

**TOHUM VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN  
XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS  
İZOLASYONU VE BUNLARIN KSANTAN SAKIZI  
ÜRETİM YETENEKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Meral YILMAZ  
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Haziran-2002**

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.**

**Proje No:001041**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Meral YILMAZ'ın "Tohum ve Toprak Örneklerinden *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* izolasyonu ve Bunların Ksantan Sakızı Üretim Yeteneklerinin Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki yüksek lisans tezi 18.06.2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Prof. Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
.....19...6...2022...tarih ve ....24/6.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Orhan ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TOHUM VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* İZOLASYONU VE BUNLARIN KSANTAN SAKIZI ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MERAL YILMAZ

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN  
2002, 80 sayfa

Ksantan sakızı bitki patojeni olan *Xanthomonas campestris* bakterisi tarafından üretilen kompleks bir ekzopolisakkarittir. Ksantan sakızı besin endüstrisinde bir suspande edici, stabilize edici yada kalınlaştırıcı ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda yağ-sondaj endüstrisinde bir yağlayıcı, emülsifiye edici ajan olarak da kullanılır. Bu nedenle bu polisakkaritin üretimi son derece önemlidir.

Bu çalışmada ilk olarak çeşitli tohum ve toprak örneklerinden *Xanthomonas campestris* izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Daha sonra standart suş olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve Türkiye'deki fasulye bitkilerinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, domates bitkisinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve Amerikan dolmalık biberinden izole edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* türleri ile devam ederek, çeşitli substratlar kullanarak ksantan sakızı üretimini, bu substratların verimi ne şekilde etkilediğini ve bu suşların verimlilikleri incelenmiştir.

*Xanthomonas campestris* izolasyonu için hastalıklı crucifer bitki tohumları ve bu hastalıklı bitkilerin bulunduğu ortamdaki toprak örnekleri ile muhtemelen başarılı bir izolasyon yapılabileceği sonucuna varılmıştır. Ksantan üretimi için kullanılan substratlar arasında şeker pancarı melası ve Triton X-100 ilavesinin glukoz, sukroz vb. substratlara alternatif olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ksantan sakızı, Ekzopolisakkaritler, *Xanthomonas campestris*

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****ISOLATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*  
FROM SEED AND SOIL SAMPLES AND INVESTIGATION OF THEIR  
XANTHAN GUM PRODUCTION AVABILITY****MERAL YILMAZ****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Program****Supervisor: Assoc. Prof. Kıymet GÜVEN  
2002, 80 pages**

Xanthan gum is a complex exopolysaccharide produced by the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Xanthan gum is widely used as a suspending, stabilizing or thickening agent in the food industry. It is also used as a lubricant, emulsifier agent in the oil-drilling industry. Therefore, production of this polysaccharide is very important.

In this study, first of all *Xanthomonas campestris* from different seeds and soil samples tried to be isolated. Later the study was focused to following goals: the production of Xanthan gum by using different substrate to determine which substrate is best to produce highest Xanthan gum with following *Xanthomonas* strains (standart strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, isolate *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 from Turkish bean plant, isolate *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Turkish tomato plant and isolate *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* from American stuffing pepper).

The results of these studies suggest that sickened crucifer plant seeds and soil samples of this plants are possibly best to isolate *Xanthomonas campestris*.

These studies also suggest that Triton X-100 added beet sugar molasses could be an alternative substrate for the production of Xanthan gum compared to substrates used such as glucose and sucrose.

**Keywords: Xanthan gum, Exopolysaccharides, *Xanthomonas campestris***

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde her türlü desteğini ve eleştirilerini esirgemeyen değerli tez hocam Doç. Dr. Kıymet GÜVEN'e öncelikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya ve bilgilerine danıştığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teşekkür ederim.

Deneyleşirimin yürütölmesinde ve malzeme temin etmemde bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Burçin MUTLU'ya ve diğler çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün çalışmalarımnda bana her zaman destek olan ve bu günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>

<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Ksantan Sakızının Genel Özellikleri.....	2
1.2. Ksantan Sakızının Kullanım Alanları.....	6
1.3. Ksantan Sakızının Endüstriyel Üretimi.....	10
1.4. <i>Xanthomonas campestris</i> .....	19
1.4.1. <i>Xanthomonas campestris</i> 'in Gelişme Ortamı.....	21
1.4.2. <i>Xanthomonas campestris</i> 'in Gelişme Sıcaklığı.....	21
1.5. Cruciferlerin Siyah Çürüklüğü yada Siyah Damarlanması.....	21
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>23</b>
2.1. MATERYAL.....	23
2.1.1. Bakteri Strainleri.....	23
2.1.2. Toprak Örneklerinin Alınması.....	23
2.1.3. Crucifer Tohumlarının Temin Edilmesi.....	24
2.1.4. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler.....	24
2.1.4.1. SX Agar.....	24
2.1.4.2. BSCAA.....	24
2.1.4.3. NSCAA.....	25
2.1.4.4. FS.....	25
2.1.4.5. YS.....	26
2.1.4.6. Jelatin Medium.....	26
2.1.4.7. Skim Milk.....	26

2.1.4.8. YMA (Yeast Malt Agar).....	27
2.1.4.9. YM-Broth (Yeast Malt Broth).....	27
2.1.4.10. YM-T Broth.....	27
2.1.4.11. Standart Üretim Ortamı.....	28
2.1.4.12. Optimize Edilmiş Besi Ortamı.....	28
2.1.4.13. LB Medium (Luria-Bertani Medium).....	29
2.1.4.14. Pulp İçeren Fermentasyon Ortamı.....	29
2.1.4.15. 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	29
2.1.4.16. 0.4 N KOH.....	29
2.1.4.17. Steril Yıkama Solusyonu.....	29
2.1.4.18. İnce Tabaka Kromotografi (İTK) Solusyonu.....	30
2.2. METOD.....	31
2.2.1. Toprakta <i>Xanthomonas campestris</i> izolasyonu.....	31
2.2.2. Crucifer tohumlarından <i>Xanthomonas campestris</i> izolasyonu.....	31
2.2.3. İdentifikasyon Testleri.....	32
2.2.3.1. Gram Boyama.....	32
2.2.3.2. Üreaz Testi.....	33
2.2.3.3. 32°C’de Büyüme.....	33
2.2.3.4. Protein Parçalanması.....	33
2.2.3.5. Asit Üretimi.....	33
2.2.3.6. Eskulin Hidrolizi.....	34
2.2.3.7. Jelatini Sıvılaştırma.....	34
2.2.4. Ksantan Sakızının Fermentasyonla Üretimi.....	34
2.2.4.1. Ön İnokulumun Hazırlanması.....	35
2.2.4.2. İnokulum Hazırlanması.....	35
2.2.4.3. Fermentasyon.....	35
2.2.4.3.1. Standart Üretim Ortamındaki Fermentasyonlar.....	35
2.2.4.3.2. Optimize Edilmiş Besiyeri’ndeki Fermentasyonlar.....	36
2.2.4.3.3. Değişik Substrat Ortamlarında Ksantan Sakızı Üretimi.....	36

2.2.4.3.3.1. Peynir Altı Suyu'ndan Ksantan Sakızı Üretimi.....	36
2.2.4.3.3.2. Kayısı Pulp'undan Erlende Ksantan Sakızı Üretimi.....	37
2.2.4.3.3.3. Şeftali Pulp'undan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi.....	38
2.2.4.3.3.4. Şeker Pancarı Melası'ndan Ksantan Sakızı Üretimi.....	38
2.2.4.3.3.5. İşlenmiş Melas'tan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi.....	39
2.2.4.3.3.6. İşlenmemiş Melas'tan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi.....	39
2.2.4.3.3.7. Erlende ve Fermentörde, İşlenmemiş Melas İle Ksantan Sakızı Üretimi'ne Triton X-100'ün Etkisi.....	40
2.2.5. Fermentasyon Sonrası Yapılan İşlemler.....	41
2.2.5.1. Fermentasyon Sıvısında Viskozite Ölçümleri.....	41
2.2.5.2. Fermentasyon Sıvısından Hücrelerin ve Diğer Katıların Uzaklaştırılması.....	41
2.2.5.3. Ksantan Sakızını Çöktürme ve Ayırma İşlemleri.....	41
2.2.5.4. Kurutma.....	42
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1. Toprakta <i>Xanthomonas campestris</i> İzolasyonu Sonuçları.....	43
3.2. Crucifer Tohumlarından <i>Xanthomonas campestris</i> İzolasyonu Sonuçları.....	43
3.3. Toprakta ve Crucifer Tohumlarından İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testleri Sonuçları.....	44
3.4. Fermentasyon Sıvısında Viskozite Ölçümleri Sonuçları.....	47
3.5. Standart Üretim Ortamındaki Fermentasyon Sonuçları.....	49
3.6. Optimize Edilmiş Besiyerindeki Fermentasyon Sonuçları.....	50
3.7. Değişik Substrat Ortamlarındaki Fermentasyon Sonuçları.....	50

3.7.1. Peynir Altı Suyu'ndan Fermentasyon ile Elde Edilen Soniclar.....	50
3.7.2. Şeftali ve Kayısı Pulpu'ndan Fermentasyon ile Elde Edilen Soniclar.....	51
3.7.3. Melas'tan Fermentasyon ile Elde Edilen Soniclar.....	52
3.7.4. Erlende ve Fermentörde, İŞlenmemiş Melas İle Ksantan Sakızı Üretimi'ne Triton X-100 İlavesinin Sonicları.....	53
3.8. Ksantan Sakızının Kromotografik Analiz Sonicları.....	57
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>59</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>Xanthomonas campestris</i> Ekstrasellular Polisakkaritinin Yapısı.....	4
1.2. <i>Xanthomonas campestris</i> 'in Elektron Mikroskobundaki Görüntüsü.....	20
3.1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459 Suşu ile Standart Üretim Ortamında a) Glukoz b) Sukroz ile Elde Edilmiş Ksantan Sakızlarının Görüntüsü.....	55
3.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459 Suşu ile a) Şeftali Pulpu, b) Kayısı Pulpu c) Glukoz İle Elde Edilmiş Öğütülmüş Ksantan Sakızları ve d) Ticari Ksantan'ın Görüntüsü.....	55
3.3. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459 Suşu ile a) İşlenmiş b) İşlenmemiş Melas İle Elde Edilmiş Olan Ksantan Sakızlarının Görüntüsü.....	56
3.4. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459, <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001, <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ve <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> suşları ile, İşlenmemiş Melas ve Triton X-100 Kullanılarak Elde Edilmiş Olan Ksantan Sakızlarının İçeriklerinin İnce Tabaka Kromatografisi Kullanılarak Tespit Edilmesi.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. <i>Xanthomonas</i> Genusuna Ait Bazı Bakteriler Tarafından Üretilen Polisakkaritlerin Ortalama Bileşimi.....	5
1.2. Ksantan Sakızının Başlıca Uygulama Alanları.....	8
1.3. Ksantan'ın Tipik Üretiminde Anahtar Adımlar.....	13
2.1. Bakteri Strainleri.....	23
2.2. Melas'ın İçeriği.....	38
3.1. Toprakta ve Crucifer Tohumlarından İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testleri Sonuçları.....	44
3.2. a) Standart Üretim Ortamında, Glukoz ve Sukroz İle Yapılan Fermentasyon Sıvısında Ölçülen Viskozite Sonuçları (d.Pas).....	47
b) Standart Üretim Ortamında Melas ile Yapılan Fermentasyon Sıvısında Ölçülen Viskozite Sonuçları (d.Pas).....	48
3.3. a) Standart Üretim Ortamında Glukoz ile Yapılan Fermentasyon Sonuçları.....	49
b) Standart Üretim Ortamında Sukroz ile Yapılan Fermentasyon Sonuçları.....	49
3.4. Optimize Edilmiş Besiyerindeki Fermentasyon Sonuçları.....	50
3.5. a) Kayısı Pulpu ile Erlende Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler (gr/100 ml).....	51
b) Şeftali Pulpu ile Erlende ve Fermentörde Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler (gr/100 ml).....	52
3.6. İşlenmiş ve İşlenmemiş Melas ile Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler.....	53
3.7. İşlenmemiş Melas ve Triton X-100 İle Elde Edilen %Verimler (gr/100 ml).....	54

## 1. GİRİŞ

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, eşsiz özelliklerinden dolayı viskoziferler, stabilize ediciler, emulsifiye ediciler ya da jelleştirici ajanlar olarak çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır.

Son yıllarda Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin her ikisi tarafından sentezlenen mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin (EPS) biyokimyasını ve genetiğini anlamak için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Biyosentez yolları açıklanmış ve ilgili genlerin birkaçı tanımlanmıştır. Bu bilgi EPS mühendisliğinin başlatılması için ya da EPS üretiminin geliştirilmesi için uygulanabilir.

Bakteri bitki ilişkilerinde virulanslık faktörleri, sinyal molekülleri ya da koruyucu ajanlar olarak çeşitli fonksiyonlara sahip olan polisakkaritler, birçok bakteri tarafından salgılanır. Bu polimerlerin bazıları gıda uygulamaları için eşsiz özelliklere sahiptir; viskozifer, stabilizer, emülsifiyer ya da jelleştirici ajanlar olarak kullanılmaktadır [1].

Sakızların özellikleri, onların kimyasal içerikleri, moleküler yapıları ve bağları, ortalama moleküler ağırlık ve dağılımları tarafından belirlenir. Birçok mikroorganizma ile üretilen polimerin verimi ve kinetiği, moleküler ağırlığı, hem de onların saf yapıları, gelişme koşullarındaki değişiklikler tarafından etkilenebilir. Polimer sentezini etkileyen önemli ortam değişiklikleri anlaşılıp kontrol edilerek, ekonomik bir yöntemin planlanmasında avantaj olarak kullanılabilir. Pek çok ekzopolisakkaridin temel karbohidrat yapısı, gelişme koşulları ile değişmez, fakat temel karbohidrat yapısına bağlı grupların içeriği, örneğin açıl ya da ketal hareketler oldukça değişiklik gösterebilir. Açıl ya da ketal gruplar gibi alt gruptaki değişiklikler polimerin özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir ve bundan dolayı çeşitli uygulamalarda etkili olabilir. Polimer performansını belirlemede çok önemli olan diğer faktör moleküler ağırlıktır. Moleküler ağırlık gelişme koşulları ile değişebilir [2].

Bugün için ticari ilgiye sahip olan polisakkaritlerden birkaçı glukon, dekstran, pullan, skleroglukan, alginat ve ksantan dır [3].

Bakteriyal heteropolisakkarit olan ksantanın suda çözünbilmesi; düşük konsantrasyonlarda yüksek viskozite göstermesi, pseudoplastik (non-Newtonian)

akış özelliğine sahip olması; viskozitesinin sıcaklık, asit ve alkalilere ve tuz etkisine farkedilebilir şekilde kararlı olması; polianyonik kolloid olmasına karşın katyonik bileşenlerin nötralleştirici etkisine duyarız olması; emülsiyon ve süspansiyonların akışını düzenleyici, kıvam verici ve kararlılık kazandırıcı olması; metal iyonlarıyla jel yapılı kompleks oluşturması; farklı tuzlarla dispers sistemlerde birlikte kullanılabilmesi; koruyucu, bağlayıcı özellikleri, dökülebilme ve pompalama kolaylıkları sağlaması ve sağlığa zararsız olmasından dolayı endüstride oldukça yaygın kullanım alanlarına sahip tek polisakkarittir [3].

Bu genel çerçevede çalışmamızda, ilk olarak, çeşitli toprak ve tohum örneklerinden *Xanthomonas campestris*'in izolasyonunu ve bu izolatların ksantan sakızı üretimindeki verimliliklerini saptamayı amaçladık. Bu basamaktan sonra çalışmamıza, standart suş olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve Türkiye'deki fasulye bitkilerinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, domates bitkisinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve Amerikan dolmalık biberinden izole edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* türleri ile devam ederek, çeşitli substratlar kullanarak ksantan sakızı üretimini, bu substratların verimi ne şekilde etkilediğini ve bu suşların verimliliğini saptamaya çalıştık.

### 1.1. Ksantan Sakızının Genel Özellikleri

Ksantan sakızı *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bakterisi ile üretilen doğal bir polisakkarit ve önemli bir endüstriyel biyopolimerdir. Ksantan sakızı ilk kez 1950 li yıllarda Northern Regional Research Laboratories (NRRL) of the United States Department of Agriculture'de keşfedilmiştir. Polisakkarit B-1459 ya da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 bakterisi tarafından üretilen ksantan sakızı diğer bilinen doğal ve sentetik suda eriyebilen sakızlara ek sağlayan özelliklerinden dolayı kapsamlı olarak çalışılmıştır. 1960'lı yıllar süresince birkaç endüstriyel laboratuvarında kapsamlı çalışma gerçekleştirilmiş ve Kelco tarafından Kelzan adıyla yarı ticari üretim gerçekleştirilmiştir. Önemli ticari üretim 1964' ün başlarında başlamıştır. Bugün ksantanın önemli miktarda üretimleri Amerika'da

Merc and Pfizer, France de Rhone Poulenc ve Sanofi-Elf ve Avusturya'da Jungbunzlauer firmaları tarafından yapılmaktadır [4].

Sadece birkaç mikrobiyal ekzopolisakkarit ticari olarak bulunabildiği halde, ksantan halen iyi kurulmuş bir üretim sağlamaktadır. Günümüze kadar USA da ksantanın uygulamaları ve üretimi üzerinde tek başına 1600 patentten daha fazla kayıt vardır. Bununla birlikte diğer bitki orjinli polisakkaritler örneğin alginat, seluloz, nişasta, arabik gum ve guar gum ya da bakteriyel orjinli örneğin alginat, pullulan, gellan ve asetan ksantan ile yarışmaktadır. Ksantanın gıdalarda kullanımı 1969'da Amerikan Gıda ve İlaç yönetimi tarafından onaylanmış ve 1980 yılında Avrupa Birliğinden E-415 no'lu onayı almıştır. Dünya çapında, her yıl 10,000-20,000 ton ksantan ticari olarak üretilmektedir [5].

Diğer bakteriyel ekzopolisakkaritler gibi, ksantan da bitki orijinli polisakkaritlere bir alternatif sağlar. Bununla birlikte bakteriyel polisakkarit üretimleri en önemli bitki polisakkaritleri (örneğin; bitki orjinli alginat ve nişasta) ile karşılaştırıldığında nispeten pahalıdır. Ksantanın bir avantajı bu bakteriyel ürünün niteliğinin spesifik üretici strainleri ve fermentasyon koşulları kullanılarak sağlanabilmesidir. Polisakkarit marketinde ksantanın yerini güçlendirmek için, üretim yönteminin fizyolojisi ve regülasyonunu araştırmak ve yeni uygulamalar yapılmak zorundadır. Ksantanın ticari başarısı sadece reolojik özellikleri üzerine değil aynı zamanda ekonomik faktörler üzerine de temel alınmalıdır. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* farklı substratların geniş bir aralığında kullanılabilir. Substratın dönüşüm oranı yüksektir ve ksantanın son ürüne dönüşümü ve geri kazanımı kolaydır ve bu nedenle de oldukça ucuzdur [5].

