Beyazlatma) Aktivitesi	67
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	69
6.	KAYNAKLAR.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Siyanobakteri Hücre Yapısı.....	6
Şekil 2.2. Siyanobakteriyel Ailelerin ve Takımların 16S rRNA Temelli Filogenetik Ağacı	9
Şekil 2.3. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritlerin Sınıflandırılması	16
Şekil 2.4. Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'nin model biyosentez yolağı.....	18
Şekil 3.1. Siyanobakteri suşlarının yetiştirildiği iklim dolabı	28
Şekil 3.2. Kültür ortamında siyanobakteri suşları.....	29
Şekil 3.3. Siyanobakteri suşlarının optik yoğunluk ölçümü	30
Şekil 3.4. Siyanobakteri suşlarının kuru biyokütlesi	31
Şekil 3.5. Siyanobakteri suşlarında klorofil a ölçümü	32
Şekil 3.6. Glikoz standart eğrisi.....	33
Şekil 4.1. Siyanobakteri suşlarının 750 nm'deki OD değerleri.....	41
Şekil 4.2. Siyanobakteri suşlarının kuru ağırlık değerleri.	41
Şekil 4.3. Siyanobakteri suşlarının klorofil-a değerleri.	42
Şekil 4.4. 55 kodlu suşun ışık mikroskobu 100x'lik büyütmedeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.5. 72 kodlu suşun ışık mikroskobu 100x'lik büyütmedeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.6. 55 kodlu suştan izole edilen EPS'nin FT-IR spektrumu	52
Şekil 4.7. 72 kodlu suştan izole edilen EPS'nin FT-IR spektrumu	53
Şekil 4.8. 55 kodlu suştan izole edilen EPS'nin XRD deseni.....	54
Şekil 4.9. 72 kodlu suştan izole edilen EPS'nin XRD deseni.....	55
Şekil 4.10. EPS'nin çözünürlüğü. a) tam çözünme, b) kısmen çözünme, c) çözünmeme.	56
Şekil 4.11. EPS örneklerinin DPPH süpürme potansiyeli değerleri.	57
Şekil 4.12. EPS örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi değerleri.	58
Şekil 4.13. EPS örneklerinin <i>Escherichia coli</i> büyümesi üzerindeki etkisi.....	60
Şekil 4.14. EPS örneklerinin <i>Staphylococcus aureus</i> büyümesi üzerindeki etkisi.	60
Şekil 4.15. EPS örneklerinin <i>Candida albicans</i> büyümesi üzerindeki etkisi.	61
Şekil 4.16. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem emme kabiliyetleri (%43 bağıl nem).	63

Şekil 4.17. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem emme kabiliyetleri (%81 bağıl nem)	
.....	64
Şekil 4.18. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem tutma kabiliyetleri. (%43 bağıl nem)	
.....	65
Şekil 4.19. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem tutma kabiliyetleri (Silika jel).....	66



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. NCBI veri tabanına göre <i>Cyanobacteriota</i> filumunda ve <i>Cyanophyceae</i> sınıfında bulunan siyanobakteri takımları	8
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan siyanobakteri suşları	27
Tablo 3.2. Blue-Green Medium ortamının içeriği	29
Tablo 4.1. Siyanobakteri suşlarının EPS üretim miktarları	44
Tablo 4.2. Seçilen siyanobakteri suşlarının, moleküler tanımlanması	48
Tablo 4.3. Liyofilize EPS'lerin HPLC analizi ile belirlenen monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
°C	: Santigrat Derece
µg/L	: Mikrogram/ Litre
µg/mL	: Mikrogram/ Mililitre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µmol	: Mikromol
ABS	: Absorbans
BG-11	: Blue-Green Medium 11
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum Klorür Dihidrat,
CFU/mL	: Toplam bakteri sayımı birimi (Coloni-Forming Units)
CO₂	: Karbondioksit
CPS	: Capsular Polysaccharides (Kapsüler Polisakkarit)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil 1-2-pikril-hidrazin
EPS	: Ekzopolisakkarit
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g/L	: Gram/Litre
g	: Gram
GOE	: Büyük Oksidasyon Olayı
H₂O	: Su
H₂S	: Hidrojen Sülfür
HePs	: Heteropolisakkaritler
HoPs	: Homopolisakkaritler
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
K₂CO₃	: Potasyum Karbonat
K₂HPO₄	: Potasyum Fosfat Dibazik
Kl-a	: Klorofil a
L	: Litre
L-DOPA	: 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-Alanine
LPS	: Lipopolisakkarit

M	: Molar
mg/L	: Miligram/Litre
mg/mL	: Miligram/Mililitre
mg	: Miligram
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaNO₃	: Sodyum Nitrat
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
Nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
pH	: Potantiel of Hydrogen (Asitlik)
PS-I	: Fotosistem I
PS-II	: Fotosistem II
RH	: Relative Humidity (Bağıl Nem)
RPM	: Revolutions per Minute (Sabit eksende 1 dakikadaki dönüş)
RPS	: Released Polysaccharides (Çevreye Salınan Polisakkarit)
SB	: Sabouraud Broth
TCA	: Trichloroacetic acid
UV	: Ultraviole
XRD	: X-Işınları Difraktometresi

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Türkiye Sularına Ait Siyanobakteri Türlerinden İzole Edilen Ekzopolisakkaritlerin (EPS) Karakterizasyonu ve Kozmetik Sektöründe Kullanılma Potansiyellerinin Araştırılması

Simge BULUT

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU
II. Danışman: Doç. Dr. Füsun AKGÜL

Temmuz, 2023

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen siyanobakteri türlerinin EPS'lerini araştırmak, karakterize etmek ve kozmetik endüstrisinde kullanılabilme potansiyelini araştırmaktır. Siyanobakteri türleri (55 ve 72) tarafından üretilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonları, fonksiyonel grupları ve kristalografik özellikleri sırasıyla HPLC, FT-IR ve XRD ile belirlenmiştir. Ayrıca, antioksidan aktiviteleri, nem emme ve nem tutma kabiliyetleri ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri değerlendirilmiştir. 16S rRNA dizileme sonucu suşlar >%98,9 benzerlik oranıyla *Chlorogloeopsis fritschii* (55) ve *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) olarak belirlenmiştir. 55 ve 72 kodlu suşların EPS üretim miktarları sırasıyla 888,0 mg/L ve 776,8 mg/L olarak bulunmuştur. İlk defa monosakkarit kompozisyonları belirlenen *C. fritschii* (55 kodlu suş) ve *P. cyanobacterium* (72 kodlu suş) suşlarından elde edilen EPS'lerde ramnoz, glukoz, arabinoz, mannoz, ksiloz ve galaktoz türlere göre farklı oranlarda bulunmuştur. En baskın monosakkarit ramnoz olarak tespit edilmiştir. EPS'lerin amorf yapıda olduğu ve farklı fonksiyonel gruplar içerdiği tespit edilmiştir. Her iki EPS'nin de %80 DPPH süpürme potansiyeline ve %8-11 arasında değişen toplam antioksidan kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki EPS'de kozmetik sektöründe yaygın olan üreye ve kitosana benzer nem tutuma kapasitesi gösterirken, onlardan daha iyi nem emilim kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, 55 kodlu EPS'nin literatüre kıyasla düşük bir konsantrasyonda (2 mg/mL) %10'luk bir tirozinaz inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, siyanobakterilerin yüksek miktarda EPS ürettiğini ve siyanobakteriyel EPS'lerin antioksidan ve anti-tirozinaz aktivitelerinin yanı sıra nem emme ve nem tutma kapasiteleri ile kozmetikte potansiyel bir doğal bileşen olarak kullanım için umut verici bir aday olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: siyanobakteri, ekzopolisakkarit (EPS), kozmetik endüstrisi, antioksidan, nem emilim ve nem tutma, tirozinaz inhibisyonu

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi BAP tarafından 0801-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Characterization Of Exopolysaccharides (EPS) Isolated From Cyanobacteria Species From Turkey Waters and Investigation Of Their Potential Use In Cosmetics Industry

Simge BULUT

Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU
Co-Supervisor: Doç. Dr. Füsün AKGÜL

July, 2023

The objective of this thesis is to investigate and characterize EPSs of different Cyanobacteria species, isolated from different regions of Turkey and explore their potential use in cosmetic industry. Monosaccharide composition, functional groups, and crystal structure of the EPSs produced by cyanobacterial species (55 and 72) were determined by HPLC, FT-IR and XRD, respectively. Additionally, their antioxidant activity, moisture absorption and moisture retention ability, and tyrosinase inhibition activity were evaluated. As a result of 16S rRNA sequencing, the strains were identified as *Chlorogloeopsis fritschii* (55) and *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) with >98.9% similarity. Both cyanobacteria species yielded high amount of EPS with 888.0 mg/L and 776.8 mg/L of extracted EPS from 55 and 77, respectively. The main component of the EPS molecules detected was rhamnose, glucose, arabinose, mannose, xylose, and galactose in different ratios. Rhamnose was the most dominant monosaccharide. Both EPSs were found to have an antioxidant activity with 80% of DPPH scavenging potential and 8-11% of total antioxidant capacity. Moreover, they both showed strong moisture absorption and retention properties compared to chitosan and urea. Additionally, 55 had a tyrosinase inhibition activity with 10% at a small concentration of 2 mg/mL. The results suggest that Cyanobacteria produced high amount of EPS and cyanobacterial EPSs are promising candidate for use as a potential natural ingredient in cosmetics with their antioxidant and antityrosinase activities as well as moisture absorption and moisture retention capacities.

Keywords: antioxidant, cosmetics industry, cyanobacteria, exopolysaccharide (EPS), moisture absorption and moisture retention, tyrosinase inhibition

The present M.Sc. thesis was supported by BAP Under the Project number of 0801-YL-21

1. GİRİŞ

Siyanobakteriler, 3,5 milyar yıllık evrim geçmişine sahip olan en eski ve en yaygın fotosentetik mikroorganizmalardan biridir (Garlapati vd., 2019). Metabolizmaları, plastisiteleri ve hücre yapılarını koruma yetenekleri sayesinde çeşitli ekolojik nişleri işgal edebilen önemli mikroorganizmalardan biridir (Abed vd., 2009; Garlapati vd., 2019). Siyanobakteriler kutup bölgelerinden kaplıcalara kadar geniş bir sıcaklık aralığında bulunabilmelerinin yanı sıra okyanuslar ve karasal ortamlar dâhil olmak üzere çeşitli habitatlarda geniş bir yayılım göstermektedirler (Schirrmeister vd., 2015; Whitton, 2012).

Siyanobakteriler, gram-negatif bakterilere özgü bir zarfa sahiptirler (Flores ve Herrero, 2014). Ayrıca kılıf, kapsüller ve müsilaj ile çevrilidir (Sciuto ve Moro, 2015). Hücre duvarının dışında bir zar yapısı (müsilaj oluşturan ekzopolisakkaritler) ve az miktarda selüloz bulunur. Müsilaj siyanobakteriyel kayma (spiral veya spin) hareketinde aktif rol oynarken kapsüller ve kılıflar ise hücreleri ekstrem habitatlardaki streslerden ve diğer zararlı koşullar altında hücreyi kurumaktan korur (Adams, 2001; Tamaru vd., 2005). Siyanobakteriler, çevresel koşullara adapte olabilme yeteneklerine ek olarak hızlı büyümelerini sağlayan hücresel mekanizmalara sahiptir (Zahra vd., 2020). Bu mekanizmalar sayesinde çeşitli biyoaktif bileşikler üretebilirler ve bu bileşikler biyoenerji, biyoteknoloji, tıp, tarım ve çevre gibi uygulama alanlarında potansiyel kullanımlarını sağlar.

Günümüzde birçok mikroorganizma, mikrobiyal biyopolimer üreticisi olarak tanımlanabilmektedir (Ates, 2015). Biyopolimerler, farklı organizmalar tarafından veya doğal kaynaklardan üretilen makromoleküllerdir (Tang vd., 2012). Polisakkaritler, mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal polimerlerden biridir. (Yadav vd., 2015). Biyolojik işlevlerine göre mikrobiyal polisakkaritler, hücre içi depo polisakkaritler (glikojenler), kapsüler polisakkaritler ve hücre dışı bakteriyel polisakkaritler (ksantan, aljinat, selüloz, vb.) olarak sınıflandırılabilir (Ates, 2015). Mikroorganizmalar tarafından üretilen (bakteri, alg, mantar vb.) ve hücre dışına salgılanan polisakkaritler ekzopolisakkaritler (EPS) olarak tanımlanmaktadır. EPS'ler doğada hücrenin korunmasında, bakterilerin katı yüzeylere yapışmasında ve hücre-hücre etkileşimlerde önemli bir role sahiptir.

EPS'nin sentezlenmesi geç logaritmik fazda gerçekleşmektedir (Freitas vd., 2011). Üretilen EPS miktarı, suşa, besiyeri bileşimine ve pH, sıcaklık ve karbon/azot oranı gibi kültür koşullarına bağlıdır (Sanalibaba ve Cakmak, 2016; Angelin ve Kavitha, 2020).

Üretilen EPS'ler, monosakkarit kompozisyonuna, taşıdığı yüke, bağ yapısına ve tekrarlayan yan zincirlerin varlığına göre yapısal farklılıklar göstermektedir ve bu yapısal farklılıklar fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir. Kimyasal yapıları bakımından EPS'ler homopolisakkaritler (HoPs) ve heteropolisakkaritler (HePs) olarak iki sınıfta toplanır. HoP'lar dallanmış veya dallanmamış olarak, glikoz veya fruktozdan oluşmaktadır (Torino vd., 2015). HeP'ler ise D-glukoz, D-galaktoz ve L-ramnoz, mannoz, arabinoz ve fukoz gibi nadir şekerlerden oluşmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020). EPS, tekstil, kozmetik, biyoremediasyon, gıdalar ve terapötikler gibi çeşitli alanlarda uygulama potansiyeline sahiptir (Laubach vd., 2021). Anti-bakteriyel, anti-tümör, anti-biyofilm, anti-viral, anti-inflamatuar ve immünomodülatör aktiviteleri ile ilgili bilimsel araştırmalar giderek önem kazanmaktadır.

Siyanobakteriler, bakteriler arasında polisakkarit üretimi için iyi bir aday olarak ortaya çıkmıştır (Pereira vd., 2019). Bunun nedenleri arasında çoğu suşun, (i) güçlü anyonik yapıya, (ii) sülfat gruplarına, (iii) çok çeşitli olası yapısal konformasyonlara ve (iv) amfipatik davranışa sahip olması sayılabilmektedir. Siyanobakteri EPS'leri, şimdiye kadar tanımlanmış 6-12 farklı türde monosakkaritten oluşan kompleks heteropolisakkaritlerdir (Rossi ve Philippis, 2016). Siyanobakteriyel EPS'lerinde yaygın olarak bulunan şekerler arasında; heksozlar, glikoz, galaktoz, mannoz ve fruktoz; pentozlar, riboz, ksiloz ve arabinoz; deoksiheksozlar, fukoz ve ramnoz; asidik heksozlar, glukuronik ve galakturonik asit yer almaktadır. Siyanobakteri EPS'leri, endüstriyel su arıtma, anti-bakteriyel, anti-oksidan, anti-koagülan, immünomodülatör ve anti-tümör aktiviteleri ile çeşitli alanlarda uygulama potansiyeline sahiptir (Dewi vd., 2018; Pereira vd., 2019).

Deri, optimal sağlığı korumak için termoregülasyon, bağışıklık ve metabolik mekanizmalar gibi gerekli fizyolojik işlevleri sağlamaktadır (Lephart, 2016). İçsel (genetik) ve dışsal (UV ışınlar, kirlilik vb.) faktörler cildin dermal tabakasında kuruluk, kırılganlık, ince çizgiler, kırışıklıklar gibi çeşitli değişikliklere neden olarak cilt yaşlanmasına sebep olmaktadır (Nowruzi vd., 2020). Bu durum kozmetik sektörünün önemini artırmıştır ve doğal kaynaklara dayalı kozmetik ürünler, daha az yan etkiye sahip olmaları nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir (Nowruzi vd., 2020). Günümüzde doğal kaynaklardan biri olan alglerin yanı sıra siyanobakteriler de kozmetik sektöründe kullanıma potansiyeline sahiptir. Siyanobakteri EPS'lerinin anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal ve anti-oksidan aktiviteleri, yaşlanma karşıtı oldukları ve cildin bariyer fonksiyonunu güçlendirdikleri için kozmetik sektöründe de oldukça önem arz etmektedir.

(Laroche, 2022; Chen vd., 2010). Dahası siyanobakteriyel EPS'lerin nemlendirici ajan olarak da kullanılabileceği rapor edilmiştir (Li vd., 2011; Morone vd., 2019; Nowruzi vd., 2020).

Bu tez kapsamında, siyanobakteriler tarafından üretilen EPS'lerin kozmetik sektöründe kullanılabilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen altı adet siyanobakterinin EPS üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve EPS üretim kapasiteleri yüksek iki suşun seçilerek moleküler tanımlamasının yapılması, üretilen EPS'lerin HPLC ile monosakkarit kompozisyonları, FTIR ile fonksiyonel grupları ve XRD ile de kristalografik özellikleri ortaya konularak karakterizasyonun yapılması hedeflenmiştir. Biyofonksiyonel özelliklerinin araştırılması için, serbest radikalini süpürme aktivitesi, total antioksidan aktivitesi ve patojenlerin büyümesi üzerine etkilerinin belirlenmesi ile birlikte nem emilimi ve nem tutma kapasitelerinin ve tirozinaz inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi diğer hedefler arasında yer almaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışması, hem literatürde sınırlı sayıda olan siyanobakteri EPS çalışmaları için bir kaynak teşkil edecek hem de siyanobakteri EPS'lerinin kozmetik sektöründe kullanılmaya aday mikroorganizma kaynaklı doğal bir ürün olabilmesi için yapılması gereken çalışmaların önünü açmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siyanobakteriler

2.1.1. Genel Özellikleri ve Ekolojileri

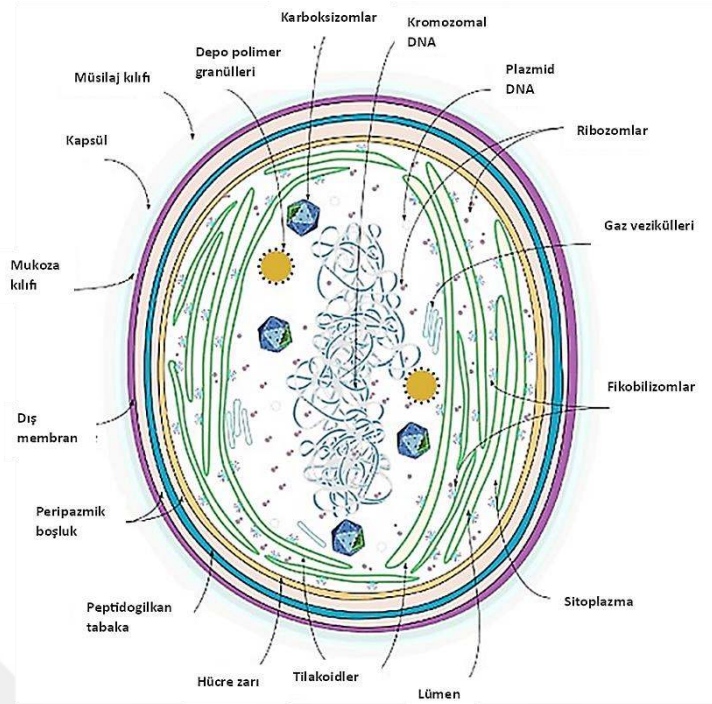
Siyanobakteriler, dünya üzerinde uzun bir evrimsel geçmişe sahip olan en önemli organizmalardan biridir (Sánchez-Baracaldo vd., 2021). Ataları, oksijenik fotosentez kapasitesini geliştirerek, Dünya atmosferinin ve okyanusların oksijenlenmesini mümkün kılmıştır. Ayrıca Siyanobakteri endosimbiontları, ökaryotlarda fotosentezin yolunu açmıştır. Jeokimyasal kanıtlar, yaklaşık 2.300-2.400 milyon yıl önce dünya atmosferindeki oksijen içeriğinde önemli bir artışa işaret etmiştir ve bu durum “Büyük Oksidasyon Olayı” (GOE) olarak bildirilmiştir (Canfield vd., 2013). Bazı araştırmacılar GOE’nin siyanobakteriyel evriminin doğrudan bir sonucu olarak meydana geldiğini savunurken, diğerleri ise siyanobakterilerin GOE’den çok önce evrimleştiğini varsaymışlardır. Oksijenin (O_2), GOE olayı sırasında atmosferin ve okyanusun kalıcı bir bileşeni haline geldiği ileri sürülmüştür (Lyons vd., 2014). Oksijenik fotosentez, bu çevresel dönüşümü gerçekleştirmek için gerekli olan tek oksijen kaynağı olduğundan, GOE hem oksijenik fotosentezin köken aldığı hem de siyanobakterilerin fotosentetik olmayan en yakın akrabalarından ayrıldığı tarihi bir olay olarak bilinmektedir (Sánchez-Baracaldo vd., 2021). Siyanobakteriler, fotosentez yoluyla O_2 ’nin en eski önemli üreticileri oldukları için önemlidirler.

Siyanobakteriler oksijenik fotosentez gerçekleştirebilen tek klorofototroflardır. Çoklu filogenetik analizler, anoksijenik fotosentez modlarının oksijenli fotosenteze göre daha az karmaşık ve daha önce evrimleştiğini göstermektedir (Bryant ve Liu, 2013; Hamilton vd., 2018). Oksijenik fototroflar, anoksijenik fotoototroflarda bulunan tek bir fotosistemin aksine, fotosistem I (PS-I) ve fotosistem II (PS-II) olmak üzere iki fotosisteme sahiptir (Sánchez-Baracaldo vd., 2021). Siyanobakteriler, PS-I ve PS-II’yi kullanan ve dolayısıyla tüm ökaryotik fotosentetik organizmalarla oksijenli fotosentezi gerçekleştirebilen tek prokaryotik organizma grubudur. Siyanobakterilerin anoksijenik fotosentez gerçekleştirme yeteneği, oksijenli fotosentezin evriminden önce yaşayan siyanobakteriyel atalarının bir kalıntısı olarak kabul edilmiştir (Padan, 1979). Anoksijenik fotosentez, CO_2 indirgemesini sağlamak için indirgenmiş kükürt bileşikler, organik asitler, hidrojen, nitrit, arsenit veya Fe (II)’den indirgenme eşdeğerlerinin sağlanmasına dayanır (Miller ve Bebout, 2004). Bazı siyanobakteriler, H_2S varlığında

oksijensiz fotosenteze geçebilir ve sülfürik fotik bölgelerde fotosentez sırasında H₂O veya H₂S kullanabilirler (Hamilton vd., 2018; Sánchez-Baracaldo vd., 2021).

Siyanobakteriler fotosentetik organizmalar oldukları için fotosentetik pigmentler ve klorofil a içerirler. Primer üreticilerdir ve flavonoidler, pigmentler (örneğin β -karoten, fikoeritrin, fikobiliprotein), fenoller, saponinler, steroidler, tanenler, terpenler, kompleks şekerler, proteinler, aminoasitler, mineraller ve vitaminler gibi çeşitli metabolitler üretmektedirler (Zahra vd., 2020; Noreña-Caro ve Benton, 2018). Bu nedenle gıda alanında insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan biyoaktif moleküllerin önemli kaynaklarından biri olma potansiyeline sahiptir. Ancak bazı siyanobakteri türlerinin mikrosistin, anatoksin ve saksitoksin gibi siyanotoksinler olarak da bilinen çeşitli biyoaktif bileşikler ürettiği de bilinmektedir (Kurmayer vd., 2016). Dolayısı ile çalışılan türün özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Buratti vd., 2017). Diğer yandan bazı siyanotoksinler, belirli kanser tedavileri için ilaç geliştirmede kullanılma potansiyeli göstermiştir (Zanchett ve Oliveira-Filho, 2013).

Siyanobakterilerin hücre duvarı, gram (-) bakterilerin hücre duvarında olduğu gibi lipopolisakkarit (LPS) açısından zengin bir dış koruyucu zardan ve periplazma ile ayrılmış bir iç peptidoglikan tabakasından oluşur (Noreña-Caro ve Benton, 2018). Gram (-) negatif bakterilerin aksine siyanobakteriyel peptidoglikan tabakası en az beş kat daha kalındır ve LPS'lerine bağlı fosfat, heptozlar ve keto-deoksioktonat bulunmaz (Durai vd., 2015). Siyanobakteri genel hücre yapısı **Şekil 2.1.**'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Hücre zarı üzerindeki peptidoglikan tabakası şeker türevleri olan N-asetilglukozamin ve N-asetil muramik asitten oluşur ve yapısında birçok amino asit bulunur (Höltje, 1998). Peptidoglikan tabakasının dışında, gevşek bir peptidoglikan fibril ağı içeren periplazmik boşluk bulunur. Siyanobakterilerde ayrıca kılıf, kapsüller ve müsilağ ile çevrilidir (Sciuto ve Moro, 2015). Hücre duvarının dışında bir zar yapısı (müsilağ oluşturan ekzopolisakkaritler) ve az miktarda selüloz bulunur. Müsilağ siyanobakteriyel kayma (spiral veya spin) hareketinde aktif rol oynar (Adams, 2001). Kapsüller ve kılıflar ise, hücreleri ekstrem habitatlardaki streslerden ve diğer zararlı koşullar altında hücreyi kurumaktan korur (Tamaru vd., 2005).



Şekil 2.1 Siyanobakteri Hücre Yapısı (Noreña-Caro ve Benton, 2018)

Siyanobakteri sitoplazması, karboksizomlar ve genetik materyal içermektedir (Ducat vd., 2011). Birçok siyanobakteri sitoplazmasında sitoplazmik yapılardan biri olan gaz vezikülleri mevcuttur, özellikle okyanusta yaşayan siyanobakteri türlerinde oldukça yaygındır (Noreña-Caro ve Benton, 2018; Sciuto ve Moro, 2015). Gaz vezikülleri, siyanobakterilerin fotosentez yapabilmesi için optimum ışık yoğunluğunu sağlamak üzere hücrelerin sudaki süspansiyonunu düzenlemektedir.

Diğer prokaryotlar gibi, siyanobakteriler de iki tür DNA içerirler; kromozomal DNA ve daha küçük, otonom, ekstrakromozomal moleküller (Cohen ve Gurevitz, 2006). Her iki DNA türü de gen transferi ve manipülasyonu için kullanılabilir. Siyanobakteri DNA'sı çeşitli ploidi seviyesine sahip dairesel kromozomlarda düzenlenmektedir (Hess, 2011). Siyanobakteriyel kromozomlar genellikle monoploid ve diploiddir ancak, yüksek oranda poliploid organizmalar da mevcuttur.

Siyanobakteriler, çevresel değişikliklere adapte olmalarını ve yoğun bir popülasyon halinde hızlı bir şekilde büyümelerini sağlayan hücresel mekanizmalara sahiptir (Zahra vd., 2020). Hücresel mekanizmalara ek olarak, hızlı büyüme oranları, besin seviyelerindeki farklılıklara, biyotik faktörlere, iklim değişikliğine veya küresel ısınmadaki farklılıklara bağlıdır. (Paerl ve Paul, 2012; Sukenik vd., 2012). Mavi-yeşil algler olarak da bilinen siyanobakteriler, tatlı su, tuzlu su, okyanuslar, göller, nehirler,

bataklıklar, yağmur ormanları, toprak, kaya, kaplıcalar ve çöl gibi çeşitli ekstrem habitatlarda bulunurlar (Whitton, 2012) . Farklı hava koşullarına (sıcak, soğuk ve ılıman gibi) uyum sağlayabilirler.

Siyanobakteriler, tek hücreler halinde bulunabildiği gibi koloniler veya filamentler olarak da var olabilen prokaryotlardır (Catherine vd., 2013; Zahra vd., 2020). Genellikle mikroskobik olmalarına rağmen hücre popülasyonları bentik matlar, büyük jelatinimsi koloniler, kabuk veya çiçek gibi formlarda gözle görünür halde olabilirler. Su sütununda büyüdüleri (planktonik), su yüzeyinde kümелendikleri (metafitik), diğer alglere, makrofitlere (epifitik) ya da substratlara (bentik) tutundukları sucul sistemlerde yaygın olarak bulunurlar (Catherine vd., 2013).

2.1.2. Morfolojik Özellikleri ve Sınıflandırmaları

Siyanobakteriler, benzersiz hücre morfolojisi, değişken hücre boyutları ve ayırt edici renkleri ile morfolojik olarak geniş bir çeşitlilik gösterirler (Singh ve Montgomery, 2011; Noreña-Caro ve Benton, 2018). Tek hücreli olarak bulunabildikleri gibi oldukça farklılaşmış karmaşık iplikli hücre grupları halinde de bulunabilirler. Tek hücreli siyanobakteriler küresel, spiral, çubuk benzeri şekilde veya kümelenmiş olabilirler (Singh ve Montgomery, 2011). İplikli siyanobakteriler, sümüksü bir kılıfla çevrili düz ipliklere benzeyen, trikom adı verilen dallı veya doğrusal hücre zincirleri halinde bulunurlar.