Üretim strainlerinin genetik modifikasyonları ile istenmeyen yan ürünün eliminasyonu fermentasyon sıvısından ksantanın geri kazanımını kolaylaştırabilir. Yararlı özellikleri ile yeni ksantan türevlerini meydana getirmek zor görünmektedir. Kimyasal modifikasyonlar ya da genetik metodlar yeni reolojik özellikleri ile ksantan türevlerinde sonuçlanabilir. Bu gibi spesifik üretimler için yeni uygulamalar, farmasötik sektörde ya da desteklenen kaynakların gelişen sektöründe keşfedilebilir. Uygulamaların yeni bir alanı ksantandan türev alan spesifik oligosakkaritler için tanımlanabilir. Spesifik olarak modifiye olan ksantan türevlerinin üretimini artırmak, onların reolojik özelliklerini karakterize etmek ve



Çizelge 1.1. *Xanthomonas* bakterileri tarafından üretilen polisakkaritlerin ortalama yüzde bileşimi

Bakteriler	D-Glukoz	D-Mannoz	D-Glukuronik asit	Piruvat	Asetat
<i>X.campestris</i>	30,1	27,3	14,9	7,1	6,5
<i>X.fragaria</i> 1822	24,6	26,1	14,0	4,9	5,5
<i>X.gummisudans</i> 2182	34,8	30,7	16,5	4,7	10,0
<i>X.juglandis</i> 411	33,2	30,2	16,8	6,9	6,4
<i>X.phaseoli</i> 1128	30,9	28,6	15,3	1,8	6,4
<i>X.vasculorum</i> 702	34,9	30,2	17,9	6,6	6,3

Trisakkarit kolları polimerin omurgası ile bağlantılı olarak düzenlenmiş gibi görünür. Meydana gelen sıkı zincir, bir kompleks oluşturmak için diğer polimer molekülleri ile birbirini etkileyen tek, çift ya da üçlü heliks olarak ortaya çıkabilir. Moleküler ağırlık dağılımı  $2 \cdot 10^6$ 'dan  $20 \cdot 10^6$  Da'ya sıralanmıştır. Üretimde kullanılan çeşitli fermentasyon koşulları, ksantanın moleküler ağırlığını etkileyebilen koşullardır [4].

Orta sıcaklıklarda eritilerek elde edilen ksantan solüsyonları oldukça viskoz olma eğilimindedir. Ksantan sakızının viskozitesi, büyük ölçüde erime sıcaklığından etkilenir. Ksantan molekülü, erime sıcaklığına bağlı olarak iki konformasyona sahip görünmektedir; heliks ve gelişigüzel halka. Ksantan solüsyonlarının önemli bir özelliği, locust bean gum ve guar gum gibi bitki galaktomannanları ile etkileşimidir. Oda sıcaklığındaki bir ksantan solüsyonuna bu galaktomannanlardan herhangi birinin eklenmesi viskozitede sinerjistik bir artışa neden olur [4].

Besin ve farmasötik uygulamalar için ksantan sakızının güvenli olup olmadığı ve toksikolojisi kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Ksantan toksik değildir ve büyümeyi engellemez. Ksantan tahriş edici değildir ve deriyi ya da

gözü tahriş etmez. Bu temel üzerinde, ksantanın bir besin katkı maddesi olarak kullanımı, United States Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır [4].

## 1.2. Ksantan Sakızının Kullanım Alanları

Ksantan sakızının endüstriyel uygulamalarının çoğu, düşük polisakkarit konsantrasyonlarında, yüksek viskozitede pseudoplastik solüsyonlar elde edebilmek için, ksantan'ın soğuk ya da sıcak suda eriyebilme yeteneği üzerine temel alınmıştır [6].

Ticari olarak üretilen başlıca mikrobiyal polisakkarit olan ksantanın başarısı aşağıdaki önemli reolojik özellikler üzerinde temel alınmaktadır. Ksantan solüsyonları düşük konsantrasyonlarda yüksek bir viskoziteye sahiptir ve pseudoplastiktir. Ayrıca ksantan sıcaklık, PH ve elektrolit konsantrasyonlarının geniş bir aralığını hissetmez. Ksantan aynı zamanda yüksek bir yırtılma stabilitesi gösterir. Ksantan bu özelliklerinden dolayı yağ, farmasötik, kozmetik, kağıt, boya ve tekstil endüstrilerinde geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bu uygulamalarda ksantan başlıca, viskozite kontrolü için ya da bir flokullant olarak, jelleştirici ve suspande edici ajan olarak kullanılmaktadır. Ksantan ayrıca besin endüstrisinde de kullanılmaktadır. Ksantan esasen bir stabilize edici, kalınlaştırıcı, jelleştirici ve emülsifiye edici ajan olarak eklenmektedir fakat aynı zamanda buz kristali oluşumunu önlemek için ve bir yapışkan olarak da kullanılmaktadır [5]. Ksantan sakızı ayrıca pastörize yöntemlerle elde edilen sürülebilir ve kesilebilir peynir ürünleri için de etkili bir stabilize edici olarak bulunmuştur [7].

Ksantan sakızı emülsiyon kararlılığı, sıcaklık dengesi, besin karışımları ile uyuşabilme ve pseudoplastik reolojik özellikleri içeren bir kısım önemli sebepten dolayı geniş bir besin çeşidinde kullanılmaktadır. Çizelge 1.2.'de ksantan sakızının besin ve diğer uygulamalarda yaygın kullanımı listelenmiştir. Ksantan sakızı sulu solüsyonları kalınlaştırıcı özelliklerinden dolayı, emülsiyon ve süspansiyonları stabilize edici ve dağıtıcı bir ajan olarak farmasötik formulasyonlarda, kozmetiklerde ve tarımsal üretimlerde kullanılmaktadır. Ksantan sakızı tekstil baskı hamurlarında, seramik cilalarında, sulu çamur

patlayıcılarının formülasyonlarında ve pas temizleyicilerinde kullanılmaktadır. Polimerin suda çözünübilirliği ve solüsyonlarının yüksek viskozitesi, yağ geri kazanımı yöntemlerinin geliştirilmesinde ve delici akışkanlarda yaygın olarak kullanımı ksantan'ın petrol endüstrisinde önemli uygulamalarına yol açmıştır [4].

Çizelge 1.2. Ksantan sakızının başlıca uygulama alanları

Uygulama	Konsantrasyon (%w/w)	İşlev
Salata sosları	0,1-0,5	Emülsiyon stabilizeri; suspande edici ajan, dağıtıcı.
Kuru karışımlar	0,05-0,2	Sıcak ya da soğuk suda çok kolay dağılır.
Şuruplar, lezzet arttırıcılar, salçalar	0,05-0,2	Kalınlaştırıcı; ısı dengesi ve üniform viskozite.
İçecekler (meyve ve yağsız susuz süt)	0,05-0,2	Dengeleyici.
Mandıra ürünleri	0,5-0,2	Dengeleyici; karışımın viskozite kontrolü.
Fırınlanmış ürünler	0,1-0,4	Dengeleyici; pompalamayı kolaylaştırıcı.
Dondurulmuş gıdalar	0,05-0,2	Donmayı arttırıcı-erime dengeleyici.
Farmasötikler (kremler ve süspansiyonlar)	0,1-1	Emülsiyon dengeleyici-doza formüllerinde düzenlilik.
Kozmetik (takma diş temizleyicileri, şampuanlar, losyonlar)	0,2-1	Kalınlaştırıcı ve dengeleyici.
Tarımda (hayvan yemlerinde katkı ve pestisit formülasyonlarında)	0,03-0,4	Süspansiyon dengeleyici, püskürtme yeteneğini arttırıcı, birikmeyi azaltıcı, yapışmayı ve sürekliliği arttırıcı.
Tekstil baskıları ve kumaş boyaları	0,2-0,5	Hamurun reolojik özelliklerinin kontrolü, boyanın göçmesini engelleyici.

Seramik cilaları	0,3-0,58	Bileme sırasında birikmeyi önler.
Sulu çamur patlayıcıları	0,3-1,0	Kalınlaştırıcıların formülleri; sıcaklık kararlılığını artırır (guar sakızı ile kombinasyonunda).
Petrol üretimi	0,1-0,4	Matkap delicisinde yağlayıcı ya da sürtünmeyi azaltıcı.
Yağ geri kazanımının artırılması	0,05-0,2	Artan viskozite ile su hareketini arttırıcı ve permeabiliteyi azaltıcı.

Ksantan sakızı ile aynı ya da daha büyük ticari ilgisi olan biyopolimerleri üretebilen mikroorganizmaların ticari uygulanabilirlikleri üzerinde karar vermeden önce ekzosellular polisakkarit (EPS) kararlılığı ve reolojik özelliklerini araştırmak gereklidir [8].

### 1.3. Ksantan Sakızının Endüstriyel Üretimi

*X.campestris* pv. *campestris*, geniş bir aralıkta karbon ve azot kaynaklarını kullanabilir. Ksantan genellikle kesikli kültürlerde, temel karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, nişasta, melas ya da mısır şurubunun enzimatik ya da asidik hidrolizatları ile üretilir. Azot kaynağı olarak kazein hidrolizatları, soya fasulyesi, maya hidrolizatları ya da çözünebilir damıtıkları sık sık kullanılır. Sürekli fermantasyonda sterilliğin korunması ve hızlı gelişen mutantların ortaya çıkma riski gibi problemler vardır ki, istenen ksantan ürünü alınamaz. Kesikli kültürlerde ksantan hemen hemen tüm gelişme fazlarında üretilir. Maksimum üretim eksponensiyel gelişme fazında gözlenmiştir. Farklı gelişme fazları ve gelişme ortamındaki değişimler, örneğin farklı substratların kullanılması ve besinlerin sınırlanması ile primer yapı etkilenmez fakat sekonder ve tersiyer yapı, moleküler kütle ve ksantan verimi etkilenir. Bu nedenle, kesikli kültürde üretilen ksantan ürünü farklı gelişme fazlarında üretilen ksantanın bir karışımını temsil eder ve bileşimi, farklı kültür koşulları ile değişebilir. Kesikli kültürde kullanılan üretim straini ve substratlara bağlı olarak 48-72 saat sonra kültür süpernatantında ksantan birikir. Sürekli kültürlerde substratın polimere %60-70 oranında yüksek dönüşümü gözlenmiştir. Ksantan üretimi substrattaki karbonun azota yüksek bir oranı ile artırılır. Azot eksikliği olan ortamda yüksek bir ksantan üretimi gözlenmiştir. Souw ve Demain (1979) ksantan üretimi için sukrozun glukoz ve piruvattan daha iyi bir substrat olduğunu rapor etmişlerdir. Onlar ayrıca suksinat ve 2-oxoglutarat ın sukroz içeren ortamda ksantan üretimi üzerinde stimüle edici etkilere sahip olduklarını da bulmuşlardır. Davidson (1978) ksantan üretiminde magnezyum ya da fosfat sınırlamasının düşük bir piruvat içeriği ile sonuçlandığını belirtmiştir [5]. *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile çalışan Qadeer ve Baing (1989)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ün diğer amonyum tuzlarından daha verimli bir azot kaynağı olduğunu kaydetmişlerdir [7].

Ksantanın endüstriyel üretimindeki temel problemlerden biri fermentasyon süresince kültürün artan viskozitesidir, öyle ki bu oksijenin ve besinlerin kullanılabilirliğini etkiler. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strainleri zorunlu aerobiktirler. Bu nedenle oksijen transfer oranı ksantan verimini etkiler. Ayrıca Suh ve ark., oksijen sınırlaması altında ksantanın moleküler kütlesinin azaldığını kaydetmişlerdir [5].

Fermentasyon süresince artan viskozite yüzünden durgun alanlara meydan vermemek için, uygun havalandırma ve kültür karışımı garantiye alınmalıdır. Bu nedenle ksantanın endüstriyel üretimi için genellikle hava karıştırılmalı tanklar yerine mekanik olarak karıştıran fermentasyon tankları kullanılır [5].

Endüstriyel üretimde yüksek viskozitesi olan ksantan solüsyonundan hücrelerin ayrılması maliyeti yüksek olan bir işlemdir. Günümüzde fermentasyon sıvısından ksantanın geri kazanımı için ideal yöntem bakteriyel hücreler ve enzimlerin yok edilmesi için pastörizasyondan sonra alkol ile genellikle isopropanol ile presipitasyondur. Bunu takiben presipite ksantan kurutulur ve toz haline getirmek için öğütülür. Alkol damıtılarak geri kazanılır. Besinsel olmayan endüstriyel uygulamalar için yaklaşık %10 ksantan içeren konsantrasyonlar tangential-flow filtrasyonu ile elde edilir. Kararlı ürün elde etmek için anti bakteriyel ajanlar konsantrasyonlara eklenir. Ksantanın enzimatik yıkımı ürünün rheolojik özelliklerini değiştirmek için kullanılır [5].

Ksantan üretimi için strainler geleneksel yöntemler ile seçilir ve geliştirilir. Ksantan sentezinde spesifik genleri kapsayan mutasyon vasıtasıyla tekrarlayan ünite yapılarını kolaylaştırmak için birçok çaba harcanmaktadır fakat bu mutantlardan elde edilen ksantan verimi, yabani tip strainlerden elde edilenden daha azdır. Betlach ve ark., (1987) glukuronik asit kalıntıları ve piruvat yapısı olmayan ksantan üreten bir mutant yapmışlardır. Bu türemiş ksantan solüsyonları oldukça viskozdur [5].

Son zamanlarda, ksantan sakızının sentezini ve dışarı verilmesini sağlayan gen kümesi izole edilmiştir. Bu kapsamlı bilimsel avantajlara rağmen, ana metabolik yollar içinden karbon akışı az bilinmektedir ve bu bilginin çoğu glukoz için spesifiktir. Entner-Doudoroff yolu enzimlerinin varlığı ve fosfofruktokinaz

aktivitesinin yokluğu, *Xanthomonas campestris*'in şeker metabolizmasının, birçok *Pseudomonas* türüne ana bir metabolik örgü ile benzediğini işaret eder [9].

Yeni strainlerin yapımı ile ksantan veriminin önemli bir artışını başarma olasılığı muhtemel görünmemektedir. Bu nedenle ksantan veriminin ve kalitesinin artırılması başlıca fermentör tasarımının geliştirilmesi ve ortam bileşiminin değiştirilmesi yoluyla başarılmaktadır. Bununla beraber, ksantan biyosentezi için kullanılan verimli substratların aralığını genişletmek için çalışmalar yapılmaktadır. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin düşük düzeyinden dolayı laktozu verimli bir karbon kaynağı olarak kullanamaz. Bu nedenle peynir altı suyu ksantan üretimi için elverişli bir karbon kaynağı değildir [5].

Ksantan sentezi için ilk olarak, izole edilen mikrobiyal strain, istenen özelliklerini koruması ve mümkün olduğu kadar uzun süre depolanabilmesi için, denenmiş yöntemler ile muhafaza edilir. Muhafaza edilen kültürün küçük bir miktarı, büyük reaktörlere inokulum elde etmek için, sıvı ortamda ya da katı yüzeylerde geliştirilerek çoğaltılır. Mikroorganizmanın gelişimi ve ksantan üretimi, kullanılan bioreaktörün çeşidi, işlem şekli (kesikli ya da sürekli), ortam bileşimi ve kültür koşulları (sıcaklık, PH, erimiş oksijen konsantrasyonu) gibi faktörler ile etkilenir. Çizelge 1.3'de tipik bir ksantan üretim yönteminin açıklamalı olarak basamakları gösterilmiştir [4].

Çizelge 1.3. Ksantan'ın tipik üretiminde anahtar adımlar

Yöntem basamağı	Ölçü ve uygulama	Destekler
<i>X.campestris</i> kültürü korunması	Uzun süre; liyofilize edilerek, derin dondurucu. Kısa süre; katı yatkı agar yada petriler	Strain geliştirilmesi; kültüre uygulanabilirlik için test
İnokulum hazırlığı	Çalkalamalı erlenler; inokulum fermenterleri	Gelişme ortamı bileşimi; kontrol edilen işlem koşulları; kontaminantlar için testler
Üretim aşaması	Bioreaktör	Araç-gereç dizaynı; üretim ortamı bileşimi; fermantasyon koşulları; kontrol edilen uygulama koşulları
Hasat	Teknik, kimyasal yada enzimatik; santrifüj yada filtrasyon	Etkisiz ve çıkarılan hücrelerin geliştirilmesi yöntemi
İzolasyon	Presipitasyon, filtrasyon	Ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi

Fermentasyon bitiminde broth, ksantan, bakteriyel hücreler ve diğer birçok kimyasalları içerir. Ksantanın geri kazanımı için genellikle, ilk olarak hücreler filtrasyon yada santrifüj yoluyla uzaklaştırılır. FDA tüzükleri ksantan sakızının besin sınıfı için presipitasyonunda izopropanol kullanılmasını önermektedir. Presipitasyondan sonra, ürünün mekanik olarak suyu uzaklaştırılır ve kurutulur. Kurutulmuş ürün öğütülür ve kaplara paketlenir [4].

Yoo ve ark., [10] *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile ksantan sakızı üretimi için, ek bir substrat olarak atık şeker pancarı pulpunun kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Bu çalışma, atık şeker pancarı pulpunun eklenmesinden önceki inkübasyon periyodu, inkübasyon sıcaklığı ve ilişkili sıcaklıklar üzerine odaklanmıştır. Ksantan sakızı üretimi ve şeker pancarı pulpunun degradasyonundaki optimal koşulları belirlemek için, inkübasyon ve ilişkili parametreler değiştirilmiştir. Fermentasyon sonrasında şeker pancarı

pulpunun ksantan sakızı eldesi için verimli bir substrat olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Papi ve ark., [11] *X.campestris*'in gelişimi ve ksantan üretimi için çeşitli dilüsyonlardaki (%10, %25, %35, %50, %75) şeftali brothunu denemişlerdir. Bu dilüsyonlar hem işlenerek saf hale getirilen hemde işlenmemiş şeftali brothu ile hazırlanmıştır. Saf şeftali broth'unun *Xanthomonas campestris* in gelişimi ve ksantan üretimi için çok iyi bir substrat olduğu bulunmuştur. En yüksek ksantan verimi % 50 lik saf şeftali brothu ile elde edilmiştir.

Galindo ve ark., [12] ksantan fermentasyonu üzerine Tween 40, Tween 80, Chaps ve Triton X-100 deterjanlarının etkisini değerlendirmişlerdir. İncelenen tüm deterjanlar 24 saatlik kültüre eklendiğinde, deterjan içermeyen kontrol ile karşılaştırıldığında son ksantan sakızı konsantrasyonu artmıştır. Triton, deterjan yokluğunda üretilen sakızdan 1,45 kat fazla üretime neden olan çok önemli bir etkiye sahiptir. Triton kullanımı fermantasyon süresince oksijen konsantrasyonunun ve fermantasyon brothunun viskozitesinin daha yüksek olmasına yol açmıştır. Bir deterjanın, örneğin Triton X-100 ün küçük miktarlarda eklenmesi ksantan fermantasyonunda fermantasyon maliyetini azaltan ve daha yüksek nitelikte bir polimer sentezine izin veren umut verici bir yoldur.

Papoutsopoulou ve ark., [13] lacZ geni, maturation protein ve proteinaz P genlerini içeren Pur291 ve pNZ521 plazmitlerini, konjugasyon ya da transformasyon ile *X.campestris*'e transfer etmişlerdir. Çalışılan tüm strainler %50 peyniraltı suyu içeren bir ortamda ya da aynı ortama %1,5 laktoz ya da %1,5 glukoz eklenmiş bir ortamda ksantan sakızı üretimi için geliştirilmiştir. Bu çalışılan strainler peyniraltı suyundan laktozu kullanabilmişlerdir fakat büyük miktarda ksantan sakızı üretimi yapamamışlardır.

Lopez ve ark., [14] birkaç zeytin fabrikasının atık sularından *X.campestris* ile ksantan üretimini araştırmışlardır. Maximum ksantan üretimi tek besin kaynağı olarak %50 zeytin atık suyu içeren ortamda 4 g/lt olarak elde edilmiştir.

Manjula Rao ve ark., [15] *X.campestris* kültürlerinden ksantan sakızının verimini, kalitesini ve bioreaktör verimliliğini arttırmak için, yeni bir strateji olarak serbest radikal kullanmışlardır. Ksantan veriminde %210'luk bir artış ve viskozitede %20 lik bir artış HOCl (oksidant) uygulamasından sonuçlanmıştır.

HOCl uygulamasının bir sonucu olarak ksantan sakızında asetat kütle fraksiyonu %42 azalmış ve piruvat kütle fraksiyonu %63 artmıştır. HOCl uygulaması ile gelişme hızı hemen hemen hiç etkilenmemiştir.

Papagianni ve ark., [2] kesikli kültürde, *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 ile, ksantan üretimi ve gelişme kinetiği üzerine, çalkalama düzeylerinin etkisini, pH kontrol edilmeden bir laboratuvar fermentöründe çalışmışlardır. Ksantanın moleküler ağırlığını ve piruvat içeriğini incelemişlerdir. Fermentasyonlar 100-600 rpm çalkalama hızlarında gerçekleştirilmiş ve hem piruvat içeriği hem de ürünün moleküler ağırlığı yaklaşık olarak hesaplanmıştır. Artan çalkalama hızı daha yüksek üretim oranı ve biomas düzeyi ile sonuçlanmıştır. Ksantanın kimyasal yapısı çalkalama hızı ile etkilenmiştir çünkü çalkalama hızının artması ile piruvat içeriği artmıştır. Bununla birlikte çalkalama hızı 100 rpm den 600 rpm'e çıkarıldığında ksantanın moleküler ağırlığı üzerine önemli olmayan etkiler gözlenmiştir.

Yang-Ming Lo ve ark., [16] kesikli, iki fazlı kesikli ve beslemeli kesikli fermentasyonlarında hücre gelişimi ve ksantan üretimi üzerine ortamdaki glukoz/yeast extract oranının (G/YE) etkilerini çalışmışlardır. Genelde, ksantan ürünü ve spesifik ürün oranı ortamdaki artan G/YE ile artmış, fakat hücre miktarı ve spesifik gelişme oranı artan G/YE kadar azalmıştır. Eksponansiyal gelişimin sonunda başlangıçta düşük bir düzeyden (%2,5 glukoz/%0,3 yeast ekstrakt) yüksek bir düzeye (%5,0 glukoz/%0,3 yeast ekstrakt) değişen G/YE ile iki fazlı bir kesikli kültür fermentasyonu, ksantan üretimi için tercih edilir bulunmuştur. İki fazlı fermentasyon tasarımı hem hızlı hücre gelişimini sağlamış hem de yüksek bir ksantan verimi ve üretim oranı vermiştir.

Flores ve ark., [17] ksantan sakızının niteliği ve üretimi üzerine çözünmüş oksijen geriliminin (dissolved oxygen tension=DOT) etkisini %10-100 arasındaki bir doygunlukta çalışmışlardır. DOT ksantan üretimi için kültürün performansında önemli bir rol oynamaktadır. Ortalama moleküler ağırlık (MMW) doygun tipteki DOT ile etkilenir. MMW %40 DOT de bir maksimuma (yaklaşık  $10 \cdot 10^6$  kg mol<sup>-1</sup>) ulaşır. Genelde yüksek moleküler ağırlıktaki polimerlerin oranı artan DOT kadar artar.

Moreira ve ark., [18] erik, şeftali ve mandalınadan *X.campestris* pv. *pruni* izole etmişlerdir. *X.campestris* pv. *pruni*'nin 18 yeni straini arasında bir eleme yapılmıştır. Sentezlenen biyopolimerlerin geleneksel ortamda (PM II) verimleri, viskozitesi ve kromotografik modelleri analiz edilmiştir. Verimler 2.3-8.3 g/L arasında değişiklik göstermiştir. %3'lük (w/v) sulu solüsyonların viskoziteleri 25, 45 ve 65°C de, 6, 12, 30 ve 60 rpm'de belirlenmiştir. Tüm biyopolimerlerin pseudoplastik davranışa sahip oldukları görülmüştür. Biyopolimerlerin kimyasal bileşimi, verimi ve viskozitesi üzerine fermentasyon zamanının (24-96 saat) etkisi belirlenmiştir. Fermentasyonun 24. saatinden sonra elde edilen biyopolimer daha yüksek viskozite göstermiştir fakat daha yüksek verim 72. saat de elde edilmiştir. Tüm strainler tarafından üretilen polimerlerin aynı mannoz, ramnoz, glukoz, ve glukuronik asit bileşimine, fakat farklı konsantrasyonlarda sahip oldukları görülmüştür. Bu çalışmadan verimin viskozite ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Yüksek broth viskozitesi, düşük kalitedeki polimerin yüksek konsantrasyonundan dolayı olabilmektedir sonucuna varmışlardır.

Stredansky ve ark., [19] *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, *X.campestris* PD 565 ve PD 659 ile ksantan üretimi için alternatif bir strateji olarak, kesiksiz fazlı fermentasyonu amaçlamışlardır. Kullanılan kesiksiz substratlar, tarım endüstrisi atıkları ya da bu yolla üretilen; öğütülmüş arpa taneleri, elma ve üzüm posası ve limon kabuklarıdır. Bunlar çok düşük maliyette elde edilebilen ürünlerdir. Üretim koşulları polimer verimini, 32.9 g/L'den 57.1 g/L'ye çıkarmak için için optimize edilmiştir. Fermentasyon sonrasında elde edilen ürünler NMR spektroskopisi ile analiz edilmiştir ve ticari ksantan ile uyumlu bir içerik ortaya çıkarılmıştır.

Letisse ve ark., [9] ksantan sakızı üretimi için *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 ile bir kesikli fermentasyon stratejisi geliştirmişlerdir. Temel ortam bileşenlerinin tümü başlangıçta sağlanmıştır. Tek şeker kaynağı olarak sukroz kullanılmıştır. Ardışık olarak tüketilen azot kaynaklarının, (soya fasulyesi hidrolizatları, amonyum ve nitrat tuzları) ortamın optimizasyonunu daha fazla kolaylaştırdığı görülmüştür. Bu çalışmada ksantan sakızının sukrozdan yeterli miktarda üretilebildiği görülmüştür. Fermentasyon süresince mümkün olduğu

kadar az ilave yapılması ve aynı zamanda ürün değerlerine karşı ekonomik önceliklerin göz önünde tutulması gerektiği vurgulanmıştır.

Kumar ve ark., [20] taksonomik olarak ilişkili olan, buğday ve pirinç ekinlerine saldıran, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ve *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*'nın etki şekillerini anlamak için, onların ekzopolisakkaritlerinin (EPSs) bileşimindeki farklılıkları incelemişlerdir. Bu patojenlerin çalkalamalı kültürlerindeki maksimum polisakkarit üretimi 24-72 saat arasında gözlenmiştir. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, buğdayın yaprak damarlarında patojendir ve pirinçlerde bakteriyal yanıklık etkeni olan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (42.02 µg/ml) ve pirinçte bakteriyal yaprak damarlanması nedeni olan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (41.91 µg/ml)'ya kıyasla oldukça yüksek bir miktarda (46.97 µg/ml) polisakkarit üretmiştir. Üç *Xanthomonas* patovar straininin polisakkaritlerinin moleküler arası hidrojen bağı ile, bir -OH grubuna, metil alkanların bir C-H grubuna, bir aldehit (RCHO) grubuna, bir C=C ya da C=O grubuna ve bir C-O grubuna sahip olduklarını infrared (FTIR) spektra öne sürmüştür. FTIR spektra aynı zamanda, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'da bir asit anhidrid grubu, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*'de bir sekonder aromatik ya da alifatik amin grubu ve *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ve *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*'da bir primer aromatik ya da alifatik amin grubunun varlığını da göstermiştir. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrumu, tüm bakterilerin polisakkaritlerinde heksos ya da pentoz'un bir β anomerik karbonu ve heksos ya da pentoz'un bir asetil amin grubu gibi yapısal olmayan şekerlerin varlığını göstermiştir. NMR spektrumu ayrıca tüm strainlerdeki heksos ya da pentoz'un α-anomerik karbonunu ve sadece *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*'deki şekerin 4 karbondaki bir dallandığını; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'daki bir uronik asit molekülünün (asit anhidrit grubu) varlığını; ve *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*'daki bir deoksi şeker olan ramnozun varlığını da tanımlamıştır.

Yang ve ark., [21] hücre adsorpsiyonu ile, örülmüş çeşitli fibröz materyallere, ksantan fermentasyon brothundan hücreleri uzaklaştırmanın uygulanabilirliğini çalışmışlardır. Kesikli fermentasyon süresince ya da fermentasyon sonrasında fermentasyon brothunda mevcut olan *Xanthomonas*

*campestris* hücrelerinin adsorbe olması için pamuk ve poliyester liflerin her ikisinde kullanılabilirliğini bulmuşlardır. Hemen hemen tüm hücreler liflere adsorbe olarak fermentasyon brothundan ayrılmıştır. Pamuğa hücre adsorbsiyonu poliyester liflerden daha hızlı olmuştur. Bu adsorbsiyon yöntemi çeşitli endüstriyel uygulamalar için yüksek saflıkta, hücresiz ksantan sakızının ekonomik üretimine izin vermektedir. Fiberlere hücre adsorbsiyonu, ksantan sakızı eksikliğinde etkili olmamıştır.

Garcia-Ochoa ve ark., [22] *X.campestris* NRRL B-1459 ile, önceden kullanılan ortam bileşimi ve uygulama koşulları altında, ksantan üretimi için yapısal olmayan kinetik bir model geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada tasarlanmış olan model biomass, karbon ve azot kaynakları, ksantan ve çözünmüş oksijen göz önüne alınarak, beş bileşenin değişim oranları ile beş farklı denklemden oluşmuştur.

Casas ve ark., [23] ksantan/locust bean gum karışımı solüsyonlarının viskozitesi üzerine farklı değişkenlerin etkisini çalışmışlardır. Ksantan sakızı ve locust bean gum molekülleri arasındaki etkileşimden dolayı, bu karışımlarda yüksek viskozite gözlenmiştir. Bu etkileşim locust bean gum'un omurgası ile ksantan sakızının yan zinciri arasında meydana gelir. Solüsyondaki ksantan sakızının konformasyonu ve locust bean gum'un yapısı, solüsyon karışımlarının son viskozitesi üzerinde önemli etki gösterir. En yüksek viskozite, ksantan sakızı 40°C ve locust bean gum 80°C'de eritildiğinde ve ksantan/locust oranı 2:4 (w/w) ve toplam 1.5 kg m<sup>-3</sup> lük bir polisakkarit konsantrasyonu ile elde edilmiştir.

Lo ve ark., [24] donmuş bir hamurdaki ve nişasta jellerindeki donma/erime dengesi üzerine, ksantan ve locust bean gum galaktomannanının etkisini incelemişlerdir. Locust bean gum, galaktoz yan zincirleri ile linear bir mannan iken, ksantan helikal bir konformasyona sahip olabilen kompleks bir polisakkarittir. İkisinin birlikte jel oluşumunu sağlayabildikleri ve farklı mekanizmalar ile buz kristallerini etkileme potansiyeline sahip olduklarını belirtmişlerdir.

#### 1.4. *Xanthomonas campestris*

*Xanthomonas*, *Pseudomonaceae* ailesinin bir genusudur. Bu genustaki tüm organizmalar bitki patojenidirler. Fitopatogenik bakteriler arasında *Xanthomonas* generusu 250'den fazla bitki türüne saldırma yeteneğinden dolayı çok önemlidir [4].

*Xanthomonas* patovaryları bazı tarımsal önemi olan lahana, yonca ve fasulye bitkilerinin büyük bir bölümünü enfekte eder [20].

Bitki patojeni olan *Xanthomonas campestris* türleri, sarı pigmentli oluşları ve ekzopolisakkarit (ksantan sakızı) üretmeleri ile, iki ortak özelliğe sahiptirler [25]. *Xanthomonas*'ın tüm türlerinde sarı pigmentler mevcuttur, fakat pigmentler özellikle strain degradasyonu olduğunda yok olabilirler [4].

Patovaryların çoğu enfeksiyon için, yüksek derecede konukçu spesifikliğı gösterirler. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, tarım dünyasında ağır kayıplarla sonuçlanan, cruciferlerde siyah çürüklüğe neden olan patojendir. İlaveten, ksantan sakızı tarımda, petrol üretiminde ve besin endüstrisinde bir stabilize edici, yoğunlaştırıcı, kalınlaştırıcı ve suspande edici ajan olarak çeşitli uygulamalara sahiptir. Bu nedenle patovar *campestris*, ksantan sakızının endüstriyel üretimi için seçilmiş olan organizmadır. [25].

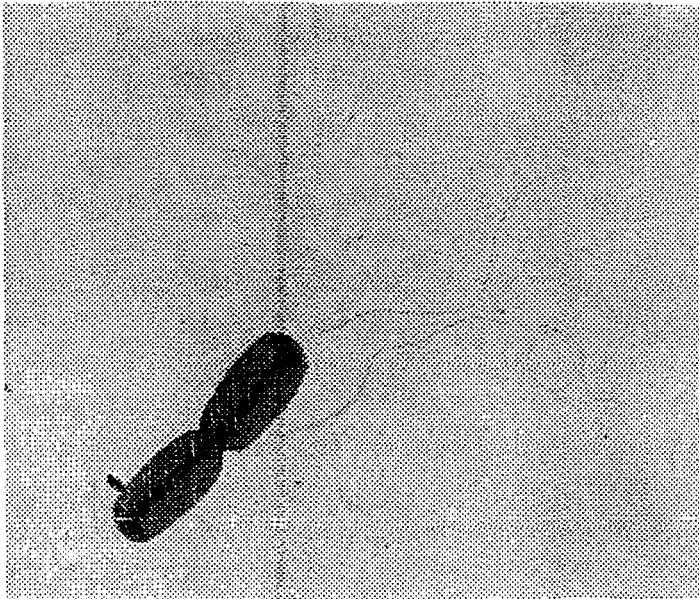
*Xanthomonas* hücreleri tek düzgün çubuklar olarak, 0,4-0,7 µm genişliğinde ve 0,7-1,8 µm uzunluğundadırlar (Şekil 1.2). Hücreler hareketli, Gram negatiftir ve polar bir flagellaya sahiptirler (1,7-3 µm uzunluğunda). Mikroorganizma kemiorganotrofiktir ve son elektron alıcısı olarak oksijen gerektiren zorunlu bir metabolizma çeşidi ile obligat bir aerobtur. Bakteri denitrifiye yapamaz ve katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Koloniler genellikle sarı, düzgün ve viskozdur. *Xanthomonas* türleri glukozu okside edebilirler ve glukoz yıkımı için ilk olarak Entner-Doudoroff yolu kullanılır (ayrıca pentoz fosfat yolu mevcuttur fakat total glukozun sadece %8-16'sı kullanılarak tüketilir). Trikarboksilik asit ve gliksilat döngülerinin her ikisi de mevcuttur [4].

*X.campestris* genellikle en çok ksantanın endüstriyel üretimi için kullanılan mikroorganizmadır. *X.campestris* standart laboratuvar ortamında gelişir ve birkaç strain çeşidi sürekli ve kesikli kültürün her ikisinde de elde edilmektedir. Üç farklı strain tanımlanmıştır; L strain (large)-bu strain 4-5 mm çapında mukoid

parlak sarı koloniler oluşturur. En iyi ksantan üretimini bu sağlar ve ksantanın piruvat içeriği yüksektir. Sm strain (small) 2 mm çapında viskoz koyu sarı koloniler oluşturur. Hücrelerin ksantan üretimi ve piruvat içeriği L straininkinden daha düşüktür. Vs strain (very small) maksimum 1 mm çapında viskoz olmayan soluk sarı renkli kolonilerdir. Bu strain ksantan üretmez[4].

Sm ve Vs strainleri genellikle kültür eskidiği için L straininin degradasyonu ile oluşur. Ksantan sakızı daima L straini kullanılarak üretilir ve strainin iyi bir şekilde korunması gerekir. Mikroorganizmanın kısa ve uzun süre korunması için farklı teknikler aşağıdaki gibi planlanmıştır. Uzun süre koruma üremeyi engelleyen bir koruma tekniğidir, %10 (v/v) gliserin solüsyonunda dondurma ve liyofilizasyon kullanılır. Kısa süreli koruma yöntemleri birkaç mikrobial gelişime izin verir. Hücreler yatık ve petrilerdeki katı kompleks ortamlarda (örneğin YM agar) 25°C de 18-20 saat geliştirilir. Yatık agar ve petriyer sonra 4°C de korunur. Kültür strain degradasyonunu önlemek için her 14 günde taze ortama transfer edilmelidir. Kültür muhafazasının kontrolü için yatık YM agar 25°C de 3 gün inkübe edilir; canlı hücreler parlak sarı ve yuvarlak 4-5 mm çapında koloniler üretir [4].

Şekil 1.2. *X. campestris*'in elektron mikroskopundaki görüntüsü (x 12 000) [4].



#### 1.4.1. *Xanthomonas campestris*'in Gelişme Ortamı

*X.campestris*'in gelişimi için kullanılan tüm ortamlar kompleks ortamlardır. En yaygın olarak YM ortamı ve YM-T olarak tanımlanmış YM nin yarı sentetik bir çeşidi kullanılır. Gelişim her iki ortamda tamamen aynıdır ve elde edilen maksimum biyomas ürünü her ikisi için birbirine oldukça yakındır; bununla birlikte, YM-T de bulunan iki nitrojen kaynağından dolayı bu ortamda bir dioksik gelişme modeli elde edilir [4].

#### 1.4.2. *Xanthomonas campestris*'in Gelişme Sıcaklığı

*Xanthomonas campestris* 25 den 30°C ye kadar uzanan farklı sıcaklıklarda kültüre alınmaktadır. Moraine, ve ark., (1966) 22-35°C arasındaki sıcaklığın gelişme üzerindeki etkisini çalışmışlardır, kullanılan ortamda optimal gelişme sıcaklığı 28°C olarak belirlenmiştir [4].

#### 1.5. Cruciferlerin Siyah Çürüklüğü ya da Siyah Damarlanması

Cruciferlerdeki siyah çürüklük ya da siyah damarlanmaya *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* neden olur. Bu hastalık dünyanın her yerinde mevcuttur. Lahana familyasının tüm üyelerinde etkilidir ve bazen ekinler üzerinde şiddetli kayıplara neden olur. Hastalık genç yaştaki bitkilere ve özellikle bitkilerin üst bölgelerine etki eder, fakat etli köklere sahip şalgam ve turp benzeri konukçularda, kökler de etkilenebilir ve kuru bir kök gelişebilir. Genç fidelerin enfeksiyonu cüceliğe, tek yönlü gelişime ve küçük yaprakların düşmesine neden olur. İlk semptomlar genellikle büyükçe bir alanda, çoğu kez V şeklinde, yaprağın diyaframına doğru ilerleyen, yaprakların kenarlarında klorotik lekeler olarak ortaya çıkar. Etkilenen alan daha sonra kahverengiye döner ve kurur. Bu süre içerisinde gövdeye ilerleyen renksiz damarlar buradan diğer yapraklara ve köklere iner ve çıkar. Yapraklar, orta damar vasıtasıyla yukarı hareket eden bakteriler tarafından sistemik olarak istila edildiğinde, klorotik bölgeler yapraklar üzerinde herhangi bir yerde ortaya çıkabilir. Önce enfekte olan yapraklar sonra da diğerleri

düŒer. İnfekte yaprakların gövdesi ve sapları dıŒarıdan sağlıklı görünür fakat çapraz bölgede onlar bakterilerin bıraktığı çoğunlukla küçük sarı yapışkanın ve iletim dokularının kahverengi yada siyahlaşmasına olanak verir. Bazen bakterilerin en büyük oyukları, özde ve korteks de oluşur. Lahana ve karnabahar başları, aynı şekilde şalgam, turp ve diğerlerinin etli kökleri de istila edilir ve renksizleşir. İnfekte olan alanlar sonradan çürükçül bakteriler ile istila edilir, bu bakteriler dokuları parçalar ve iğrenç bir koku ortaya çıkar.

Siyah çürüklük bakterileri, bitki atıklarını yada tohumlarını kış bitiminde infekte eder. Eğer bu bakteriler kotiledonlar yada genç yapraklar ile temas eder yada bulaşırsa, bakteriler stomalar, hidatodlar yada yaralar aracılığı ile onları infekte eder ve bunların vasıtasıyla hücreler arasına yayılırlar. Daha sonra bakteriler damarlarda çoğalır ve bitkide baştanbaşa yayılır, hatta tohumlara ulaşırlar. Aynı zamanda, bu bölgelerdeki ksilem parçalanır ve bakteriler parankimayı çevreleyen hücrelerarası boşluklara yayılır. Bu hücreler kısa süre içinde parçalanır ve oyuklar oluşur.