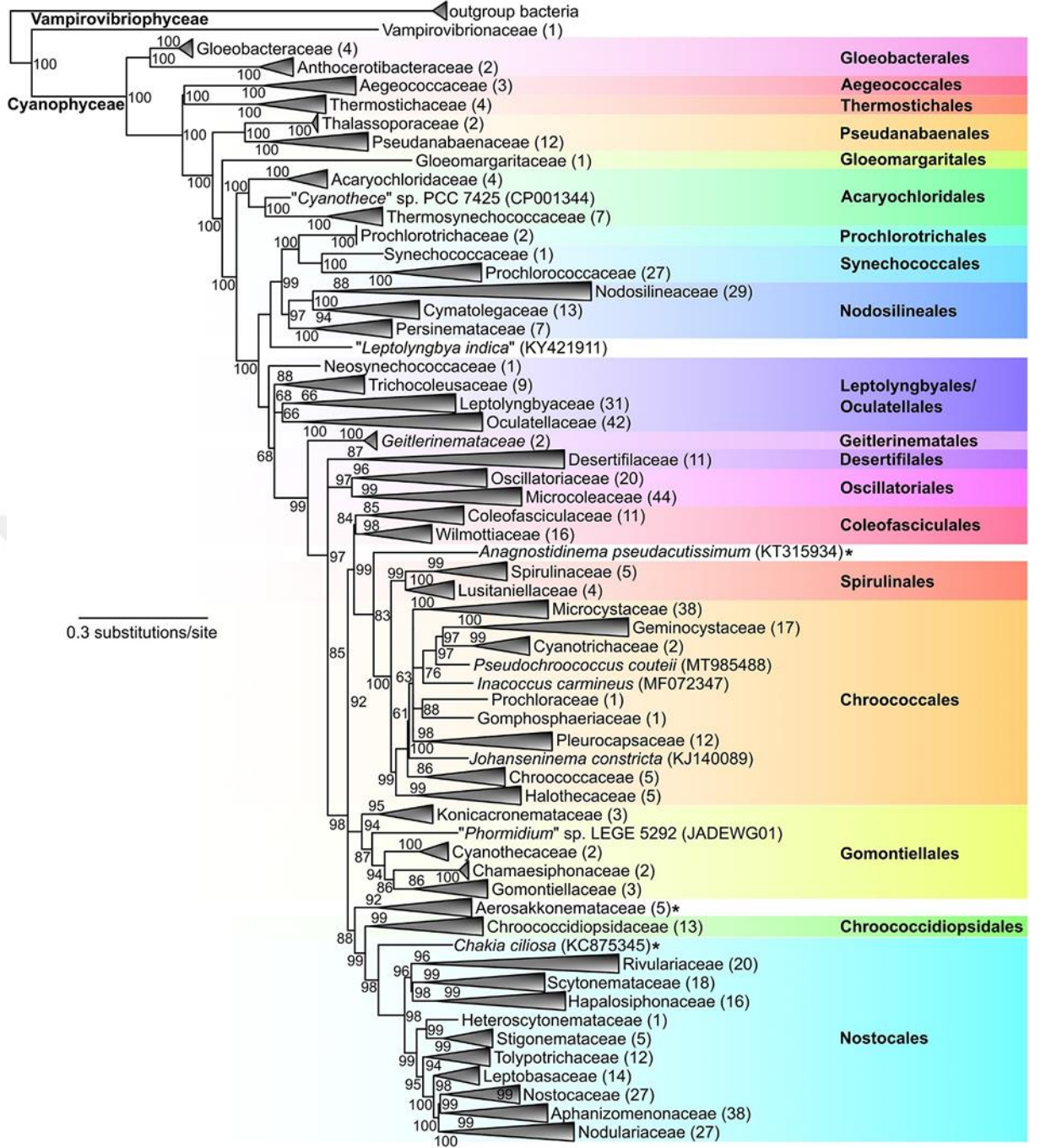
Sistematik olarak algler, farklı alemlerde ve buna bağlı farklı alt filumlarda yer alırlar. Siyanobakteriler ise, prokaryot süperaleminde, *Eubacteria* aleminde, *Cyanobacteria* filum'unda bulunurlar. Geniş bir morfolojik çeşitliliğe sahip olan Siyanobakteriler geleneksel taksonomik sınıflandırmada, morfoloji ve gelişim özellikleri temel alınarak beş ana gruba ayrılırlar (Rippka vd., 1979). Bu sınıflandırmada Grup I (*Chroococcales*), *Synechococcus* ve *Gloeocapsa* gibi soliter ve koloni halinde bulunan tek hücreli siyanobakterileri içerir (Turner, 1997; Knoll, 2008). İkili bölünme veya tomurcuklanma yeteneğine sahiptir. Grup II (*Pleurocapsales*), tek hücreli ila psödo-filamentli, thallus oluşturan siyanobakterilerden oluşur ve hücreler çoklu ve ikili bölünme yeteneğine sahiptir. Grup III (*Oscillatoriales*), hücre farklılaşması olmayan filamentli siyanobakterileri içerirken, Grup IV (*Nostocales*) akinet ve heterosist üretmesiyle öne çıkan filamentlerden oluşur. Grup V (*Stigonematales*), daha karmaşık çok hücreli organizasyona sahip hücre farklılaştırıcı siyanobakterilerden oluşmaktadır.

Siyanobakterilerin taksonomik sistemi, sürekli olarak gelişmektedir. Sınıflandırma yapılırken, bireysel türler, hücre şekli ve boyutu gibi en belirgin morfolojik özelliklerine, müsilaaj yapısına (özellikle tek /kokoid türlerde); ipliksi siyanobakterilerde genişlik, sivrileşme, dallanma tipi, aktinlerin ve heterositlerin varlığına veya karmaşık talus oluşturan türlerde koloni yapısı ve mimarisine göre cinslere, familyalara ve takımlara ayrılırlar (Strunecký vd., 2023). Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ile birlikte 16S rRNA dizilemenin kolaylaşması ve veri tabanlarının genişlemesi ile siyanobakterilerin taksonomik sınıflandırılması yeni bir döneme girmiştir ve 2014-2021 arasında hızla yeni cinsler ve türler tanımlanmıştır (Osorio-Santos vd., 2014; Strunecký vd., 2023). Ancak hala klasik morfolojik taksonomiye dayalı sınıflandırmalar devam etmektedir (Schirrmeyer vd., 2011; Strunecký vd., 2023). **Tablo 2.1.**'de National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında kayıtlı olan *Cyanobacteriota* filumunda yer alan *Cyanophyceae* sınıfında bulunan siyanobakteri takımları sunulmuştur. Bu sene yayınlanan siyanobakterilerin güncel sınıflandırmasını içeren bir yayında rapor edilen taksonomik sınıflandırma ise **Şekil 2.2.**'de verilmiştir.

Tablo 2.1. NCBI* veri tabanına göre *Cyanobacteriota* filumunda ve *Cyanophyceae* sınıfında bulunan siyanobakteri takımları

<i>Chroococcidiopsidales</i>	<i>Gloeomargaritales</i>	<i>Oscillatoriothyriceae</i>	<i>Spirulinales</i>
<i>Desertifilales</i>	<i>Nodosilineales</i>	<i>Pleurocapsales</i>	<i>Synechococcales</i>
<i>Gloeobacterales</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Pseudanabaenales</i>	<i>Thermotichales</i>

*National Center for Biotechnology Information



Şekil 2.2. Siyanobakteriyel Ailelerin ve Takımların 16S rRNA Temelli Filogenetik Ağacı (Strunecký vd., 2023)

2.1.3. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları

Kuruluk, UV radyasyonu ve tuzluluk gibi çevresel stres koşullarına karşı adaptif stratejiler geliştiren siyanobakteriler, bu dış etkenlere karşı koruyucu olarak mikrosporin benzeri aminoasitler, scytonemin ve fitohormonlar gibi çeşitli ikincil metabolitler üretmektedirler (Haque vd., 2017). Siyanobakteriler tarafından üretilen ikincil metabolitlerin gıda, hayvan yemi, ilaç, biyoyakıt ve endüstriyel atıkların

biyoremediasyonu gibi biyoteknolojik uygulama alanlarında geniş bir kullanıma potansiyeli vardır (Garlapati vd., 2019). Ayrıca üretmiş oldukları metabolitlerin yanı sıra biyokütleleri de biyoteknolojik olarak oldukça önemli olup çeşitli endüstriyel uygulama alanlarına sahiptir.

2.1.3.1. Tarımda Siyanobakteriler

Tarımda sentetik (inorganik gübreler, bitki koruyucu kimyasallar vb.) yöntemlerin uzun süreli kullanımı, toprak verimliliği ve çevre kalitesi ile ilgili endişeleri artırmaktadır (Garlapati vd., 2019). Günümüzde kullanılan yöntemlerde sadece çevre dostu değil aynı zamanda düşük maliyetli sürdürülebilir yöntemler tercih edilmektedir. Siyanobakteriler, tarım sektöründe en çok yararlanılan mikroorganizmalardan biridir (Singh vd., 2016). Ekonomik katkısı, besin döngüsü, azotun fiksasyonu, fosforun biyoyararlanımı, kirliliğin ve arazi bozulmasının önlenerek çevrenin korunması, siyanobakterilerin toprak ve çevre yönetiminde uygulama alanları arasında sayılabilir. Zira kimyasalların kullanımının azaltılmasının yanı sıra besinlerin geri dönüşümü ve ıslah yoluyla toprak verimliliğinin restorasyonu da bunlara dahil edilebilir. Özellikle siyanobakterilerin doğal biyo-gübre olarak kullanılması tarımsal ve ekolojik koşullarda üretkenliğin artmasına katkıda bulunmaktadır.

1950'lerde, kurutulmuş siyanobakteriyel biyokütlenin toprağa uygulanması ile başlatılan "algalizasyon" süreci, toprak verimliliği ile ilgili değişikliklere sebep olarak tarla denemelerinde mahsul veriminin %15–20 artmasına yardımcı olmuştur (Garlapati vd., 2019; Mishra ve Pabbi, 2004). Bu uygulama hem ekonomik açıdan uygun hem de diğer kimyasallara kıyasla daha doğal bir yöntemdir. Osman vd. (2010) iki adet siyanobakteri türü (*Nostoc entophyllum* ve *Oscillatoria angustissima*) ile yaptıkları çalışmada, algleri bezelye bitkisi için kimyasal gübrenin yerine biyo-gübre olarak kullanarak bezelye verimi üzerine etkilerini araştırmışlardır (Osman vd., 2010). Toprak bu türlerin biriyle ya da ikisiyle beraber inoküle edildiğinde, siyanobakterilerin bezelyenin çimlenme yüzdesini artırdığını, diğer ölçülen büyüme parametrelerini ve fotosentetik pigment fraksiyonlarını uyardığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak tavsiye edilen kimyasal gübre dozunun yaklaşık %50'sini azaltılabileceğinden, siyanobakteriyel biyo-gübrelerin kullanılması tavsiye edilmiştir. Bu nedenle, siyanobakteriler, verimliliği artırmak ve çevresel riskleri azaltmak için kimyasal gübrelere kısmen ekonomik olarak bir alternatif olarak sunulabilir.

2.1.3.2. Biyoyakıt Üretiminde Siyanobakteriler

Şu anda dünyanın petrol tüketimi günde yaklaşık 11,6 milyon tondur ve fosil yakıtlar, toplam enerji talebinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (Farrokh vd., 2019). Bu durum, yeraltı fosil yakıt kaynaklarının yakın zamanda tükeneceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, doğabilecek enerji krizini çözebilmek adına fosil yakıt gibi tükenbilir kaynaklara alternatif sürdürülebilir enerji kaynağı arayışı önemli bir bilimsel araştırma alanı haline gelmiştir (Sadvakasova vd., 2021; Zahra vd., 2020). Yenilenebilir enerji kaynakları arasında biyoyakıtlar, toksik olmadıkları, biyobozunur oldukları ve yenilenebilir kaynaklardan meydana geldikleri için petrole alternatif olarak düşünülmektedir. Son otuz yılda siyanobakteriler, biyoyakıt üretiminde, özellikle hücrelerinin lipid üretme ve fotosentez ile hızlı biyokütle biriktirme yeteneklerinden dolayı, yoğun ve kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır.

Biyodizel ve hidrokarbon üretimi için on beş heterosistöz siyanobakteriyel suş ile yapılan bir çalışmada, normal büyüme koşulları altında suşların biyokütle, lipid ve hidrokarbon verimliliği ile beraber yağ asidi içeriğini ve biyoyakıt kalitesini araştırılmıştır (Anahas ve Muralitharan, 2018). Test edilen siyanobakteriyel suşlarda ağırlıklı olarak biyodizel üretimi için uygun olan palmitik asit (%3,79–40,84) ve stearik asit (%14,64–69,84) bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular ile, siyanobakteriyel yağlardan türetilen biyodizelin, yakıt kalitesi parametreleri açısından diğer menşeli biyodizellerin yerine geçebileceği sonucuna varılmıştır. Filamentli siyanobakterilerden olan *Plectonema terebrans* BERC10 ile yapılan bir çalışmada, bikarbonat takviyeli atık sudan yararlanılarak suşun stres manipülasyonuna yanıtta büyüme şekli ve biyorafineri potansiyeli değerlendirilmiştir (Shahid vd., 2021). Pigmentsiz biyokütlenin, lipid profili ve biyodizel bileşimi üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin olmadığını, ayrıca biyokütledeki önemli miktarlarda değerli metabolitler, *P. terebrans*' un çok ünlü biyorafineri için aday suş olma potansiyeli olduğunu göstermişlerdir.

2.1.3.3. Gıda Sektöründe Siyanobakteriler

Siyanobakteriler, sahip olduğu amino asitler, mineraller, karbonhidratlar, proteinler, aktif enzimler, fikosiyaninler ve vitaminler gibi bileşenlerden dolayı gıda takviye kaynağı olarak kabul edilirler (Zahra vd., 2020). *Spirulina* olarak bilinen *A. platensis* yaygın bir besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Dünya çapında yetiştirilen bu siyanobakteri türü, kümes hayvanları, akvaryum ve su ürünleri endüstrilerinde yem

takviyesi olarak kullanılmaktadır. Kurutulmuş *Spirulina* %24 karbonhidrat, %51-71 protein, %8 yağ ve %5 sudan oluşmaktadır ve B12 vitamini ve demir gibi çeşitli temel besinler ve diyet mineralleri açısından zengin bir kaynaktır (Khan vd., 2005). Yakın tarih bir çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri'nde *Aphanizomenon flosaquae*, *Spirulina* ve klorofit *Chlorella* gibi siyanobakteriyel türleri içeren çok sayıda diyet takviyesinin tüketici pazarlarında bulunduğu rapor edilmiştir (Marsan vd., 2018). Ayrıca siyanobakteriyel pigmentler de gıda renklendiricilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zahra vd., 2020).

2.1.3.4. Çevresel Uygulamalarda Siyanobakteriler

Siyanobakteriler, ağır metaller, ham petrol, pestisitler, naftalin, fenoller ve ksenobiyotikler gibi çeşitli kirleticilerin biyoremediasyonunda kullanılma potansiyeline sahiptir (Zinicovscaia ve Cepoi, 2016; Hamouda vd., 2016). Bazı siyanobakteri türlerinin, belirli kirleticileri dekontamine etme özellikleri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *Aphanothece halophyletica*, *Dactylococcopsis salina* ve *Oscillatoria sp.* türlerinin petrol bileşiği olan n-alkanları parçaladığı ortaya konulmuştur (Abed ve Köster, 2005). Diğer bir çalışmada, *Anabaena azotica* şusunun, bir pestisit olan γ -heksaklorosikloheksanı etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı ve pestisit biyoremediasyonunda kullanma potansiyelinin olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2012). Ayrıca siyanobakterilerin, geleneksel biyolojik işlemler kullanılarak parçalanması zor olan karmaşık kirletici maddelerden olan tekstil boyalarını parçalamak için de kullanılabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Zahra vd., 2020).

Dellamatrice vd. (2017)'nin *A. flos-aquae*, *Phormidium autumnale* ve *Synechococcus sp.* türleri ile yaptıkları bir çalışmada, üç tekstil boyasının (İndigo, RBBR ve Kükürt Siyahı) ve Belediye Arıtma İstasyonundan gelen boya içeren atık suyunun siyanobakteriler tarafından parçalanmasını değerlendirmişleridir (Dellamatrice vd., 2017). Elde ettikleri sonuçlarda *P. autumnale* UTEX 1580 şusunun, indigo boyayı tamamen toksik olmayan ikincil metabolitlere indirgediğini ve çalışmada kullanılan tüm siyanobakteri suşlarının, tekstil atığını iyileştirme ve kirletici gücünü azaltma potansiyeli gösterdiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda siyanobakteriler, amonyak, fosfat ve ağır metallerin (Cr, Pb, Co, Cu, Zn) uzaklaştırılması için endüstriyel ve evsel atık su arıtımında kullanılabilmektedir. (Garlapati vd., 2019). Toprak ve sudan kirleticileri uzaklaştırma yeteneğine sahip olan siyanobakteri türleri, sürdürülebilir tarım uygulamasının oluşturulmasına da katkıda bulunmaktadır (Zahra vd., 2020). Örneğin, *Anabaena sp.*,

Lyngya sp., *Spirulina sp.*, *Nostoc sp.* veya *Microcystis sp.* varlığının tarım alanlarındaki glifosat herbisit etkisinin giderilmesine yardımcı olabileceği rapor edilmiştir.

Siyanobakterilerin sahip olduğu bütün bu biyofonksiyonel özelliklere ürettiği ikincil metabolitlerin katkısının büyük olduğu rapor edilmiştir (Favas vd., 2022, Mourelle vd., 2017). Dolayısı ile bu özelliklere katkı sağlayan moleküllerin ve metabolitlerin açığa çıkarılması ve araştırılması kullanım alanlarını geliştirmek adına oldukça önemlidir.

2.1.3.5. Tıbbi Uygulamalarda ve Kozmetik Sektöründe Siyanobakteriler

Siyanobakteriler, biyoteknolojik uygulamalarla tıp alanında kullanılabilecek ikincil metabolitlere sahiptirler. Bu nedenle son zamanlarda ticari ve tıbbi alanlarda uygulamaları olan biyoaktif bileşikler üretmeleri araştırmacıların daha fazla ilgisini çekmiştir (Tan, 2007). Bunun yanı sıra, bazı güçlü toksinler üretmelerine rağmen, bu mikroorganizmalar, aynı zamanda anti-fungal, anti-biyotik ve anti-kanser özellikleri açısından önemli olan çok sayıda bileşik de üretirler (Zahra vd., 2020). Dahası, siyanobakterilerden ekstrakte edilen metabolitlerin, anti-mikrobiyal anti-viral, anti-inflamatuvar, anti-tümör, anti-malaryal, immünosupresan ve anti-HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) etkiler gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarının olduğu gösterilmiştir (Mayer vd., 2009).

Senousy vd. (2020) topraktan ve tarımsal drenaj suyundan izole ettikleri, içerisinde siyanobakteri türlerinin de bulunduğu mikroalglerin anti-kanser ve anti-oksidan potansiyellerini araştırmışlardır (Senousy vd., 2020). Farklı insan kanser hücre hatları (Caco-2, MCF-7, PC3 ve HepG-2) ile yapılan çalışmada bazı siyanobakteri ve mikroalgin kanserli hücre çoğalmasını önlediği gösterilmiştir. Kolon ve prostat kanseri hücre hatlarına karşı test edilen tüm türler arasında en yüksek anti-kanser etkiyi *Dolichospermum crassum* HSSASE20 gösterirken, meme kanseri hücre hattına karşı en yüksek antikanser etkiyi *Oscillatoria sancta* HSSASE19 göstermiştir. Apoptotik kaskadları uyarabilen ve kanser tedavisinde kemo-direnci yenebilen apoptojenler içeren etkili serbest radikal temizleyicileri olan mikroalgelerin, güvenli ve düşük maliyetli anti-oksidan ve anti-kanser terapötik alternatifleri olabileceği rapor edilmiştir.

Ekstrem habitatlarda kendine yaşama ortamı bulan siyanobakteriler güneş radyasyonuna yüksek düzeyde maruz kaldığı durumlarda da kendini koruma yeteneğine sahiptir (Morone vd., 2019). Aşırı koşullarda hayatta kalabilmek için ultraviyole (UV) radyasyona karşı koruma sağlayan, dehidrasyon ve oksidatif stresi azaltabilen bileşikler üretme yeteneklerinin yanı sıra melanin sentezinde görev alan tirozinaz enzimini inhibe

edici bileşikler içermesi, siyanobakterilerin kozmetik endüstrisindeki uygulamalarıyla doğal bileşiklere alternatif bir yaklaşım olarak kabul edilmesini sağlamıştır.

2.2. Ekzopolisakkaritler (EPS'ler)

Biyopolimerler, canlı organizmalar tarafından üretilen veya biyolojik materyallerden kimyasal olarak sentezlenen polimerlerdir (Tang vd., 2012). Kısacası, biyopolimerler sentetik veya doğal polimerler olarak sınıflandırılmaktadır. Biyopolimerler, biyoyumlulukları, toksik olmamaları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve biyolojik süreçlerle geri dönüştürülebilme olasılıkları sebebiyle petrol bazlı polimerlere göre daha üstündür (Ates, 2015). Petrol bazlı polimerler toksisite ve atık birikimi gibi çevreye ve insanlığa olumsuz etkilere sahip olmasına rağmen, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Keshavarz & Roy, 2010). Bu sebeple, petrol bazlı polimerlerin yaratmış olduğu sorunlara yanıt olarak biyopolimerler araştırmacıların aradığı uygun bir alternatif haline gelmiştir.

Doğal polimerler kullanılan monomerik birime ve oluşan biyopolimerlerin yapısına göre üç kategoriye ayrılır: polisakkaritler, polipeptitler ve polinükleotidler (Yadav vd., 2015). Polipeptitler, amino asitlerin peptid bağları aracılığıyla birleşmesiyle oluşan polimerik moleküllerdir ve biyoteknoloji, ilaç geliştirme ve biyomühendislik gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Li vd., 2019). Polinükleotidler, nükleotid monomerlerinin fosfodiester bağları aracılığıyla birleşmesiyle oluşan polimerik moleküllerdir ve biyoteknoloji, genetik mühendisliği gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Noreen vd., 2020). Çoğu bitki ve hayvan dokusunda bulunan polisakkaritler ise glikozidik bağlarla bağlanmış monosakkarit zincirlerinden oluşan karmaşık ve polimerik karbonhidratlardır (Laubach vd., 2021). Polisakkaritler, selüloz, nişasta, kitin, pektin ve glikozaminoglikanlar gibi farklı formlarda bulunabilirler.

Selüloz ve kitin, en bol bulunan biyopolimerlerdendir. Selüloz, bitkilerin hücre duvarında bulunur ve kâğıt, tekstil ve biyoyakıt gibi birçok amaç için kullanılabilir (Klemm vd., 2005). Kitin, böcek kabuklarının dış iskeletinde bulunur ve biyomedikal ve tarım gibi alanlarda uygulama potansiyeline sahiptir (Chen vd., 2015). Polisakkaritlerin çözünürlük, viskozite, jelleşme kapasitesi ve zincir uzunluğu (polimerizasyon derecesi) gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri, onları birçok uygulama alanında kullanımları açısından avantajlı hale getirmektedir (Pereira vd., 2019). Günümüzde polisakkaritler bitkilerden (selüloz, nişasta, pektin vb.), alglerden (agar, alginat, karagenan) ve hayvanlardan (heparin, kondroitin sülfat, hyaluronik asit) izole edilebilmektedir.

Mikrobiyal polisakkaritler kontrollü şartlar altında hızlı, sürekli ve yüksek verimlilikle üretilbildiğinden, iklimsel ve jeolojik çevre koşullarından kolayca etkilenen bitkilerden ve alglerden üretilen polisakkaritlere tercih edilmektedir (Freitas vd., 2017; Pereira vd., 2019).

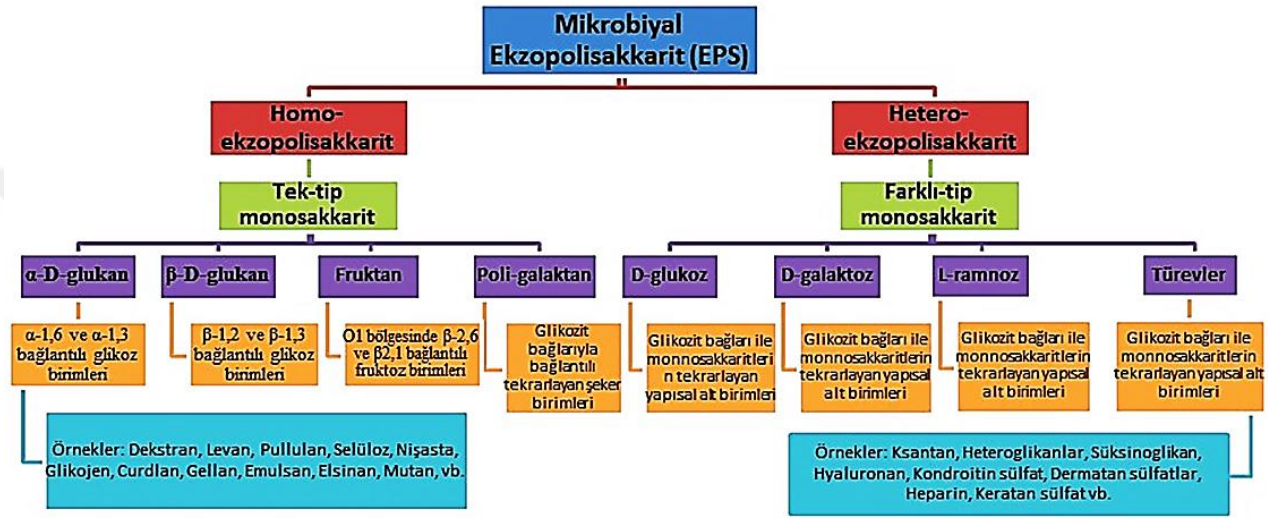
Mikrobiyal polisakkaritler, bakteri, maya, alg, mantar vb. tarafından sentezlenen çözünür veya çözünmez polimerik maddelerdir (Dilna vd., 2015). Dış ortama sentezlenen ve salgılanan veya hücre duvarına bağlı enzimler tarafından hücre dışı olarak sentezlenen bakteriyel polisakkaritler, ekzopolisakkaritler (EPS'ler) olarak adlandırılırlar (Nwodo vd., 2012). EPS'ler, mikroorganizmaların metabolik yan ürünleridir ve protein, DNA, fosfolipid, asetat, gliserol, piruvat, sülfat, karboksilat ve süksinat gibi gruplar içerebilen, karbonhidratlardan (şeker kalıntılarından) oluşan yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (Angelin ve Kavitha, 2020). EPS biyolojik olarak parçalanabilir, toksik değildir, biyolojik olarak uyumludur ve doğal kaynaklarda bol miktarda bulunmaktadır. Hücre korunmasında önemli bir rol oynayan mikrobiyal EPS'nin aynı zamanda mikroorganizmanın yüzeye tutunmasına yardımcı olduğu ve hücre-hücre etkileşimlerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Nicolaus vd., 2010).

Bakteriler hücre dışı EPS'yi, hücre zarfının üzerinde, kapsüler ya da cıvık (slime) tabaka şeklinde üretmektedirler (Ruas-Madiedo ve De Los Reyes-Gavilán, 2005). Kapsüler polisakkaritler, bakteri hücre yüzeyine sıkıca bağlıdır ve fagositoza, bakteriyofaj saldırısına, kuruma ve ozmotik strese karşı koruma sağladığı ayrıca hücre sel tanımada rol oynadığı düşünülmektedir (Angelin ve Kavitha, 2020). Hücre dışında slime tabaka olarak üretilen EPS'ler ise, hücrelere zayıf bir şekilde tutunur ve kolayca uzaklaştırılabilirler.

EPS, logaritmik faz boyunca veya geç logaritmik fazda veya durağan fazda sentezlenir ancak maksimum üretim geç logaritmik fazda gerçekleşmektedir (Freitas vd., 2011). Üretilen EPS miktarı, suşa, besiyeri bileşimine ve pH, sıcaklık ve karbon/azot oranı gibi kültür koşullarına bağlıdır (Sanalibaba ve Cakmak, 2016; Angelin ve Kavitha, 2020). Üretilen EPS'ler, monosakkarit kompozisyonuna, taşıdığı yüke, bağ yapısına ve tekrarlayan yan zincirlerin varlığına göre yapısal farklılıklar göstermektedir ve bu yapısal farklılıklar fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir.

Bakteriyel EPS'lerdeki farklılıklar çeşitlidir ancak kimyasal bileşimleri, işlevleri, moleküler ağırlıkları ve fiziksel özellikleri ile karakterize edilebilmektedirler (Laubach vd., 2021). Kimyasal yapıları bakımından EPS'ler homopolisakkaritler (HoPs) ve heteropolisakkaritler (HePs) olarak iki sınıfta toplanırlar. HoP'lar dallanmış veya

dallanmamış olarak, glikoz veya fruktozdan oluşurlar ve α -D-glukanlar (dekstran, mutanlar, alternan, reuteran, vb.), β -D-glukanlar, fruktanlar (levan, inülin, vb.) ve poligalaktanlar olarak gruplandırılırlar (Torino vd., 2015). HeP'ler ise D-glukoz, D-galaktoz ve L-ramnoz, mannoz, arabinoz ve fukoz gibi nadir şekerlerden oluşmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020). Bazı durumlarda N-asetil glukozamin, N-asetil galaktozamin veya glukuronik asit de yapılarında mevcuttur. EPS'lerin şematik sınıflandırması **Şekil 2.3**'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritlerin Sınıflandırılması (Bajpai, 2016)

2.2.1. Siyanobakteri EPS'leri

Siyanobakterilerde EPS, hücre yüzeyine gevşek ya da sıkıca bağlanmış bir şekilde, kapsüler polisakkaritler (CPS) olarak veya çevreye salınan polisakkaritler (RPS) olarak üretilmektedir (Pereira vd., 2009). Ekstra polimerik maddelerden oluşan kompleks bir ağın parçası olan siyanobakteri EPS'si proteinleri, nükleik asitleri, lipidleri ve ikincil metabolitleri de içerebilmektedir. Bu polimerler, şimdiye kadar tanımlanmış on üç farklı monosakkaritten oluşabilen heteropolisakkaritlerdir (Rossi ve Philippis, 2016). Siyanobakteriyel EPS'de yaygın olarak bulunan şekerler arasında; heksozlar, glikoz, galaktoz, mannoz ve fruktoz; pentozlar, riboz, ksiloz ve arabinoz; deoksiheksozlar, fukoz ve ramnoz; asidik heksozlar, glukuronik ve galakturonik asit yer almaktadır. Bazılarında bunlara ek olarak glukozamin, galaktozamin, N-asetil galaktozamin ve N-asetil glukozamin gibi amino şekerler bulunabilmektedir.

Siyanobakteriyel EPS'de sıklıkla en yüksek konsantrasyonda bulunan monosakkarit glikozdur (Li vd., 2001; Pereira vd., 2019). Bununla birlikte, bazı siyanobakteriyel polimerlerde ramnoz, ksiloz, arabinoz, fukoz, mannoz ve üronik asit glikozdan daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Çoğu siyanobakteri EPS'si, suşa özgü heterojen bir bileşime sahiptir ve bu da siyanobakteriyel polimerlerin çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır (Pereira vd., 2009). Siyanobakteri EPS'si, ayrıca sülfat grupları da içerebilmektedir (Colica ve De Philippis, 2013). Sülfat gruplarının ve üronik asidin varlığı siyanobakteriyel polimerin anyonik yüküne katkıda bulunur ve molekülün negatif yükte olmasını sağlar. Anyonik yükü beraber kazanılan yapışkan özellik EPS'nin metal iyonlarına olan afinitesini artırmaktadır (Kehr ve Dittmann, 2015). Öte yandan birçok siyanobakteriyel EPS, ester bağlı asetil gruplarının, deoksişekerlerin (örneğin ramnoz ve fukoz) ve peptidik fraksiyonların varlığından kaynaklı olarak önemli ölçüde hidrofobik karakter gösterir. Bu hidrofobik grupların varlığı, polisakkaritlerin emülsifiye edici özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Pereira vd., 2019; Pereira vd., 2009).

2.2.2. Siyanobakteriyel EPS Üretim Mekanizması

EPS'nin çoğu, siyanobakteriler tarafından hücre içinde sentezlenir ve hücre dışı ortama ihraç edilir (Ates, 2015; Li ve Wang, 2012). EPS üretiminde yer alan enzimler dört grupta kategorize edilebilir. Birinci grup, glikozu (Glc) glikoz-6-fosfata (Glc-6-P) fosforile eden hekzokinaz gibi hücre içi enzimlerdir. Bu enzimler, diğer hücresel metabolizmalarda da yer alırlar. İkinci grup, şeker nükleotitlerinin dönüşümünü katalize etmek için gereklidir. Glc-1-P'ın, EPS sentezindeki anahtar moleküllerden biri olan UDP-Glc'ye dönüşümünü katalize eden Uridin-5'-difosfat (UDP)-glukoz pirofosforilaz bu grupta yer alır. Diğer enzim grubu, hücre periplazmik zarında bulunan glikosiltransferazlardır (GTF'ler). Şeker nükleotitleri, GTF'ler tarafından glikosil taşıyıcı lipide bağlı tekrar eden bir birime aktarılır. Son grubun, makromoleküllerin polimerizasyonunda yer aldığı ve hücre zarı ile hücre duvarı dışında bulunduğu düşünülmektedir (Ates, 2015). EPS biyosentezinin bu genel mekanizmaları, **Şekil 2.4.**'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

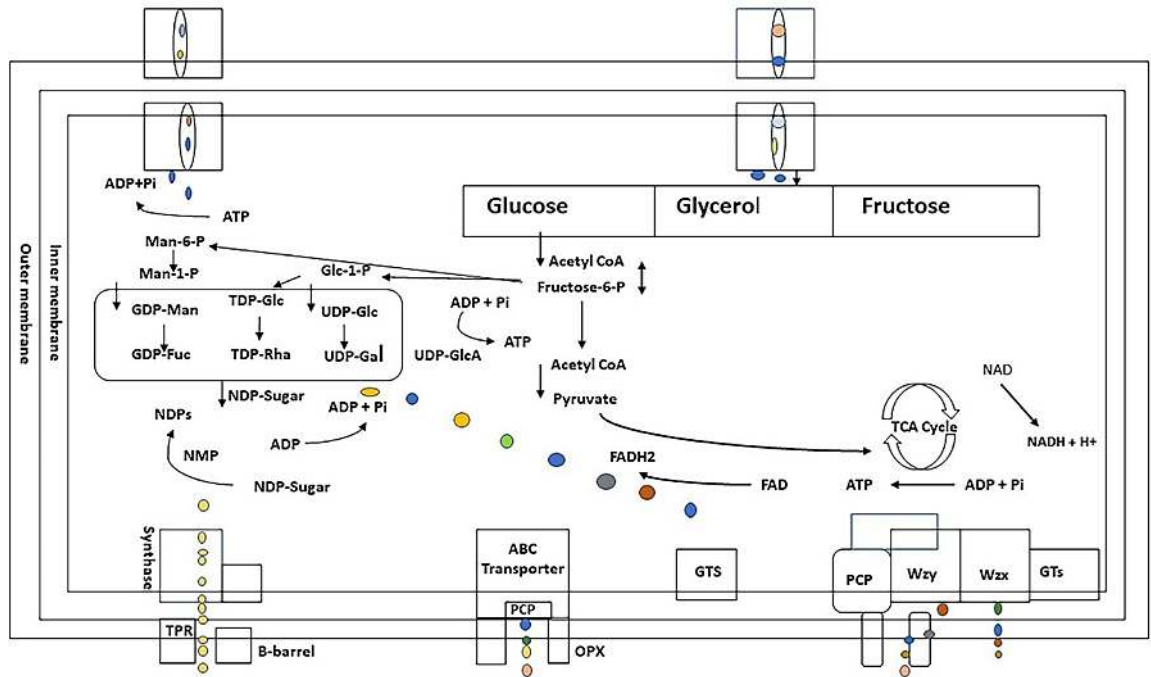
Mikrobiyal polisakkarit üretimi için genel olarak üç yolak tanımlanmıştır.; a) Wzx/Wzy bağımlı yolak, b) ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıya-bağılı yolak ve c) Senteze bağılı yolak.

a) Wzx/Wzy'ye bağımlı yolakta, glikosiltransferaz enzimi bir Wzy proteini içeren tekrarlayan birim oluşana kadar, aktif şekerleri spesifik bir dizide bir lipit

taşıyıcısına bağlar (Al-Amin vd., 2021). Zar proteini olan Wzx de, lipide bağlı oligosakkaritleri sitoplazmadan periplazmaya taşır. Daha sonra bu oligosakkaritler Wzy tarafından polimerize edilir. Son olarak, büyüyen polisakarit, Wzc, Wzb ve Wza proteinleri tarafından dış zar boyunca yer değiştirir ve ihraç edilir.

b) ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıya-bağlı yolağı, kapsüler polisakarit (CPS) durumunda bulunur ve tek bir GT bulunan operon içerir; dolayısı ile homopolimerlerle sona erer (Singh vd., 2018). Polimerizasyon periplazmada gerçekleşir. Tekrar eden birimlerin dışa aktarımı burada, iç zar ve periplazmik proteinleri kapsayan ABC-taşıyıcı polisakarit kopolimeraz (PCP) ve dış zar polisakarit dışa aktarma (OPX) ailesi aracılığıyla yapılır. Bu yolla oluşturulan CPS'ler, indirgeyici ucunda korunmuş bir glikolipid fosfatidil gliserol ve poli-2-keto-3-deoksioktulosonik asit taşır.

c) Senteze bağlı yolda EPS salgılanması, bir lipit alıcısının varlığında veya yokluğunda meydana gelir (Al-Amin vd., 2021, Singh vd., 2018). Hem polimerizasyonun hem de translokasyon işleminin tek sentaz proteini tarafından mümkün kılındığı sentaza bağımlı yoldan oluşur. Bu yola ayrıca, selüloz, aljinatlar ve hyaluronik asit gibi homopolimerlerin oluşumuyla sonuçlanır.



Şekil 2.4. Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'nin model biyosentez yolağı (Al-Amin vd., 2021)

2.2.3.Siyanobakteriyel EPS'lerinin Kullanım Alanları

Mikrobiyal polisakkaritler gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde biyo-flokülanlar, biyo-absorbanlar ve ilaç taşıyıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır. EPS, güçlü su bağlama kabiliyetine, su tutma kapasitesine ve jelleşme potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra, ksantan, sfingan, aljinat ve selüloz gibi bakteri hücrelerinin yüzeyinde biyofilm oluşumunu destekleyen koruyucu bir bariyer görevi görmektedir (Pereira vd., 2019; Angelin ve Kavitha, 2020). Siyanobakteriyel EPS'leri, floküle edici, emülsifiye edici ve reoloji değiştirici ajanlar olarak kullanılabilir (Bhunja vd., 2018). Siyanobakteri EPS'leri, aynı zamanda endüstriyel ve evsel atık suların arıtımında ve ağır metallerin uzaklaştırılmasında bir biyoremediasyon ajanı olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Mota vd., 2016; Pereira vd., 2019). Çevresel etkilerinin yanı sıra diğer mikrobiyal EPS'ler gibi siyanobakteriyel EPS'lerin de anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-koagülan, immünomodülatör ve anti-tümör aktivitelerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Dewi vd., 2018; Pereira vd., 2019). EPS'lerin bu biyofonksiyonel özelliklerinin, barındırdığı şeker kompozisyonu, yapısındaki monosakkaritlerin birbiriyle yaptığı bağ yapısı ve moleküler ağırlığı gibi kimyasal karakterine göre farklılık gösterebileceği rapor edilmiştir (Ye vd., 2016; Rashmi vd., 2021). Örneğin, siyanobakteriyel polimerlerin sülfat içeriği ile anti-oksidatif ve anti-koagülan aktiviteleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Parwani vd., 2014). Siyanobakteri EPS'leri diğer doğal polisakkaritler ile rekabet ederek, gıda, ilaç endüstrilerinde ve kozmetik gibi biyoteknolojik uygulama alanlarında ilgi çekici hale gelmiştir.

2.2.4.Siyanobakteri EPS'lerinin Kozmetik Sektöründe Kullanım Potansiyelleri

Cilt, organizmayı iç ve dış faktörlerden kaynaklanan hasarlardan koruyan karmaşık bir sistemdir ve kozmetik sektörü, farklı cilt tiplerine (normal, yağlı, hassas gibi) adapte edilmiş yardımcı maddelerin ve aktif bileşenlerin yardımıyla cildin dokusunu, morfolojisini ve görünüşünü iyileştirmeyi hedefleyen ürünler tasarlamaktadır (Mourelle vd., 2015; Mourelle vd., 2017). Polisakkaritlerin iyi bir serbest radikal tutucu ve immünoestimülatör olması, bu molekülleri kozmetik ürünlerde kullanılabilen doğal kaynaklı adaylar olarak öne çıkarmaktadır (Spolaore vd., 2006; Koller vd., 2014; Hamed, 2016).

Siyanobakteriler tarafından üretilen EPS'ler, biyolojik aktivitelerine ilişkin çok sayıda yayına konu olmuştur. Bu araştırmalarda daha çok, anti-oksidan, anti-viral, anti-

funga, anti-bakteriyel, yaşlanma karşıtı, anti-kanser ve immünomodülatör ajanlar olma potansiyelleri yer almaktadır (Laroche, 2022; Chen vd., 2011). EPS'lerin anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal ve anti-oksidan aktiviteleri, yaşlanma karşıtı oldukları ve cildin bariyer fonksiyonunu güçlendirdikleri için kozmetik sektöründe de oldukça önem arz etmektedir. Dahası siyanobakteriyel EPS'lerin nemlendirici ajan olarak da kullanılabileceği rapor edilmiştir (Li vd., 2011; Morone vd., 2019; Nowruzi vd., 2020). Nemlendirici ajan olma potansiyeli EPS'lerin su tutma ve nem emilim kapasitesi ile ilişkilidir.

2.2.4.1. UV Koruması

Ultraviyole (280–400 nm) radyasyonu insan derisinde kısa dönem etkilere (güneş yanığı) ve kronik reaksiyonlara (erken cilt yaşlanması ve cilt kanseri) neden olmaktadır (Lisby vd., 2005). Güneş ışığına kronik olarak tekrar tekrar maruz kalmanın, cilt yaşlanmasının yanı sıra iyi huylu ve kötü huylu deri tümörlerinin ana nedeni olduğu gösterilmiştir. Deri pigmentasyonu, melaninin geniş bir UV radyasyon bandını emdiği ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırdığı, yüksek güneş ışığına maruz kalmanın neden olduğu hasarlara karşı koruma sağlayan endojen bir mekanizmadır (Brenner ve Hearing, 2008). Dolayısı ile güneş koruyucu losyonlar, nemlendiriciler ve makyaj malzemeleri gibi kozmetik ürünlerde güneş koruyucularının bulunmasına yönelik tüketiciler talebi nedeniyle, her yıl dünya çapında büyük miktarlarda UV filtresi üretilmektedir ve inorganik ve organik UV filtreli güneş kremleri piyasası oldukça genişlemiştir (Derikvand vd., 2017).

Siyanobakteri EPS'lerinin UV radyasyonuna karşı koruyucu etkilerine dair yapılan bir çalışma bulunmamakla beraber mikrobiyal EPS'lerin hücreleri UV radyasyonuna karşı koruduğu ve bu korumanın EPS'nin serbest radikal süpürme yeteneği ile yani antioksidan özelliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2007, Li vd., 2022). UV-B radyasyonunun suda yaşayan *Synechocystis* sp.'nin ve çölde yaşayan *Chroococcus minutus*'un fotosentetik aktivitesi ve hücre dışı polimerik maddelerinin kompozisyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışmada, UV-B radyasyonuna karşı, çöl siyanobakteri türü olan *C. minutus*'un, suda yaşayan *Synechocystis* sp.'den daha yüksek PSII toleransı gösterdiği bulunmuştur (Song vd., 2016). Bunun yanı sıra çöl ve su türlerinin hücre dışı polimerik maddelerindeki proteinler, UV-B radyasyonu altında önemli  l de ayrışırken, polisakkaritlerin proteinlerden çok daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dahası, *Synechocystis* sp.'nin hücre dışı polisakkaritlerinde çok az bozunma görülürken *C. minutus* polisakkaritlerinin neredeyse

hiç ayrışmadığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlarla, çöl siyanobakterisinin suda yaşayan türlere kıyasla UV-B radyasyonuna karşı daha yüksek toleransının olmasının, EPS'sinin UV-B radyasyonu tarafından indüklenen foto degradasyona karşı daha yüksek dirençli olması ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Song vd., 2016). Bu veriler, siyanobakteri EPS'sinin UV radyasyonuna karşı etkili olabileceğini ve bunun üzerine çalışmaların artırılması gerektiğini göstermektedir. Bazı çalışmalarda, siyanobakteri EPS'sinin monosakkarit bileşenlerinin ve moleküler ağırlığının UV-B radyasyonuna karşı aktivitesini etkileyebileceğini göstermiştir (Calazans vd., 2000; Song vd., 2016).

2.2.4.2. Nemlendirici

Cildin yaşlanmasının önüne geçmenin en kritik önlemi nemlendiricilerin kullanılmasıdır (Yarkent vd., 2020). Nemlendiriciler, cildin görünümünü ve elastikiyetini muhafaza ederken zararlı çevresel koşullardan da koruyabilmektedir. Nemlendiriciler, transepidermal su kaybını önlemek için su içeriğini çekmeye tutmaya ve arttırmaya ve su buharlaşmasını azaltmaya yönelik yumuşatıcılar, nem tutucular ve nemlendiriciler gibi birçok kimyasal maddenin kombinasyonunu içermektedir (Lodén, 2003). Siyanobakterilerin kozmetikte nemlendirici ajanlar olarak potansiyel kullanımı, dehidrasyona karşı koruyucu mekanizmalara sahip olmalarından kaynaklanmaktadır ve bu koruma, ürettikleri ve dışarıya saldıkları EPS'ler aracılığı ile gerçekleşmektedir. (Morone vd., 2019).

Pseudomonas fluorescens polisakkaritinin nem emme ve tutma özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, *P. fluorescens* EPS'sinin nem tutma kabiliyetinin, kozmetik ve klinik tıp alanlarında yaygın bir şekilde kullanılan hiyalüronik asit'e yakın, gliserolden ise yüksek olduğu bulunmuştur (Zhao vd., 2013). Bu yeni polisakkaritin kararlı ve yüksek kalitede olduğunu, elde edilmesinin kolay olduğunu ve endüstriyel büyük ölçekli üretim potansiyeline sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, *Pediastrum duplex* ekstraktının önemli miktarda polisakkarit içerdiği ve bu polisakkaritin cildin nemlendirilmesi için değerlendirilebileceğini önermişlerdir (Wang vd., 2015).

Nostoc commune EPS'sinin araştırıldığı bir çalışmada ise, *N. commune* polisakkaritinin kitosan ve üreye kıyasla güçlü nem emme ve nem tutma kapasitesine sahip olduğu saptanmış ve bu nedenle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde potansiyel uygulanabilirliği vurgulanmıştır (Li vd., 2011). Yapılan çalışmalar siyanobakteriler tarafından üretilen EPS'lerin nem emilim ve nem tutma özelliklerinin önemli olduğu

kozmetik, gıda koruma ve biyotıp alanlarında potansiyel uygulamaları olabileceğini göstermektedir.

2.2.4.3. Antioksidan

Yaşlanma, güneşe maruz kalma, hava kirliliği, sigara ve kötü beslenme gibi çevresel faktörler kaynaklı ya da genetik ve zamana bağlı faktörler kaynaklı olarak gerçekleşebilmektedir (Morone vd., 2019). Metabolik süreçler sırasında serbest radikallerin üretimine bağlı mutasyonların bir sonucu olarak rastgele hücre hasarına karşılık gelen stokastik bir süreç söz konusudur (Puizina-Ivic, 2014). Dolayısı ile yoğun UV ışınlarına maruz kalmaktan kaçınmak serbest radikallerin üretimin engel olmak açısından önemlidir. Bunun yanı sıra E ve C vitaminleri, koenzim Q10, alfa-lipoik asit, glutatyon gibi çeşitli antioksidanların da yaşlanma belirtilerini azaltabileceği belirtilmiştir. Siyanobakteri EPS'lerinin anti-oksidan aktivitelerinin olması bu alanda kullanım potansiyelini gündeme getirmiştir (Li vd., 2011; Morone vd., 2019). EPS'yi cilt hidrasyonundaki işlevlerine paralel olarak, kozmetik uygulamalarında yararlı ve mümkün kılan diğer bir özelliği de anti-oksidan potansiyelleridir. Siyanobakterilerden elde edilen EPS'nin, süperoksit anyonlarını ve hidroksil radikallerini ayırma, oksidatif stres azaltma mekanizmasında yer alan enzimlerin aktivitesini artırma ve lipid peroksidasyonunu azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. (Morone vd., 2019). Hindistan'da çeltik tarlasından izole edilen *Anabaena* sp. suşunun tanımlanmasının yapıldığı bir çalışmada siyanobakterinin ürettiği EPS miktarı ve kimyasal özellikleri de araştırılmıştır (Tiwari vd., 2019). Heteropolisakkarit yapıda olduğu belirlenen *Anabaena* sp. EPS'sinin glikoz, ksiloz, ramnoz ve glukuronik asitten oluştuğu ortaya konulmuştur. EPS üretiminin kayda değer bulunduğunu (320,21 mg/L) ve üretilen EPS'nin önemli derecede anti-oksidan ve süpürücü aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Şeker içeriğinin, bağ yapısının ve zincir dallanmasının da incelendiği çalışmada EPS yapısının anti-oksidan aktive gibi biyofonksiyonel özelliklerini etkileyebileceği belirtilmiştir.

2.2.4.4. Anti-inflamatuar

Cilt, koruyucu fiziksel bariyer işlevinin yanı sıra alerjik dermatit ve inflamatuvar yanıt gibi bağışıklık süreçlerinde de aktif olarak yer alır (Bos, 1997). Topikal kortikosteroidler, alerjik dermatit tedavisinde kullanılan ana bileşiklerdir ancak bu tedavi, kutanöz atrofi, çatlak ve adrenal supresyon gibi ciddi yan etkilerin indüklenmesini de beraberinde getirmektedir. (Belsito vd., 2006). Siyanobakterilerde bulunan bazı

bileşiklerin foto koruyucu, nemlendirici ve anti-oksidan etkilerine ek olarak anti-inflamatuar özelliklere de sahip olduğu ortaya çıkmıştır ve bu bileşiklerden biri olan polisakkaritler nedeniyle anti-inflamatuar yetenekleri de kanıtlanmıştır (Guzmán vd., 2003; De Jesus Raposo vd., 2013; Mourelle vd., 2017).

Zampieri vd., (2020) yaptıkları bir çalışmada *Phormidium sp.* suşundan izole edilen EPS'inin terapötik potansiyelini araştırmışlardır (Zampieri vd., 2020). Hem kimyasal hem de mekanik uyarılmış zebra balığı inflamasyon modelinin kullanıldığı bu çalışmada *Phormidium* EPS'inin, ani-inflamatuar ve inflamasyon çözücü etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra *in vitro* ve *in vivo* olarak EPS'nin test edilen konsantrasyonlarda toksisitesinin olmadığı tespit edilmiş ve siyanobakteriyel EPS'nin ani-inflamatuar etkilerinin doğal kaynaklı önemli terapötik moleküllerden biri olabileceği ve kronik enflamatuar hastalık iyileşmesi için potansiyelinin olduğu ortaya konulmuş bulunmaktadır.

2.2.4.5. Beyazlatma

Beyazlatma, melaninin anormal birikiminden kaynaklanan çil ve lentigo senilis gibi pigmentasyon bozukluklarının tedavisine yönelik kozmetik formülasyonlardaki taleplerden biridir (Slominski vd., 2004; Morone vd., 2019). Tirozinaz, melanin biyosentezinde yer alan bir enzimdir ve inhibisyonu beyazlatma bileşikleri için bir hedeftir (Hearing, 2011). Bu alanda çok az çalışma yapılmış olmasına rağmen, siyanobakterilerin, tirozinaz inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ve pigment bozukluklarını tedavi etme potansiyeli olduğu literatürde yer almaktadır (Morone vd., 2019; Sano ve Kaya, 1996). Kısıtlı sayıda bulunan çalışmalarda mikrobiyal EPS'lerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu ve kozmetikte beyazlatıcı olarak kullanılma potansiyellerinin olduğu rapor edilmiştir (Luang-In vd., 2018; Bajpai vd., 2016; Jin vd., 2019).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında siyanobakterilerin ve EPS'lerinin kozmetik sektöründe sentetik ürünlerin karşısında doğal bir bileşen olarak önemli bir yere sahip olma potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

2.3. Kaynak Özetleri

Hussein vd., (2015), *Nostoc carneum* suşundan izole ettikleri EPS'nin fizikokimyasal karakterizasyonunu yaparak anti-oksidan aktivitesini araştırmışlardır (Hussein vd., 2015). Sadece %54'ünün karbonhidrat olduğu belirlenen *N. carneum*

EPS'sinin ksiloz ve glikoz içerdığını, kalanının ise protein, sülfat ve üronik asitten meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda FT-IR ile EPS'nin sülfat içeren fonksiyonel gruplarının olduğu ve karboksil asit içerdği belirlenmiştir. İndirgeme gücü ve DPPH ile yapılan *in vitro* anti-oksidan analizleri sonucunda *N. carneum* EPS' sinin anti-oksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada *Oscillatoria formosa*'nın üretmiş olduğu EPS'nin, fiziko-kimyasal karakterizasyonu yapılmıştır ve EPS üretim kinetiği incelenmiştir (N. Jindal vd., 2011). HPLC analizi ile *O. formosa* EPS'sinin tanımlanamayan üç şekerin dışında riboz, mannoz ve galakturonik asit içerdği ortaya konulmuştur. FT-IR spektrumu ile de EPS'nin karboksil ve karbonil grupları içerdği ve polianyonik bir karaktere sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen fizikokimyasal verilerle *O. formosa* EPS'sinin farklı endüstriyel alanlarda kullanılma potansiyelinin olduğu belirtilmiştir.

Li vd. (2011) *Nostoc commune* suşundan elde ettikleri EPS ile yaptıkları bir çalışmada, EPS'nin doğal yapısından gelen biyomedikal potansiyeli araştırmak için antioksidan ve nem tutma kapasitelerini araştırmışlardır (Li vd., 2011). Yapılan çalışmada, *N. commune*'den elde edilen polisakkaritin doza bağlı bir şekilde hem süperoksit anyonu hem de hidroksil radikallerini temizleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *Nostoc* polisakkariti kitosan ve üre ile *in vitro* olarak karşılaştırıldığında güçlü bir nem emme ve nem tutma kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Diğer bir çalışmada *Tolypothrix tenuis* ve *Anabaena* türlerine ait siyanobakterilerden izole edilen ekzopolimerlerin hemostatik biyomalzeme olma potansiyelleri araştırılmıştır (Bhatnagar vd., 2014). Hidrofilik yapıda olduğu tespit edilen siyanobakteri ekzopolimerlerinin güçlü trombojeniklik ve daha kısa kan pıhtılaşma süresi sergilediği bulunmuştur. Sitotoksik olmayan ve hafif hemolitik olan ekzopolimerler, yaygın yara enfeksiyonlu bakterilere karşı anti-bakteriyel aktivite göstermiştir. Bunların yanı sıra süper emme kapasitesi ile hemorajik yaralar için etkili bir ajan olma özelliği taşıdığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma siyanobakteri ekzopolimerlerinin yara tedavisindeki potansiyelini ortaya koymuştur.

Yoshikawa vd., (2021), *Chroococcus sp.* suşunun ürettiği EPS'nin kimyasal ve fizyolojik karakterizasyonunu yaparak EPS üretiminden sorumlu genleri araştırmışlardır (Yoshikawa vd., 2021). *Chroococcus sp.* EPS'sinin monosakkarit kompozisyonunun galaktoz, rhamnoz, fukoz, ksiloz, mannoz, glukoz, galakturonik asit ve glukuronik asit içerdği ve *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx*, *wzy* ve *wzz* genlerinin, EPS sentezinde rol aldığı tespit

edilmiştir. Elde edilen verilerle *Chroococcus sp.* suşunun EPS üretiminde Wzy'ye bağımlı yolağı kullanabilmiş olabileceği önerilmiştir.

Kuraklığa dayanıklı karasal siyanobakterilerden olan *N. flagelliforme* EPS'sinin toprağın fizikokimyasal özelliklerini iyileştirdiği ve ekolojik olarak önemli olduğu bildirilmiştir (Wu vd., 2021). *N. flagelliforme*'daki üç nem kaybı seviyesinin EPS üretimi ve anti-oksidan sistemi üzerindeki etkilerinin fizyolojik ve transkriptomik yöntemlerle araştırıldığı bu çalışmada *N. flagelliforme*'nin kuraklığa yanıt olarak genlerdeki transkripsiyonel değişimde ve anti-oksidan sisteminde yer alan EPS üretim mekanizmasının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. EPS sentezinden sorumlu genlerin dehidrasyon altında hızla aktive edilmesi, dehidrasyonun *N. flagelliforme*'da EPS içeriğinin artmasına neden olabileceğini göstermiştir. Kuraklığa yanıt olarak *N. flagelliforme*'de EPS birikim mekanizmasını devreye sokulduğu görülmüştür.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum nitrat (NaNO_3), Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4), Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Metanol (%99), Kloroform (%99), DMSO (Dimetil sülfoksit), Askorbik asit, Sodyum sülfat, Amonyum molibdat, Sodyum Klorür (NaCl), Üre, Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Silika jel Merck'ten, Trichloroacetic acid (TCA) (%99.5) ISOLAB'tan, Etanol (%99) Tekkim'den, Fenol, Potasyum karbonat (K_2CO_3) Riedel-de Haën'den, Ferric Ammonium Citrate AppliChem'den, EDTA- Na_2 BioShop'tan, Citric acid, Sülfürik asit (%95-97), Glukoz monohidrat, Aseton (%99), DPPH (1,1-Difenil 1-2-pikrilhidrazin), Agar, Tyrosinase from mushroom, Sigma-Aldrich'ten, GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti EurX'ten, FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz Solis Biodyne'den, HighPrep™ PCR Clean-up System (AC-60005) MAGBIO'dan, Mueller Hinton Broth (MHB), Sabouraud Broth (SB) Biolife'dan, Kitosan Benosen'den, BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti, L-DOPA (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine) ise Thermo Fisher'dan temin edildi.