Yaprak infeksiyonlarında bakteriler, hidatodlar yada yaralar aracılığı ile yaprakların yüzeyine ulaşır ve sonra yağmur damlaları ve rüzgar ile yayılırlar Yağmurlu havada, sıcak hava infeksiyonu hızlıca geliştirir ve görünür semptomlar ortaya çıkabilir.

Siyah çürüklüğün kontrolü zordur ve iki yada üç yıl önce siyah çürüklük olmayan toprağa dikilen fidelerin ve bakterisiz tohumun kullanımına bağlıdır. Bu yüzden ekin rotasyonu gereklidir. Sıcak su ile tohum muamelesi (50°C de 30 dk) ve son zamanlarda tetracycline yada streptomycin antibiyotiği %0.5'lik sodyum hipoklorit de 30 dk emdirilir ve bunu takiben su ile çalkalanır. Bu işlemler bakteri içermeyen tohum elde etmeye yardım eder [26].

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Bakteri Strainleri

Çalışmamızda kullanılan test bakterileri ve alındıkları yerler Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteri strainleri

ORGANİZMA	STRAIN NO	KÖKENİ
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NRRL B-1459 *	U.S
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	TPPB 5001 **	Türkiye
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	***	U.S
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	****	Türkiye

\* :Northern Regional Research Laboratory (NRRL) of the U.S. Department of Agriculture.

\*\* :Ankara Zirai Araştırma Merkezi.

\*\*\* :Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi (Hüseyin Basım).

\*\*\*\* :Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü.

#### 2.1.2. Toprak Örneklerinin Alınması

Eskişehir Hasan Polatkan semti ve Kızılınler Köyü civarında bulunan karnabahar, lahana ve turp tarlalarının değişik bölgelerinden alınan toprak örnekleri, ayrı ayrı temiz naylon poşetler içinde laboratuvara getirilerek *Xanthomonas campestris* deteksiyonu için incelemeye alınmıştır.

### 2.1.3. Crucifer Tohumlarının Temin Edilmesi

Çalışmamızda kullanılan beyaz turp, kırmızı turp, şeker pancarı ve beyaz lahana tohumları, 50 g'lık paketler halinde Eskişehir Yunusemre Arıcılık ve Tohumculuktan alınmıştır.

### 2.1.4. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler

#### 2.1.4.1. SX Agar

Çözünür patates nişastası	10.0 g
Beef extract (Difco)	1.0 g
Amonyum klorid	5.0 g
Potasyum difosfat	2.0 g
Metil violet B	1 ml (%20 lik etanol içinde %1lik)
Metil green	2 ml
Sikloheksimid	250 mg
Agar	15.0 g
Distle Su	1000 ml

pH=6.8'e ayarlanmıştır. 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve daha sonra steril petrilere 15-20' şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır [27].

#### 2.1.4.2. BSCAA

Çözünür nişasta	10.0 g
Glisin	0.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g

Metil green (%1 sulu)	0.2 ml
Sikloheksimid (100 mg/ml)	2.0 ml
Agar	15.0 g
Distile Su	1000 ml

121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve daha sonra steril petrilere 15-20' şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır [28].

#### 2.1.4.3. NSCAA

Nutrient agar (Difco)	23.0 g
Çözünür patates nişastası (Baker)	15.0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra L için 0.2 ml stok sikloheksimid solusyonu eklenmiştir. 100 mg/ml stok sikloheksimid solusyonu hazırlamak için %75 lik metanol yada etanol'un 1.0 ml sinde 1.0 g sikloheksimid eritilerek hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre sterilizasyonu gerekli değildir. Daha sonra steril petrilere 15-20'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır [28].

#### 2.1.4.4. FS

Çözünür nişasta	10.0 g
Maya ekstrakt	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Metil green (%1 sulu)	1.5 ml
Agar	15.0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra L için 0.2 ml stok sikloheksimid solusyonu ve 1.0 ml stok piridoksin HCl (1 mg/ml) eklenmiştir. Daha sonra steril petrilere 15-20'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır [28].

#### 2.1.4.5. YS

Amonyum fosfat ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	0.5 g
Potasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	5.0 g
Maya ekstrakt (Difco)	5.0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [27].

#### 2.1.4.6. Jelatin Medium

Et ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Jelatin	120 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [27].

#### 2.1.4.7. Skim Milk

10 g süt tozuna son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiş ve 110°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

#### 2.1.4.8. YMA (Yeast Malt Agar)

Malt ekstrakt	3.0 g
Maya ekstrakt	3.0 g
Dekstroz	10.0 g
Pepton	5.0 g
Agar	20.0 g
Distile Su	1000 ml

0.4 N KOH ve 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH 7±0.2'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 1.1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir [3].

#### 2.1.4.9. YM-Broth (Yeast Malt Broth)

Besiyeri YMA'nın içeriklerinden agar hariç diğer maddelerin tümü aynıdır [3].

#### 2.1.4.10. YM-T Broth

D-Glukoz	12.0 g
Maya ekstrakt	1.5 g
Malt ekstrakt	1.5 g
Pepton	2.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (AP)	1.3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri içerikleri suda çözülerek 0.4 N KOH ve 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 7±0.2'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 1.1 atmosfer basınçta 15 dk süre ile steril edilmiştir [3].

#### 2.1.4.11. Standart Üretim Ortamı

D-Glukoz	22.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (AP)	2.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	.0.2 g
Antifoam (Köpük kırıcı)	0.1 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri pH'sı 0.4 N KOH ve 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 7±0.2'ye ayarlanmıştır. Bu besiyerinin hazırlanmasında şekerin karamelleşme reaksiyonunu önlemek için glukoz, pH'sı 4.5'e ayarlanarak ayrı olarak 121°C de 1.1 atm basınçta 20 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Azot ve tuzların karışımı da ayrı olarak sterilize edilmiştir. Bunlar inokulasyondan önce aseptik koşullarda karıştırılmıştır [3].

#### 2.1.4.12. Optimize Edilmiş Besi Ortamı

Maya ekstrakt	3.0 g
Malt ekstrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Sukroz	50.0 g
CaCO <sub>3</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g
NaCl	0.5 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri pH'sı 6.0-7.0 ye ayarlanarak 121°C'de 1.1 atm basınçta 20 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir [8].

#### 2.1.4.13. LB Medium (Luria-Bertani Medium)

950 ml deiyonize suya;

Bacto-tripton	10.0 g
Bacto-maya ekstrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g

eklenerek pH 5N NaOH (~0.2 ml) ile 7.0 ye ayarlanmıştır. Solüsyonun hacmi deiyonize su ile 1 L ye tamamlanmıştır. 121°C'de 1.1 atm basınçta 20 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir [30].

#### 2.1.4.14. Pulp İçeren Fermentasyon Ortamı

Meyve pulpu 2600 g de 20 dk santrifüj edilerek süpernatantın çeşitli dilüsyonları (%5, %10, %15, %25, %35, %50) hazırlanmıştır. Her bir dilüsyona %0.5 NH<sub>4</sub>Cl ve %0.2 maya ekstrakt ilave edilmiştir. pH 7'ye ayarlanarak 121°C'de 1.1 atm basınçta 20 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir [11].

#### 2.1.4.15. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2.7 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ml distile su içinde karıştırılmıştır [31].

#### 2.1.4.16. 0.4 N KOH

2.24 gr KOH 100 ml distile su içinde çözündürülerek karıştırılmıştır [31].

#### 2.1.4.17. Steril Yıkama Solüsyonu

1 L distile suya 8.5 g NaCl eklenerek 75 ml'si 250 ml'lik erlene konularak otoklavlanmıştır. 2-4°C'de soğuduktan sonra, tohumlar eklenmeden hemen önce 1 damla Tween-20 eklenmiştir [28].

#### **2.1.4.18. İnce Tabaka Kromotografi (İTK) Solusyonu**

Triklorometan-metanol-asetik asit-su (40:40:10:10) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır [18]. Karışım deney sırasında taze olarak kullanılmıştır.

## 2.2. METOD

### 2.2.1. Toprakta *Xanthomonas campestris* İzolasyonu

Toprakta *Xanthomonas campestris* izolasyonu amacıyla içerinde 9.0 ml steril distile su bulunan 5 adet steril tp hazırlanmıştır. Toprak rneklerinin her birinden 1 gr (yaş ağırlık) alınarak 9 ml steril distile su içeren 1. tüpe aktarılmış ve tp 3-5 sn vortekste karıştırılmıştır. 10 kez seyrelmiş olan bu tüpten steril bir pipet ucu ile 1 ml alınarak 2. tüpe aktarılmış ve tekrar vortekste karıştırılmıştır. Bu işlemler 5. tüpe kadar tekrarlanarak  $10^{-5}$  kez seyreltme işlemi yapılmıştır. Her bir tüpten steril bir pipet ucu ile 0.1 ml alınarak SX agar içeren petri yüzeyine pipetlenmiş ve steril bir drigalski spatülü ile yüzeye yayılmıştır. Standart kültür olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile de pozitif kontrol olması amacıyla SX agar üzerine çizgi ekim yapılarak petriler  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda standart suş ile aynı özellikleri gösteren; 3. gün; kk translucent, 4-5 mm nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler, 5. gün; 3 mm çapında, mukoid, konveks, sirküler, translucent ve mavi mor merkezli, 8-10 mm nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler belirlenerek saflaştırma yapmak üzere SX agar üzerine çizgi ekim yapılmış daha sonra identifikasyon testleri yapılmak üzere stok besiyeri olan YM agara transfer edilmiştir [32].

### 2.2.2. Crucifer Tohumlarından *Xanthomonas campestris* İzolasyonu

Kırmızı turp, beyaz turp, beyaz lahana ve şeker pancarı tohumlarından *Xanthomonas campestris* izolasyonu için her bir tohum örneğinden 1000 adet (~40 gr) alınarak 250 ml'lik steril erlene konmuştur. zerine 2.1.4.17. de belirtilen steril yıkama solusyonundan 75 ml eklenerek  $3-5^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat bekletilmiştir. Steril 3 kat tlbent bezinden temiz erlene szlmş ve 25 ml steril yıkama solusyonu ile çalkalanmıştır. 2 adet 50 ml'lik steril tüplerde 10.000 rpm'de, 10 dk ( $2^{\circ}\text{C}$ ) santrifüjlenerek. süpernatantlar uzaklaştırılmış ve her bir pellet 3 ml steril %0.85'lik NaCl ile süspande hale

getirilmiştir. Daha sonra ikisi bir araya toplanarak 0.5 ml ve 4.5 ml tuz solusyonlarında 1:100 olacak şekilde seyreltilmiştir ve  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$ 'lik dilüsyonlardan NSCAA, BSCAA ve FS üzerine 0.1 ml pipetlenerek drigalski spatülü ile yayılmıştır. Petriler  $30^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir ve 3 gün inkübasyon süresi sonunda kontrol strain olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile aynı özellikte olan; 1-2 mm çaplı, sarı, açık yeşil, mukoid, şeffaf, nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler belirlenerek aynı besiyeri üzerinde çizgi ekim yapılarak saflaştırma yapılmış ve daha sonra identifikasyon testleri yapılmak üzere stok besiyeri olan YM agara transfer edilmiştir [34].

### 2.2.3. İdentifikasyon Testleri

#### 2.2.3.1. Gram Boyama

YM agara çizgi ekim yapılarak saflaştırılmış olan kolonilerden, 24 saat lik aktif kültür hazırlamak amacıyla, taze YM agar içeren petrilere çizgi ekim yapılarak  $30^{\circ}\text{C}$  de inkübe edilmiştir. Gram boyama işlemi, bu aktif kültürler ile yapılmıştır.

Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde emülsifiye edilip yüzeye öze ile yayılmıştır. Lam ilk olarak havada kurutulmuş, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat ilk önce kristal violet ile 1 dk boyanmış ve fazla boya akıtılmıştır. Sonra gram iyodür (lugol) çözeltisiyle boyanarak 1 dk etkiye bırakılmıştır. Fazla lugol akıtılarak alkol ile 6 sn muamele edilmiştir. Distile su ile alkol yıkanarak uzaklaştırılmış ve son olarak preparat safranin ile 30 sn boyanmıştır. Fazla boya akıtılarak suyla yıkanmış ve havada iyice kuruduktan sonra immersiyon objektifi yardımıyla incelenmiştir. Koyu mor (menekşe) renkli boyanmış olan mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli boyanmış olanlar ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir [29].

### 2.2.3.2. Üreaz Testi

1 g maya ekstrakt kullanılarak hazırlanan YS ortamına %0.0016 (w/v) kresol red eklenerek 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra filtre ile steril edilmiş üre solusyonundan son konsantrasyon %2 olacak şekilde eklenmiş ve steril tüplere paylaştırılmıştır. 24 saat lik aktif kültürden öze dolusu kültür aşılansarak 27°C de çalkalamalı etüvde 14 gün inkübe edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu ile beliren alkalitedeki artış (yaklaşık pH 9.0) üreaz aktivitesinin kanıtıdır ve bu sonucu veren mikroorganizmalar üreaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [27].

### 2.2.3.3. 32°C de Büyüme

YS besiyeri tüplere dağıtılarak steril edilmiştir. 24 saatlik aktif kültür ekilerek 32°C de 50-75 rpm de 10-12 gün inkübe edilmiştir. Büyüme göstergesi spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçülerek tespit edilmiştir. Sıfır'ın üzerindeki absorbans değerleri pozitif olarak değerlendirilmiştir [27].

### 2.2.3.4. Protein Parçalanması

10 g süt tozuna son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklenmiş ve %0.004 bromcresol purple (w/v) ilave edilerek tüplere paylaştırılmıştır. 110°C'de 20 dk steril edilmiştir. 24 saat'lik aktif kültürden inokulasyon yapılarak 27°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif sonuç olan tüplerde şeffaf bir reaksiyon gözlenmiş ve proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [27].

### 2.2.3.5. Asit Üretimi

1 g maya ekstrakt kullanılarak hazırlanan YS besiyerine agar 12 g/L ve bromcresol purple 0.7 ml/L (%1.5 alkol solusyonundan) eklenerek pH 6.8'e ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Karbon kaynağı %0.5 (v/v) filtre ile steril edilerek eklenmiş ve besiyeri steril tüplere paylaştırılmıştır.

Aktif kültürler ekilerek 2, 4, 7, 21 ve 28 günlük inkübasyondan sonra asit üretimi için incelenmiştir. Tüplerde sarı renk oluşumu asit üretiminin kanıtıdır ve sonuç pozitif olarak kaydedilmiştir [27].

#### 2.2.3.6. Eskulin Hidrolizi

YS brotha ferric ammonium citrate %0.05 (w/v) ve eskulin %0.1 (w/v) eklenerek pH 6.8'e ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri steril tüplere paylaştırılarak aktif kültürler ekilmiş ve 28 gün çalkalamalı inkübasyondan sonra koyu kahverengi renk oluşumu eskulin kullanımının işareti olarak ele alınmıştır. UV ışığı altında floresans görünmediğinde tam bir hidroliz olmuştur ve sonuç pozitifdir [27].

#### 2.2.3.7. Jelatini Sıvılaştırma

Jelatin medium hazırlanarak besiyeri tüplere yaklaşık 4-10 ml miktarda dağıtılmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve tüpler yana yatırılmadan hemen soğutulmuştur. İnokulasyona kadar tüpler soğukta tutulmuştur. Aktif kültürlerden tüplere transfer iğnesi ile ekim yapılarak 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 3, 7, 14, ve 21 gün sonra tüpler 30 dk 4°C'de tutulmuştur Tüp yana yatırıldığında ortam kolayca akıyorsa jelatin hidroliz edilmiş demektir ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir [27].

#### 2.2.4. Ksantan Sakızının Fermentasyonla Üretimi

Fermentasyon denemelerinde, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 standart suşu ve Türkiye'deki çeşitli bitkilerden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve Amerikan dolmalık biberinden izole edilmiş olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* suşları kullanılmıştır.

Fermentasyon denemelerine geçmeden önce stok besiyeri olan YMA'da bulunan mikroorganizmalar, önce YM agarı sonra YM brotha transfer edilerek

aktive edilmiştir. Aktif mikroorganizmalar daha sonra YM-T ortamına aktarılarak inokulum hazırlanmış ve daha sonra fermentasyon safhasına geçilmiştir.

#### 2.2.4.1. Ön İnokulum Hazırlanması

-80°C'deki stok kültürler, YM agar'a transfer edilerek 28°C de 3 gün inkübe edilmiştir. Bu taze kültürler YM brothların aşılmasında kullanılmıştır.

Hazırlanan taze kültürler içinde 14 ml YM broth olan test tübüne bir öze dolusu transfer edilerek, 28°C de 100 dev/dk'da 24 saat inkübe edilmiştir. Böylece hem ön inokulum hazırlanmış hem de kültürler aktive edilmiştir [3].

#### 2.2.4.2. İnokulum Hazırlanması

Hazırlanan 14 ml'lik ön inokulum, içinde 100 ml YM-T broth bulunan 250 ml hacimli erlenlere aseptik koşullar altında inokule edildikten sonra, 28°C de 200 dev/dk'da 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inokulum, fermentasyon ortamının aşılmasında kullanılmıştır. Burada belirtilen ön inokulum ve inokulum hacmi 1 L'lik fermentasyon ortamı içindir [3].

#### 2.2.4.3. Fermentasyon

Fermentasyonlar çalkalamalı erlenlerde veya 2.5 L hacimli fermentörde (New Brunswick Scientific, Bioflo 3000) gerçekleştirilmiştir. Fermentördeki üretimler için kullanılan hacimler 2 L'ye göre ayarlanmıştır. Fermentasyonlar 28°C, 250 rpm ve 72 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

##### 2.2.4.3.1. Standart Üretim Ortamındaki Fermentasyonlar

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile standart üretim ortamı kullanılarak yapılan fermentasyon, glukoz ile erlen ve fermentörde, sukroz ile sadece erlen de denenmiştir. Standart üretim ortamı 2.1.4.11.'de belirtildiği gibi

hazırlanmıştır. Bu ortamda kullanılan glukozun miktarı 22.5 g/L, sukrozun miktarı ise 50 g/L'dir.

Hem erlenlerde hem de fermentörde standart üretim ortamı hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiş ve her iki kültür için ayrı ayrı hazırlanmış olan %10 (v/v) oranındaki inokulumlar ile aseptik koşullar altında aşılacaktır. 28°C de 250 dev/dk'da 72 saat inkübasyondan sonra ortam, analiz edilinceye kadar +4°C de saklanmıştır [3].

#### 2.2.4.3.2. Optimize Edilmiş Besiyerindeki Fermentasyonlar

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 straini ile optimize edilmiş besiyeri kullanılarak yapılan fermentasyon, hem glukoz hem de sukroz kullanılarak sadece erlenlerde denemiştir. Bu ortamda kullanılan glukozun miktarı 20 gr/lt, sukrozun miktarı ise 50 g/L'dir.

2.1.4.12.'de içeriği verilen optimize edilmiş besiyeri, erlenlerde hazırlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiş ve %10 (v/v) oranında, ayrı ayrı hazırlanan inokulumlar aseptik koşullar altında fermentasyon ortamına aşılacaktır. 2.2.4.1.'de verilen ön inokulum aşaması burada inokulum basamağı olarak kullanılmıştır. 28°C de 250 dev/dk'da 72 saat inkübasyondan sonra ortam, analiz edilinceye kadar +4°C de saklanmıştır [8].