3.1.2.Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu'ndan (MAKUMACC), Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş altı siyanobakteri suşunun EPS üretim kapasitesi belirlenmiş ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan iki suş çalışmaya alınmıştır (**Tablo 3.1.**). Çalışmalarda kullanılan diğer test bakterileri (*Escherichia coli* 35215, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ve *Candida albicans* 1023) ise Prof. Dr. Belma Aslım'ın (Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji laboratuvarı) ve Prof. Dr. Gülden Başyigit Kılıç'ın (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Gıda Mühendisliği) kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan siyanobakteri suşları

Suş Kodları	İzolasyon Kaynağı
MAKUMACC-55	İçme suyu, Kastamonu
MAKUMACC-59	Kabatepe göleti, Çanakkale
MAKUMACC-62	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversite kampüsü
MAKUMACC-63	Yeşilgöl, Kastamonu
MAKUMACC-71	Bolayır göleti, Çanakkale
MAKUMACC-72	Kabatepe göleti, Çanakkale

3.2. Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Işık mikroskobu (Ex-31-T, Soptop)

İklimlendirme dolabı (TK 600, Nuve)

Spektrofotometre (T-60 -UV-VIS, PG Instruments Limited)

Vakum pompası (Rocker 400)

Etüv (KD 400, Nuve)

Santrifüj (Universal 320, Hettich)

Sıcak su banyosu (WB-22, Daihan Scientific)

Manyetik karıştırıcı (MSH-20D, Daihan Scientific)

Soğutmalı Santrifüj (NF 800R, Nuve)

Liyofilizatör (ALPHA 1-2 LD PLUS, CHRIST)

İnkübatör (IN 160 ve INE 600, Memmert)

Mikroplaka Spektrofotometre (BioTek, EPOCH)

Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (PROMINENCE, SHIMADZU)

Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FT-IR) (IRTracer-100, SHIMADZU)

X-Işınları Difraktometresi (XRD) (Rigaku Smart Lab)

McFarland Densitometre (DEN-1B, Biosan)

Desikatör

3.3. Yöntem

3.3.1. Siyanobakterilerin Aktifleştirilmesi ve Gelişme Ortamları

Siyanobakteri suşlarının geliştirilmesinde, daha önce farklı türler ile yapılan kültür çalışmalarında kullanılan ve siyanobakterilerin iyi ürediği kültür ortamı olarak tespit edilen Blue-Green Medium (BG-11) (**Tablo 3.2.**) kullanılmıştır (Kumar & Gaur, 2014; Hughes vd., 1958).

Steril BG-11 kültür ortamında aktifleştirilen siyanobakteri suşları, 1,5 litre hacimlerde erlenlere aktarılmıştır ve stok siyanobakteri kültürlerinden 750 nm’de optik yoğunluğu 0,5-1,1 absorbans aralığında inokülasyon yapılmıştır. Kültürlerin dış ortamlarda büyüebilmeleri için gerekli olan sıcaklık, havalandırma ve ışık gereksinimleri iklimlendirme dolabı içerisinde suni ortam oluşturularak sağlanmıştır. İnokülasyonu yapılan sıvı kültürler, iklimlendirme dolabında $24\pm4^{\circ}\text{C}$ ’de sıcaklıkta, $200\ \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 12/12 (aydınlık/karanlık) fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Karışım ve havalandırma işlemi, 500 mL/dk havalandırma kapasitesine sahip hava pompaları ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Siyanobakteri suşlarının yetiştirildiği iklim dolabı



Şekil 3.2. Kültür ortamında siyanobakteri suşları

Tablo 3.2. Blue-Green Medium^a ortamının içeriği (Hughes, 1958)

Madde	g/L
NaNO ₃	15,0
K ₂ HPO ₄	4,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7,5
CaCl ₂ . 2H ₂ O	3,6
Citric acid	0,60
Ferric ammonium citrate	0,60
EDTANa ₂	0,1
Na ₂ CO ₃	2,0
	mL/L
Trace-metal mix A5 ^b	1

^a: Ortamın pH'ı 7.1,

^b: H₃BO₃: 2,86 g/L; MnCl₂. 4H₂O: 1,81 g/L; ZnSO₄. 7H₂O: 0,22 g/L; Na₂MoO₄. 2H₂O: 0,39 g/L; CuSO₄. 5H₂O: 0,08 g/L; Co(NO₃)₂. 6H₂O: 0,05 g/L

3.3.1.1. Kültür Büyüme Parametreleri

Kültürlerin gelişimleri üç günde bir kültivasyon kontrolü yapılarak takip edilmiştir. Kültivasyon kontrolünde optik yoğunluk (750 nm) ve kuru biyokütle belirlenmiş ve klorofil a miktar tayini yapılmıştır (Parsons & Strickland, 1963).

3.3.1.1.1. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi (OD)

Siyanobakteri kültürlerinin hücre yoğunluğu optik yoğunluk (Optical Density=OD) tayini ile belirlenmiştir. Kültür gelişimi takibinin yapıldığı günlerde, homojen olmasına

dikkat edilerek alınan 1 mL kültürün optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak 750 nm’de T-60-UV-VIS spektrofotometre cihazı (PG Instruments Limited) kullanılarak ölçülmüştür. Her siyanobakteri suşu için, ölçümler 3 tekrarlı yapılmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Kör olarak BG-11 besi ortamı kullanılmıştır (Ouyang vd., 1998).



Şekil 3.3. Siyanobakteri suşlarının optik yoğunluk ölçümü

3.3.1.1.2. Kuru Biyokütle Ağırlık Tespiti

Siyanobakteri kültürünün büyüme sürecinde kültür durumu hakkında bilgi veren parametrelerden biri de kültürdeki biyokütle ağırlığıdır. Bunun için; optik yoğunluğun belirlendiği aynı günlerde kültürlerden 10 mL numune alınıp, filtre kâğıdı ile vakum pompasıyla süzülerek, 40°C’de etüvde kurutulmuş ve kuru biyokütle ağırlığı aşağıdaki denklemle belirlenmiştir (Vonshak, 1986).

$$\text{Kuru Ağırlık} = \text{Filtre son ağırlığı} - \text{Filtre başlangıç ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \quad (3.1.)$$



Şekil 3.4. Siyanobakteri suşlarının kuru biyokütlesi

3.3.1.1.3. Klorofil-a Miktarının Tespiti

Kültür büyümesini gözlemlemek için, OD ve kuru biyokütle ağırlığının tespit edildiği aynı günlerde klorofil-a miktarı tayini için şu adımlar uygulanmıştır (Lichtenthaler, 1987). Kültürden alınan 1mL örnek, 2 mL ependorf tüpüne konulmuştur ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet üzerine 2 mL metanol (%99) eklenmiştir. Örnekler 60°C'de sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edilip ardından 10 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kör olarak metanol kullanılmış ve ekstraksiyonun optik yoğunluğu 665,2 ve 652,4 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Klorofil a (Chl a)} = 16,72 (A_{665,2}) - 9,16(A_{652,4}) \quad (3.2.)$$



Şekil 3.5. Siyanobakteri suşlarında klorofil a ölçümü

3.3.2. Siyanobakterilerden Ekzopolisakkarit (EPS) İzolasyonu ve EPS'lerin Liyofilizasyonu

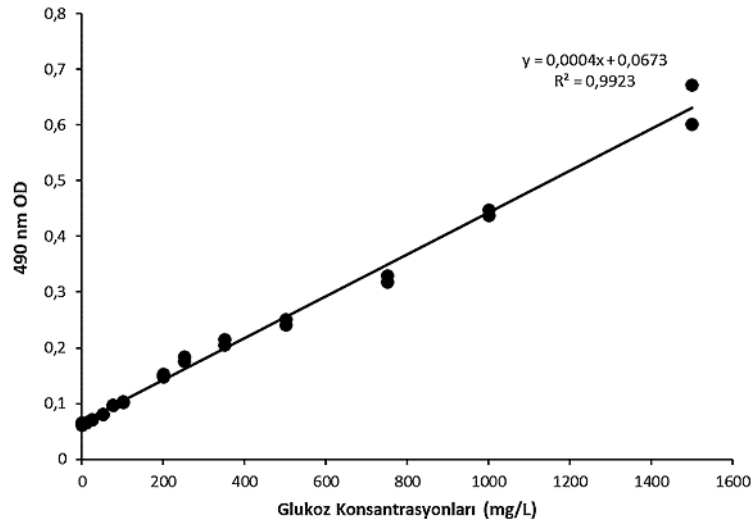
Siyanobakterilerden EPS izolasyonunda Ozturk ve arkadaşlarının (2014) kullandığı yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Ozturk vd., 2014). BG-11 kültür ortamında aktifleştirilen siyanobakteri suşlarına stok inokülasyonu ile kurulan kültürlerin büyümesi 20. gün'de sonlandırılarak, EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültür içerisinden alınan 300 mL örnek, 80°C'de 10 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örnekler %4 oranında Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek, manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de 20 dakika TCA çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 4000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant üzerine iki katı kadar hacimde etilalkol (%99) eklenerek +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır ve kalan alkolü tamamen uzaklaştırmak için pelletler 37°C de etüv içerisinde yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 2 mL steril distile suda vorteks yardımı ile çözünen örnekler -20°C'de saklanmıştır.

İzole edilen EPS'ler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Liyofilizatör cihazı (CHRIS ALPHA1-2LD PLUS, Almanya) kullanılarak sonraki analizlerde kullanmak üzere liyofilize edilmiştir.

3.3.3. EPS Miktar Tayini

Siyanobakteri EPS miktar tayini kültür ortamından ve ekstrakte edilmiş EPS örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Kültür süpernatantından miktar tayini için siyanobakteri kültür ortamının üst fazından 3 mL alınmıştır ve 4000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar analizde kullanılmıştır.

Siyanobakteri suşlarının EPS üretim miktarları, fenol-sülfürik asit metodu kullanılarak belirlenmiştir (Dubois vd., 1951; Strieth vd., 2021). Elde edilen kültür süpernatantı ve distile suda çözünen EPS ekstraktlarının üzerine (1 mL) 500 µL %5'lik fenol solüsyonu ve 2,5 mL konsantre sülfürik asit (%95-93) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, 30°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 490 nm'de spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları ölçülmüştür. Ölçümler üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. Kör değer olarak dH₂O kullanılmıştır. Standart olarak glikoz kullanılmıştır ve siyanobakteri suşlarının EPS üretim miktarları hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre (Şekil 3.6.) belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Glikoz standart eğrisi

3.3.4. Seçilen Siyanobakteri Suşlarının Moleküler Tayini

Çalışmanın devamı için seçilen siyanobakteri suşlarının 16S rRNA gen bölgesi baz alınarak yapılan moleküler tanımlamaları BM Labosis (Ankara)'de gerçekleştirilmiştir. Kültürlerden alınan 1 mL örneklerden EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) ile üretici protokolü takip edilerek total DNA izole edilmiştir. Elde edilen DNA'ların miktar ve saflığı Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm ile kontrol edildikten sonra CYA 781 R (5'-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3') ve CYA 359 F (5'-GGGAATYTTCCGCAATGG-3') primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle çoğaltılmıştır.

PCR ürünleri agaroz jel üzerinde kontrol edildikten sonra MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılarak üretici prosedürüne göre saflaştırılmıştır. ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak ampikonların dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla elde edilen okumalar, BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılarak kontig haline getirilmiştir. NCBI veri tabanı kullanılarak en yakın tür belirlenmiştir.

3.3.5. Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu

3.3.5.1. Monosakkarit Kompozisyonlarının Araştırılması

EPS'lerin monosakkarit kompozisyonlarının tayini için Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı (SHIMADZU, PROMINENCE) ile EPS'lerin monosakkarit kompozisyonları TS13359 metoduna göre belirlenmiştir. Bu analiz için, EPS örneklerinden 0,01 g alınarak, 3 mL metanol-su (25:75, v/v) karışımı içerisinde ultrasonik su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Numuneler ultrasonik su banyosunda tutulduktan sonra filtreden geçirilerek sisteme enjekte edilmiştir. Mobil faz içeriği metanol: su (80:20), kolon sıcaklığı: 30°C; akış hızı: 0,8 mL/dk olarak belirlenmiştir.

3.3.5.2. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR)

EPS'lerin içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FT-IR) (SHIMADZU, IRTracer-100) analizi yapılmıştır. 2 mg liyofilize EPS örneği, 200 mg kuru potasyum bromür (KBr) ile öğütülerek bir kalıpta preslenip hazırlanmıştır (Jindal vd., 2011). FT-IR spektrumu, bir Perkin Elmer spektrumu GX FT-IR sisteminde 4 cm⁻¹ çözünürlükle 4000 ila 500 cm⁻¹ bölgesinde geçirgenlik modunda kaydedilmiştir (Jindal vd., 2013).

3.3.5.3. X-ışını Difraktometresi (XRD)

X-Işınları kırınımı ile EPS'lerin kristallografik özelliklerinin belirlenmesi ve içerdikleri fazların belirlenmesi amacıyla X-ışını difraktometresi (XRD) analizi

yapılmıştır. Toz halinde 1 mg liyofilize EPS örneklerinin XRD desenleri, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ve 40 kV-30 mA değerinde ışın saçan X-ışını difraktometresi (Rigaku Smart Lab) kullanılarak $0,01 \text{ s}^{-1}$ tarama hızında $2\theta:10-80^\circ$ aralığında tarama yapılarak elde edilmiştir (Rajasekar vd., 2019).

3.3.6. Liyofilize EPS'nin Çözünürlüğü

Polisakkaritlerin yapısındaki hidrofilik ve hidrofobik gruplarının dağılımı, farklı çözücülerdeki çözünürlüğün belirlenmesinde en önemli faktör olmuştur. Genç ve arkadaşlarının (2021) kullandığı yöntemde, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Genc vd., 2021). EPS örneklerinin distile su, etanol, metanol, kloroform, aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO) içindeki çözünürlüğü belirlenmiştir. Bu amaçla, liyofilize EPS numunelerinden 1 mg tartılarak çözücüden 1 mL eklenmiştir. Numuneler yaklaşık 2 dakika boyunca vorteks yardımıyla karıştırılarak, çökeltme oluşumu gözlenmiştir.

3.3.7. Liyofilize EPS'lerin Fonksiyonel Özellikleri

3.3.7.1. Antioksidan Potansiyeli

a) Liyofilize EPS örneklerinin 1,1-difenil-1-2-pikril-hidrazin (DPPH) serbest radikalının süpürme potansiyeli, Blois (1958) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir (Blois, 1958). DMSO: metanol karışımı içerisinde çözünen liyofilize EPS'ler, seri dilüsyonla 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır ve üzerine 50 μL 1 mM DPPH solüsyonu eklenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme sonunda 517 nm'de spektrofotometrik olarak örneklerin optik yoğunlukları ölçülmüştür. Ölçümler üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Örneklerin DPPH radikal süpürme potansiyeli aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH radikal süpürme aktivitesi} = [(A_0 - A_{\text{örnek}})/A_0 \times 100] \quad (3.3.)$$

$A_0 = \text{DPPH} + \text{Metanol Absorbansı}$

$A_{\text{örnek}} = \text{Örnek} + \text{DPPH} + \text{Metanol Absorbansı}$

b) EPS'nin toplam antioksidan aktivitesi Adebayo-Tayo ve arkadaşlarının (2018) kullanmış olduğu, Mitsuda yöntemi ile belirlenmiştir (Adebayo-Tayo vd., 2018). Antioksidan kapasite karışımı için 4 mM (1,235 g) amonyum molibdat, 0,6 M sülfürik asit (45 mL), 28 mM (0,9942 g) sodyum sülfat ve 250 mL deiyonize su kullanılmıştır.

DMSO: distile su karışımı içerisinde çözünen liyofilize EPS'ler, seri dilüsyonla 0-1000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan EPS örneklerinden 0,1 mL alınarak yukarıda verilen karışımdan 1 mL eklenmiştir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme sonunda 695 nm'de spektrofotometrik olarak örneklerin optik yoğunlukları ölçülmüştür. Ölçümler üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. Kör değer olarak dH₂O kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Toplam antioksidan aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% = [(A_{\text{örnek}} - A_0) / A_0] \times 100 \quad (3.4.)$$

$A_{\text{örnek}} = \text{Örnek} + \text{Reaksiyon Karışımı}$

$A_0 = \text{Reaksiyon Karışımı} + \text{Distile su}$

c) EPS'nin indirgeme gücü, Oyaizu yöntemi ile test edilmiştir (Oyaizu, 1986; Adebayo-Tayo vd., 2018). 1 mL DMSO: distile su içerisindeki EPS örnekleri (0-1000 µg/mL), 2,5 mL 2mM fosfat tamponuna (pH 6.6) ve %1 potasyum ferrosiyanür (2,5 mL) ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 50°C de 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımına %10 trikloroasetik asit (2,5 mL) ilave edilip 3000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Distile su (2,5 mL) ve %1 ferrik klorür (0,1 mL) eklenmiştir. Karışımın absorbansı, 10 dakikalık inkübasyon sonrasında 700 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak askorbik asit kullanılmıştır.

d) EPS'nin hidrojen peroksit temizleme potansiyeli standart yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Adebayo-Tayo vd., 2018). 0,1M fosfat tamponlu tuzlu su (pH 7.4) içinde 10 mM hidrojen peroksit çözeltisi hazırlanmıştır. 0-1000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan EPS numunelerinin 1 mL'si, 2 mL hidrojen peroksit çözeltisi içerisine eklenmiştir. Daha sonra karışım 30°C'de 10 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın absorbansı 230 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak askorbik asit kullanılmıştır.

3.3.7.2. Antimikrobiyal Aktivitesi

EPS'lerin antimikrobiyal aktivitesi Maruthanayagam ve arkadaşlarının (2020) kullandığı yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir (Maruthanayagam vd., 2020). Test mikroorganizması olarak *Staphylococcus aureus* ATCC25923,

Escherichia coli 35215, ve *Candida albicans* 10231 suşları kullanılmıştır. Bakteriler Mueller Hinton Broth (MHB) besi ortamında geliştirilirken, mantar Sabouraud Broth (SB) besi ortamında geliştirilmiştir.

Stoktan (-80°C) alınan test mikroorganizmalarının aktifleştirilmesi için, sıvı besiyerine öze yardımıyla ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aktif kültürler, yayma plaka yöntemi ile agar petrilere transfer edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda McFarland densitometre cihazında 0,5'te (10^8 CFU/mL) ölçülen mikroorganizmaların konsantrasyonu seyreltilerek bakteriler için 10^6 CFU/mL'ye, mantar için ise 10^4 CFU/mL'ye ayarlanmıştır. Mikroorganizmalar agar üzerine damla ekim metodu ile ekilerek konsantrasyonları teyid edilmiştir (Chen vd., 2003).

Serum fizyolojik içerisinde çözünen liyofilize EPS'ler, 0,22 µm şırınga filtreleri kullanılarak steril edilmiştir. Seri dilüsyonlarla 0-1000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan EPS'ler mikrobiyal inokulum ile 96 kuyucuklu mikropalkanın son hacmi 200 µL olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Mikropilaka kuyucuklar içerisine EPS örneklerinden 50 µL ve mikrobiyal süspansiyon ise 150 µL eklenmiştir. Ardından 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 600 nm'de spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları ölçülmüştür. Analiz üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. Kör olarak inoküle edilmemiş besiyeri ortamları kullanılmıştır. EPS'lerin mikrobiyal büyüme üzerindeki aşağıda verildiği gibi yüzde inhibisyonu formülüne göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon \%} = \frac{(\text{Kontrol} - \text{Test})}{\text{Kontrol}} \times 100 \quad (3.5.)$$

Kontrol = Test örneği içermeyen mikrobiyal inokulum

3.3.8. Liyofilize EPS'lerin Nem Emilim ve Nem Tutma Kapasitesi

3.3.8.1. Nem Emilimi

Siyanobakterilerden izole edilen liyofilize EPS'lerin nem absorpsiyon kapasitesinin değerlendirilmesi için 10 mg olarak tartılan numuneler, önce 4 saat boyunca 100°C' de etüvde kurutulmuştur (Li vd., 2011). Pozitif kontrol olarak kitosan ve üre kullanılmıştır.

Kurutulan EPS numuneleri, kitosan ve üre oda sıcaklığında iki ayrı bağlı nem ortamında bekletilerek ağırlık değişimi gözlenmiştir. Doymuş K_2CO_3 çözeltisi içeren desikatör %43 bağlı nem (RH) seviyesi elde etmek için kullanılırken, doymuş $(NH_4)_2SO_4$

çözeltisi içeren desikatör, %81 RH seviyesi elde etmek için kullanılmıştır. Örneklerin ağırlıkları, 3, 6, 9, 12, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde ölçülmüştür.

Numunedeki ağırlık artışı ile değerlendirilen nem emme (absorpsiyon) kabiliyeti (Ra), aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Ra (\%) = 100 \times \frac{W_n - W_0}{W_0} \quad (3.6.)$$

Burada W_0 ve W_n , sırasıyla numunenin desikatöre konulmadan önceki ve sonraki ağırlıklarıdır (Zhao vd., 2013).

3.3.8.2. Nem Tutma

Siyanobakteri EPS'lerinin nem tutma kapasitelerinin değerlendirilmesi için 10 mg tartılan örnekler, 24 saat boyunca distile su bulunan desikatör içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Pozitif kontrol olarak kitosan ve üre kullanılmıştır. Yaş EPS numuneleri, kitosan ve üre, oda sıcaklığında doymuş K_2CO_3 çözeltisi ile %43 bağıl nem ortamı sağlanan desikatörde veya silika jel içeren desikatörde bekletilerek ağırlık değişimleri gözlenmiştir. Örneklerin ağırlıkları 3, 6, 9, 12, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde ölçülmüştür.

Numunedeki ağırlık azalışı ile değerlendirilen nem tutma kabiliyeti (R_r), aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$R_r (\%) = \frac{H_n}{H_0} \times 100 \quad (3.7.)$$

Burada H_0 numunenin distile su içerisinde bekletildikten sonraki ağırlığı, H_n numunenin K_2CO_3 veya silika jel içerisinde bekletildikten sonraki ağırlıklarıdır (Sun vd., 2014).

3.3.9. EPS'nin Tirozinaz İnhibisyon (Beyazlatma) Aktivitesi

EPS'lerin tirozinaz inhibisyon aktivitesi, Fawole ve arkadaşlarının (2012) kullanmış olduğu yöntem ile yapılmıştır (Fawole vd., 2012). DMSO: Potasyum fosfat tampon karışımı içerisinde çözünen liyofilize EPS'ler seri dilüsyonla 250-2000 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Daha sonra EPS örneklerinden 70

μL , 30 μL tirozinaz enzimi (fosfat tamponunda 333 Units/mL, pH 6.5) ile karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Beş dakika sonunda reaksiyon karışımına 110 μL substrat (12 mM L-DOPA) eklenip 30 dakika 35°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 492 veya 475 nm’de spektrofotometrik olarak optik yoğunlukları ölçülmüştür. Analiz üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Blank için L-DOPA hariç tüm bileşenleri içeren karışım kullanılmıştır. Yüzde tirozinaz inhibisyonu şu şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \right] \times 100 \quad (3.8.)$$

A kontrol, DMSO'nun absorbansı ve A numune, ekstrakt veya askorbik asit içeren test reaksiyon karışımının absorbansıdır.

3.3.10. İstatistiksel analizler

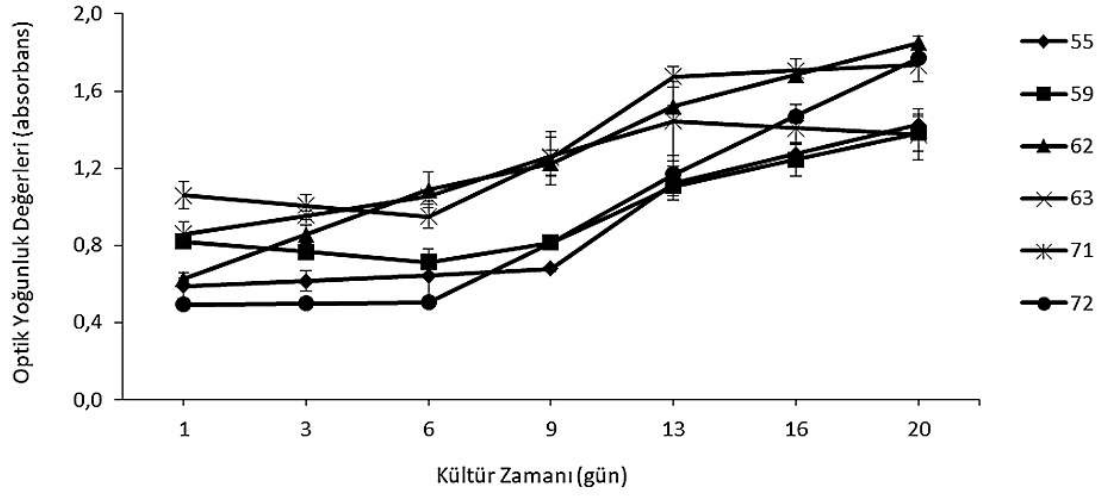
Bütün analizler en az üç tekrarlı olarak yapılmıştır ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak rapor edilmiştir. Araştırma sonuçları JMP paket programı kullanılarak, varyans analizi (One-way ANOVA) tekniği ile analiz edilmiştir. T-testi ve Duncan çoklu karşılaştırma ($P < 0,05$) testleri kullanılarak gruplar arasındaki farklılıklar test edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tezi kapsamında yapılan çalışmada kullanılan siyanobakteri suşları Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş olup kültür optimizasyonu, kültürlerden EPS izolasyonu ve elde edilen EPS'lerin karakterizasyonu ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. Klasik ve moleküler düzeydeki tanımlamaları yapılarak kültür koleksiyonuna dahil edilmiştir. Bu çalışmada, EPS üretim kapasiteleri yüksek iki siyanobakterileri suşu seçilerek moleküler tanımlaması ve ürettikleri EPS'lerin karakterizasyonları ve biyofonksiyonel özellikleri incelenerek kozmetik sektöründe kullanılabilme potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Bunun için, üretilen EPS'lerin miktarları belirlenerek HPLC ile monosakkarit kompozisyonları; FTIR ile fonksiyonel grupları, XRD ile de kristalografik özellikleri ortaya konulmuştur. Ayrıca, serbest radikalini süpürme aktivitesi, total antioksidan aktivitesi ve patojenlerin büyümesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Bütün bunların yanı sıra, EPS'lerin nem emilimi ve nem tutma kapasiteleri ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri saptanmıştır.

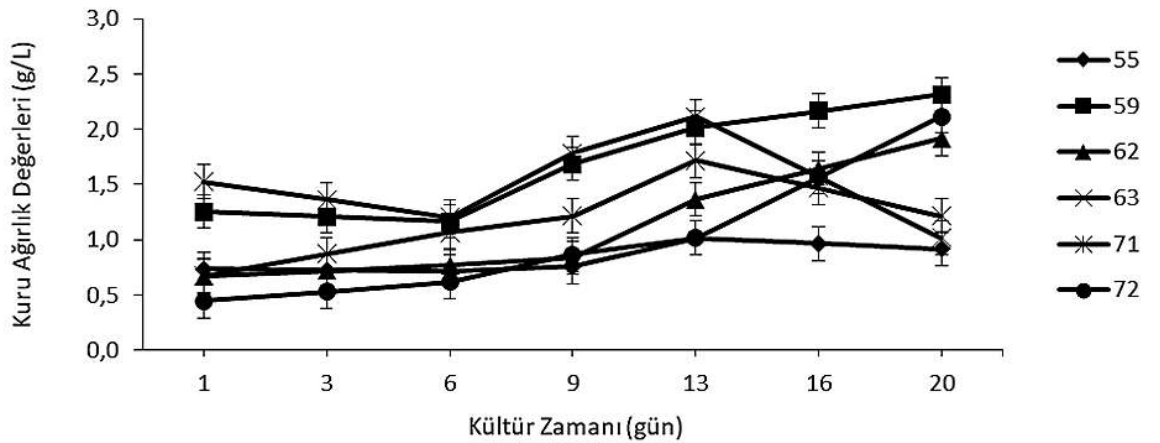
4.1. Kültür Büyüme Parametreleri

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu'ndan altı siyanobakteri suşlarının gelişimleri üç günde bir kültivasyon kontrolü yapılarak takip edilmiştir. Kültivasyon kontrolünde optik yoğunluk ve kuru biyokütle belirlenmiş ve klorofil a miktar tayini yapılmıştır (Parsons ve Strickland, 1963). 0,5-1,1 abs aralığında kurulan siyanobakteri kültürleri 20. günde durağan faz aşamasına girmiştir. 20. gün sonunda bütün kültürler sonlandırılmıştır. OD değerinin tespiti, 20 günlük kültivasyon süresince 3 günde bir, 1 mL örnek alınarak 750 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kültür süresince elde edilen en yüksek OD değerleri; 55 numaralı kültür için 1,4 abs, 59 numaralı kültür için 1,4 abs, 62 numaralı kültür için 1,8 abs, 63 numaralı kültür için 1,7 abs, 71 numaralı kültür için 1,4 abs ve 72 numaralı kültür için 1,8 abs olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.1.**).



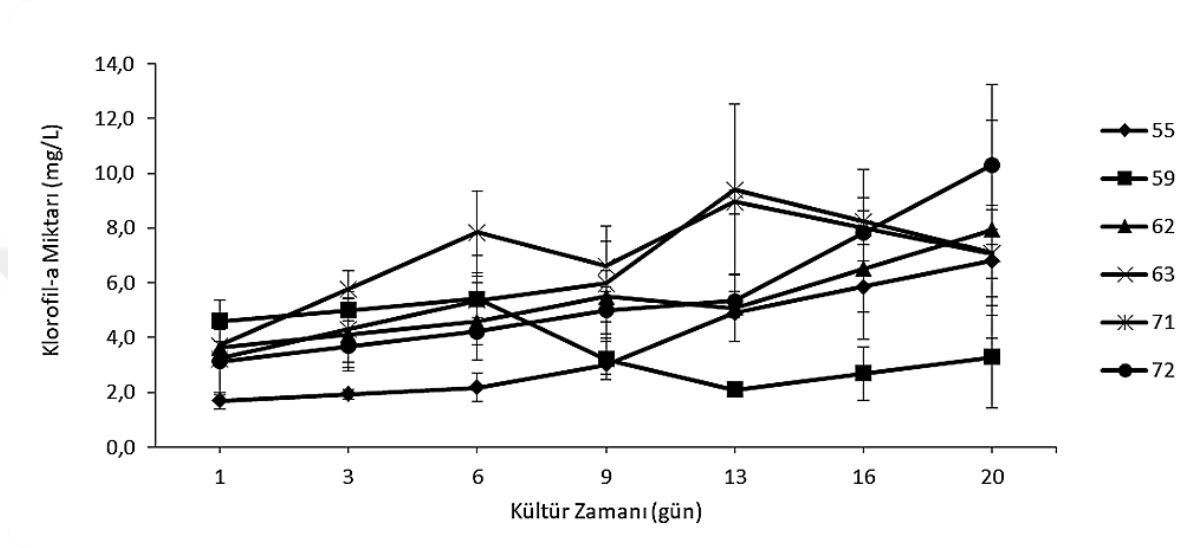
Şekil 4.1. Siyanobakteri suşlarının 750 nm'deki OD değerleri. Hata çubukları (SD, n=3), 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder.

OD değerinin belirlendiği günlerde her siyanobakteri suşundan 10 mL örnek alınarak kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Kültür süresi içerisinde elde edilen en yüksek kuru ağırlık değerleri; 55 numaralı kültür için 1,0 g/L, 59 numaralı kültür için 2,3 g/L, 62 numaralı kültür için 1,9 g/L, 63 numaralı kültür için 2,1 g/L, 71 numaralı kültür için 1,7 g/L ve 72 numaralı kültür için 2,1 g/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Siyanobakteri suşlarının kuru ağırlık değerleri. Hata çubukları (SD, n=3), 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder.

OD ve kuru ağırlık değerlerinin tespit edildiği günlerde, her siyanobakteri suşundan örnekleme yapılarak klorofil a (Kl-a) değerleri hesaplanmıştır. Kültür süresi boyunca elde edilen en yüksek Kl-a değerleri; 55 numaralı kültür için 6,8 mg/L, 59 numaralı kültür için 5,4 mg/L, 62 numaralı kültür için 8,0 mg/L, 63 numaralı kültür için 9,0 mg/L, 71 numaralı kültür için 9,4 mg/L ve 72 numaralı kültür için 10,3 mg/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Siyanobakteri suşlarının klorofil-a değerleri. Hata çubukları (SD, n=3), 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder.

Sánchez-Bayo vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, *Arthrospira maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana* ve *Nannochloropsis gaditana* kültürlerinde biyokütleyi en üst düzeye çıkarma hedefiyle en uygun büyüme koşullarını optimize etmek için çalışmıştır (Sánchez-Bayo vd., 2020). 18:6, 12:12 ve 6:18 fotoperiyodlarındaki kuru ağırlık miktarları karşılaştırılmış ve kuru ağırlık miktarlarının fotoperiyot döngülerine göre değiştiği vurgulanmıştır. En yüksek kuru ağırlık miktarları, *A. maxima* için 0,95 g/L, *N. gaditana* için 1,5 g/L, *C. vulgaris* için 0,5 g/L ve *I. galbana* için 1,2 g/L olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda optimum koşulların kültüre bağlı olarak değişebileceği ancak doğal aydınlık-karanlık döngüsüne daha yakın olduğu için 12:12 fotoperiyodu seçildiği vurgulanmıştır. Bu tez çalışmasında da doğal aydınlık: karanlık döngüsü olan 12:12 fotoperiyodu kullanılmıştır.

Diğer bir çalışmada Chamizo vd. (2020), biyokabuk oluşturan siyanobakteri türlerinden *Nostoc commune*, *Scytonema javanicum* ve *Phormidium ambiguum* suşlarının sıvı veya katı ortamda yetiştirilirken gösterdikleri büyüme ve polisakkaritik matriks

özelliklerindeki farklılıkları incelemişlerdir (Chamizo vd., 2020). Sıvı besi ortamında heterokistik olan *N. commune* ve *S. javanicum* için BG-11⁰ besiyeri, *P. ambiguum* için ise BG-11 besiyeri (nitratlı) kullanılmıştır ve kültüvasyon süresi 9 gün boyunca takip edilmiştir. 9 günlük kültüvasyon sonunda *P. ambiguum* en yüksek kuru ağırlığa (3,33 g/L) sahip iken, *N. commune* ve *S. javanicum* sırasıyla 1,46 g/L ve 1,75 g/L ile daha düşük bir büyüme göstermiştir. *P. ambiguum* 'un kültüvasyonun 7. gününde 31,9 mg/L ile en yüksek Kl-a değerine sahip iken, *N. commune* ve *S. javanicum* 9 günlük kültüvasyon sonunda sırasıyla 24,1 mg/L ve 8,9 mg/L Kl-a değerlerine ulaştığı saptanmıştır. Siyanobakteri büyümesi sırasında EPS üretiminin de Kl-a içeriğine benzer bir eğilime sahip olduğu bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında kullanılan siyanobakterilerin daha önce kültür optimizasyonu yapılmamıştır. Tez çalışmasındaki siyanobakteri kültürleri yetiştirilir iken, BG-11 kültür ortamı, 12/12 (aydınlık/karanlık) fotoperiyodu ve kültür için gerekli diğer koşulları iklimlendirme dolabı kullanılarak sağlanmıştır. 20 günlük kültüvasyon sonunda en yüksek klorofil-a miktarı 72 numaralı kültürde 10,3 mg/L iken en düşük 59 numaralı kültürde 5,4 mg/L olarak bulunmuştur. En yüksek kuru ağırlık değeri 59 numaralı kültürde 2,3 g/L iken, en düşük 55 numaralı kültürde 1,0 g/L olarak saptanmıştır. OD değerlerinde ise, en yüksek 1,8 abs en düşük 1,4 abs değerleri elde edilmiştir. Suşlar arasındaki kültür büyüme farklılıklarının ekzopolisakkarit gibi ikincil metabolitlerin üretimine de yansması beklenmektedir.

4.2. EPS Miktar Tayini

Siyanobakterilerin EPS üretim miktarları, 20 günlük kültür sonunda fenol-sülfürik asit metodu kullanılarak belirlenmiştir (Dubois vd., 1951). Altı siyanobakteri suşunun EPS üretim kapasitesi **Tablo 4.1.**'de gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan bütün siyanobakteri suşlarının yüksek EPS üretme kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kültür ortamında bulunan EPS miktarları 73,9-404,3 mg/L olarak bulunmuştur. EPS ekstraksiyonu sonrasında elde edilen EPS'lerin miktarları ise 235,5-1189,3 mg/L olarak saptanmıştır. EPS üretim miktarlarına ve yapılan ön antioksidan denemelerine göre 55 ve 72 kodlu siyanobakteri suşları ile tez çalışmasının geri kalan analizlerini gerçekleştirmek üzere devam edilmiştir.

Tablo 4.1. Siyanobakteri suşlarının EPS üretim miktarları (mg/L)

Suş Kodu	Kültür Ortamında EPS	Saflaştırılmış EPS
55	80,5	888,0
59	79,1	675,5
62	194,4	1070,5
63	105,0	235,5
71	404,3	1189,3
72	73,9	776,8

Çalışmaya dahil edilen siyanobakteri suşlarından EPS izolasyonu daha önce yapılmamıştır. Sadece, cins düzeyinde bilgisi verilen *Chlorogloeopsis sp.* 6912 cinsine ait eski bir yayın mevcuttur. Bu yayında da ortama salınan polisakkarit miktarı 30 mg/L olarak tespit edilmiştir (Nicolaus vd., 1999). Literatürde çalışılmış diğer siyanobakteri suşlarının EPS üretimine bakıldığında 6,57-340,7 mg/L arasında değiştiği görülmektedir (Chindanonda vd., 2021; Nicolaus vd., 1999; Tiwari vd., 2020).

Nicolaus vd. (1999), 3., 4. ve 5. alt gruplarda heterokist ve heterokist olmayan siyanobakterilerin EPS'lerini incelemişlerdir (Nicolaus vd., 1999). Standart büyüme koşullarında (BG11 ortamı, sürekli aydınlatma ve havalandırma), *Phormidium sp.* tarafından en yüksek EPS üretimi 30 mg/L olarak belirlenmiştir. *Nostocaceae* olarak sınıflandırılan türler (alt grup 4) arasında, en yüksek ekzopolisakkarit üretenler *Anabaena* WSAF ve *Anabaena torulosa* (sırasıyla 56 ve 22 mg/L) olarak bulunmuştur. *Nostocaceae* sınıfı dışındaki (alt grup 5) heterosistöz siyanobakteriler arasında en iyi EPS üreticisi *Chlorogloeopsis sp.* 6912'nin ise, toplam EPS'nin yaklaşık %90' ını temsil eden yaklaşık 30 mg/L ortama salınan EPS biyosentezlediği tespit edilmiştir.

Anabaena sp. CCC746 EPS'nin karakterizasyonun yapıldığı bir çalışmada, 15 günlük inkübasyon sonrasında ortama salınan EPS 83,74 µg/mL iken, total EPS 193,76 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Tiwari vd., 2020). Aynı ortam koşullarını kullanarak inkübasyon süresini (30 gün) artırdıklarında EPS üretiminde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Inkübasyon süresinin uzun olması total EPS'nin 193,76 µg/mL'den 340,7 µg/mL'ye yükselmesiyle sonuçlanmıştır. *Anabaena sp.* CCC745 EPS'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise BG-11 kültür ortamında 15 günlük inkübasyon sonrasında , 74,4 µg/mL kültür ortamına salınan EPS üretildiği gözlemlenmiştir (Tiwari

vd., 2019). 30 gün inkübasyon sonunda bu miktar önemli ölçüde yükselmiştir ve 145,72 µg/mL kültür ortamına salınan EPS tespit edilmiştir. Uzatılan inkübasyon süresi ile toplam EPS üretiminin, 171,09'dan 320,21 µg/mL'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Buna rağmen bu miktarlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz üretim miktarlarının oldukça altındadır.

Altı mikroalg, üç diyatom ve üç siyanobakteriyel tür kullanılarak yapılan bir çalışmada, kültürlerin tek veya karışık kültür ortamlarında EPS üretme yetenekleri araştırılmıştır (Chindanonda vd., 2021). *Navicula sp.*, *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Oscillatoria subbrevis*, *Cylindrotheca Closterium* ve *Skeletonema costatum* türlerinin mono-klonal kültürlerinde 15 günlük inokülasyon sonunda 6,57- 11,78 mg/L arasında EPS ürettikleri tespit edilmiştir. Yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olan dört mikroalgal türünün (*C. closterium*, *S. costatum*, *Navicula sp.* ve *O. Subbrevis*) kültür kombinasyonları yapılarak ölçülen EPS üretimlerinde ise üretimin 1,93- 39,97 mg/L arasında değiştiği bulunmuştur.

Başka bir çalışmada ise, 40 siyanobakteri suşunun EPS üretimi araştırılmış ve bu suşlar arasında en yüksek EPS üreten türler *Nostoc sp.* BTA97 ve *Anabaena sp.* BTA990 (sırasıyla 1,58 mg/mL, 1,29 mg/mL) olarak tespit edilmiştir (Tiwari vd., 2015).

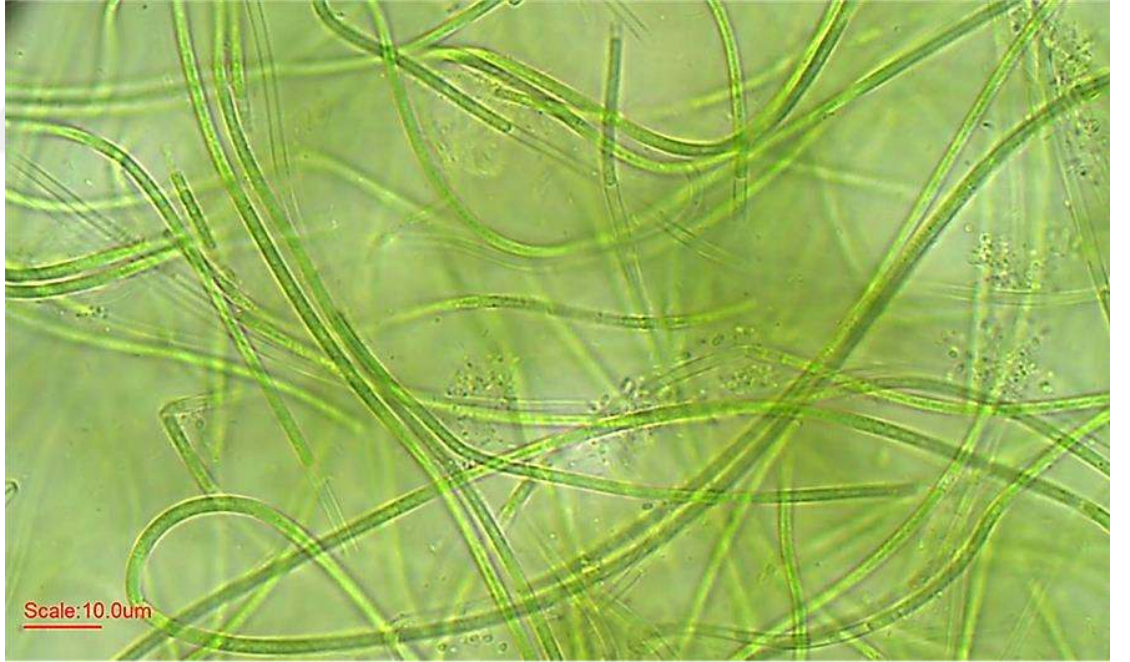
Bu tez kapsamında çalışılan suşlarda EPS üretim kapasitesi literatürde çalışılan siyanobakterilerin ortalama üretim kapasitelerine kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. EPS üretim kapasiteleri siyanobakterinin türüne ve suşuna bağlı olarak değişmektedir. Bunun yanı sıra inkübasyonu süresi gibi hücre dışı faktörler de total üretim miktarını etkilemektedir.

4.3. Mikroskopik Görüntüler

Yüksek EPS üreticisi 55 ve 72 kodlu siyanobakteri suşlarının ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. 55 kodlu suşun ışık mikroskobu 100x'lik büyütmedeki görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm



Şekil 4.5. 72 kodlu suşun ışık mikroskobu 100x'lik büyütmedeki görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm

Siyanobakteriler, benzersiz hücre morfolojisi, değişken hücre boyutları ve ayırt edici renkleri ile morfolojik olarak geniş bir çeşitliliğe sahiptirler (Singh ve Montgomery, 2011; Noreña-Caro ve Benton, 2018). Siyanobakterilerin taksonomik sistemi, sürekli

olarak gelişmektedir. Morfolojik olarak sınıflandırma, bireysel türler için hücre şekli (veya boyutuna) ve müsilaaj yapısına (özellikle tek /kokoid türlerde) dikkat edilir iken ipliksi siyanobakterilerde genişlik, sivrileşme, dallanma tipi, aktinlerin ve heterositlerin varlığına veya karmaşık talus oluşturan türlerde koloni yapısı ve mimarisine göre cinslere, familyalara ve takımlara ayrılırlar (Strunecký vd., 2023).

Chroococcus benzeri siyanobakterilerin tipik morfolojik özellikleri "küresel koloniler halinde 2-8 yarım küre veya düzensiz hücreler, genellikle ayırık lamelli müsilaajlı zarflarla çevrili, düzensiz tilakoidlerle birden fazla düzlemde bölünen" olarak tanımlanmaktadır (Wang vd., 2021). *Phormidium* benzeri siyanobakterilerin morfolojik özellikleri ise, karışık filamentlerden oluşur, genellikle kolonial, ince, düz, sümüksü matlara sahiptir, koloni varlığında makroskobik görünüm kazanır ve trikomlara sahiptir (Pabuçcu ve D. Yücer, 2018). Mikroskobik gözlemler sonucu, morfolojik sınıflandırmaya göre örnekler *Chroococcus* sp. (55) ve *Phormidium* sp. (72) olarak belirlenmiştir.

4.4. Siyanobakteri Suşlarının Moleküler Tayini

Yüksek EPS üreticisi olan suşlardan 55 ve 72 kodlu Siyanobakteri suşlarının 16S rRNA gen bölgesi baz alınarak moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. NCBI veri tabanı kullanılarak edilen sonuçlara göre, 55 kodlu suş %99,72 benzerlikle *Chlorogleopsis fritschii*, 72 kodlu suş ise %98,91 benzerlik ile *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* olarak belirlenmiştir (**Tablo 4.2.**).

Klasik yöntemlerle morfolojiye dayalı olan taksonomik sınıflandırmada örneklerin *Chroococcus* sp. (55) ve *Phormidium* sp. (72) olarak belirlenmesine rağmen moleküler tayinde 55 kodlu suş, *Chlorogleopsis fritschii* olarak, 72 kodlu suş ise *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* olarak tespit edilmiştir. Bu da moleküler tayinin günümüzde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ile birlikte 16S rRNA dizilemenin kolaylaşması ve veri tabanlarının genişlemesi ile siyanobakterilerin taksonomik sınıflandırılması yeni bir döneme girmiştir (Osorio-Santos vd., 2014; Strunecký vd., 2023). Siyanobakterilerin sınıflandırmasında kullanılan morfolojik kriterlerin uygulanmasındaki temel sorunlar, çevresel koşullara göre değişen morfolojik özellikler, benzer morfoloji sergileyen ancak farklı filogeniye sahip türlerin varlığı ve moleküler verilere dayalı olarak aynı klase ait olan ancak farklı morfoloji veya ekoloji sergileyen türlerin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır (Jasser vd., 2022). Literatürde morfolojik özelliklerin temel alındığı sınıflandırma yöntemlerinin

tek başına yeterli olamayacağı ve moleküler yöntemlerin de taksonomik çalışmalara dahil edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Jasser vd., 2022; Komárek, 2016; Wang vd., 2021).

Tablo 4.2. Seçilen siyanobakteri suşlarının, moleküler tanımlanması

Suş Kodu	Blast Sonucu Elde Edilen Tür Adı	Benzerlik %'si
55	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i>	99,72
72	<i>Pseudanabaenaceae cyanobacterium</i>	98,91

4.5. Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu

Mikrobiyal EPS'lerin yapısal özellikleri, özellikle şeker kompozisyonu, ile fonksiyonel özellikleri arasında doğrudan veya dolaylı bir ilişki olduğu düşünüldüğünden siyanobakteri suşları tarafından üretilen EPS'lerin yapısal karakterizasyonu önem arz etmektedir (Tukenmez vd., 2019; Sungur vd., 2017). Bunun için çalışma kapsamında, üretilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonları, fonksiyonel grupları ve kristalografik özellikleri belirlenmiştir.

4.5.1. Monosakkarit Kompozisyonları

Çalışmada elde edilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Sonuçlar **Tablo 4.3.**'de verilmiştir. HPLC kromatogramlarına dayanarak, siyanobakteri EPS'lerinin farklı oranlarda, ramnoz, glikoz, arabinoz, mannoz, xyloz ve galaktoz içerdiği bulunmuştur. Her iki EPS örneğinde de en baskın monosakkaritin ramnoz olduğu görülmüştür. 55 numaralı EPS örneğinin monosakkarit içeriğinde %70,82 oranında ramnoz ve %19,90 oranında glikoz en fazla bulunurken xyloz ve galaktoz ise sırasıyla %2,05 ve 0,79 ile en az bulunan şekerlerdir. 72 numaralı EPS örneğinde ise, %89,03 ramnoz ve %5,44 oranında glikoz bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmada kullanılan siyanobakterilerin her ikisinin de heteropolisakarit yapıda EPS ürettiği görülmüştür ancak üretilen EPS'lerin karbonhidrat kompozisyonları türe göre farklılık göstermektedir.

Tablo 4.3. Liyofilize EPS'lerin HPLC analizi ile belirlenen monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları

Suş Kodu	EPS'lerin Monosakkarit Kompozisyonu (%)					
	Ramnoz	Glikoz	Arabinoz	Mannoz	Xyloz	Galaktoz
55	70,82	19,90	3,44	3,00	2,05	0,79
72	89,03	5,44	1,97	2,13	1,03	0,41

Literatürde çalışılan siyanobakteri EPS'lerinin şimdiye kadar tanımlanmış 6-12 farklı türde monosakkaritten oluşan kompleks heteropolisakkaritlerden oluştuğu bulunmuştur (Rossi & Philippis, 2016; Han vd., 2014; Jindal vd., 2013). Bizim sonuçlarımız da bunu doğrulamaktadır. *Chlorogloeopsis fritschii* 'nin (55) EPS'si ile ilgili daha önce yapılan bir çalışma mevcut değildir. Sadece, cins düzeyinde belirlenen *Chlorogloeopsis* sp. 6912 suşundan elde edilen EPS ile yapılan bir çalışma bulunmaktadır. Bu yayında ortama salınan polisakkaritin monosakkarit bileşiminde en yüksek glikoz ve mannoz (26,4:21,6 molar) tespit edilmiştir (Nicolaus vd., 1999). *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) EPS'si ile cins ya da tür seviyesinde yapılan bir çalışma bulunmamaktadır; ilk defa bu tez kapsamında çalışılmıştır. Literatürde çalışılmış olan diğer siyanobakteri EPS'lerine bakıldığında genellikle en yüksek oranda bulunan monosakkaritin glikoz olduğu görülmektedir (Li vd., 2001; Pereira vd., 2019).

Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Ohki vd. (2014), *Cyanothece* sp. suşundan izole ettikleri EPS'nin yüksek oranda ramnoz ve glikoz içerdiğini rapor etmişleridir (Ohki vd., 2014). GC-MS ile tespit ettikleri monosakkarit kompozisyonu 38,6:13,8:4,8:4,8:2,4:3,5:2,0:0,6:6,5 molar oranla ramnoz, glukoz, galaktoz, ksiloz, mannoz, fukoz, arabinoz, riboz ve bilinmeyen şeker olarak belirtilmiştir. Başka bir çalışmada, *Anabaena* sp. CCC745 EPS'inin heteropolisakkarit olduğu ve glikoz, ksiloz, ramnoz ve glukuronik asitten oluştuğu gösterilmiştir (Tiwari vd., 2019). Diğer prokaryotlardan farklı olarak siyanobakteriyel EPS'lerin çoğunda, yoğun olarak ramnoz gibi pentoz şekerlerin bulunduğu vurgulanmıştır. *Nostoc commune*, *Scytonema javanicum* ve *Phormidium ambiguum* EPS'lerinin sıvı ortamda yetiştirilirken gösterdikleri polisakkaridik matriks özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *N. commune* ve *P. ambiguum* EPS'lerinin şeker içeriği açısından benzer bir profil gösterdiği, *S. javanicum* EPS'sinin ise farklı olduğu gözlenmiştir (Chamizo vd., 2020).

S. javanicum ve *P. ambiguum* için ana monosakkarit bileşeni glikoz iken (sırasıyla %63,5 ve %35,4), *N. commune* EPS'sinin ana şeker bileşeni ksiloz olarak rapor edilmiştir.

Nicolaus vd. (1999), standart koşullar altında yetiştirdikleri heterosistöz siyanobakteriler arasında en iyi EPS üreticisi olan *Chlorogloeopsis* sp. 6912 tarafından ortama salınan polisakkaritin şeker bileşiminde en yüksek glikoz ve mannoz (26,4: 21,6) bulunduğunu tespit etmişlerdir (Nicolaus vd., 1999). EPS'nin, glikoz ve mannozun yanı sıra, galaktoz (14,5), fukoz (5,0), ramnoz (2,9) ve arabinoz (1,0) da içerdiği bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan türlerden biri (55) ile aynı cins olmasına rağmen, ürettikleri EPS'lerde baskın olan monomerler farklılık göstermektedir. Bu da türler arasında üretilen EPS'lerin bileşenlerinin farklı olabileceğini ve EPS'ler tür hatta suş bazında çalışmanın önemini göstermektedir.

Türe göre farklılık gösteren EPS kompozisyonunun, EPS'nin hem yapısal hem de fonksiyonel özellikleri üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Han vd., 2014; Ye vd., 2016; Rashmi vd., 2021). *Nostoc flagelliforme* EPS'sinin fizikokimyasal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada EPS'nin monosakkarit bileşiminde hidrofobik gruplardan olan ramnoz ve fukoz monomerlerinin bulunmasının, polisakkaritlerin emülsifiye edici özelliğine katkıda bulunduğu vurgulanmaktadır (Han vd., 2014). Tek hücreli bir deniz siyanobakterisi olan *Synechococcus elongatus* EPS'nin uranyum adsorpsiyonu ve yağların emülsifikasyonu üzerine etkisini araştıran bir çalışmada ise, *S. elongatus* kültür filtratının, biyosürfaktan özelliği sergilediği ve EPS'deki üronik asit ve ramnoz şekerinin varlığı nedeniyle petrolle kararlı bir emülsiyon oluşturduğu rapor edilmiştir (Rashmi vd., 2021).

Selenyum açısından zenginleştirilmiş kültür ortamı kullanılarak elde edilen *Pseudomonas* PT-8 (Se-EPS) EPS'sinin fizikokimyasal özelliklerinin ve antioksidan aktivitelerinin normal kültür ortamından elde edilen EPS'nin özellikleri ile kıyaslandığı bir çalışmada, Se-EPS ve EPS'lerin benzer monosakkarit bileşenlerine sahip olmalarına rağmen ramnoz içeriklerinin farklı olduğu görülmüştür (Ye vd., 2016). Yüksek ramnoz içeriğine sahip EPS'nin, orijinal formuna kıyasla gelişmiş antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Polisakkaritlerin antioksidan özelliklerinin, bileşimdeki farklı monosakkaritlerin oranına bağlı olduğu; bunların arasında, antioksidan özelliklerle ilişkili en önemli faktörün ise ramnoz olduğu belirtilmiştir.

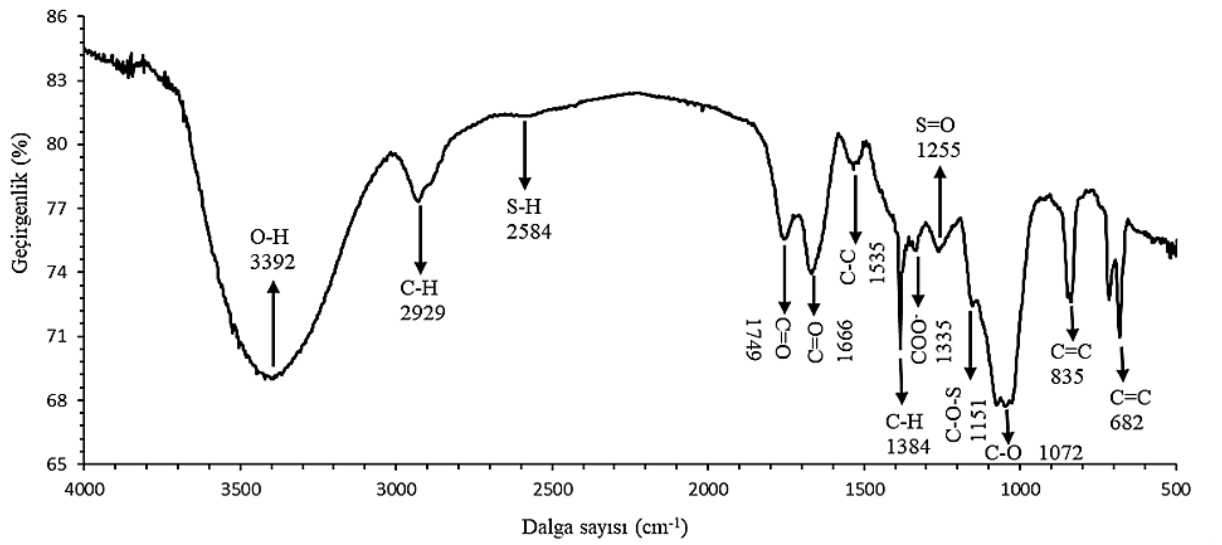
4.5.2. FT-IR

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) ile EPS'lerin fonksiyonel gruplarının tayini yapılmıştır. Analiz sonuçları **Şekil 4.6 ve Şekil 4.7.**'de verilmiştir.