#### 2.2.4.3.3. Değişik Substrat Ortamlarında Ksantan Sakızı Üretimi

##### 2.2.4.3.3.1. Peynir Altı Suyundan Ksantan Sakızı Üretimi

Çalışmamızda kullanılan peynir altı suyu, Bilecik'teki bir mandıradan temin edilmiştir. Peynir altı suyunun laktoz içeriği Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, tespit edilmiş (Mesut Kaplan, kişisel iletişim) ve bu substrat çalışmamızda *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile ksantan üretimi için denenmiştir.

Peynir altı suyu fermentasyona alınmadan önce, içerdiği proteinlerden arındırılmak amacıyla bir ön işlemden geçirilmiştir [3]. Bunun için, peynir altı suyu 121°C de 15 dk süre ile otoklavlanmış daha sonra filtre kağıdı ile süzülerek berraklaştırılmıştır. Yaklaşık %5 laktoz içerdiği tespit edilmiş olan bu berrak çözeltinin %2.25 glukozu verecek olan miktarı, standart üretim ortamındaki glukoz yerine karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan fermentasyon ortamına 2.2.4.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan %10 (v/v) oranında inokulumlar, ayrı ayrı, aseptik koşullar altında aşılanmıştır. 28°C, 250 rpm de 72 saat'lik fermentasyon basamağından sonra, 2.2.5.'de belirtildiği şekilde hücreler ortamdan uzaklaştırılıp, presipitasyon yapıldıktan sonra kurutma işlemi yapılmış ve elde edilen ürünler tartılarak % verim değerleri hesaplanmıştır

#### 2.2.4.3.3.2. Kayısı Pulp'undan Erlende Ksantan Sakızı Üretimi

Çalışmamızda kullanılan kayısı pulpu Türker Kimya'dan temin edilmiştir. Şeker içeriği, Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, tespit edilmiş (Mesut Kaplan, kişisel iletişim) ve bu substrat çalışmamızda *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 strainleri ile ksantan üretimi için denenmiştir.

Ksantan üretimi için ilk olarak stok besiyerindeki *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* TPPB 5001 suşları, YMA besiyerine ekilmiş ve 28°C de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir. Daha sonra, inokulum ortamı hazırlamak amacıyla 100 ml LB broth hazırlanarak, aktifleşmiş kültürlerden bir öze dolusu ayrı ayrı, LB broth'a transfer edilmiş ve 28°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu kültürlerin 10 ml'si, 500 ml'lik erlenlerdeki, %5, %10, %15, %25, %35, %50'lik dilasyonlardaki, 2.1.4.14'de belirtildiği şekilde hazırlanmış olan pulp içeren fermentasyon ortamlarının 100 ml'sine aktarılmıştır [11]. 28°C de, 250 rpm de 72 saatlik fermentasyon basamağından sonra, işlemler 2.2.5.'de belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır. Her iki suş tarafından, elde edilen ürünler kurutulularak % verim hesaplanmıştır.

#### 2.2.4.3.3.3. Şeftali Pulp'undan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi

Çalışmamızda kullanılan şeftali pulpu Aroma Meyve Suyu ve Konsantre Fabrikası'ndan temin edilmiştir. Şeker içeriği, Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, tespit edilmiş (Mesut Kaplan, kişisel iletişim) ve bu substrat çalışmamızda *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile ksantan üretimi için denenmiştir.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 strainleri ile sadece %35'lik ve %50'lik dilusyonlardaki şeftali pulpu içeren fermentasyon ortamları denemiştir. %35'lik fermentasyon ortamı her iki suş ile ayrı ayrı sadece erlenlerde, %50'lik fermentasyon ortamı ise hem erlenlerde hem de fermentörde gerçekleştirilmiştir. Aktifleştirme ve inokulasyon basamakları kayısı pulpu ile yapılan işlemlerin aynısıdır. Fermentördeki denemeler için, hacimler 2 lt'lik besi ortamına göre ayarlanmıştır [11]. 28°C de, 250 rpm de 72 saatlik fermentasyon basamağından sonra, işlemler 2.2.5.'de belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır. Her iki suş tarafından erlende ve fermentörde elde edilen ürünler kurutularak % verim hesaplanmıştır.

#### 2.2.4.3.3.4. Şeker Pancarı Melası'ndan Ksantan Sakızı Üretimi

Çalışmamızda kullanılan melas Eskişehir Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir. Melasın içeriği Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, tespit edilmiş (Mesut Kaplan, kişisel iletişim) ve Çizelge 2.2.de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Melas'ın içeriği

Kuru madde (%)	78.4
Polarizasyon (%)	45.5
Şeker (%)	58.0

Rutubet düzeyi (%)	21.07
Kül miktarı (%)	8.58
Refraktometre indisi:	1.4875
Kırılma indisi: (Brix)	78.85

#### 2.2.4.3.3.5. İşlenmiş Melas'tan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi

Melas, içerdiği bazı kolloidal bileşikler ve ağır metalleri (Cu, Fe, Pb, v.b.) uzaklaştırmak amacıyla ön işleminden geçirilmiştir. Bunun için, 170 g melas 300 ml distile su içinde karıştırılıp çözündürülerek, üzerine 50 ml distile suda çözünen 0.30 g potasyum ferrisiyanat çözeltisi konulmuştur. Tüm çözelti distile su ile 500 ml'ye tamamlanıp 5 g diatome toprağı yerine, 5 g perlit ilave edilerek iyice karıştırılmıştır [3]. Bir gece +4°C'de tutulan melas çözeltisi, bu süre sonunda filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Böylece istenmeyen bazı bileşiklerden arındırılmış ve oldukça berraklaşmış bir melas çözeltisi elde edilmiştir.

Bu çözeltiden %2.25 glukozu verecek şekilde hesaplanarak alınan miktar, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 ile ksantan sakızı üretmek amacıyla, standart üretim ortamındaki glukoz yerine kullanılmıştır. Hem erlende hem de fermentörde hazırlanan bu fermentasyon ortamlarına %10 (v/v) oranında inokulumlar, ayrı ayrı, aseptik koşullar altında aşılmiştir. 28°C, 250 rpm'de 72 saat'lik fermentasyon basamağından sonra, 2.2.5.'de belirtildiği şekilde hücreler ortamdan uzaklaştırılıp, presipitasyon yapıldıktan sonra kurutma işlemi yapılmış ve % verim değerleri hesaplanmıştır.

#### 2.2.4.3.3.6. İşlenmemiş Melas'tan Erlende ve Fermentörde Ksantan Sakızı Üretimi

Melas ön işleminden geçirilmeden, %2.25 glukozu verecek şekilde hesaplanmış, erlende ve fermentörde bulunan standart üretim ortamına ilave edilerek ksantan üretimi için araştırılmıştır. Bu amaçla 2.2.4.2.'de belirtildiği

şekilde *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile inokulumlar ayrı ayrı hazırlanarak %10 (v/v) oranında fermentasyon ortamlarına aktarılmış ve 28°C, 250 rpm'de 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. 28°C, 250 rpm de 72 saatlik fermentasyon basamağından sonra, işlemler 2.2.5.'de anlatıldığı gibi tekrarlanmıştır. Her iki suş tarafından, erlende ve fermentörde elde edilen ürünler kurutularak % verim hesaplanmıştır.

#### 2.2.4.3.3.7. Erlende ve Fermentörde, İşlenmemiş Melas İle Ksantan Sakızı Üretimi'ne Triton X-100'ün Etkisi

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile, işlenmemiş melas kullanılarak, ksantan üretimine Triton X-100'ün etkisi denenmiştir. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile ksantan üretimi, hem erlende hem de fermentörde, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile ksantan üretimi ise sadece erlende çalışılmıştır.

Fermentasyon ortamı, işlenmemiş melasın %2.25 glukozu verecek şekilde alınan miktarı, erlendeki ve fermentördeki standart üretim ortamına ilave edilip, otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. 2.2.4.2.'de belirtildiği şekilde inokulumlar ayrı ayrı hazırlanarak, %10 (v/v) oranında fermentasyon ortamına aktarılmıştır. Galindo.E ve ark. [12] yapmış oldukları çalışmada belirtildiği şekilde 1lt'lik fermentasyon ortamı için 0.5 gr Triton X-100, 5 ml distile su içinde karıştırılarak otoklavda steril edilmiştir. Triton X-100 fermentasyonun 25-30. saatleri arasında damla damla fermentasyon ortamına aktarılmıştır. 28°C de, 250 rpm de 72 saatlik fermentasyon basamağından sonra işlemler 2.2.5.'de belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır. Bu 4 suş tarafından elde edilen ürünler tartılıp %verim hesaplanmıştır.

## 2.2.5. Fermentasyon Sonrası Yapılan İşlemler

### 2.2.5.1. Fermentasyon Sıvısında Viskozite Ölçümleri

Mikroorganizma tarafından üretilen polisakkaritin viskozite ölçümleri fermentasyon sıvısında gerçekleştirilmiştir. Viskozite ölçümleri için Haake viscotester VT02 modelinde viskozimetre kullanılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında,  $62.5 \text{ dk}^{-1}$  rotor hızında, üretici firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. Viskozimetre ölçümü için, ölçüm cihazı yere paralel şekilde sabitlenmiştir. Fermentasyon sıvısının 150 ml' si ölçüm küvetine aktarılmış, 3 numaralı prob kullanılarak elde edilen değerler d.Pas olarak kaydedilmiştir. Aşağıda verilen birimler üretici firma kitapçığından alınmıştır.

$$1 \text{ dPas (deci Pascalsecond)} = 1 \text{ P (Poise)}$$

$$1 \text{ dPas (deci Pascalsecond)} = 100 \text{ mPas}$$

$$1 \text{ mPas (mili Pascalsecond)} = 1 \text{ cP (centi Poise)}$$

### 2.2.5.2. Fermentasyon Sıvısından Hücrelerin ve Diğer Atıkların Uzaklaştırılması

Fermentasyon tamamlandıktan sonra, fermentasyon ortamı, Kurt [3]'un yönteminde olduğu gibi 1 saat  $+4^{\circ}\text{C}$  de 20.000 rpm'de santrifüj edilerek bakteri hücreleri dibe çöktürülmüştür. Ksantan biyopolimerini içeren süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde erlene dökülerek daha ileri analizler için saklanmıştır.

### 2.2.5.3. Ksantan Sakızını Çöktürme ve Ayırma İşlemleri

Bu işlem Kurt [3]'un yöntemine göre yapılmıştır. Santrifüj ile ayrılan süpernatant kısım %1'lik çözelti oluşturmak üzere KCl ile karıştırılmıştır. KCl ile kompleks oluşturan biyopolimer daha sonra %96'lık etil alkol ile (1:3 oranında; süpernatant:etil alkol) sürekli çalkalanarak çöktürülmüştür. Çökelti santrifüj ile 10.000 dev/dk'da 10 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır. Bu basamaktan sonra elde edilen ürün kurutulmak üzere cam kap içine alınmıştır.

#### 2.2.5.4. Kurutma

Fermentasyon sıvısından ayrılmış olan ksantan sakızı ( $K^+$  tuzu halinde) Kurt [3]'ün yönteminde olduğu gibi bir gece oda sıcaklığında tutulmuştur. Kurutulan örnekler hassas terazide tartılarak % verim hesaplanmıştır. % verim değeri, 100 ml'lik fermentasyon ortamından elde edilen ksantan sakızının g olarak miktarı (g/100 ml), şeklinde saptanmıştır

#### 2.2.6. Ksantan Sakızının Kromotografik Analizi

Bu çalışmada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile, işlenmemiş melas ve Triton X-100 kullanılarak elde edilmiş olan ksantan sakızları kromotografik yöntem ile incelenmiştir.

İşlemler Moreira ve ark., [18] kullandıkları yöntem değişikliğe uğratarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla mikserde öğütülerek toz haline getirilmiş olan ksantan sakızını saflaştırmak için polisakkaritlerin %2 (w/v) sulu solusyonları 72 saat süre ile ultra saf su içinde diyaliz edilmiştir. Daha sonra 50°C'de kurutularak toz haline getirilmiş olan biyopolimerlerin 0.05 g'mı 0.5 ml 2N HCl ile 20 dk kaynatılarak hidroliz edilmiştir Hidroliz işlemi ticari ksantan için de aynı şekilde yapılmıştır. Kaynatma işleminden sonra örnekler 0.5 ml 2N NaOH ile muamele edilerek nötrleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak glukoz, glukuronik asit ve ramnoz monomerleri kullanılmıştır. Bu monomerlerden 0.2 g alınarak 0.5 ml distile suda çözündürülmüştür. Negatif kontrol olarak hidroliz edilmemiş ticari ksantan (0.05 gr'mı 0.5 ml distile su içinde çözündürülmüş) kullanılmıştır. Hidroliz edilmiş örnekler, pozitif ve negatif kontroller ince tabaka kromatografisi (İTK) üzerine 2 µl olacak şekilde spotlanmıştır. Spotlar kuruduktan sonra kromatografi plağı triklorometan-metanol-asetik asit-su (40:40:10:10) içinde 1 saat bekletilerek örnekler yürütülmüştür. Daha sonra kromatografi plağına sülfirik anisaldehit püskürtülerek 100°C'de 5 dk ısıtılmış ve spotlar görsel hale getirilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Toprakтан *Xanthomonas campestris* İzolasyonu Sonuçları

Toprak örneklerinden yapılan izolasyon işlemlerinden sonra 23 izolatın SX agar üzerinde standart strain olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile benzer koloni özellikleri olan, 3. gün; küçük translucent, 4-5 mm nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler, 5. gün; 3 mm çapında, mukoid, konveks, sirküler, translucent ve mavi mor merkezli, 8-10 mm nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu koloniler TP1 den TP23'e kadar isimlendirilmiştir (Çizelge 3.1). Bu 23 izolat SX agar üzerinde saflaştırılarak, daha sonra identifikasyon testlerine alınmak üzere %15'lik gliserol içeren ependorf tüplerinde -80°C'de ve stok besiyeri olan YMA üzerinde +4°C'de saklanmıştır.

#### 3.2. Crucifer Tohumlarından *Xanthomonas campestris* İzolasyonu Sonuçları

2.2.2.'de belirtildiği şekilde yapılan tohum izolasyonları sonucunda 9 izolatın seçici besiyerleri olan NSCAA, BSCAA ve FS üzerinde, standart suş olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile benzer koloni özellikleri (1-2 mm çaplı, sarı, açık yeşil mukoid, şeffaf, nişasta hidroliz zonu ile çevrili) gösterdiği tespit edilmiştir. Bu 9 izolat BT1, BT2, BT3, BT4 (beyaz turp izolatları), KT1, KT2 (kırmızı turp izolatları), LH1, LH2, LH3 (beyaz lahana izolatları) olarak isimlendirilmiştir (Çizelge 3.1). Şeker pancarı tohumundan tipik *Xanthomonas campestris* benzeri koloni izole edilememiştir. Bu izolatlar da toprak izolatları ile aynı şekilde identifikasyon testlerine alınmak üzere %15'lik gliserol içeren ependorf tüplerinde -80°C'de ve stok besiyeri olan YMA üzerinde +4°C'de saklanmıştır.

### **3.3. Toprakta ve Crucifer Tohumlarından İzole Edilen Mikroorganizmaların İdentifikasyon Testleri Sonuçları**

Toprakta elde edilen 23 izolat ve tohumdan elde edilen 9 izolat, pozitif kontrol olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile birlikte identifikasyon testlerine alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Cizelge 3.1. Toprak ve Tohumdan Elde Edilen İzolatların İdentifikasyon Testi Sonuçları

İzolatlar	Gram boyama	32°C'de gelişme	Eskulin hidrolizi	Jelatini sıvılaştırma	Proteaz aktivitesi	Üreaz aktivitesi	Asit üretimi					
							Glukoz	Arabinoz	Sukroz	Fruktoz	Trehaloz	Sellobioz
*Standart	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TP1	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
TP2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
TP3	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
TP4	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
TP5	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
TP6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TP7	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TP8	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
TP9	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
TP10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TP11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
TP12	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
TP13	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
TP14	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TP15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TP16	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TP17	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

TP18	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
TP19	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
TP20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TP21	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TP22	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
TP23	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
BT1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BT2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BT3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BT4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KT1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KT2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LH1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LH2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LH3	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

\*İdentifikasyon testlerinde standart olarak *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 straini kullanılmıştır.

Tohum ve topraktan izole edilen bakterilerin, yapılan bu identifikasyon testleri sonucunda, 32°C’de gelişme, eskulin hidrolizi, jelatini sıvılaştırma, proteaz aktivitesi, glukoz, arabinoz, sukroz, fruktoz, trehaloz ve sellobioz’dan asit üretimi testlerinde, standart *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 gibi pozitif, gram boyama ve üreaz aktivitesi testlerinde ise negatif sonuç veren 6 izolatin, *Xanthomonas campestris* olabileceği sonucuna varılmıştır. Bunlardan 2 tanesi topraktan (TP7, TP21), 3 tanesi beyaz turptan (BT1, BT2, BT3), ve 1 tanesi de beyaz lahanadan (LH1), izole edilen kültürlerdir.

### 3.4. Fermentasyon Sıvısında Viskozite Ölçümleri Sonuçları

Oda sıcaklığında, Haake viscotester VT02 modelindeki viskozimetre ile, 62.5 dk<sup>-1</sup> rotor hızında, 3 numaralı prob kullanılarak yapılan viskozite ölçümleri, sadece standart üretim ortamında glukoz ve sukroz ile ve işlenmemiş melas ile yapılan fermentasyon sıvılarında ölçülebilmştir. Diğer fermentasyon sıvılarının viskozitesi, viskozimetrenin ölçüm aralığına girmediğinden dolayı yapılamamıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.a ve 3.2.b’de verilmiştir.

Çizelge 3.2.a. Standart Üretim Ortamında, Glukoz ve Sukroz İle Yapılan Fermentasyon Sıvısında Ölçülen Viskozite Sonuçları (d.Pas)

Mikroorganizma	Standart Üretim Ortamı		
	Glukoz (Erlen)	Glukoz (Fermentör)	Sukroz (Erlen)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	5.0 d.Pas	5.3 d.Pas	4.0 d.Pas

Standart üretim ortamında glukoz ve sukroz ile yapılan fermentasyonlarda sadece *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 straini ile

viskozite ölçümü yapılabilmektedir. En yüksek viskozite değeri, fermentörde glukoz ile yapılan fermentasyon sıvısında elde edilmiştir.

Çizelge 3.2.b. Standart Üretim Ortamında Melas ile Yapılan Fermentasyon Sıvısında Ölçülen Viskozite Sonuçları (d.Pas)

Standart Üretim Ortamı				
Mikroorganizma	İşlenmemiş melas (Erlen)	İşlenmemiş melas (Fermentör)	İşlenmemiş melas+Triton X-100 (Erlen)	İşlenmemiş melas+Triton X-100 (Fermentör)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	0.8 d.Pas	0.8 d.Pas	0.9 d.Pas	0.9 d.Pas
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	*	*	0.7 d.Pas	*
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	*	*	0.65 d.Pas	*

\*: Bu fermentasyonlar yapılmadığı için viskozite ölçülemediği için.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 straini ile Çizelge 3.2.b' de gösterilen tüm ortamlarda fermentasyonlar yapılmıştır ve bu ortamlarda ölçülen viskozite değerleri yaklaşık bulunmuştur.

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* suşları ile, sadece erlende, işlenmemiş melas ve Triton X-100 kullanılarak fermentasyon yapılmıştır. Bu ortamdaki fermentasyon sıvılarında ölçülen viskozite değeri, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile elde edilen viskozite değerinden daha düşüktür.