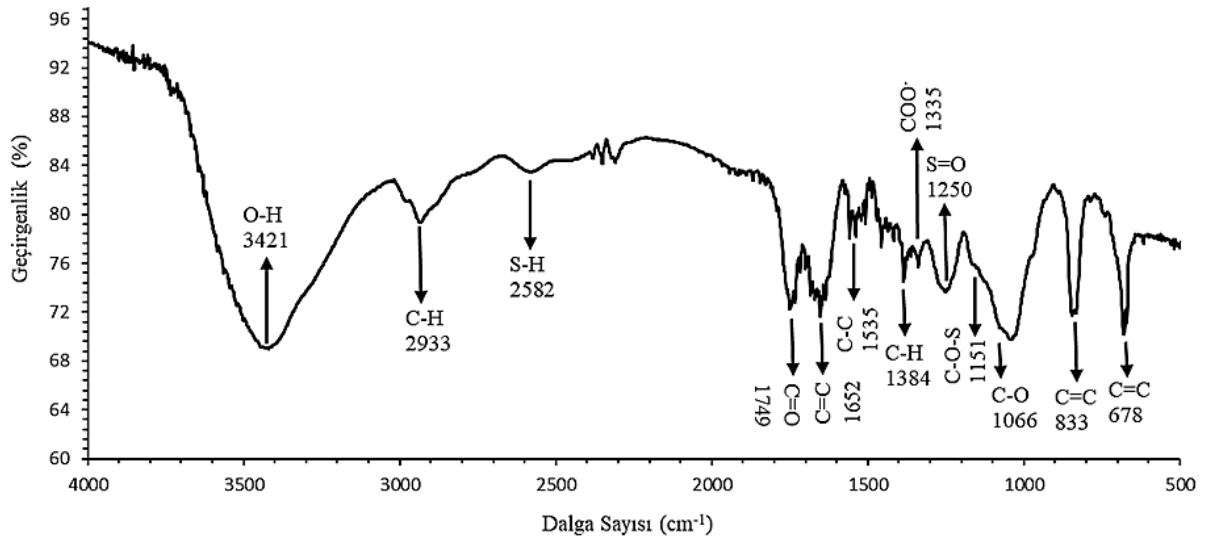
Elde edilen sonuçlara bakıldığında, her iki örnek için de 3550-3201 cm^{-1} arasında yer alan geniş bant hidroksil (-OH) gruplarının gerilme titreşimini temsil etmektedir. Oluşan geniş bant 55 kodlu örnek için en yüksek piki 3392 cm^{-1} 'de gösterirken 72 kodlu örnek için 3421 cm^{-1} 'de göstermektedir. Hidroksil gruplarının gerilme titreşimine bağlı bu pik bir karbonhidrat halkasına ait karakteristik pik olarak kabul edilmektedir (Sirin & Aslim, 2021). 2999-2841 cm^{-1} arasında oluşan bantlar C-H grupların (metil ve metilen) gerilme titreşimini temsil etmekte olup, 55 kodlu örnek için en yüksek pik 2929 cm^{-1} 'de elde edilirken 72 kodlu örnek için 2933 cm^{-1} 'de elde edilmiştir. Ayrıca her iki örnek için 1384 cm^{-1} 'de görülen bant C-H bükülme titreşimlerini temsil etmektedir. Gözlemlenen bu orta bükülme bandı CH_2 veya CH_3 bükülmesinin karakteristliğidir, bunların hepsi karbonhidratlar için tipik bantlardır. 1749 cm^{-1} civarında görülen gerilme bandı ester karbonil gruplarının gerilmesinden kaynaklı C=O gerilme titreşimini temsil etmektedir. 1685-1650 cm^{-1} arasında oluşan bant C=O grubunun gerilme titreşimini temsil etmektedir. 1580 – 1500 cm^{-1} arasında yer alan bandın aromatik bileşenlerden kaynaklı C-C bağı titreşimine ait olduğu tespit edilmiştir. Her iki spektrumda 1335 cm^{-1} 'de görülen bant karboksilat grupları (RCOO^-) temsil etmektedir. 1300 – 1170 cm^{-1} arası bölgede yer alan bantların alifatik esterleri ve aromatik esterleri temsil ettiği saptanmıştır. Spektrumda 1200 – 800 cm^{-1} arasında yer alan bantların polisakkaritlerin karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu özelliğinden ötürü bölgenin polisakkaritlerin parmak izi bölgesi olarak kabul edilir (Sirin & Aslim, 2021). En yüksek piki 1070 cm^{-1} civarında tespit edilen bu bant polisakkaritlerin C-O bağının gerilme titreşimini temsil etmektedir. 55 kodlu örneğin spektrumunda 835 cm^{-1} 'de ve 72 kodlu örneğin spektrumunda 833 cm^{-1} 'de yer alan bandın C=C gerilme titreşimini temsil ettiği görülmektedir. Ayrıca spektrumlarda 682 cm^{-1} 'de (55 kodlu suş için) ve 678 cm^{-1} 'de (72 kodlu suş için) yer alan bantların da C=C gerilme titreşimi temsil ettiği görülmektedir. Bu C=C gruplarının α -D glukoz bağlarının germe titreşiminden kaynaklı olduğu kabul edilebilir (Sirin & Aslim, 2020).

Elde edilen spektrumlardan yapı içerisinde oluşabilecek kükürt bağlı gruplar sorgulandığında; 1250 cm^{-1} 'de oluşan pikin asimetric S=O bağının germe titreşimini temsil ettiği ve bu bağın sülfatlanmış polisakkaritlerden kaynaklı sülfat ester O-SO_3^-

gruplarının yapıya katkısını temsil ettiği belirlenmiştir (Delattre vd., 2016; Liu vd., 2018; Mota vd., 2013). 55 kodlu örneğin spektrumunda 1151 cm^{-1} 'de görülen bandın asimetrik ve simetrik C-O-S titreşimine ait olduğu saptanmıştır. Bu sonuç sülfat gruplarının varlığını kanıtlamaktadır (Hussein vd., 2015; Mota vd., 2013; Şentürk & Yılmaz, 2020). Bu bant 72 kodlu örneğin spektrumunda aynı bölgede geniş bir bant olduğundan net olarak tespit edilememiştir. Diğer güçlü bir bulgu ise, her iki spektrumda da $2600 - 2550\text{ cm}^{-1}$ arasında oluşmuş tiyol gruplarına bağlı S-H gerilme titreşimine ait zayıf sinyalli bir bant görülmektedir (Ohki vd., 2014). Ayrıca 1070 cm^{-1} civarında görülen pikin SO_3 grubunu temsil edilebileceği de belirlenmiştir (Abdel-wahab vd., 2022).



Şekil 4.6. 55 kodlu suştan izole edilen EPS'nin FT-IR spektrumu



Şekil 4.7. 72 kodlu suştan izole edilen EPS'nin FT-IR spektrumu

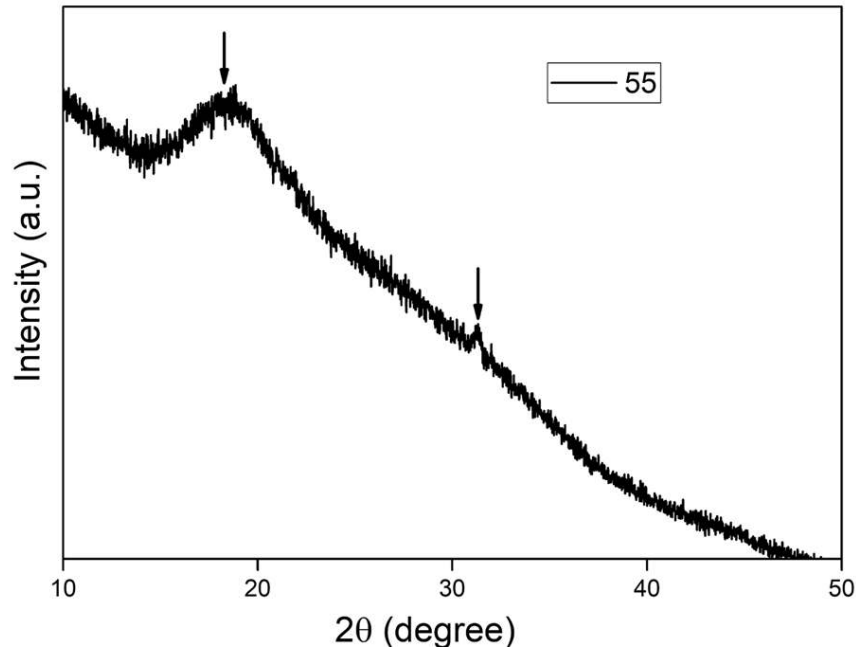
Amin (-NH) ve amid (-C=ON=) gruplarının varlığına bakıldığında; amin gruplarının 1400 cm^{-1} civarında ve amide gruplarının 1530 cm^{-1} civarında yer alan bantlar ile temsil edilebilecekleri belirlenmiştir. Amin ve amid gruplarının varlığı yapının sadece polisakkarit olmadığı aynı zamanda peptidleri ve proteinleri de içerdiği şeklinde yorumlanabilir (Mota vd., 2013).

EPS yapısında bulunan fonksiyonel grupların varlığının suşa göre farklılık gösterebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ohki vd., 2014; Şentürk & Yılmaz, 2020). Ayrıca EPS'lerin hidroksil, amino, karbonil ve karboksil grupları gibi fonksiyonel grupları, antioksidan aktivitelerinden sorumlu tutulmuştur (H. Li vd., 2017; Sathiyarayanan vd., 2017). EPS'lerin aynı zamanda sülfat grubu içerebileceği çeşitli çalışmalarca rapor edilmiştir (Liu vd., 2018; Mota vd., 2013; Şentürk & Yılmaz, 2020). Bizim çalışmamızda kullanılan EPS'lerin de sülfat ilişkili pikler verdiği görülmüştür. Yapısında sülfat grubu bulunan polisakkaritlerin anyonik karakterleri etkileneceğinden metal iyonlarına bağlanabileceği ve metal bağlama kapasitelerini arttırabileceği gösterilmiştir (Kailasam vd., 2022; Şentürk & Yılmaz, 2020). Aynı şekilde, polimerlerin sülfat içeriği ile anti-oksidadif ve anti-koagülan aktiviteleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Parwani vd., 2014).

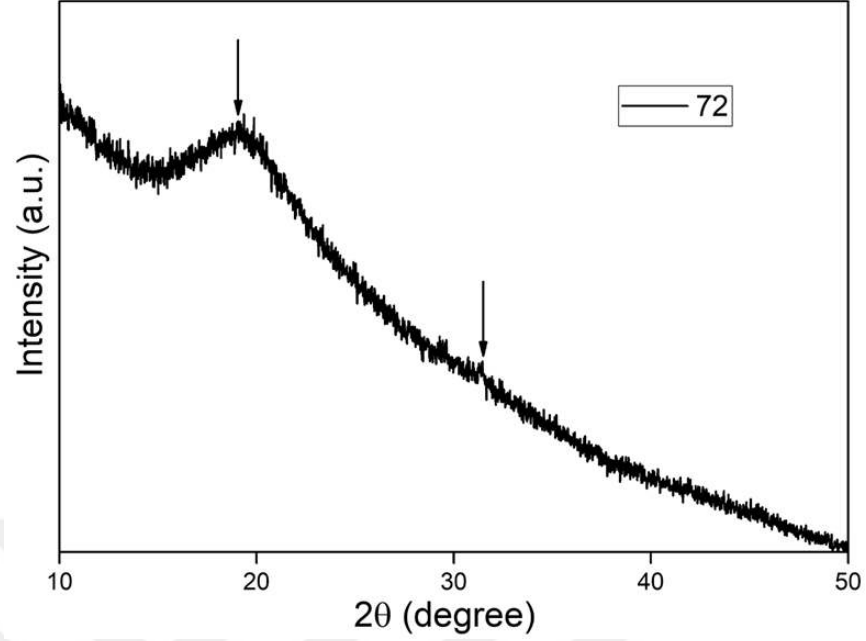
4.5.3. XRD

X-Işınları kırınımı (XRD), malzemelerin faz tanımlanmasında kullanılan yaygın bir tekniktir (Singh vd., 2011). 55 ve 72 kodlu örneklerin kristalografik özelliklerinin karakterizasyonu için XRD analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar **Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.**'da verilmiştir. Yapıların $18,50^\circ$ 'de merkezlenmiş geniş bir pike sahip olduğu görülmektedir. Bu da her iki örneğin büyük ölçüde amorf yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Mikrobiyal EPS'lerin literatürde çoğunlukla amorf yapıda olduğu görülmüştür (Mathivanan vd., 2021; Sirin & Aslim, 2020). Amorf yapıda olan polimerlerin, amorf olmayan yani güçlü kristalin yapı gösteren polimerlere göre daha üstün biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Singh vd., 2011). Bakteriyel EPS'nin metal detoksifikasyonunun incelendiği bir çalışmada, EPS'nin metal dekompozisyonunda amorf yapının etkisinin olabileceği ifade edilmiştir (Mathivanan vd., 2021).

Kristalografik özelliklerinin yanı sıra, 55 kodlu örneğin XRD deseninde $31,34^\circ$ 'de çok zayıf bir pik olduğu görülmektedir. Bu pikin yapı içerisinde yer alması olası kükürt bağlı gruplardan kaynaklı olduğu öngörülmektedir. Bu yorumun kesin olarak yapılabilmesi için elde edilen analizlere ek olarak örneklerin X-ışınları Floresans Spektrometresi (XRF) veya Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) – Enerji Dağılımı Spektrometresi (EDS) ile elementel analizinin yapılması gerekmektedir.



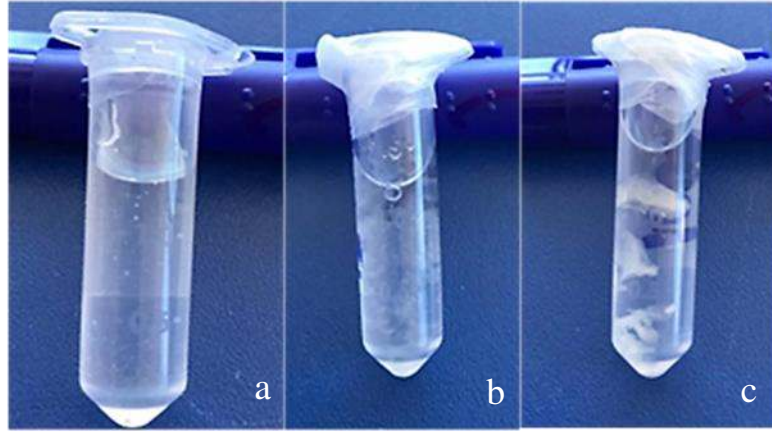
Şekil 4.8. 55 kodlu suştan izole edilen EPS'nin XRD deseni



Şekil 4.9. 72 kodlu suştan izole edilen EPS'nin XRD deseni

4.6. Liyofilize EPS'nin Çözünürlüğü

Chlorogloeopsis fritschii (55) ve *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) suşlarından ilk defa izole edilen EPS'lerin çeşitli çözücülerde çözünürlüğü (distile su, etanol, metanol, kloroform, aseton, DMSO) belirlenmiştir. EPS'ler DMSO içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip iken distile su içerisinde kısmen çözünürlük göstermiştir (**Şekil 4.10.**). Metanol, etanol, aseton, klorofom içerisinde ise hiç çözünme göstermemiştir. Ancak DMSO ile karıştırıldıklarında çözünme sağlanmıştır. Polisakkaritlerin yapısındaki hidrofilik ve hidrofobik grupların dağılımı, farklı çözücülerdeki çözünürlüğün belirlenmesinde önemli bir faktör olmaktadır (Genc vd., 2021). EPS monosakkarit bileşiminin dikkat çeken bir diğer özelliği de hidrofobik gruplar olan fukoz ve ramnoz gibi deoksi şekerlerinin varlığıdır (Han vd., 2014). Bu hidrofobik grupların varlığı, polisakkaritlerin emülsifiye edici özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır. Tez kapsamında çalışılan EPS'lerin monosakkarit kompozisyonlarında (**Tablo 4.3.**) çözünürlüğü etkileyen ramnozun oldukça yüksek çıkması EPS'lerin çoğu çözücüde çözünmeyişini açıklamaktadır.



Şekil 4.10. EPS'nin çözünürlüğü. a) tam çözünme, b) kısmen çözünme, c) çözünmeme.

4.7. Liyofilize EPS'lerin Fonksiyonel Özellikleri

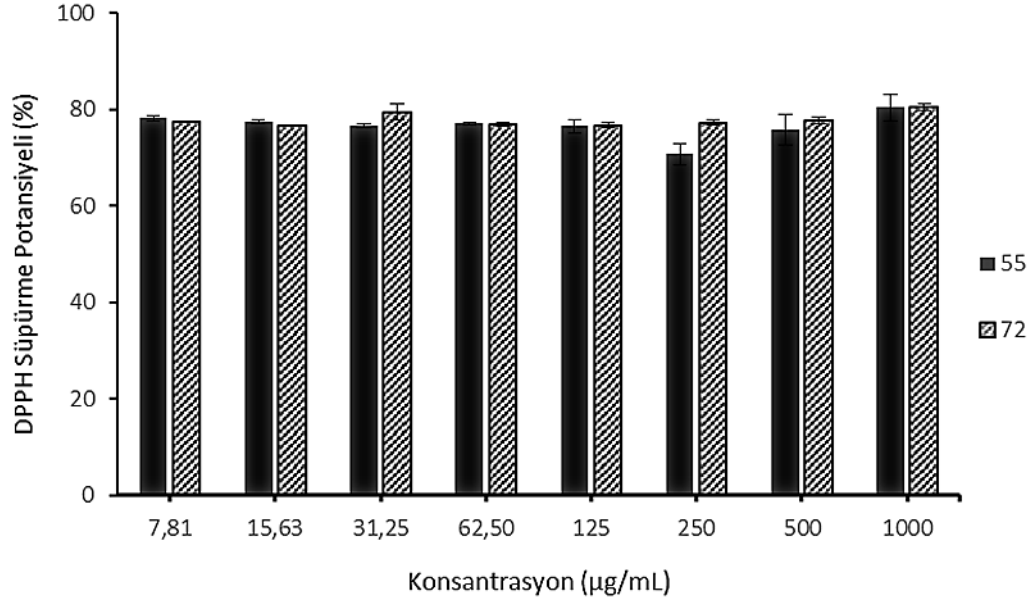
4.7.1. Antioksidan Potansiyeli

Bu çalışmada siyanobakteri suşlarından izole edilen, farklı konsantrasyondaki (0-1000 µg/mL) EPS'lerin anti-oksidan potansiyelleri DPPH serbest radikalının süpürme potansiyeli, indirgenme gücü, hidrojen peroksit temizleme potansiyeli ve total antioksidan tayini ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda indirgeme gücü ve hidrojen peroksit temizleme potansiyeli testlerinde anlamlı sonuçlar elde edilemediği için DPPH ve total antioksidan sonuçları verilmiştir. Literatürde *Chlorogloeopsis fritschii* (55) ve *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) türlerine ait cins ya da tür seviyesinde herhangi bir anti-oksidan aktivite çalışması mevcut değildir ve ilk defa bu tez kapsamında çalışılmıştır.

Liyofilize EPS'lerin farklı konsantrasyonlarda (7,81-1000 µg/mL) DPPH serbest radikalını süpürme potansiyeli, Blois (1958) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. DPPH radikali, kararlı bir serbest radikal olduğundan dolayı anti-oksidanların serbest radikal süpürme aktivitelerini tahmin etmek için yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir (Dilna vd., 2015). DPPH radikalleri temizlendiğinde reaksiyon karışımının rengi mordan sarıya değişirken 517 nm'deki absorbansı da azalmaktadır. DPPH süpürme potansiyelinin, EPS'de serbest radikalleri daha kararlı bir forma indirmek için elektron veren hidroksil grubu ve diğer fonksiyonel grupların varlığından kaynaklandığı öngörülmektedir (Shen vd., 2013; Nainangu vd., 2020).

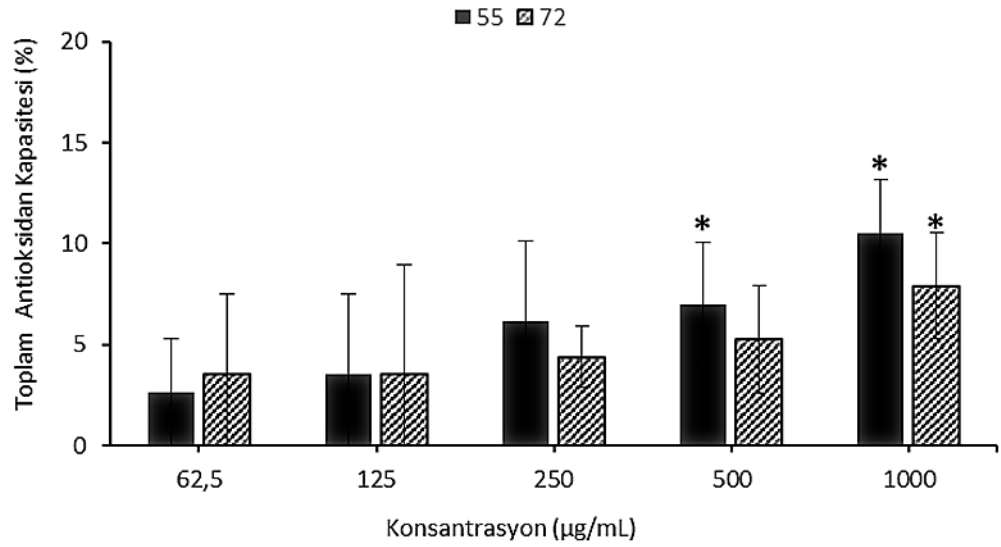
55 ve 72 kodlu suşların EPS'leri en yüksek 1000 µg/mL konsantrasyonda %80 DPPH süpürme potansiyeli göstermiştir (**Şekil 4.11.**). Analiz sırasında kullanılan diğer

konsantrasyonlarda ise 55 ve 72 kodlu suşların EPS'leri sırasıyla %71-78 ve %77-79 arasında değişen DPPH süpürme potansiyeli sergilemiştir.



Şekil 4.11. EPS örneklerinin DPPH süpürme potansiyeli değerleri. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Liyofilize EPS'lerin toplam antioksidan aktiviteleri ise Mitsuda (1996) yöntemi ile belirlenmiştir. EPS'nin 695 nm'de maksimum absorbans gösteren fosfor molibdin indirgeme kabiliyeti tespit edilmiştir. EPS'lerin ikisi de artan konsantrasyonlarda toplam antioksidan aktivite göstermişlerdir. 55 kodlu suşun (*Chlorogloeopsis fritschii*) ürettiği EPS'nin 1000 µg/mL konsantrasyonda toplam antioksidan aktivitesi %11 iken 72 kodlu suşun (*Pseudanabaenaceae cyanobacterium*) ürettiği EPS'nin en yüksek toplam antioksidan aktivitesi %8 olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.12.**).



Şekil 4.12. EPS örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi değerleri. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Yıldız ile işaretlenmiş değerler, T-testi kullanılarak negatif kontrolden istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) temsil etmektedir.

Literatürde *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) suşlarının ait anti-oksidan aktivite çalışmaları bulunmamasına rağmen diğer siyanobakteri türlerinin ürettikleri EPS'lerin anti-oksidan aktivitelerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hussein vd., 2015). Glikoz ve Xylozdan oluşan *Nostoc carneum* EPS'si ile yapılan bir çalışmada, EPS, DPPH süpürme aktivitesi göstermiştir ancak oldukça yüksek konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Yaklaşık 32 mg/mL konsantrasyonda en fazla %40-50 arası bir süpürme aktivitesi göstermiştir.

Farklı kültür koşulları altında yetiştirilen (normal, tuz stresi ve mikсотrofik kültür) *Nostoc flagelliforme* EPS'si 2,5 mg/mL konsantrasyonda %57,73-43,54 arasında değişen DPPH süpürme aktivitesi göstermiştir (Shen vd., 2018). EPS'lerin anti-oksidan aktiviteleri arasında ortaya çıkan farklılığın, kültür koşullarına bağlı olarak EPS'lerin içerdiği değişen ramnoz ve üronik asit oranlarına bağlı olabileceği rapor edilmiştir. Bu durum çalışmamızda yüksek oranda ramnoz içeren EPS'lerin düşük konsantrasyonlarda yüksek DPPH süpürme aktivitesine sahip olmasını açıklamaktadır.

Weissella confusa EPS'nin karakterizasyonunun yapıldığı ve anti-oksidan kapasitesinin incelendiği bir çalışmada, 10 mg/mL konsantrasyonda yaklaşık %70 DPPH

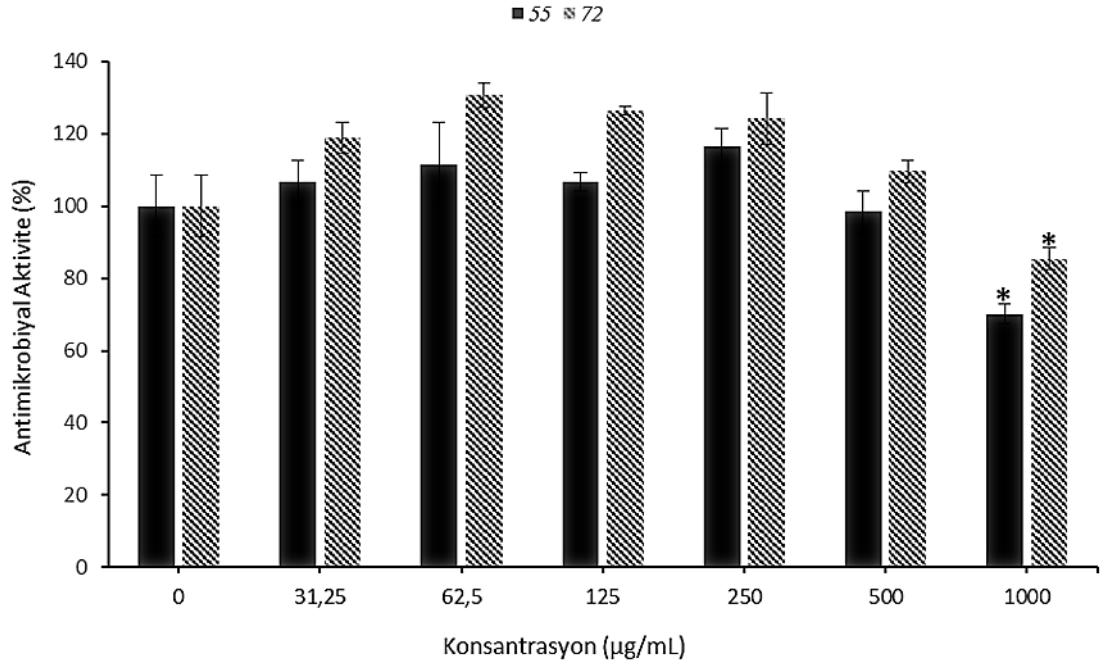
süpürme aktivitesi gösterirken, total antioksidan kapasitesi %1.8 bulunmuştur (Adebayo-Tayo vd., 2018).

Yeni yapılan bir çalışmada *Gloeocapsa gelatinosa* EPS'nin DPPH radikallerini nötralize etme kabiliyeti test edilmiştir (Gongi vd., 2022). *G. gelatinosa* EPS'si yine oldukça yüksek konsantrasyonlarda (200-2000 mg/L) %60-95 arasında bir DPPH süpürme aktivitesi göstermiştir. Polisakkaritlerin yapısında bulunan O-H bağının zayıf ayrışma enerjisi, EPS'lere serbest radikallerin stabilizasyonunda H- bağışlamada potansiyeli sağladığı kanısına varılmıştır. *Anabaena sp.* CCC746 EPS' sinin toplam antioksidan potansiyelinin test edildiği başka bir çalışmada ise EPS'nin orta düzeyde toplam antioksidan potansiyelinin varlığı saptanmıştır ve bunun ise EPS'nin biyokimyasal bileşimine ve şeker içeriğine bağlı olduğu rapor etmişlerdir (Tiwari vd., 2020).