### 3.5. Standart Üretim Ortamındaki Fermentasyon Sonuçları

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile, standart üretim ortamı kullanılarak yapılan fermentasyonlar, glukoz ile hem erlende hem de fermentörde, sukroz ile sadece erlende denenmiştir. 72 saatlik fermentasyon sonrasında elde edilen ürünler (Şekil 3.1.a ve 3.1.b) tartılarak % verim hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.3.a ve 3.3.b'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3.a Standart Üretim Ortamında Glukoz ile Yapılan Fermentasyon Sonuçları

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı	% verim (gr/100 ml)	
		Erlen	Fermentör
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	Glukoz (22.5 g/L)	2.08	3.02
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	Glukoz (22.5 g/L)	0.69	0.73

Çizelge 3.3.b Standart Üretim Ortamında Sukroz ile Yapılan Fermentasyon Sonuçları

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı	% verim (gr/100 ml)
		Erlen
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	Sukroz (50 g/L)	1.36
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	Sukroz (50 g/L)	0.40

Çizelge 3.3.a. ve 3.3.b.'de, standart üretim ortamında *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'un, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001'den daha verimli bir suş olduğu ve bu ortamda kullanılan glukoz'un (22.5 g/L), sukroz'dan (50 g/L) daha fazla verim artışına neden olduğu görülmektedir. Ayrıca Çizelge 3.3.a'da, her iki strain ile glukoz kullanılarak yapılan fermentasyon denemelerinde fermentördeki verimlerin, erlendekilerden daha yüksek olduğu görülmektedir.

### 3.6. Optimize Edilmiş Besiyerindeki Fermentasyon Sonuçları

Ksantan üretimi için 2.1.4.12'de içeriği verilen optimize edilmiş besiyerindeki fermentasyon *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile glukoz ve sukroz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 72 saat'lik fermentasyon sonrasında yapılan işlemler, 2.2.5'de belirtildiği şekilde aynen tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Optimize Edilmiş Besiyerindeki Fermentasyon Sonuçları

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı	% verim (gr/100ml)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	Glukoz (20 g/L)	0.68
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	Sukroz (50 g/L)	0.62

Çizelge 3.4.'de, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'un optimize edilmiş besi ortamında glukoz (20 g/L) ile, sukroz'dan (50 g/L) daha fazla verim sağladığı görülmektedir.

Bu sonuçlardan ksantan sakızı üretimi amacıyla, standart üretim ortamının, optimize edilmiş besi ortamından daha verimli olduğu ve standart üretim ortamında sukroz yerine glukoz kullanıldığında verimin daha fazla olduğu saptanmıştır.

### 3.7. Değişik Substrat Ortamlarındaki Fermentasyon Sonuçları

#### 3.7.1. Peynir Altı Suyu'ndan Fermentasyon ile Elde Edilen Sonuçlar

2.2.4.3.3.1.'de belirtildiği şekilde *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 strainleri ile peynir altı suyu kullanılarak yapılan 72 saat'lik fermentasyonlarda, her iki strain ile de bu ortamda ksantan üretimi gerçekleşmediği saptanmıştır.

### 3.7.2. Şeftali ve Kayısı Pulpundan Fermentasyon ile Elde Edilen Sonuçlar

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile ksantan üretimi için, kayısı pulpunun %5, %10, %15, %25, %35, %50'lik dilusyonları ile hazırlanan fermentasyon ortamları, sadece erlenlerde çalışılmıştır.

Bu suşlar ile ksantan üretimi için, şeftali pulpunun sadece %35 ve %50'lik dilusyonları ile hazırlanan fermentasyon ortamları, hem erlenlerde hem de fermentörde çalışılmıştır. 72 saat'lik fermentasyon basamağından sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5.a ve 3.5.b' de gösterilmiştir. Şekil 3.2.a. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile şeftali pulpu, b. kayısı pulpu, c. glukoz ile elde edilmiş olan öğütülmüş ksantan sakızları, Şekil 3.2.d'de ise ticari ksantan sakızı gösterilmiştir.

Çizelge 3.5.a Kayısı Pulpu ile Erlenlerde Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler (gr/100 ml).

Mikroorganizma	%5'lik kayısı pulpu	%10'luk kayısı pulpu	%15'lik kayısı pulpu	%25'lik kayısı pulpu	%35'lik kayısı pulpu	%50'lik kayısı pulpu
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	0.09	0.16	0.22	0.38	0.51	0.70
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	0.08	0.15	0.17	0.31	0.46	0.48

Çizelge 3.5.a.'da her iki suş ile de, erlenlerde elde edilen ksantan veriminin %5'lik dilusyondan, %50'lik dilusyona doğru arttığı ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'un bu fermentasyon ortamlarında, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001'den daha verimli bir strain olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.5.b Şeftali Pulpu ile Erlende ve Fermentörde Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler (gr/100 ml).

Mikroorganizma	%35'lik şeftali pulpu (Erlen)	%50'lik şeftali pulpu	
		(Erlen)	(Fermentör)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	0.53	0.74	0.79
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	0.48	0.56	0.60

Çizelge 3.5.b.'de her iki suş ile de, erlendeki %50'lik dilusyonda, erlendeki %35'lik dilusyondan daha fazla ksantan verimi sağlandığı ve her iki suşun fermentördeki %50'lik dilusyonda, erlendeki %50'lik dilusyondan daha verimli olduğu saptanmıştır.

Ayrıca hem kayısı hem de şeftali pulpu ortamında, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'un *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001'den daha verimli bir suş olduğu saptanmıştır.

### 3.7.3. Melas'tan Fermentasyon ile Elde Edilen Sonuçlar

Ksantan sakızı üretimi amacıyla *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile, işlenmiş ve işlenmemiş melas kullanılarak, hem erlende hem de fermentörde yapılan 72 saat'lik fermentasyon sonuçları (Şekil 3.3.a ve Şekil 3.3.b) Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. İşlenmiş ve İşlenmemiş Melas ile Elde Edilen Fermentasyon Sonucundaki % Verimler

Mikroorganizma	İşlenmiş Melas (%verim;gr/100 ml)		İşlenmemiş Melas (%verim;gr/100 ml)	
	Erlen	Fermentör	Erlen	Fermentör
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	0.73	0.78	1.66	1.78
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	0.35	0.40	0.60	0.68

Çizelge 3.6.'da, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'un her iki fermentasyon ortamında da *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001'den daha verimli bir suş olduğu ve işlenmemiş melas ile elde edilen fermentasyon sonuçlarının, işlenmiş melas ile elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca her iki ortamda da fermentörden elde edilen sonuçlar erlende elde edilen sonuçlardan daha verimli olmuştur.

#### 3.7.4. Erlende ve Fermentörde, İşlenmemiş Melas İle Ksantan Sakızı Üretimi'ne Triton X-100 İlavetinin Sonuçları

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile hem erlende hem de fermentörde, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile sadece erlende, işlenmemiş melas ve Triton X-100 kullanılarak yapılmış olan 72 saat'lik fermentasyon basamağından sonra elde edilen verimler Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. İşlenmemiş Melas ve Triton X-100 İle Elde Edilen %Verimler (gr/100 ml)

Mikroorganizma	İşlenmemiş melas +Triton X-100 (%verim;gr/100 ml)	
	Erlen	Fermentör
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NRRL B-1459	1.76	1.82
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> TPPB 5001	0.64	0.69
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0.85	*
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	1.05	*

\*: Bu fermentasyonlar yapılmamıştır.

Çizelge 3.7.'de işlenmemiş melas ve Triton X-100 ile yapılan fermentasyonlarda, en verimli suşun *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve sırasıyla *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 olduğu görülmektedir.

Şekil 3.1.a) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile, standart üretim ortamında glukoz 'dan, b) Sukroz'dan elde edilmiş ksantan sakızlarının görüntüsü.

a)

b)



Şekil 3.2.a) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile,şeftali pulpundan b) Kayısı pulpundan, c) Glukoz'dan elde edilmiş olan öğütülmüş ksantan sakızları, d) Ticari ksantan'ın görüntüsü

a)

b)



c)



d)



Şekil 3.3.a) *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459 standart suşu ile işlenmiş melas b) İşlenmemiş melas ile elde edilen ksantan sakızlarının görüntüsü.

a)



b)



### 3.8. Ksantan Sakızının Kromotografik Analiz Sonuçları

Şekil 3.4.'de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile, işlenmemiş melas ve Triton X-100 kullanılarak elde edilmiş olan ksantan sakızlarının içerikleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak gösterilmiştir.



1). Ramnoz, 2). Glukuronik asit, 3). Glukoz, 4) ve 9). Ticari ksantan, 5). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 standart suşu ile elde edilmiş ksantan, 6). *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşu ile elde edilmiş ksantan, 7). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşu ile elde edilmiş ksantan, 8). *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* suşu ile elde edilmiş ksantan, 10). Hidroliz edilmemiş ticari ksantan.

Bu sonuçlara göre tüm strainlerden elde edilen ksantan sakızları ve ticari ksantan sakızının glukoz içerdiği, fakat net bir glukuronik asit varlığının tespit edilemediği görülmüştür. Arka arkaya yapılan denemelerden sonra kromatografi plağı üzerinde glukozun mavi-siyah, glukuronik asitin kırmızı-kahverengi ve ramnozun ise sarı-turuncu renk oluşturduğu doğrulanmıştır.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ksantan sakızı *Xanthomonas* genusu bakterileri tarafından üretilen, eşsiz özelliklere sahip, ticari anlamda üretilen ilk mikrobiyal polisakarittir. Ksantan sakızına besinsel ve besinsel olmayan endüstri sektörlerinde ilgi giderek artmaktadır [7]. Bu nedenle çalışmamızda ilk olarak, çeşitli toprak ve tohum örneklerinden *Xanthomonas campestris*'in izolasyonunu ve bu izolatların ksantan sakızı üretimindeki verimliliklerini çeşitli substratlar kullanarak saptamayı amaçladık. Bu basamaktan sonra çalışmamıza, standart suş olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve Türkiye'deki fasulye bitkilerinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, domates bitkisinden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve Amerikan dolmalık biberinden izole edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* türleri ile devam ederek, çeşitli substratlar kullanarak ksantan sakızı üretimini, bu substratların verimi ne şekilde etkilediğini ve bu suşların verimliliğini saptamaya çalıştık.

Schaad ve ark., [32] topraktan *Xanthomonas campestris* izolasyonu için seçici bir ortam olarak SX agar kullanmışlardır. Çoğu *Xanthomonas campestris* kolonisi, 30 °C' de 3 gün inkübasyondan sonra 4-5 mm çapında, parlak bir nişasta hidroliz zonu ile çevrelenmiş translüent koloniler olarak görülmüştür. 5 gün boyunca, 3 mm çapında, mukoid, parlak, konveks, yuvarlak ve mavimsi-mor merkezli translüent koloniler oluşmuş ve kolonilerin nişasta parçalanma zonu 8-10 mm çapında olmuştur. *Xanthomonas campestris*'in izolasyonu ve populasyon tespiti için toprak ortamında, SX agar diğer test edilmiş ortamların birkaçına üstün gelmiştir. SX agar üzerinde sadece 1:10 dilue edilmiş pek çok toprak başarıyla denenmiştir. Çünkü toprak bakterilerinin büyük bir kısmı gelişmemiştir. Ayrıca SX agar üzerinde toprak bakteri kolonilerinin %80-90'ı 2 mm den küçük çapta kalmıştır ve sadece %10' u nişasta hidrolizi yapmıştır. SX agarın ek bir avantajı, sarı pigmentli bakterilerin çoğunun, ki bu bakteriler diğer ortamlar üzerinde *Xanthomonas*lar ile kolayca karıştırılabilmektedir, eliminasyonunu sağlamıştır. Bunun yanında SX agarın *Xanthomonas campestris* izolasyonu için dezavantajları da olmuştur. SX agar toprağa eklenmiş olan *Xanthomonas campestris*

populasyonunun sadece %10'unu belirlemiştir. Ayrıca SX agar üzerinde birkaç saf kültür izolatının gelişiminde çeşitlilik olmuştur; verim %13-63 arasında değişiklik göstermiştir. Yinede patojen toprak izolasyonları için SX agar, test edilen diğer birkaç ortama üstün gelmiştir.

Randhawa ve ark., [33] crucifer tohumlarından *Xanthomonas campestris* izolasyonu için seçici bir ortam olarak NSCA (nutrient nişasta cycloheximide agar) kullanmışlardır. Çeşitli crucifer tohumlarından elde edilen *Xanthomonas campestris* kolonilerinin sayısının, çoğunlukla NSCA plakları üzerinde var olan saprofitik ve antagonistik bakterilerin sayısına bağlı olduğu saptanmıştır. *Xanthomonas campestris* kolonileri, yıkanan tohumda antagonistik bakteriler mevcut olduğunda %50'den daha az oranda elde edilmiştir. NSCA besisi ortamına 10 µg/ml nitrofurantoin ve 0.5 µg/ml vancomycin (NSCAA) veya 2 µg/ml nitrofurantoin ve 0.1 µg/ml vancomycin (BSCAA) eklenmesi, yıkanan crucifer tohumlarından elde edilen saprofitik ve antagonistik bakterilerin gelişimini önemli ölçüde düşürmüştür. NSCAA yada BSCAA üzerinde *Xanthomonas campestris*, yıkanan tohumun 1:10 dilasyonları ile yada dilue edilmeden elde edilmiştir. Oysa NSCA üzerinde saprofitik ve/yada antagonistik bakterileri azaltmak için 1:100 oranındaki dilasyonlar gerekli olmuştur.

Bizim çalışmamızda, topraktan *Xanthomonas campestris* izolasyonu amacıyla SX agar, crucifer tohumlarından *Xanthomonas campestris* izolasyonu amacıyla NSCAA, BSCAA, FS besiyerleri kullanılmıştır. SX agar besiyerinde seçici özellik gösteren, nişasta hidroliz zonu ile çevrili, mavi-mor merkezli, mukoid, parlak, konveks, yuvarlak koloniler, diğer besiyerlerinde seçici özellik gösteren 1-2 mm çaplı, sarı, açık yeşil mukoid, şeffaf, nişasta hidroliz zonu ile çevrili koloniler tespit edilmiştir. Ancak toprak ve tohum örneklerinden elde edilen 32 izolatın, 12 adet identifikasyon testleri sonucunda, bu testlerin *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* izolasyonu için yeterli olmadığı görülmüştür. Ayrıca izolasyon amacıyla kullanılan seçici ortamlardaki koloniler, saflaştırma amacıyla YM agar üzerine transfer edildiğinde bu besiyerinde *Xanthomonas campestris* kolonilerinin özelliği olan, sarı renkli görüntünün yanıtıcı olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle tam bir identifikasyon yapılabilmesi için tarlada, patojenite testlerinin yapılmasının gerekli olduğu görülmüştür.

Araştırmacılar çeşitli yıllarda, ksantan sakızı üretimi ile ilgili yaptıkları fermentasyon çalışmalarında, hücre büyümesi ve ksantan verimini etkileyen faktörleri incelemişlerdir.

Gupte ve ark., [8] *Xanthomonas campestris*'den ksantan sakızı üretimi için temel bir ortam deneyerek formüle etmişlerdir (optimize edilmiş ortam). Bu ortamda *Xanthomonas campestris* ICa 125 straini ile maksimum EPS (ekzozelular polisakkarit) verimi elde etmek için ortam bileşenlerinin konsantrasyonları ile, diğer gelişme parametreleri değiştirilmiştir. Fermentasyon ortamında 50 g/L sukroz kullanıldığında maksimum EPS sentezi 4 g/L (%0.4) elde edilmiştir. Glukoz ve laktoz'un her ikisi için 20 g/L kullanıldığında bu şekerler için maksimum EPS sentezi sağlanmıştır; glukoz için 3.1 g/L (%0.31) ve laktoz için 2.9 g/L (%0.29) dir. Fermentasyon ortamında azot kaynağı olarak yeast ekstrakt 3 g/L ve pepton 5 g/L, inorganik tuz olarak 0,5 g/L CaCO<sub>3</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L NaCl, 0.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> kullanıldığında maksimum EPS konsantrasyonunu sağlamıştır Bu ortamda *Xanthomonas campestris* ICa 125 straini ile yapılan fermentasyonlarda maksimum EPS verimi, %10 oranında inokulum kullanılarak sağlanmıştır.

Abd El-Salam ve ark., [7] belirttiğine göre Rogovin ve ark (1961) glukoz %1 oranında kullanıldığında glukoz'un %90'ının polisakkarit olarak geri kazanıldığını ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte glukoz konsantrasyonu arttığında biyoproses verimi göze çarpar şekilde azalmıştır. Diğer taraftan *Xanthomonas campestris* ATCC B951 ile çalışan Funahashi ve ark (1987) en verimli ksantan üretimi için glukoz konsantrasyonunun 30 ve 40 g/L olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar gelişimin ve ksantan üretiminin durmasını önlemek için, belirtilen en iyi konsantrasyondaki glukoz'un aralıklarla eklenmesi ile glukoz konsantrasyonunu kontrol etmeyi önermişlerdir.

Bizim çalışmamızda *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile glukoz (20 g/L) ve sukroz (50 g/L) kullanılarak, optimize edilmiş besi ortamında %10 inokulum oranı ile PH:7'de ve 28°C'de fermentasyonlar yapılmıştır. Glukoz ile elde edilen biyopolimer verimi 6.8 g/L (%0.68), sukroz ile elde edilen biyopolimer verimi ise 6.2 g/L (%0.62) dir. *Xanthomonas campestris* ICa 125 straini ile elde edilen sonuçların tersine, çalışmamızda *Xanthomonas*

*campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile optimize edilmiş fermentasyon ortamında glukoz'dan, sukroz'a kıyasla daha fazla verim sağlanmıştır.

Çalışmamızda diğer bir fermentasyon ortamı olarak, Kurt [3] tarafından yapılan çalışmada kullanılan standart üretim ortamı kullanılmıştır (D-Glukoz 22.5 g,  $K_2HPO_4$  5.0 g,  $(NH_4)_2HPO_4$  2.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  .0.2 g, Antifoam (Slikon) 0.1 g, Distile su 1000 ml). Bu ortamdaki karbon ve azot kaynaklarının ve inorganik tuzların oranı optimize edilmiş ortamdan farklıdır. Kurt [3] tarafından *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile standart üretim ortamında 22.5 g/L glukoz ve 2.5 g/L  $(NH_4)_2HPO_4$  kullanılarak, erlende yapılan fermentasyon sonucunda, 1 kg fermentasyon brothunda %13.3'lük bir verim elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile aynı koşullar altında elde edilen verim 20.8 g/L (%2.08) dir ve daha düşük bir verim elde edilmiştir. Fakat bu ortamda glukoz ile elde ettiğimiz verim 20.8 g/L (%2.08), optimize edilmiş ortamda glukoz ile elde ettiğimiz verimden 6.8 g/L (%0.68) daha yüksek olduğundan dolayı, çalışmamızın bundan sonraki basamaklarında standart üretim ortamı kullanılmıştır.

Ksantan sakızı üretimi üzerine sıcaklığın etkisi birçok kişi tarafından çalışılmıştır. Garcia-Ochoa ve ark., [4] belirttiğine göre Moraine ve Rogovin (1966) optimal üretim sıcaklığının 28°C olduğunu göstermişlerdir. Cadmus ve ark., (1978) daha yüksek bir kültür sıcaklığında ksantan üretiminin arttığını fakat piruvat içeriğinin ise düştüğünü belirtmişlerdir. Thonart ve ark (1985) çalışmalarında, ksantan sakızı üretimi için optimum bir yöntemin sıcaklığının 33 °C olduğunu kaydetmişlerdir. Shu ve Yang (1990) yüksek bir ksantan verimi için sıcaklığın 31 ve 33 °C olduğunu fakat 27-31 °C'deki kültürün daha yüksek bir piruvat içeriğine sahip sakız ürettiğini ileri sürmüşlerdir. Shu ve Yang (1990) ek olarak ksantan üretimi için optimal sıcaklığın, kullanılan üretim ortamı üzerine bağlı olduğunu doğrulamışlardır. Garcia-Ochoa ve ark (1997) sıcaklığın etkisiyle ilgili yaptıkları çalışmada, kullandıkları ortam için optimal üretim sıcaklığının 28°C olduğunu, fakat 31°C'deki üretim performansının çok farklı olmadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamız boyunca fermentasyon için kullandığımız sıcaklık 28 °C'dir.