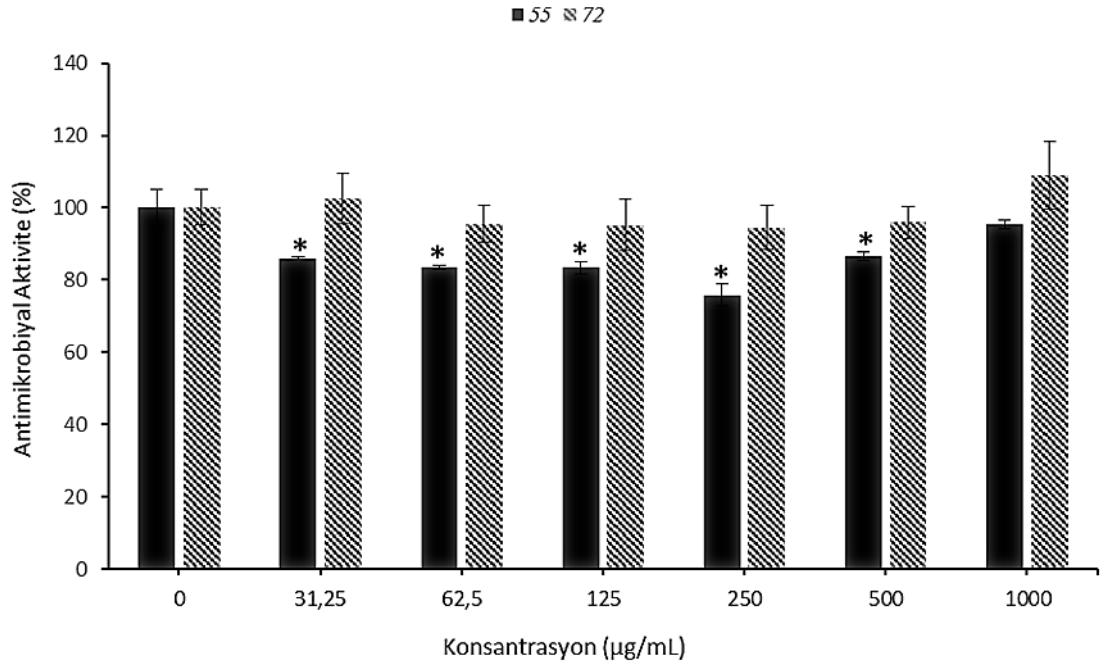
Son olarak yeni yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* EPS'si yaklaşık 90 µg/mL'lik bir konsantrasyonda %62 oranında DPPH süpürme aktivitesi göstermiştir ve EPS'nin sahip olduğu OH, C=C, C=O, C-O-C gibi fonksiyonel grupların, anti-oksidan ve anti-tümör aktivitelere katkısının olduğu belirtilmiştir (L. Zhang & Yi, 2022).

4.7.2. EPS'nin Antimikrobiyal Aktivitesi

Liyofilize EPS'lerin anti-mikrobiyal aktivitesi için, test mikroorganizması olarak gram pozitif bakteri için *Staphylococcus aureus* ATCC25923, gram negatif bakteri için *Escherichia coli* 35215, ve mantar içinde *Candida albicans* 10231 suşları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyondaki (0-1000 µg/mL) siyanobakteri EPS'lerinin bu patojenler üzerindeki anti-mikrobiyal etkisi mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayininde, çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda EPS'ler test mikroorganizmaları üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ancak büyümelerini inhibe edici bir etki gösterdiği görülmüştür. 55 ve 72 kodlu suşların EPS'leri, *E. coli* suşunun büyümesini sırasıyla %30 ve 15 azaltırken *C. albicans*'ın büyümesini %7-5 ve 28-10 arasında azaltmıştır. *S. aureus*'u sadece 55 kodlu suşun EPS'si %24-13 arasında büyümesini azaltmıştır (**Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15.**).

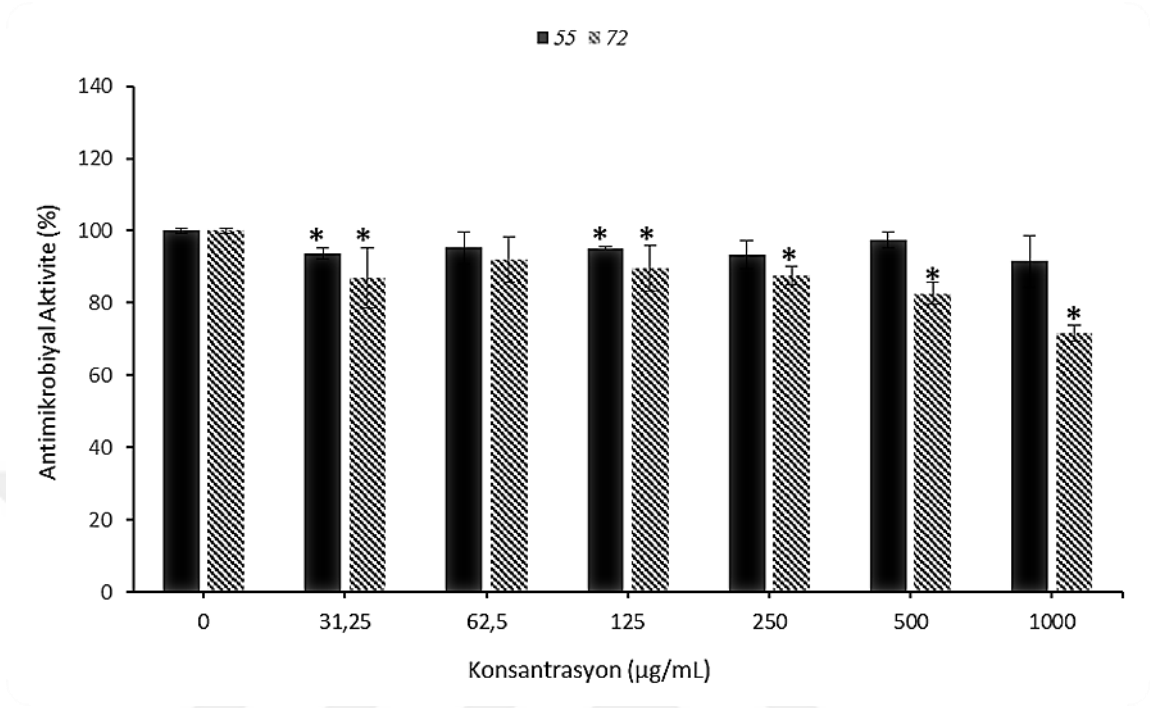


Şekil 4.13. EPS örneklerinin *Escherichia coli* büyümesi üzerindeki etkisi. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Yıldız ile işaretlenmiş değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) temsil etmektedir.



Şekil 4.14. EPS örneklerinin *Staphylococcus aureus* büyümesi üzerindeki etkisi. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade

edilmiştir. Yıldız ile işaretlenmiş değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) temsil etmektedir.



Şekil 4.15. EPS örneklerinin *Candida albicans* büyümesi üzerindeki etkisi. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Yıldız ile işaretlenmiş değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) temsil etmektedir.

Literatürde *Chlorogloeopsis fritschii* (55) ve *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) türlerine ait cins ya da tür seviyesinde bir anti-mikrobiyal aktivite çalışmaları bulunmamaktadır. Literatürde çalışılan diğer siyanobakteri EPS'lerine ait çalışmalarda anti-mikrobiyal aktivitenin suşa özgü farklılıklar gösterebileceği görülmüştür (Najdenski vd., 2013; Maruthanayagam vd., 2020).

Çalışmamıza benzer şekilde Maruthanayagam vd. (2020), iki farklı *Phormidium sp.* suşundan elde edilen EPS'lerin anti-mikrobiyal aktivitesini test patojenlerinin (*S. aureus*, *Bacillus subtilis* ve *C. albicans*) büyümeleri üzerindeki yüzde inhibisyonu şeklinde ölçmüşlerdir (Maruthanayagam vd., 2020). Oldukça yüksek konsantrasyonlarda (4 mg/ml) kullanılan *Phormidium sp.* EPS'lerinin ikisi de *B. subtilis* gelişimi üzerinde %11-13 arasında bir inhibisyon göstermiştir ancak diğer patojenler üzerindeki etkileri suşa bağlı olarak farklılık göstermiştir. EPS'lerden biri *S. aureus* gelişimini %86 oranında; *C.*

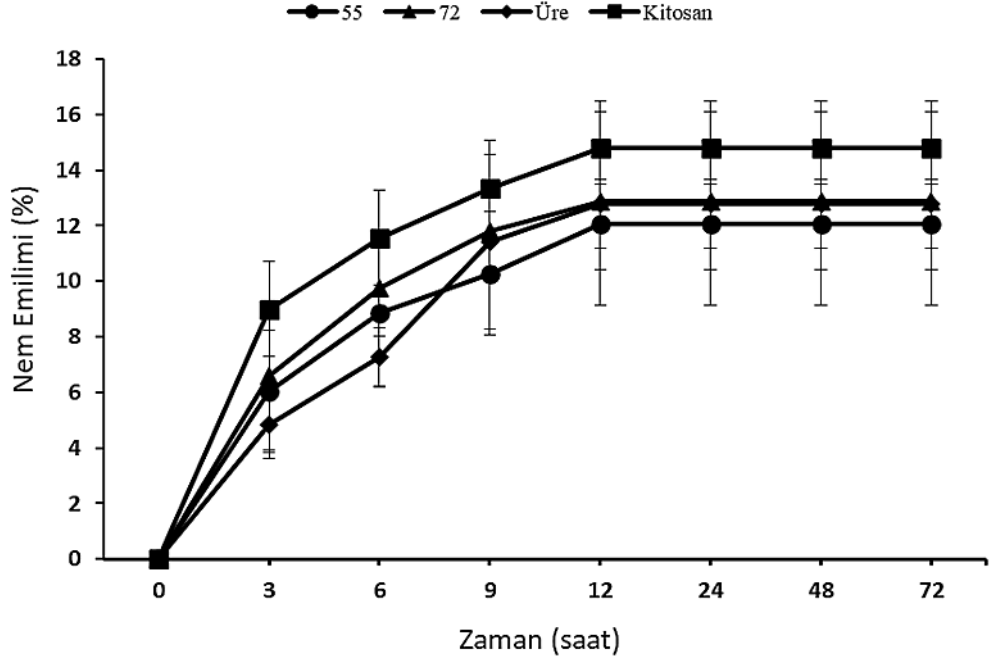
albicans büyümesini ise %4 oranında inhibe ederken, diğer suşun EPS'si ise hiçbir etki göstermemiştir.

Najdenski vd. (2013)'nin yaptığı bir çalışma dört siyanobakteri EPS'sinin çeşitli gıda patojenleri üzerindeki etkileri MİK ile belirlenmiştir (Najdenski vd., 2013). Elde edilen sonuçlarla anti-mikrobiyal etkinin tamamen türe özgü olduğu ve EPS'lerin patojenler üzerindeki büyüme inhibisyonu etkilerindeki farklılığın, farklı türdeki polisakkaritlerin farklı moleküler ağırlıkları, birincil yapıları, zincir konformasyonları ve yük özellikleri ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır.

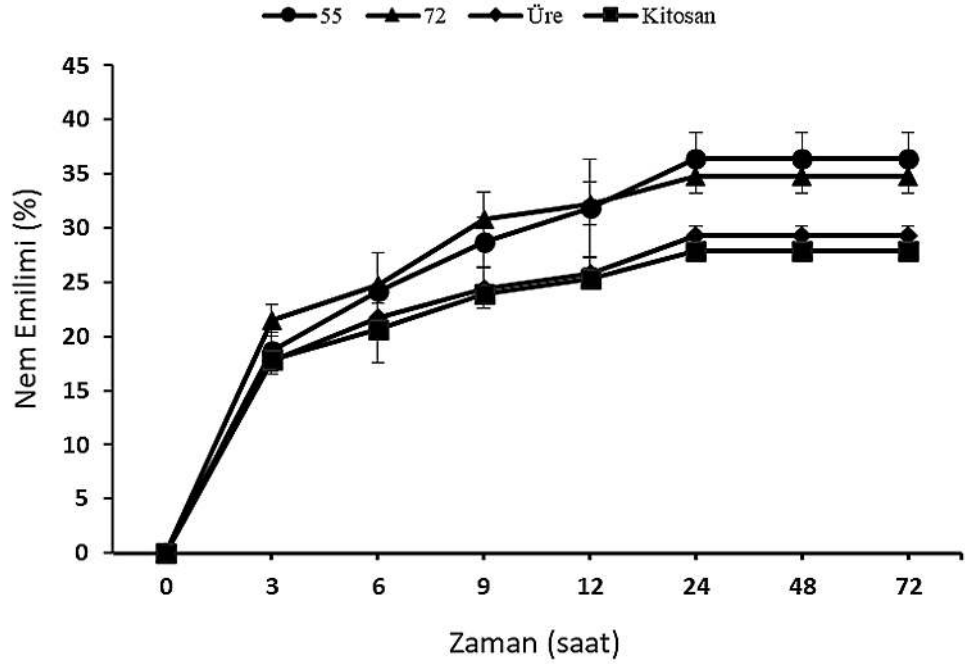
4.8. Liyofilize EPS'lerin Nem Emilim ve Nem Tutma Kapasitesi

Kozmetikte kullanılan bileşenlerin nem tutma kapasitesi oldukça önemli olmakla beraber cilt yaşlanmasına karşı da faydalı olabilmektedir (Chen vd., 2022). Kozmetikte kullanılan nemlendiriciler, transepidermal su kaybını önlemek için cildin nemini ve hidrasyonunu koruyabilen higroskopik bir maddedir. Siyanobakterilerin kozmetikte nemlendirici maddeler olarak potansiyel kullanımı, bu organizmaların dehidrasyona karşı, EPS üretimi ve atılımı yoluyla koruyucu mekanizmalara sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Morone vd., 2019). Tez kapsamında, siyanobakteri EPS'lerinin kozmetikte kullanım potansiyelinin bir parçası olarak, çalışmada yer alan siyanobakteri EPS'lerinin nem tutma ve nem emilim kapasiteleri araştırılmıştır.

Liyofilize EPS'lerin nem emilim kapasitesi, doymuş K_2CO_3 (%43 RH) ve $(NH_4)_2SO_4$ (%81 RH) çözeltileri içeren desikatörler kullanılarak tespit edilmiştir. EPS'lerin nem emilim kapasitesi, kozmetikte yaygın olarak kullanılan ve nem emilim kapasiteleri yüksek olan üre ve kitosan ile karşılaştırılmıştır. %43 RH (bağıl nem)'de, siyanobakteri EPS'leri, kitosan ve üreye göre benzer nem emilim kapasiteleri göstermiştir ($p>0,05$) (**Şekil 4.16.**) %81 RH (bağıl nem)'de, EPS'ler kitosan ve üreye göre daha güçlü nem emilim kapasitesi göstermiştir (**Şekil 4.17.**). Artan bağıl nem ile birlikte nem emme oranının da arttığı tespit edilmiştir. 55 ve 72 kodlu EPS'lerin sırasıyla nem emme oranları %43 RH' da 12 ± 2 , 13 ± 2 ve %81 RH' da 36 ± 2 , 35 ± 2 olmuştur.

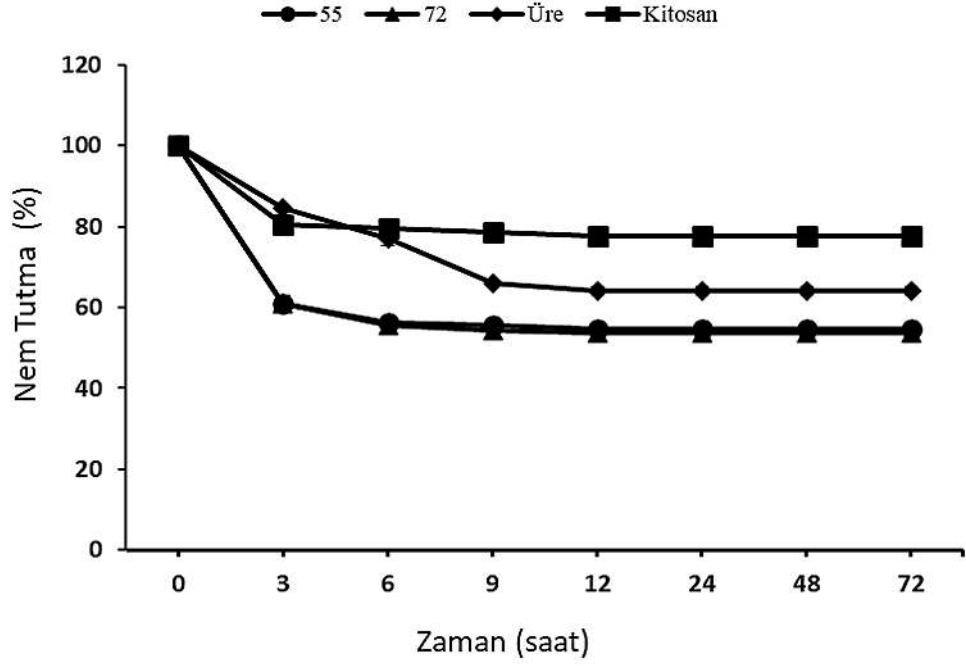


Şekil 4.16. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem emme kabiliyetleri. Kurutulmuş numuneler belirtilen süreler boyunca 25°C'de doymuş K_2CO_3 desikatör (%43 bağıl nem) içerisine yerleştirilmiştir. Nem Emilimi gravimetrik olarak incelenmiştir. Tüm analiz, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Tüm değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) test edilmiştir.

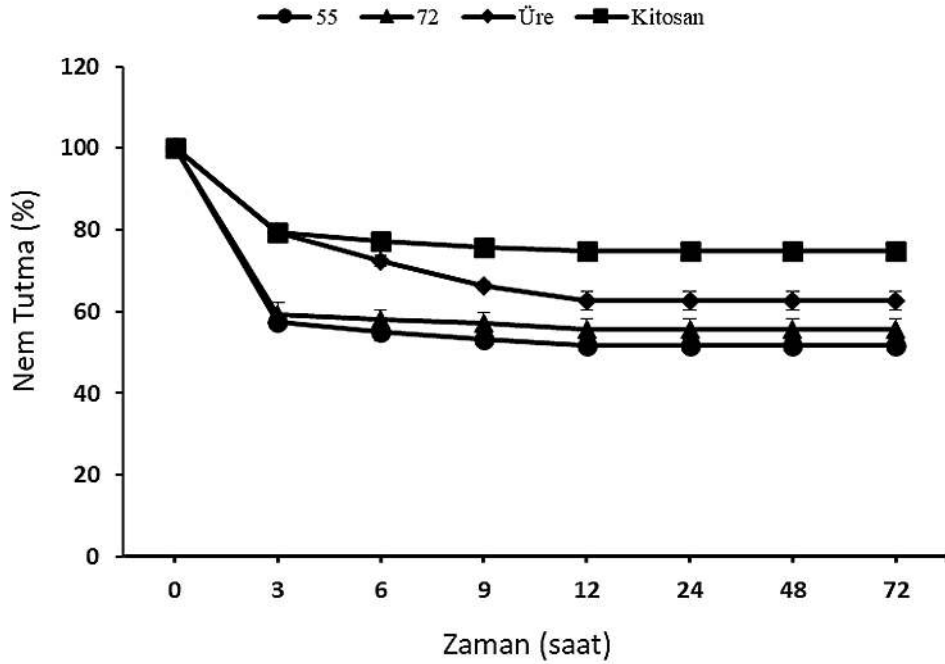


Şekil 4.17. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem emme kabiliyetleri. Kurutulmuş numuneler belirtilen süreler boyunca 25°C'de doymuş $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ desikatör (%81 bağıl nem) içerisine yerleştirilmiştir. Nem Emilimi gravimetrik olarak incelenmiştir. Tüm analiz, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Tüm değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) test edilmiştir.

Liyofilize EPS'lerin nem tutma kapasitesinin ölçümü için de, doymuş K_2CO_3 (%43 RH) ve silika jel içeren desikatörler kullanılmıştır. EPS'lerin nem tutma kapasitesi, üre ve kitosan ile karşılaştırılmıştır. %43 RH'da ve silika jelde, siyanobakteri EPS'leri kitosan ve üreye göre biraz düşük olmasına rağmen oldukça yüksek bir nem tutma kapasitesi göstermiştir (**Şekil 4.18.** ve **Şekil 4.19.**). Analiz sırasında, silika jeldeki tüm numunelerin su kaybı %43 RH'da olduğundan çok daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. 55 ve 72 kodlu EPS'lerin sırasıyla nem tutma oranları %43 RH'da 55 ± 1 ve 54 ± 1 ; silika jelde ise 52 ± 2 ve 56 ± 3 olmuştur.



Şekil 4.18. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem tutma kabiliyetleri. Islak numuneler belirtilen süreler boyunca 25°C'de doymuş K_2CO_3 desikatör (%43 bağıl nem) içerisine yerleştirilmiştir. Nem tutma gravimetrik olarak incelenmiştir. Tüm analiz, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Tüm değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) test edilmiştir.



Şekil 4.19. EPS örnekleri, kitosan ve üre'nin nem tutma kabiliyetleri. Islak numuneler belirtilen süreler boyunca silika jel bulunan desikatör içerisine yerleştirilmiştir. Nem tutma gravimetrik olarak incelenmiştir. Tüm analiz, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Tüm değerler, T-testi kullanılarak istatistiksel farklılığı ($P < 0,05$) test edilmiştir.

Chlorogloeopsis fritschii (55) (veya *Chlorogloeopsis* sp) *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72) (veya *Pseudanabaenaceae* sp) türlerinde çalışma olmamakla beraber literatürde siyanobakteri EPS'lerinin nem tutma ve nem emilim analizlerini içeren çalışma oldukça kısıtlıdır.

Nostoc commune EPS'sinin nem emilim ve nem tutma kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada (Li vd., 2011). %43 RH'da EPS'nin nem emilimi %10,1 iken, %81 RH'de %15,0 bulunmuştur. Nem tutma kapasitesinde, %43 RH'da nem tutma oranı %75,2 iken, silika jel de %28 tespit edilmiştir.

Siyanobakteri EPS'lerinin nem tutma ve nem emilim kapasitelerine dair yeterince çalışma bulunmadığından literatürde diğer mikrobiyal EPS'lere baktığımızda çalışmamızda yer alan siyanobakteriyel EPS'lerin oldukça yüksek nem emilim ve nem tutma kapasitesinin olduğu görülmektedir. *Zunongwangia profunda* SM-A87 EPS'nin nem emme oranları %43 RH'de $12,5 \pm 0,5$ ve %81 RH'de $28,8 \pm 2$ olarak bulunmuştur

(Sun vd., 2014). Diğer bir çalışmada ise, *Pseudomonas fluorescens* PGM37 EPS' nin nem tutma ve nem emilim kapasitesini incelemişlerdir (Zhao vd., 2013). %43 RH'da EPS'nin nem emilimi %12,82, %81 RH'de ise, %43 RH'deki numunelere benzer sonuç gösterdiği tespit edilmiştir. Silika jelde nem tutma kabiliyeti ise %34,1 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada, kullanılan EPS'lerle daha önce hiç çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, siyanobakteriyel EPS'lerin kozmetik sektöründe kullanılan materyallere yakın nem tutuma hatta daha iyi nem emilim kapasitesinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar kozmetik sektörü için oldukça anlamlı bulunmaktadır.

4.9. EPS'nin Tirozinaz İnhibisyon (Beyazlatma) Aktivitesi

Cilt pigmentasyonu, sürekli güneş ışığına maruz kalınması nedeniyle cilt hücrelerinde artan melanin sonucunda meydana gelmektedir (Nowruzi vd., 2020). Tirozinaz, melanin biyosentezinde yer alan bir enzimdir ve fazla güneş ışığına maruz kalınması sonucu melanine dönüşen melanozomların oluşumunu teşvik eder (Slominski vd., 2004). Tirozinaz inhibitörleri içeren kozmetik ürünler bu süreci kısıtlar ve beyazlatmayı uyarak cilt hiperpigmentasyonunu önler (Morone vd., 2019; Nowruzi vd., 2020). Tez kapsamında, siyanobakteri EPS'lerinin kozmetikte kullanım potansiyelinin bir parçası olarak, çalışmada yer alan siyanobakteri EPS'lerinin tirozinaz inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır.

EPS'nin tirozinaz inhibisyon aktivitesi, Fawole ve arkadaşlarının (2012) kullanmış olduğu yöntem ile belirlenmiştir. Bu analizde 500-1000 µg/mL konsantrasyonlarda etki görülmediğinden konsantrasyon 2000 µg/mL (2 mg/mL)'ye kadar artırılmıştır. 2 mg/mL konsantrasyonda, 55 kodlu EPS'nin %10'luk bir tirozinaz inhibisyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. 72 kodlu suşta bu konsantrasyonda tirozinaz inhibisyon aktivitesi gözlenmemiştir. Literatürde EPS'lerin beyazlatma ya da tirozinaz inhibisyon aktivitesine dair çalışma oldukça azdır ve birkaç bakteri ve mantar suşlarından izole edilen EPS'leri içermektedir.

Luang-In vd. (2018)'nin yaptığı bir çalışmada *Bacillus tequilensis* EPS'si ancak 20 mg/mL konsantrasyonda %34'lük bir inhibisyon aktivitesi göstermiştir (Luang-In vd., 2018). Yine aynı şekilde *Lactobacillus sakei* EPS'nin tirozinaz inhibisyonunun test edildiği bir çalışmada 10, 25, 50, 100 ve 200 mg/mL konsantrasyonları kullanılmış ve %13,17 ile 62,85 arasında değişen tirozinaz inhibisyonu tespit edilmiştir (Bajpai vd., 2016). Jin vd. (2019) de bir mantar türü olan *Fomitopsis castanea* EPS'nin tirozinaz

inhibisyonunu 10-20 mg/mL konsantrasyonlarında araştırmışlardır ve %18,6 ile 72,4 arasında değişen tirozinaz inhibisyon aktiviteleeri tespit etmişlerdir (Jin vd., 2019).

Literatürde siyanobakteri EPS'lerinin beyazlatma aktivitesine dair bir çalışma mevcut değildir ancak diğer mikrobiyal EPS'lerin beyazlatma aktivite analizlerine bakıldığında da oldukça yüksek konsantrasyonlarda EPS kullanıldığını görülmektedir. Bu da bizim az miktarda EPS ile elde ettiğimiz tirozinaz inhibisyon aktivitesini oldukça kıymetli kılmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha önce yapılan çalışmalarla siyanobakterilerden elde edilen EPS'lerin özellikle biyolojik aktiviteleri ve anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal ve anti-oksidan aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Laroche, 2022;Tannin-Spitz vd., 2005). Bu özelliklerinin aynı zamanda yaşlanma karşıtı olabileceği ve cildin bariyer fonksiyonunu güçlendirebileceği belirtilmektedir. Ayrıca EPS'lerin güçlü su tutma kapasiteleri, nemlendirici ajan olarak kullanılabilme potansiyellerini öne çıkarmaktadır.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar ve çıkarımlar elde edilmiştir.

- Türkiye'nin farklı bölgelerindeki sulara ait altı siyanobakteri suşundan ilk defa EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- EPS üretim kapasitesinin türlere göre farklılık göstermesine rağmen, çalışılan siyanobakterilerden beşinin literatüre kıyasla oldukça yüksek miktarda (675,5-1189,3 mg/L) EPS üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.
- EPS üretim yeteneği yüksek iki suşun 16S rRNA temelli moleküler tanımlaması gerçekleştirilmiş ve suşlar >%98,9 benzerlik oranıyla *Chlorogloeopsis fritschii* (55 kodlu suş) ve *Pseudanabaenaceae cyanobacterium* (72 kodlu suş) olarak belirlenmiştir.
- *C. fritschii* (55 kodlu suş) ve *P. cyanobacterium* (72 kodlu suş) suşlarından elde edilen EPS'lerin ilk defa monosakkarit kompozisyonları belirlenmiştir ve aynı monosakkaritler türlere göre farklı oranlarda bulunmuştur.
- Literatürde siyanobakteri EPS'lerinin çoğunluğunda baskın şeker olarak glikoz bulunmasına rağmen, çalışmamızda kullanılan suşların EPS'lerinde en baskın monosakkarit ramnoz olarak tespit edilmiştir. EPS kompozisyonunda yer alan şekerler ve oranları, EPS'nin hem yapısal hem de emülsifiye edici, antitümör ve antioksidan aktivite gibi fonksiyonel özellikleri üzerinde etkili olabilmektedir.
- EPS'ler DMSO içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip iken distile su içerisinde kısmen çözünürlük göstermiştir. Metanol, etanol, aseton, klorofom içerisinde ise hiç çözünme göstermemiştir. Bu şekilde çözünürlüğün, hidrofobik gruplar içeren ramnoz şekerinin EPS kompozisyonunda baskın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) suşlarına ait EPS'lerin fonksiyonel grupları belirlenmiştir ve polisakkaritlerde yaygın olarak bulunan fonksiyonel grupların yanı sıra sulfat gruplarının varlığı ön görülmüştür. Bu, EPS' ye metal bağlama yeteneği verebilen bir gruptur.