Araştırmacıların çoğu, *Xanthomonas campestris*'in gelişimi için nötral PH değerinin optimum olduğu konusunda anlaşmışlardır. Ksantan üretimi boyunca, ksantan'daki asidik gruplar nedeniyle PH, nötral değerden yaklaşık 5'e düşmektedir. Bazı araştırmacılar bu işlem için PH kontrolünün gerekli olmadığını belirtmişlerdir fakat diğerleri KOH, NaOH, ve NH<sub>4</sub>OH gibi alkaliler ile kontrol edilmesi gerektiğini önermişlerdir [4].

Garcia-Ochoa ve ark., [22] PH kontrolünün hücre gelişimini artırdığını, fakat ksantan üretimi üzerinde etkili olmadığını göstermişlerdir. PH kontrol edildiğinde, ksantan üretimi durgun faza ulaşıldığında durmuştur ve bu etki PH kontrolü için kullanılan alkaliye bağlı olmamıştır. PH kontrol edilmediği zaman sakız üretimi, gelişimin durgun fazı boyunca sürmüştür. Bizim çalışmamızda erlende yapılan fermentasyonlarda PH kontrol edilmemiştir. Fermentörde yapılan fermentasyonlarda ise, PH 0.4 N KOH ile kontrol edilmiştir. Yapılan fermentasyonlarda, fermentörde elde edilen ksantan verimleri erlendekilerden daha yüksek olmuştur.

Ksantan sakızı üretimi için çeşitli tipte bioreaktörler kullanılmaktadır fakat en fazla çalkalamalı tanklar kullanılmaktadır. Çalkalamalı reaktörlerde oksijen transfer oranı, hava akım oranı ve çalkalama hızı tarafından etkilenir. Bazı yazarlar sabit bir hız kullanmışlardır fakat diğerleri, fermentasyon süresi boyunca hızı değiştirmişlerdir. Hız planı kullanıldığında, farklı yazarlar farklı durumları izlemiştir [4].

Garcia-Ochoa ve ark., [4] daha önce yaptıkları çalışmada belirttiklerine göre fermentasyon süresince sabit bir akım oranı kullanmışlardır (1 L/L dk) ve kültür performansı üzerine çalkalama hızının etkisini incelemişlerdir. Çalkalama hızı 500 rpm'in altında sabit olduğunda, ksantan üretimi broth viskozitesinin artması ile sınırlanan oksijen transferinden dolayı azalmıştır. Çalkalama hızı 500 rpm'in üzerinde sabit tutulduğunda da, mekanik karıştırmanın şiddetinden dolayı, hücreler kötü yönde etkilendikleri için ksantan üretimi zayıf olmuştur. Bu problem ile ilgili olarak çalkalama hızı, fermentasyonun başlangıcında, düşük değerlerden (200-300 rpm) daha sonra yüksek değerlere değiştirilmiştir. Aşırı karıştırmanın benzer etkileri diğer fermentasyonların birçoğu için de kaydedilmiştir.

Papagianni ve ark., [2] kesikli kültürde *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 ile ksantan üretimini PH kontrol edilmeden bir laboratuvar fermentöründe çalışmışlardır. Çalkalama hızı 100 rpm'den 600 rpm'e çıkarıldığında daha yüksek biyomas ve daha fazla ürün elde edilmiştir. Çalkalama hızının artması ile ksantanın piruvat içeriği artmış, bununla birlikte ksantanın moleküler ağırlığı üzerinde önemli bir etki gözlenmemiştir.

Flores ve ark., [17]'nin belirttiğine göre Peters ve ark (1989) ksantan üretimi sırasında çalkalama hızının artması ile ortalama moleküler ağırlığın arttığını kaydetmişlerdir.

Bizim çalışmamızda inokulum safhasında 100-200 dev/dk, fermentasyon safhasında ise 250 dev/dk çalkalama hızları kullanılmıştır. Fermentörde elde edilen verimlerin erlende elde edilen verimlerden daha yüksek olması, fermentasyon sıvısının daha yüksek karıştırılması ve erlendekilerden farklı olarak, sürekli bir şekilde verilen steril hava akımı nedeniyle olduğu düşünülmüştür ve sonuçlarımız literatürlerle uygunluk göstermiştir.

Ksantan fermentasyonu için inokulum hazırlanırken mikroorganizma, kompleks katı bir kültür ortamından (genellikle YM agar) küçük hacimli (5 yada 7 ml) kompleks sıvı bir ortama (genellikle YM) transfer edilir fakat inkübasyon, ksantan üretimini önemli bir şekilde önlemek için 7 saat veya daha kısa olarak sınırlanır. Bu kültür, aynı inorganik tuzları içeren 40-100 ml'lik bir ortama transfer edilir. Fermentördeki üretim için inokulum hacmi, toplam brothun %5-10'u kadardır [4].

Gupte ve ark., [8] yaptıkları çalışmada, fermentasyon ortamına aşılana inokulum büyüklüğünün, biyopolimer verimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. %1, %2, %5, %10, %20'lik inokulumları ele almışlar ve en yüksek polimer verimini %10'luk inokulum ile elde etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmalarda da inokulum ortamı olarak YM-T ve %10 oranında kullanılmıştır.

Abd El-Salam ve ark., [7] ksantan sakızı üretimi için *Xanthomonas campestris* E-NRC-3 ile şeker kamışı melası kullanmışlardır. Ksantan verimi üzerine şeker konsantrasyonunun, farklı azot kaynakları ilavesinin ve havalandırma oranının etkisini incelemişlerdir. Optimum koşullar ortamdaki %25

şeker, 2.4 g amonyum klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), hava/ortam oranı 3:2 ve  $30^\circ\text{C}$ 'de 72 saat inkübasyon ile elde etmişlerdir.

Yang-Ming Lo ve ark., [16] yaptıkları çalışmada, değişik şekillerde uygulanan kesikli, iki fazlı kesikli ve fed-batch fermentasyonlarında ksantan verimi ve hücre gelişimi üzerine, ortamdaki glukoz/yeast ekstrakt oranının (G/YE) etkilerini çalışmışlardır. Genelde ksantan verimi, ortamdaki artan G/YE ile artmış fakat hücre miktarı ve spesifik gelişim oranı artan G/YE kadar azalmıştır. Ekspansiyon gelişimin sonunda başlangıçta düşük bir düzeyden (%2.5 glukoz/%0.3 yeast ekstrakt), yüksek bir düzeye (%5.0 glukoz/%0.3 yeast ekstrakt) değişen G/YE ile iki fazlı kesikli fermentasyon, ksantan üretimi için tercih edilmiştir. İki fazlı fermentasyon tasarımı hem hızlı hücre gelişimini sağlamış hem de yüksek bir ksantan ürünü ortaya çıkarmıştır. Buna zıt olarak sabit faz süresince fermentöre glukoz'un aralıklarla eklenmesi ile fed-batch fermentasyon, ksantan üretimi için uygun görülmemiştir.

Bizim çalışmamızdaki 72 saat'lik kesikli fermentasyon ortamlarında kullanılan glukoz'un miktarı 22.5 g/L'dir Azot kaynağı olarak standart üretim ortamında 2.5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , optimize edilmiş ortamda ise 3g/L malt ekstrakt ve 5 g/L pepton kullanılmıştır. Standart üretim ortamında elde edilen verim optimize edilmiş ortama göre daha fazla olmuştur.

Abd El-Salam ve ark., [7] belirttiklerine göre *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile çalışan Qadeer ve Baing (1989)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 'ün diğer amonyum tuzlarından daha verimli bir azot kaynağı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna dayanarak standart üretim ortamında elde edilen verimin optimize edilmiş ortamda elde edilen verimden yüksek olması, kullanılan azot kaynağının *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 için daha fazla verim artışına neden olduğunu düşündürmüştür.

Garcia-Ochoa ve ark., [4] ksantan solusyonunun viskozitesinin, viskozitenin ölçüldüğü sıcaklığa ve ksantanın eridiği sıcaklığa bağlı olduğunu, viskozitenin, sıcaklığın artması ile azaldığını ve bu davranışın 10 ve  $80^\circ\text{C}$  arasında tamamen tersine olduğunu belirtmişlerdir. Solusyon viskozitesinin aynı zamanda polimerin erime sıcaklığına da bağlı olduğunu;  $40^\circ\text{C}$ 'ye kadar artan erime sıcaklığına bağlı olarak viskozitenin azaldığını ve 40 ve  $60^\circ\text{C}$  arasında

viskozitenin sıcaklığın artması ile arttığını, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklar için artan sıcaklığa bağlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. Bu davranış ksantan molekülünün konformasyonel değişimi ile ilişkilendirilmiştir. Konformasyon, düzenli bir durumdan (düşük erime sıcaklığı) düzensiz bir duruma (yüksek erime sıcaklığı) dönüşmüştür. Dönüşme sıcaklığının tuz konsantrasyonuna bağlı, polimer konsantrasyonundan bağımsız olduğu kaydedilmiştir.

Ksantan solusyonlarının viskozitesinin polimer konsantrasyonunun artması ile kuvvetli bir şekilde arttığı belirtilmiş ve bu davranış, moleküller arası etkileşimle ilişkilendirilmiştir. Solusyondaki tuzların varlığının ksantan viskozitesini etkilediğini, düşük polimer konsantrasyonunda solusyona az bir miktar tuz eklendiğinde viskozitenin az bir miktar arttığı kaydedilmiş ve bu etki moleküller arası etkinin azalmasından kaynaklanan moleküler boyutlardaki indirgenme ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek ksantan konsantrasyonunda yada çok miktarda tuz eklendiğinde viskozite artışının muhtemelen polimer molekülleri arasındaki etkileşimin artmasından dolayı olduğu kanısına varılmıştır. Ksantan solusyonunun viskozitesinin tuz konsantrasyonu %0.1 (w/v) oranını aştığı zaman, tuz konsantrasyonundan bağımsız olduğu kaydedilmiştir [4].

Ksantan solusyonlarının viskozitesi, PH'nın 1-13 arasında değişmesinden etkilenmemiştir. PH 9 yada daha yüksek bir değerde, ksantanın yavaş yavaş deasetile olduğu, ksantan 3 den daha düşük bir PH da iken piruvik asit asetil grupları kayb olduğu ve deasetilasyon yada depiruvilasyonun her ikisinde ksantan solusyonunun viskozitesi üzerindeki etkisinin çok az olduğu belirtilmiştir. Deasetile yada depiruvile olmuş ksantanın orijinal ksantana benzer reolojik özellikler gösterdiği kaydedilmiştir [4].

Fermentasyon broth'unun viskozitesi, ksantan üretiminin bir indikatörü olarak yaygın şekilde kullanılsa da viskozitenin, üretilen polimerin kalitesini yansıtmadığı, yüksek broth viskozitesinin, düşük kalitedeki polimerin yüksek konsantrasyonundan kaynaklanıyor olabileceği, diğer taraftan konsantre edilmiş ksantan solusyonlarının viskozitesinin yeni polimerleri karakterize etmek için yaygın şekilde kullanıldığı fakat polimer molekülünün büyüklüğü yada şekli hakkında net bilgi vermediği belirtilmiştir. Düşük konsantrasyonlu

solusyonlardaki yüksek viskozitenin, bir biyopolimerin endüstriyel kullanımının belirlenmesinde kolay bir ölçek olduğu belirtilmiştir [18].

Ksantan sakızı içeren fermentasyon ortamlarında viskozite çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir.

Gupte ve ark., [8] yaptıkları çalışmada fermentasyon sıvılarının viskozitelerini Hake Viskometer kullanarak %1'lik biyopolimer solusyonu ile  $30 \pm 2$  °C de ölçmüşlerdir. Ölçülen viskozite değerleri ile polimer verimleri arasında linear bir ilişkinin olduğu görülmüştür.

Moreira ve ark., [18] yaptıkları çalışmada her bir strainden elde edilen biyopolimerlerin %3 (w/v) oranındaki sulu solüsyonlarının viskozitelerini ve ticari ksantanın viskozitelerini 6, 12, 30 ve 60 rpm'de ve 25, 45, ve 65°C'de bir Brookfield model LV viskozimetre ile ölçmüşlerdir. Bu sonuçlara göre, devir sayısının artması ile ölçülen viskozite değerinde bir azalma olmuştur. Bazı strainlerden elde edilen polimerin viskozitesinde sıcaklığın artması ile viskozite değerinde azalma, bazı strainlerden elde edilen polimerin viskozitesinde ise sıcaklığın artması ile viskozite değerinde artma olmuştur.

Bizim çalışmamızda fermentasyon sıvılarının viskoziteleri oda sıcaklığında, Haake viscotester VT02 modelindeki viskozimetre ile,  $62.5 \text{ dk}^{-1}$  rotor hızında, 3 numaralı prob kullanılarak yapılmıştır. Viskozite sadece standart üretim ortamında glukoz ve sukroz ile ve işlenmemiş melas ile yapılan fermentasyon brothlarında ölçülebilmektedir. Diğer fermentasyon brothlarının viskozitesi, viskozimetrenin ölçüm aralığına girmediğinden dolayı yapılamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre polimer veriminin artması ile viskozite değerinde artma olmuştur fakat bu bize elde edilen polimerin kalitesi hakkında bir fikir vermemektedir. Bunun için, daha ileri analiz olarak HPLC kullanılması gereklidir. Elde edilen viskozite değerlerinin literatürler arasında değişiklik göstermesinin, fermentasyonda kullanılan strainlerin, viskozimetrenin, ölçüm sıcaklığının, PH'ın ve viskozimetrenin devir sayısının (rpm) farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çeşitli *Xanthomonas* türleri ile, ksantan biyosentezi için kullanılan verimli substratların aralığını genişletme yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Bizim çalışmamızda ksantan sakızı üretimi amacıyla denenmiş substratlardan birisi de

süt endüstrisi atığı olan PAS (peynir altı suyu) dır. Peynir altı suyu, peynir veya kazein üretimi sırasında sütün renin, ısı veya asitle pıhtılaştırılması sonucu elde edilmektedir. Başlıca karbon kaynağı maddesi laktozdur [33].

Bizim çalışmamızda PAS, karbon kaynağı olarak standart üretim ortamındaki %2.25 glukoz'a eşit miktarda kullanılmıştır.

Peynir altı suyu kullanılarak yapılan 72 saat'lik fermentasyonlarda, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile bu ortamda ksantan üretimi gerçekleşmediği saptanmıştır.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin düşük düzeyde olmasından dolayı, bir karbon kaynağı olarak laktoz'u verimli bir şekilde kullanamayacağı bu nedenle PAS'ın ksantan üretimi için uygun bir karbon kaynağı olmadığı belirtilmiştir [5].

Bizim çalışmamızda da PAS ile ksantan sakızı elde edilememesi bu bilgileri doğrulamaktadır.

Becker ve ark., [5]'nin belirttiklerine göre Fu ve Tseng (1990) *Xanthomonas campestris* pv *campestris*'e  $\beta$ -galaktosidaz kodlayan geni taşıyan bir plazmiti yerleştirmişlerdir. Ortaya çıkan yeni strain PAS içeren ortamda ksantan üretimi yapabilmıştır fakat plazmit özel bir zorlama olmadan kararlı kalamamıştır.

Papoutsopoulou ve ark., [13] lacZ geni, maturation protein ve proteinaz P genlerini içeren Pur291 ve pNZ521 plazmitlerini, konjugasyon yada transformasyon ile *X.campestris*' e transfer etmişlerdir. Çalışılan tüm strainler %50 peyniraltı suyu içeren bir ortamda yada aynı ortama %1,5 laktoz yada %1,5 glukoz eklenmiş bir ortamda ksantan sakızı üretimi için geliştirilmiştir. Çalışılan bu strainler peyniraltı suyundan laktozu kullanabilmişlerdir fakat büyük miktarda ksantan sakızı üretimi yapamamışlardır.

Bu sonuçlardan ksantan sakızı üretimi için PAS'ın etkili bir substrat olmadığı görülmüştür.

Papi ve ark., [11] *X.campestris* ATCC 13951'in gelişimi ve ksantan üretimi için çeşitli dilüsyonlardaki (%10, %25, %35, %50, %75) şeftali broth'unu denemişlerdir. Bu dilüsyonlar hem işlenerek saf hale getirilen hemde işlenmemiş

şeftali brothu ile hazırlanmıştır. Öncelikle *X.campestris* kolonileri LB broth'a (Luria Bertani) %0.2 glukoz eklenmiş ortamda geliştirilerek inokulum hazırlanmıştır. Daha sonra hem saflaştırılmış hem de saflaştırılmamış şeftali pulp'unun çeşitli dilusyonlarına %0.5 NH<sub>4</sub>Cl ve saflaştırılmış pulp için %0.2, saflaştırılmamış pulp için %1 yeast ekstrakt ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış olan fermentasyon ortamlarına %10 oranında inokulumlar transfer edilmiş ve 28°C'de çalkalayarak inkübe edilmiştir. Bir substrat olarak saflaştırılmamış şeftali brothu kullanıldığında sadece %20'ye kadar olan konsantrasyonlarda strain gelişimi gözlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri gelişimi muhtemelen pektin, seluloz ve hücre gelişimini etkileyen diğer makromoleküllerin konsantrasyonlarından dolayı inhibe edilmiştir. Saf şeftali broth'unun *Xanthomonas campestris*'in gelişimi ve ksantan üretimi için çok iyi bir substrat olduğu bulunmuştur. En yüksek ksantan verimi % 50'lik saf şeftali brothu ile elde edilmiştir (~2.25 g/100 ml). %75'lik şeftali brothunda daha düşük gelişme olmasının nedeni muhtemelen ortam PH 'ının 5.5'e düşmesinden dolayı olmuştur.

Bizim çalışmamızda *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile ksantan sakızı üretimi amacıyla şeftali ve kayısı pulplarını saflaştırıp kayısı pulpu ile %5, %10, %15, %25, %35, %50'lik dilusyonlarda fermentasyon ortamları erlende, şeftali pulpu ile %35'lik fermentasyon ortamı erlende, %50'lik dilusyonlardaki fermentasyon ortamları ise hem erlende hem de fermentörde hazırlanmıştır. Çalışmamızdaki fermentasyon ortamlarının PH'sı Papi ve ark [11] dan farklı olarak 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.4 N KOH ile 7'ye ayarlanmıştır. 28°C'de 250 rpm'de 72 saat'lik fermentasyon basamağından sonra elde edilen ürünler kurutulup tartıldığında onların çalışmasına paralel olarak en yüksek verim %50'lik kayısı ve şeftali pulpu ile elde edilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda elde edilen verimler daha düşüktür. Şeftali pulp'u ile elde edilen verimler kayısı pulp'u ile elde edilen verimlerden daha fazla olsa da birbirine yakın değerler elde edilmiştir. Bunun nedeni, şeftali pulp'unun şeker içeriğinin, kayısı pulp'unun şeker içeriğinden daha fazla olması ile ilişkilendirilmiştir.

Manjula Rao ve ark., [15] *X.campestris* kültürlerinden ksantan sakızının verimini, kalitesini ve bioreaktör verimliliğini arttırmak için, yeni bir strateji olarak serbest radikal kullanmışlardır. Ksantan veriminde %210 luk bir artış ve viskozitede %20 lik bir artış HOCl (oksidant) uygulamasından sonuçlanmıştır. HOCl uygulamasının bir sonucu olarak ksantan sakızında acetate kütle fraksiyonu %42 azalmış ve piruvat kütle fraksiyonu %63 artmıştır. HOCl uygulaması ile gelişme hızı hemen hemen hiç etkilenmemiştir. HOCl uygulanmış hücrelerden elde edilen ksantan sakızının viskozitesi 4.2 cP dir. Buda yabancı tip hücrelerden elde edilen 3.5 cP den %20 daha fazla olduğunu göstermiştir. Ksantan sakızının viskozitesinin acetat kütle yüzdesi ile azaldığı ve piruvat kütle yüzdesi ile arttığı bilinmektedir ve çalışmada elde edilen değerlerin buna uyduğu belirtilmiştir.

Yoo ve ark., [10] *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile ksantan sakızı üretimi için, ek bir substrat olarak atık şeker pancarı pulp'unun kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Bu çalışma, atık şeker pancarı pulpunun eklenmesinden önceki inkübasyon periyodu, inkübasyon sıcaklığı ve ilişkili sıcaklıklar üzerine odaklanmıştır. Ksantan sakızı üretimi ve şeker pancarı pulp'unun degradasyonundaki optimal koşulları belirlemek için, inkübasyon ve ilişkili parametreler değiştirilmiştir. Bu çalışmada mikroorganizma sukroz agar içeren petrilere saklanmıştır. Kültürler iki hafta aralıklarla transfer edilmiştir. Petrilere oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Kültürler YM broth'da 48 saat 28°C de 200 rpm'de aktive edilmiştir. Daha sonra aktive edilen kültür üretim ortamı olan, sukroz agar daki agar hariç aynı ortama, transfer edilmiştir. Kültürler 28 yada 32°C de, 250 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu şeker pancarı pulp'unun eklenmesinden önceki üretim ortamında, hücre gelişimini sağlayan zaman olarak tanımlanmıştır, farklı çalkalamalı kültürlerde 1-5 gün arasında değişiklik göstermiştir. İnkübasyondan sonra her bir çalkalamalı kültüre steril şeker pancarı pulp'undan (yaş ağırlık 50 gr, kuru ağırlık 7.47 gr) eklenmiştir. Çalkalamalı kültürler 28 yada 32°C de, 250 rpm'de şeker pancarı pulp'u ile ilişkilendirilmiştir. Bu ilişki süresi farklı çalkalamalı kültürler için 1-5 gün arasında değiştirilmiştir. Ksantan sakızı üretimi, şeker pancarı pulp'u ilave edilmiş ortamda, ilave edilmemiş ortama göre daha fazla olmuştur. Buna bağlı olarak, ksantan sakızı üretimi için şeker pancarı pulp'u kullanımının, besinsel olmayan

üretim sektörü için, maliyete etkili ilave bir substrat potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmamızda ksantan sakızı üretimi amacıyla bir substrat olarak Eskişehir Şeker Fabrikası'ndan alınmış şeker pancarı melası kullanılmıştır.

Melas şeker endüstrisinin bir yan ürünü olarak elde edilmektedir. Şekerin kristal hale gelmesi için yapılan birçok işlemden sonra geriye kalan kıvamlı, koyu renkli yapışkan maddedir. Şeker kamışından ve şeker pancarından elde edilen melas olmak üzere iki tip melas vardır. Melas etanol, asetik asit, sitrik asit gibi önemli birçok metabolitin eldesinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Ortalama %50 sukroz, %30 diğer maddeler, %20 su içerir. Melas sadece şeker açısından değil, gerek organik ve inorganik maddeler ve gerek vitaminler açısından da zengin bir ortam olarak değerlendirilmektedir [33].

Çalışmamızda melas hem saflaştırılarak (işlenmiş) hem de saflaştırılmadan (işlenmemiş) kullanılmıştır. Her iki şekilde de melas fermentasyon ortamına %2.25 glukoz'u verecek oranda katılmıştır. Fermentasyonlar *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile hem erlende hem de fermentörde yapılmıştır. 72 saatlik fermentasyon basamağından sonra işlenmemiş melas ile elde edilen ksantan verimi, işlenmiş melas ile elde edilen ksantan veriminden daha fazla olmuştur. Ayrıca fermentörde, erlendekilerden daha fazla verim elde edilmiştir ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşunun, melas ile ksantan sakızı üretiminde *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşundan daha verimli olduğu görülmüştür. İşlenmemiş melas ile daha fazla verim alınmasının nedeni olarak, melas'ın bileşimindeki koloidal bileşiklerin ksantan sakızı üretimini teşvik ettiğini düşündürmektedir. Çünkü melas saflaştırılırken bu moleküllerden arındırılmıştır ve daha düşük ksantan verimi elde edilmiştir. Fakat işlenmemiş melas ile elde edilen ksantan sakızının besinsel sektörde kullanılması, içerdiği koloidal bileşikler yüzünden sakıncalı olabileceği için toksisite testlerinin yapılması gerekmektedir. İşlenmemiş melas ile elde edilen ksantan sakızının besinsel olmayan endüstri sektöründe kullanılmasının daha uygun olduğu düşünülmüştür. İşlenmemiş melas kullanarak *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 suşu ile fermentörde elde edilen ksantan veriminin 1.78

g/L (%0.178), yine aynı suş ile saf glukoz kullanarak erlende elde edilen ksantan verimine 2.08 g/L (%0.208) yaklaşık bir değerde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak melasın ksantan sakızı üretiminde maliyete etkili verimli bir substrat olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Galindo ve ark., [12] ksantan fermentasyonu üzerine Tween 40, Tween 80, Chaps ve Triton X-100 deterjanlarının etkisini çalışmışlardır. İncelenen tüm deterjanlar 24 saatlik küLüre eklendiğinde, deterjan içermeyen kontrol ile karşılaştırıldığında final ksantan sakızı konsantrasyonu artmıştır. Triton, deterjan yokluğunda üretilen sakızdan 1,45 kat fazla verim artışına neden olmuştur. Triton kullanımı fermentasyon süresince oksijen konsantrasyonunun ve fermentasyon broth'unun viskozitesinin daha yüksek olmasına yol açmıştır.

Bizim çalışmamızda da, işlenmemiş melas ile ksantan sakızı üretimine Triton X-100'ün etkisi çalışılmıştır. Deneyle *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 suşları ile hem erlende hem de fermentörde, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile sadece erlende yapılmıştır. İşlenmemiş melas içeren fermentasyon ortamlarına fermentasyonun 25-30. saatleri arasında 0.5 g/L Triton X-100 damla damla ortama ilave edilmiştir. Fermentasyon sonrasında elde edilen ürünler kurutulup tartıldığında en yüksek verim *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 [erlende 17.6 g/L (%1.76), fermentörde 18.2 g/L (%1.82)] ve sırasıyla *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 10.5 g/L (%1.05), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 8.5 g/L (%0.85) ve *Xanthomonas campestris* TPPB 5001 [erlende 6.4 g/L (%0.64), fermentörde 6.9 g/L (%0.69)] suşları ile elde edilmiştir. Bu Triton X-100 eklenmemiş melasdan elde edilen ksantan verimleri ile karşılaştırıldığında Galindo ve ark., [12]'nin yaptıkları çalışmadaki gibi Triton X-100'ün ksantan sakızı üretimine olumlu yönde etki ettiğini göstermiştir.

Abd El-Salam ve ark., [7] lahanadan *Xanthomonas campestris* E-NRC-3 izole ederek şeker kamışı melası ile ksantan sakızı üretimini çalışmışlardır. Sakız üretimi için gelişme koşullarının optimizasyonunu araştırmışlardır. En yüksek verim, melasın %25'lik konsantrasyonu ile L'de 600 mg NH<sub>4</sub>Cl kullanıldığında,

hava/ortam oranı 3:2 olduğunda, 450 rpm'de ve 3 gün inkübasyon periyodu ile sağlanmıştır. Elde edilen polimer verimi 70.5 g/L (%7.05) dir.

Stredansky ve ark., [19] *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, *X.campestris* PD 565 ve PD 659 ile ksantan üretimi için öğütölmüş arpa taneleri, elma ve üzüm posası ve limon kabuklarını kullanmışlardır. Fermentasyon sonrasında 57.1 g/L (%5.71) polimer verimi elde etmişler ve ticari ksantan ile uyumlu bir ürün ortaya çıkarmışlardır.

Ksantan sakızı üretimi amacıyla bizim çalışmamızda kullanılan substratlara ek olarak ileriki çalışmalarda Stre Stredansky ve ark., [19] ve Abd El-Salam ve ark., [7]'nin kullandıkları substratların denenebileceği görüşüne varılmıştır.

Garcia-Ochoa ve ark., [4] ksantan sakızının 2,8:2,0:2,0 molar oranında (Şekil 1) iki glukoz, iki mannoz ve bir glukuronik asit üniteleri ile oluşturulan tekrarlayan pentasakkarit üniteleri içeren bir heteropolisakkarit olduğunu belirtmişlerdir.

Moreira ve ark., [18] *Xanthomonas campestris* pv.*pruni*'nin 18 yeni straininden elde ettikleri ksantan sakızlarının kimyasal bileşimlerini belirlemek için ince tabaka kromatografi yöntemini kullanmışlardır. Kromatografi sonuçlarına göre tüm strainlerden elde edilen ksantanların mannoz, glukoz ve glukuronik aside sahip oldukları kaydedilmiştir. Bu araştırmacıların belirttiklerine göre Sloneker ve Jeanes (1962) ksantanın D-glukoz, D-mannoz, D-glukuronik asit ve asetik, piruvik asit parçalarından oluştuğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte Sutherland (1983) birçok çalışmada farklı *Xanthomonas* strainleri ve farklı küLür koşulları ile farklı içerikli polimerlerin üretilebileceğini göstermiştir.

Moreira ve ark., [18] ksantan yapısındaki farklılıkların temel olarak piruvat ve asetat konsantrasyonlarındaki bir değişimden dolayı olduğunu aynı zamanda karbonhidrat bileşimindeki çeşitlilikten de olabileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların belirttiğine göre Sutherlend (1981) pek çok durumda, monosakkaritler arasındaki oranın korunduğunu (1:1) fakat farklı türlerden elde edilen strainler ve mutantlar arasında küçük değişikliklerin meydana gelebileceğini kaydetmiştir.

Moreira ve ark., [18] belirttiklerine göre Lawson ve Symes (1977) *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* tarafından üretilen ramnoz içeren diyaliz edilemeyen bir polimer bulmuşlardır. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* ve *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*'in çok benzer olduklarını fakat *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ile benzer olmadığını belirtmişlerdir. *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* ve *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* tarafından üretilen polimerlerdeki ramnozun varlığının genetik benzerliği ifade edebileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* suşları ile, işlenmemiş melas ve Triton X-100 kullanılarak elde edilmiş olan ksantan sakızlarının içeriği kromatografik yöntem ile incelenmiştir. Sonuçlara göre tüm strainlerden elde edilen polimerlerin glukoza sahip oldukları görülmüştür. Fakat glukuronik asit aL ünitesi net bir şekilde belirlenememiştir. Bunun nedeni olarak biyopolimerlerin tam olarak hidroliz edilememesi olabilir. Elimizde D-mannoz olmadığı için bu monomer deneylerimizde pozitif kontrol olarak kullanılamamıştır.

Tüm bu sonuçlar ksantan sakızı üretimi amacıyla, en verimli suşun *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 olduğunu ve melasın ksantan üretiminde, kullanılan diğer substratlara oranla etkili bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca Türkiye'deki çeşitli hastalıklı bitkilerden izole edilen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 strainleri ve Amerikan dolmalık biberinden izole edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* suşlarının ksantan üretiminde standart suş olan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459'a alternatif olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Çalışmamızın ilk basamağı olan tohum ve toprak örneklerinden *Xanthomonas campestris* izolasyonu aşamasında, ticari olarak satılan tohum örnekleri kullanılmıştır. Dolayısıyla bu tohumlar, büyük olasılıkla sağlıklı olacağından hastalık etmeni olan *Xanthomonas campestris* taşıması olasılığı da azdır. İzolasyon amacıyla kullanmış olduğumuz toprak örnekleri herhangi bir

hastalık belirtisi taşımayan crucifer bitkilerinin bulunduğu tarlalardan alınmıştır. Bu nedenle çalışmamızda başarılı bir *Xanthomonas campestris* izolasyonu yapılamamıştır. Başarılı bir *Xanthomonas campestris* izolasyonu için bu kriterler göz önünde bulundurulmalı; toprak örnekleri hastalıklı crucifer bitkilerinin köklerinden alınmalı ve bu hastalıklı bitkilere ait tohum örnekleri kullanılmalıdır.

Daha ileriki çalışmalarda ksantan sakızı sentez basamaklarındaki enzimlerin, aktivitelerini arttıran ve azaltan faktörlerin belirlenerek daha verimli ve kaliteli ksantan sakızı üretimi yoluna gidilmelidir.

## 5. KAYNAKLAR

1. KRANENBURG, R.V., BOELS, I.C., KLEEREBEZEM, M. ve VOS.W., *Genetics and Engineering of Microbial Exopolisaccharides for Food: Approaches for the Production of Existing and Novel Polysaccharides*, Current Opinion in Biotechnology, **10**, 498-504 (1999).
2. PAPAGIANNI, M., PSOMAS, S.K., PARAS, S.V. ve KYRIAKIDIS, D.A., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M., *Xanthan Production by Xanthomonas campestris in Batch Cultures*, Process Biochemistry, **37**, 73-80 (2001).
3. KURT SEVİNÇ., *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile Ksantan Sakızı Üretimi ve Çeşitli Azot ve Karbon Kaynaklarının Verime Etkisinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir (1987).
4. GARCIA-OCHOA, F., SANTOS, V.E., CASAS, J.E. ve GOMEZ, E., *Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties*, Biotechnology Advances, **18**, 549-579 (2000).
5. BECKER, A., KATZEN, F., PÜHLER, A. ve IELPI, L., *Xanthan Gum Biosynthesis and Application: A Biöchemical/Genetic Perspective*, Appl Microbiol Biotechnol, **50**, 145-152 (1998).
6. SCHRÖTER, K., FLASCHEL, E., PÜHLER, A. ve BECKER, A., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Secretes The Endoglucanases ENGXCA And ENGXCB: Construction Of an Endoglucanase-Deficient Mutant For Industrial Xanthan Production, Appl.Microbiol Biotechnol, **55**, 727-733 (2001).
7. ABD EL-SALAM, M.H., FADEL, M.A. ve MURAD, H.A., *Bioconversion of Sugarcane Molasses into Xanthan Gum*, Journal of Biotechnology, **33**, 103-106, (1994).

8. GUPTE.M, D. ve KAMAT, M.Y., *Isolation of Xanthomonas Strains from Agricultural Produce, Their Characterization and Potential Related to Polysaccharide Production*, Folia Microbiol, **42**, 621-628 (1997).
9. LETISSE, F., CHEVALLEREAU., LUC SIMON, J. ve D, LINDEY.NIC., *Kinetic Analysis of Growth and Xanthan Gum Production with Xanthomonas campestris on Sucrose, Using Sequentially Consumed Nitrogen Sources*, Appl.Microbiol Biotechnol, **55**, 417-422 (2001).
10. D, YOO.S. ve W, HARCUM.S., *Xanthan Gum Production from Waste Sugar Beet Pulp*, Bioresource Technology, **70**, 105-109 (1999).
11. PAPI, R.M., EKATERINIADOU, L.V., BELETSIOTIS, E., TYPAS, M.A. ve KYRIAKIDIS, D.A., *Xanthan gum and Ethanol Production by Xanthomonas campestris and Zymomonas mobilis from Peach Pulp*, Biotechnology Letters, **21**, 39-43 (1999).
12. GALINDO E. ve SALCEDO G., *Detergents Improve Xanthan Yield and Polymer Quality in Cultures of Xanthomonas campestris*, Enzyme and Microbial Technology,**19**, 145-149 (1996).
13. PAPOUTSOPOULOU, S.V., EKATERINIADOU, L.V. ve KYRIAKIDIS, D.A., *Genetic Construction of Xanthomonas campestris and Xanthan Gum Production from Whey*, Biotechnology Letters, **16**, 1235-1240 (1994).
14. LOPEZ, M.J., MORENO, J. ve RAMOS-CORMENZANA, A., *The Effect of Olive Mill Wastewaters Variability on Xanthan Production*, Journal of Applied Microbiology, **90**, 829-835 (2001).
15. RAO, Y.M. ve SURESHKUMAR, G.K., *Improvement in Bioreactor Productivities Using Free Radicals: HOCl-Induced Overproduction of Xanthan*

*Gum from Xanthomonas campestris and Its Mechanism*, Biotechnology and Bioengineering, **72**, 62-68 (2001).

16. LO, YANG-MING., YANG SHANG-TIAN. ve MIN, DAVID B., *Effect of Yeast Extract and Glucose on Xanthan Production and Cell Growth in Batch Culture of Xanthomonas campestris*, Appl Microbiol Biotechnol, **47**, 689-694 (1997).

17. FLORES, F., TORRES, L.G. ve GALINDO E., *Effect of the Dissolved Oxygen Tension During Cultivation of Xanthomonas campestris on the Production and Quality of Xanthan Gum*, Journal of Biotechnology, **34**, 165-173 (1994).

18. MOREIRA, A.S., VENDRUSCOLO, J.L.S. ve GIL-TURNES, C., and VENDRUSCOLO, C.T., *Screening Among 18 Novel Strains of Xanthomonas campestris pv. pruni*, Food Hydrocolloids, **15**, 469-474 (2001).

19. STREDANSKY, M. ve CONTI, E., *Xanthan Production by Solid State Fermentation*, Process Biochemistry, **34**, 581-587 (1999).

20. SUNISH KUMAR, R. ve SAKTHIVEL, N., *Exopolysaccharides of Xanthomonas Pathovar Strains That Infect Rice and Wheat Crops*, Appl. Microbiol Biotechnol, **55**, 782-786 (2001).

21. TIAN YANG, S., MING LO, Y. ve CHATTOPADHYAY, D., *Production of Cell-Free Xanthan Fermentation Broth by Cell Adsorption on Fibers*, Biotechnol. Prog, **14**, 259-264 (1998).

22. GARCIA-OCHOA, F., E.SANTOS, V. ve ALCON, A., *Xanthan Gum Production an Unstructured Kinetic Model*, Enzyme and Microbial Technology, **17**, 206-217 (1995).

23. CASAS, J.A. ve GARCIA-OCHOA, F., *Viscosity of Solutions of Xanthan/Locust Bean Gum Mixtures*, Journal of the Science Food and Agriculture, **79**, 25-31 (1999).
24. LO, T.C. ve RAMSDEN, L., *Effects of Xanthan and Galactomannan on the Freze/Thaw Properties of Starch Gels*, Nahrung, **44**, 211-214 (2000).
25. TSENG, Y.I., CHOY.K, T., HUNG, C.H., LIN, N.T., LIU.J, Y., LOU, C.H., YANG, B.Y., WEN, F.S., WENG, S.F. ve WU, J.R., *Chorosome Map of Xanthomonas campestris pv.campestris 17 with Locations of Genes Involved in Xanthan Gum Synthesis and Yellow Pigmentation*, Journal of Bacterology, **181**, 117-125 (1999).
26. GEORGE, N. A., *Plant Pathology* (Third Edition), Academic Pres.Inc. San Diego, California 92101, p.549-550 (1998).
27. DYE, D. W., *Laboratory Guide for Identification Plant Pathogenic Bacteria*, Minnesota, p.46 (1980).
28. SCHAAD, N.W., *Detection and Identification of Bacteria*, Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material,, Chapter 3. (Eds) Saettler, A. W., Schaad, N. W and Roth, D. A., APS Press The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota (1989).
29. TAMER, A. Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniv. Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. **74**, Eskişehir (1989).
30. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ve MANIATIS, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Second Edition) (1989).

31. SKOOG, A.D., WEST, D.M. ve HOLLER, F.J., *Analitik Kimya Temelleri (7.Baskı)*, Özkan Matbaacılık-Ankara (1996).
32. SHADD, N.W. ve WHITE, W.C., *A Selective Medium for Soil Isolation and Enumeration of Xanthomonas campestris*, *Phytopathology*, **64**, 876-880 (1974).
33. CİHANGİR, N., *Biyoteknolojiye Giriş Ders Notları, (Yayınlanmamış)* (1999).
34. RANDHAWA, P.S. ve SCHAAD, N.W., *Selective Isolation of Xanthomonas campestris pv. Campestris from Crucifer Seed*, *Phytopathology*, **74**, 268-272 (1984).