- *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) suşlarına ait EPS'lerin kristalografik özellikleri belirlenmiştir ve amorf yapıda oldukları ortaya konulmuştur.
- Yapısal karakterizasyonlarının yanı sıra, *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) suşlarına ait EPS'lerin ilk defa fonksiyonel özellikleri test edilmiştir.
- *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) EPS'lerinin yüksek DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan kapasitelerinin yüksek olması, doğal kaynaklı antioksidan ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir.
- EPS'lerin antimikrobiyal etkilerinin olmadığı ancak bazı patojenlerin büyümelerini kısmen baskıladığı görülmüştür.
- Literatürde EPS'lerin nem emilim ve nem tutam kapasiteleri ile ilgili çalışma oldukça kısıtlıdır. *C. fritschii* (55) ve *P. cyanobacterium* (72) EPS'lerinin nem emilim ve nem tutma kapasitelerinin araştırıldığı analizlerde EPS'lerin, kozmetik sektöründe kullanılan materyallere yakın nem tutuma hatta daha iyi nem emilim kapasitesinin olduğu ortaya konmuştur.
- Tirozinaz inhibitörlerinin, melanin biyosentezini engellediği için kozmetikte önemli bir yeri vardır. Literatürde EPS'lerin beyazlatma ya da tirozinaz inhibisyon aktivitesine dair çalışma oldukça azdır ve birkaç bakteri ve mantar suşlarından izole edilen EPS'leri içermektedir. Siyanobakteriyel EPS bu kapsamda ilk defa çalışılmıştır. *P. cyanobacterium* (72) EPS'sinde tirozinaz inhibisyon aktivitesi gözlenmemesine rağmen *C. fritschii* (55) EPS'si literatüre göre düşük bir konsantrasyonda yüksek bir tirozinaz inhibisyon (beyazlatma) aktivitesi göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda yüksek miktarda EPS üreten siyanobakterilerden izole edilen EPS'lerin, antioksidan ve anti-tirozinaz aktivitelerinin yanı sıra sahip oldukları nem emme, nem tutma ve beyazlatma (tirozinaz inhibisyonu) kapasiteleri ile kozmetik sektöründe sentetik ürünlerin karşısında doğal bir bileşen olarak önemli bir yere sahip olma potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-wahab, B. A., El-kareem, H. F. A., Alzamami, A., Fahmy, C. A., Elesawy, B. H., Mahmoud, M. M., Ghareeb, A., Askary, A. El, Nahas, H. H. A., Attallah, N. G. M., Altwaijry, N., & Saied, E. M. (2022). Novel Exopolysaccharide from Marine *Bacillus subtilis* with Broad Potential Biological Activities: Insights into Antioxidant ,Anti-Inflammatory, Cytotoxicity, and Anti-Alzheimer Activity. *Metabolites*, 12, 715.
- Abed, R. M.M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Abed, Raeid M.M., & Köster, J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.07.001>
- Adams, D. G. (2001). *How do cyanobacteria glide ?* 28, 131–133.
- Adebayo-Tayo, B., Ishola, R., & Oyewunmi, T. (2018). Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports*, 19, e00271. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00271>
- Al-Amin, A., Parvin, F., Chakraborty, J., & Kim, Y. I. (2021). Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability. *Environmental Technology Reviews*, 10(1), 44–57. <https://doi.org/10.1080/21622515.2020.1869323>
- Anahas, A. M. P., & Muralitharan, G. (2018). Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Energy Conversion and Management*, 157(September 2017), 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.12.012>
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Ates, O. (2015). Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(December), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>

- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S. C., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Lim, J., & Park, Y. H. (2016). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i1.23819>
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2016). Partially Purified Exo-Polysaccharide from *Lactobacillus Sakei* Probio 65 with Antioxidant, α -Glucosidase and Tyrosinase Inhibitory Potential. *Journal of Food Biochemistry*, 40(3), 264–274. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12230>
- Belsito, D., Wilson, D. C., Warshaw, E., Fowler, J., Ehrlich, A., Anderson, B., Strober, B. E., Willetts, J., & Rutledge, E. S. (2006). A prospective randomized clinical trial of 0.1% tacrolimus ointment in a model of chronic allergic contact dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.03.025>
- Bhatnagar, M., Parwani, L., Sharma, V., Ganguly, J., & Bhatnagar, A. (2014). Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena* sp. (Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents for wound management. *Carbohydrate Polymers*, 99, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.005>
- Bhunja, B., Prasad Uday, U. S., Oinam, G., Mondal, A., Bandyopadhyay, T. K., & Tiwari, O. N. (2018). Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydrate Polymers*, 179(August 2017), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.091>
- Blois, M. S. (1958). © 1958 Nature Publishing Group.
- Bos, J. D. (1997). The skin as an organ of immunity. *Clinical and Experimental Immunology, Supplement*, 107(SUPPL. 1), 3–5.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 539–549. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>
- Bryant, D. A., & Liu, Z. (2013). Green Bacteria. Insights into Green Bacterial Evolution through Genomic Analyses. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397923-0.00004-7>
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*,

- 91(3), 1049–1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., De França, F. P., & Lopes, C. E. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), 245–247. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00125-2)
- Canfield, D. E., Ngombi-Pemba, L., Hammarlund, E. U., Bengtson, S., Chaussidon, M., Gauthier-Lafaye, F., Meunier, A., Riboulleau, A., Rollion-Bard, C., Rouxel, O., Asael, D., Pierson-Wickmann, A. C., & El Albani, A. (2013). Oxygen dynamics in the aftermath of the Great Oxidation of Earth's atmosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 16736–16741. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315570110>
- Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E. S., Mark, H., Aurélie, V., & Jean-François, H. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. *Water Research*, 47(15), 5464–5479. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.042>
- Chamizo, S., Adessi, A., Torzillo, G., & De Philippis, R. (2020). Exopolysaccharide Features Influence Growth Success in Biocrust-forming Cyanobacteria, Moving From Liquid Culture to Sand Microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.568224>
- Chen, B., You, W., Huang, J., Yu, Y., & Chen, W. (2010). Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 833–840. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0240-y>
- Chen, Chin Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5)
- Chen, Chun Yen, Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, H. J., Lee, P. Y., Chen, C. Y., Huang, S. L., Huang, B. W., Dai, F. J., Chau, C. F., Chen, C. S., & Lin, Y. S. (2022). Moisture retention of glycerin solutions with various concentrations: a comparative study. *Scientific Reports*, 12(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-13452-2>

- Chen, X., Gao, Y., Wang, L., Chen, H., & Yan, N. (2015). Effect of Treatment Methods on Chitin Structure and Its Transformation into Nitrogen-Containing Chemicals. *ChemPlusChem*, 80(10), 1565–1572. <https://doi.org/10.1002/cplu.201500326>
- Chindanonda, C., Saramul, S., & Piumsomboon, A. (2021). Diatom-cyanobacterial biofilm formation and its effects on sediment stability under laboratory conditions. *Science and Technology Asia*, 26(3), 114–124. <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2021.51>
- Cohen, Y., & Gurevitz, M. (2006). The Cyanobacteria—Ecology, Physiology and Molecular Genetics. *The Prokaryotes*, 1074–1098. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_39
- Colica, G., & De Philippis, R. D. (2013). Exopolysaccharides from cyanobacteria and their possible industrial applications. *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, 197–207. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch12>
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., & De Morais, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Dellamatrice, P. M., Silva-Stenico, M. E., Moraes, L. A. B. de, Fiore, M. F., & Monteiro, R. T. R. (2017). Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.012>
- Derikvand, P., Llewellyn, C. A., & Purton, S. (2017). Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 52(1), 43–56. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1214882>
- Dewi, I. C., Falaise, C., Hellio, C., Bourgougnon, N., & Mouget, J. L. (2018). Anticancer, antiviral, antibacterial, and antifungal properties in microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00012-8>
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with

- potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *Lwt*, 64(2), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
- Ducat, D. C., Way, J. C., & Silver, P. A. (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>
- Durai, P., Batool, M., & Choi, S. (2015). Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides. *Marine Drugs*, 13(7), 4217–4230. <https://doi.org/10.3390/md13074217>
- Farrokh, P., Sheikhpour, M., Kasaeian, A., Asadi, H., & Bavandi, R. (2019). Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. *Biotechnology Progress*, 35(5). <https://doi.org/10.1002/btpr.2835>
- Favas, R., Morone, J., Martins, R., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2022). Cyanobacteria Secondary Metabolites as Biotechnological Ingredients in Natural Anti-Aging Cosmetics: Potential to Overcome Hyperpigmentation, Loss of Skin Density and UV Radiation-Deleterious Effects. *Marine Drugs*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/md20030183>
- Fawole, O. A., Makunga, N. P., & Opara, U. L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-200>
- Flores, E., & Herrero, A. (2014). The Cell Biology of Cyanobacteria Edited by The Cell Biology of. In *Caister Acad. Press*. <https://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/27581>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Freitas, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245(PartB), 1674–1683. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>
- Garlapati, D., Chandrasekaran, M., Devanesan, A. A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

- 103(12), 4709–4721. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09811-1>
- Genc, B., Taskin, M., & Adiguzel, A. (2021). Exopolysaccharide of *Anoxybacillus pushchinoensis* G11 has antitumor and antibiofilm activities. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2101–2118. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02185-x>
- Gongi, W., Pinchetti, J. L. G., Cordeiro, N., & Ouada, H. Ben. (2022). Extracellular Polymeric Substances Produced by the Thermophilic Cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*: Characterization and Assessment of Their Antioxidant and Metal-Chelating Activities. *Marine Drugs*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/md20040227>
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., & Calleja, J. M. (2003). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 665–670. <https://doi.org/10.1002/ptr.1227>
- Hamed, I. (2016). The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104–1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>
- Hamilton, T. L., Klatt, J. M., De Beer, D., & Macalady, J. L. (2018). Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: Insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain *hensonii*. *ISME Journal*, 12(2), 568–584. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.193>
- Hamouda, R. A. E. F., Sorour, N. M., & Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 112, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.001>
- Han, P. P., Sun, Y., Wu, X. Y., Yuan, Y. J., Dai, Y. J., & Jia, S. R. (2014). Emulsifying, flocculating, and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 36–49. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0505-7>
- Haque, F., Banayan, S., Yee, J., & Chiang, Y. W. (2017). Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. *Chemosphere*, 183, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.106>
- Hearing, V. J. (2011). Determination of Melanin Synthetic Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, E8–E11. <https://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>
- Hess, W. R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 608–614.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.024>

- Höltje, J.-V. (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 181–203. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.1.181-203.1998>
- Hughes, E. O., Gorham, P. R., & Zehender, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 4(3), 225–236. <https://doi.org/10.1139/m58-024>
- Hussein, M. H., Abou-Elwafa, G. S., Shaaban-Dessuuki, S. A., & Hassan, N. I. (2015). Characterization and antioxidant activity of exopolysaccharide secreted by *Nostoc carneum*. *International Journal of Pharmacology*, 11(5), 432–439. <https://doi.org/10.3923/ijp.2015.432.439>
- Jasser, I., Panou, M., Khomutovska, N., Sandzewicz, M., Panteris, E., Niyatbekov, T., Łach, Ł., Kwiatowski, J., Kokociński, M., & Gkelis, S. (2022). Cyanobacteria in hot pursuit: Characterization of cyanobacteria strains, including novel taxa, isolated from geothermal habitats from different ecoregions of the world. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 170(January). <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107454>
- Jin, J., Hanh Nguyen, T. T., Kim, C., & Kim, D. (2019). Antimelanogenesis effects of fungal exopolysaccharides prepared from submerged culture of *Fomitopsis castanea* mycelia. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1204–1211. <https://doi.org/10.4014/JMB.1905.05037>
- Jindal, N., Singh, D. P., & Khattar, J. I. S. (2011). Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoria formosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2139–2146. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0678-6>
- Jindal, Namita, Pal Singh, D., & Singh Khattar, J. (2013). Optimization, characterization, and flow properties of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Lyngbya stagnina*. *Journal of Basic Microbiology*, 53(11), 902–912. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200201>
- Kailasam, S., Arumugam, S., Balaji, K., & Vinodh Kanth, S. (2022). Adsorption of chromium by exopolysaccharides extracted from lignolytic phosphate solubilizing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206(September 2021), 788–798. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.047>
- Kehr, J. C., & Dittmann, E. (2015). Biosynthesis and function of extracellular glycans in

- cyanobacteria. *Life*, 5(1), 164–180. <https://doi.org/10.3390/life5010164>
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
- Khan, Z., Bhadouria, P., & Bisen, P. (2005). Nutritional and Therapeutic Potential of Spirulina. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(5), 373–379. <https://doi.org/10.2174/138920105774370607>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Knoll, A. H. (2008). Cyanobacteria and Earth History. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution, January 2008*, 1–20.
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6(PA), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346–353. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Kumar, D., & Gaur, J. P. (2014). Growth and metal removal potential of a Phormidium bigranulatum-dominated mat following long-term exposure to elevated levels of copper. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(17), 10279–10285. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2920-x>
- Kurmayer, R., Deng, L., & Entfellner, E. (2016). Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria Planktothrix. *Harmful Algae*, 54, 69–86. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.004>
- Laroche, C. (2022). Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. *Marine Drugs*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- Laubach, J., Joseph, M., Brenza, T., Gadhamshetty, V., & Sani, R. K. (2021). Exopolysaccharide and biopolymer-derived films as tools for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 329(August 2020), 971–987. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.027>
- Lephart, E. D. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 31, 36–54.

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>

- Li, F., Hu, X., Qin, L., Li, H., Yang, Y., Zhang, X., Lu, J., Li, Y., & Bao, M. (2022). Characterization and protective effect against ultraviolet radiation of a novel exopolysaccharide from *Bacillus marcorestinum* QDR3-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221(September), 1373–1383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.114>
- Li, H., Ding, F., Xiao, L., Shi, R., Wang, H., Han, W., & Huang, Z. (2017). Food-derived antioxidant polysaccharides and their pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/nu9070778>
- Li, H., Xu, J., Liu, Y., Ai, S., Qin, F., Li, Z., Zhang, H., & Huang, Z. (2011). Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1821–1827. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.046>
- Li, J., & Wang, N. (2012). The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-31>
- Li, L. L., Qiao, Z. Y., Wang, L., & Wang, H. (2019). Programmable Construction of Peptide-Based Materials in Living Subjects: From Modular Design and Morphological Control to Theranostics. *Advanced Materials*, 31(45), 1–12. <https://doi.org/10.1002/adma.201804971>
- Li, P., Harding, S. E., & Liu, Z. (2001). Cyanobacterial exopolysaccharides: Their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), 375–404. <https://doi.org/10.1080/02648725.2001.10648020>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lisby, S., Gniadecki, R., & Wulf, H. C. (2005). UV-induced DNA damage in human keratinocytes: Quantitation and correlation with long-term survival. *Experimental Dermatology*, 14(5), 349–355. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.00282.x>
- Liu, X., Zhang, M., Liu, H., Zhou, A., Cao, Y., & Liu, X. (2018). Preliminary characterization of the structure and immunostimulatory and anti-aging properties of the polysaccharide fraction of: *Haematococcus pluvialis*. *RSC Advances*, 8(17), 9243–9252. <https://doi.org/10.1039/c7ra11153c>
- Lodén, M. (2003). Role of Topical Emollients and Moisturizers in the Treatment of Dry

- Skin Barrier Disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4(11), 771–788.
<https://doi.org/10.2165/00128071-200304110-00005>
- Luang-In, V., Saengha, W., & Deeseenthum, S. (2018). Characterization and Bioactivities of a Novel Exopolysaccharide Produced from Lactose by *Bacillus tequilensis* PS21 Isolated from Thai Milk Kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(1), 9–17. <https://doi.org/10.4014/mbl.1712.12018>
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., & Planavsky, N. J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, 506(7488), 307–315.
<https://doi.org/10.1038/nature13068>
- Marsan, D. W., Conrad, S. M., Stutts, W. L., Parker, C. H., & Deeds, J. R. (2018). Evaluation of microcystin contamination in blue-green algal dietary supplements using a protein phosphatase inhibition-based test kit. *Heliyon*, 4(3), e00573.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00573>
- Maruthanayagam, V., Basu, S., Bhattacharya, D., & Mukherjee, J. (2020). Effects of surface material on growth pattern and bioactive exopolymers production of intertidal cyanobacteria *Phormidium* sp. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 49(10), 1669–1677.
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Mathimani, T., Rajaram, R., Annadurai, G., & Yin, H. (2021). Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208(October 2020), 111567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111567>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., & Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(5), 283–308.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.011>
- Miller, S. R., & Bebout, B. M. (2004). Variation in Sulfide Tolerance of Photosystem II in Phylogenetically Diverse Cyanobacteria from Sulfidic Habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 736–744.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.736-744.2004>
- Mishra, U., & Pabbi, S. (2004). Cyanobacteria: A potential biofertilizer for rice. *Resonance*, 9(6), 6–10. <https://doi.org/10.1007/bf02839213>
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2019a). Revealing the potential

- of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. *Algal Research*, 41(September 2018). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2019b). Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. *Algal Research*, 41(September 2018), 101541. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
- Mota, R., Guimarães, R., Büttel, Z., Rossi, F., Colica, G., Silva, C. J., Santos, C., Gales, L., Zille, A., De Philippis, R., Pereira, S. B., & Tamagnini, P. (2013). Production and characterization of extracellular carbohydrate polymer from *Cyanothece* sp. CCY 0110. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1408–1415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.070>
- Mota, R., Rossi, F., Andrenelli, L., Pereira, S. B., De Philippis, R., & Tamagnini, P. (2016). Released polysaccharides (RPS) from *Cyanothece* sp. CCY 0110 as biosorbent for heavy metals bioremediation: interactions between metals and RPS binding sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 7765–7775. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7602-9>
- Mourelle, M. Lourdes, Gómez, C. P., & Legido, J. L. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>
- Mourelle, M L, Gómez, C. P., & Legido, J. L. (2015). Cosmética termal: Valor añadido en los centros termales. *Proceedings of the 1st International Congress on Water Healing Spa and Quality of Life; Failde, JM, Formella, A., Fraiz, JA, Gómez, M., Pérez, F., Rodríguez, V., Eds*, 99–105.
- Nainangu, P., Antonyraj, A. P. M., Subramanian, K., Kaliyaperumal, S., Gopal, S., Sampath Renuka, P., & A, W. A. (2020). In vitro screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29(April), 101772. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101772>
- Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., Ninova, M. S., & Kussovski, V. K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1533–1540. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12122>
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from

- extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145–1158. <https://doi.org/10.1080/09593330903552094>
- Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M. C., De Giulio, A., & Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*, 52(4), 639–647. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00202-2)
- Noreen, A., Sultana, S., Sultana, T., Tabasum, S., Zia, K. M., Muzammil, Z., Jabeen, M., Lodhi, A. Z., & Sultana, S. (2020). Natural polymers as constituents of bionanocomposites. In *Bionanocomposites: Green Synthesis and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816751-9.00003-9>
- Noreña-Caro, D., & Benton, M. G. (2018). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. *Journal of CO2 Utilization*, 28(September), 335–366. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>
- Nowruzi, B., Sarvari, G., & Blanco, S. (2020). The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research*, 49(November 2019), 101959. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101959>
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002–14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Ohki, K., Le, N. Q. T., Yoshikawa, S., Kanesaki, Y., Okajima, M., Kaneko, T., & Thi, T. H. (2014). Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0094-4>
- Osman, M. E. H., El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., & Gheda, S. F. (2010). Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), 861–875. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0491-7>
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L. H., Kováčik, L., Martin, M. P., & Johansen, J. R. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, 49(4), 450–470. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.976843>
- Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., & Johnson, C. H. (1998).

- Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8660–8664. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8660>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Ozturk, S., Aslim, B., Suludere, Z., & Tan, S. (2014). Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.040>
- Pabuçcu, K, D. Yücer, T. (2018). *Investigation of the Medical Features of Phormidium Species Giriş Siyanobakteriler*.
- Padan, E. (1979). Facultative Anoxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. *Annual Review of Plant Physiology*, 30(1), 27–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.000331>
- Paerl, H. W., & Paul, V. J. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 46(5), 1349–1363. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>
- Parsons, T. R., & Strickland, J. D. H. (1963). Marine-plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21(3), 155–163.
- Parwani, L., Bhatnagar, M., Bhatnagar, A., & Sharma, V. (2014). Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1473–1482. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0180-7>
- Pereira, S. B., Sousa, A., Santos, M., Araújo, M., Serôdio, F., Granja, P., & Tamagnini, P. (2019). Strategies to obtain designer polymers based on cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20225693>
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., & Tamagnini, P. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 917–941.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00183.x>

- Puizina-Ivic, N. (2014). Skin aging SKIN AGING. *Acta Dermatoven*, 17(2), 47–53.
- Rajasekar, P., Palanisamy, S., Anjali, R., Vinosha, M., Elakkiya, M., Marudhupandi, T., Tabarsa, M., You, S. G., & Prabhu, N. M. (2019). Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 809–821. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.09.024>
- Rashmi, V., Darshana, A., Bhuvaneshwari, T., Saha, S. K., Uma, L., & Prabakaran, D. (2021). Uranium adsorption and oil emulsification by extracellular polysaccharide (EPS) of a halophilic unicellular marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU130911. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4(December 2020), 100051. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100051>
- Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Rossi, F., & Philippis, R. De. (2016). The Physiology of Microalgae. *The Physiology of Microalgae*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Ruas-Madiedo, P., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–856. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8)
- Sadvakasova, A. K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Kirbayeva, D. K., Alwasel, S., & Allakhverdiev, S. I. (2021). Potential of cyanobacteria in the conversion of wastewater to biofuels. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(8), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03107-1>
- Sanalibaba, P., & Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Sánchez-Baracaldo, P., Bianchini, G., Wilson, J. D., & Knoll, A. H. (2021). Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends in Microbiology*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.008>
- Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on

- Growth and Biomass Composition. *Molecules*, 25(12), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/molecules25122834>
- Sano, T., & Kaya, K. (1996). Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 90–92.
<https://doi.org/10.1021/np9600210>
- Sathiyarayanan, G., Dineshkumar, K., & Yang, Y. H. (2017). Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 731–752.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1306689>
- Schirrmeister, B. E., Antonelli, A., & Bagheri, H. C. (2011). The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-45>
- Schirrmeister, B. E., Gugger, M., & Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: Evidence from genes and fossils. *Palaeontology*, 58(5), 769–785. <https://doi.org/10.1111/pala.12178>
- Sciuto, K., & Moro, I. (2015). Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 711–738.
<https://doi.org/10.1007/s10531-015-0898-4>
- Senousy, H. H., Abd Ellatif, S., & Ali, S. (2020). Assessment of the antioxidant and anticancer potential of different isolated strains of cyanobacteria and microalgae from soil and agriculture drain water. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(15), 18463–18474. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08332-z>
- Şentürk, K., & Yılmaz, M. (2020). Investigation of Exopolysaccharide Production Capacities of Cyanobacterial Strains Isolated from Lake Uluabat, Turkey. *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research*, 3(December 2019), 1–9.
- Shahid, A., Malik, S., Liu, C. G., Musharraf, S. G., Siddiqui, A. J., Khan, F., Tarbiah, N. I., Gull, M., Rashid, U., & Mehmood, M. A. (2021). Characterization of a newly isolated cyanobacterium *Plectonema terebrans* for biotransformation of the wastewater-derived nutrients to biofuel and high-value bioproducts. *Journal of Water Process Engineering*, 39(September 2020), 101702.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101702>
- Shen, J., Shi, C., & Xu, C. (2013). Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: Fermentation Optimization, Characterization and Antioxidant Activity. *Food Technology and Biotechnology*, 51(4), 520–527.

- Shen, S. gang, Jia, S. ru, Wu, Y. kai, Yan, R. rong, Lin, Y. H., Zhao, D. xue, & Han, P. pei. (2018). Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme*. *Carbohydrate Polymers*, 198(February), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.111>
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529>
- Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.061>
- Singh, S., Kant, C., Yadav, R. K., Reddy, Y. P., & Abraham, G. (2018). Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Biosynthesis, and Biotechnological Applications. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00017-9>
- Singh, S. P., & Montgomery, B. L. (2011). Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology*, 19(6), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.001>
- Sirin, S., & Aslim, B. (2020). Characterization of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides for use as a defined neuroprotective agent against amyloid beta1–42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65147-1>
- Sirin, S., & Aslim, B. (2021). Protective effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria against amyloid beta1-42induced oxidative stress in SH-SY5Y cells: Involvement of the AKT, MAPK, and NF-κB signaling pathway. *Process Biochemistry*, 106(July 2020), 50–59.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84(4), 1155–1228. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2003>
- Song, W., Zhao, C., Zhang, D., Mu, S., & Pan, X. (2016). Different resistance to UV-B radiation of extracellular polymeric substances of two cyanobacteria from contrasting habitats. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01208>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial

- applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Strieth, D., Schwarz, A., Stiefelmaier, J., Erdmann, N., Muffler, K., & Ulber, R. (2021). New procedure for separation and analysis of the main components of cyanobacterial EPS. *Journal of Biotechnology*, 328(December 2020), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.007>
- Strunecký, O., Ivanova, A. P., & Mareš, J. (2023). An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *Journal of Phycology*, 59(1), 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A., & Quesada, A. (2012). Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes - physiological, regional, and global driving forces. *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00086>
- Sun, M. L., Liu, S. B., Qiao, L. P., Chen, X. L., Pang, X., Shi, M., Zhang, X. Y., Qin, Q. L., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z., & Xie, B. Bin. (2014). A novel exopolysaccharide from deep-sea bacterium *Zunongwangia profunda* SM-A87: Low-cost fermentation, moisture retention, and antioxidant activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7437–7445. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5839-8>
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., & Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*, 47, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., & Sakamoto, T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7327–7333. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005>
- Tan, L. T. (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*, 68(7), 954–979. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.012>
- Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., & Sandeep, K. P. (2012). Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5), 426–442. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500508>
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., & Arad, S. (2005).

- Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0679-7>
- Tiwari, O. N., Khangembam, R., Shamjetshabam, M., Sharma, A. S., Oinam, G., & Brand, J. J. (2015). Characterization and Optimization of Bioflocculant Exopolysaccharide Production by Cyanobacteria *Nostoc* sp. BTA97 and *Anabaena* sp. BTA990 in Culture Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(7), 1950–1963. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1691-2>
- Tiwari, O. N., Mondal, A., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. kanti, Jaladi, P., Oinam, G., & Indrama, T. (2019). Purification, characterization and biotechnological potential of new exopolysaccharide polymers produced by cyanobacterium *Anabaena* sp. CCC 745. *Polymer*, 178(July), 121695. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.121695>
- Tiwari, O. N., Muthuraj, M., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., Annapurna, K., Sahu, M., & Indrama, T. (2020). Biosynthesis, purification and structure-property relationships of new cyanobacterial exopolysaccharides. *Polymer Testing*, 89(April), 106592. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106592>
- Torino, M. I., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44753-8>
- Turner, S. (1997). *Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria*. 52, 13–52. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6542-3_2
- Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, December, 117–145. <https://doi.org/10.1201/9780203712405>
- Wang, H., Jiang, X., Mu, H., Liang, X., & Guan, H. (2007). Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. Agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. *Microbiological Research*, 162(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.011>
- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential

- of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>
- Wang, Y., Jia, N., Geng, R., Yu, G., & Li, R. (2021a). Phylogenetic insights into chroococcus-like taxa (Chroococcales, Cyanobacteria), describing *Cryptochroococcus tibeticus* gen. nov. sp. nov. and *Limnococcus fonticola* sp. nov. from Qinghai-Tibet plateau. *Journal of Phycology*, 57(6), 1739–1748. <https://doi.org/10.1111/jpy.13205>
- Wang, Y., Jia, N., Geng, R., Yu, G., & Li, R. (2021b). Phylogenetic insights into chroococcus-like taxa (Chroococcales, Cyanobacteria), describing *Cryptochroococcus tibeticus* gen. nov. sp. nov. and *Limnococcus fonticola* sp. nov. from Qinghai-Tibet plateau. *Journal of Phycology*, 57(6), 1739–1748. <https://doi.org/10.1111/jpy.13205>
- Whitton, B. A. (2012). Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, 9789400738, 1–760. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wu, S., Yu, K., Li, L., Wang, L., & Liang, W. (2021). Enhancement of exopolysaccharides production and reactive oxygen species level of *Nostoc* flagelliforme in response to dehydration. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(26), 34300–34308. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13051-0>
- Yadav, P., Yadav, H., Shah, V. G., Shah, G., & Dhaka, G. (2015). Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(9), 21–25. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13907.6565>
- Yarkent, Ç., Gürlek, C., & Oncel, S. S. (2020). Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17(February). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100304>
- Ye, S., Zhang, J., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., & Li, Y. O. (2016). Biosynthesis of selenium rich exopolysaccharide (Se-EPS) by *Pseudomonas* PT-8 and characterization of its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 142, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.058>
- Yoshikawa, S., Kanesaki, Y., Uemura, A., Yamada, K., Okajima, M., Kaneko, T., & Ohki, K. (2021). Physiological and genomic analysis of newly-isolated polysaccharide synthesizing cyanobacterium *Chroococcus* sp. FPU101 and chemical analysis of the exopolysaccharide. *Journal of General and Applied*

- Microbiology*, 67(5), 207–213. <https://doi.org/10.2323/JGAM.2021.02.002>
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments - MDPI*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/environments7020013>
- Zampieri, R. M., Adessi, A., Caldara, F., Codato, A., Furlan, M., Rampazzo, C., De Philippis, R., La Rocca, N., & Valle, L. D. (2020). Anti-inflammatory activity of exopolysaccharides from *Phormidium* sp. ETS05, the most abundant cyanobacterium of the therapeutic euganean thermal muds, using the zebrafish model. *Biomolecules*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biom10040582>
- Zanchett, G., & Oliveira-Filho, E. C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*, 5(10), 1896–1917. <https://doi.org/10.3390/toxins5101896>
- Zhang, H., Hu, C., Jia, X., Xu, Y., Wu, C., Chen, L., & Wang, F. (2012). Characteristics of γ -hexachlorocyclohexane biodegradation by a nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena azotica*. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 221–225. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9670-7>
- Zhang, L., & Yi, H. (2022). Potential antitumor and anti-inflammatory activities of an extracellular polymeric substance (EPS) from *Bacillus subtilis* isolated from a housefly. *Scientific Reports*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05143-9>
- Zhao, L., Fan, F., Wang, P., & Jiang, X. (2013). Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(7), 2841–2850. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4515-0>
- Zinicovscaia, I., & Cepoi, L. (2016). Cyanobacteria for bioremediation of wastewaters. *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*, 1–124. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26751-7>