



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN BAKTERİYAL  
LEVAN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FURKAN ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. NURCİHAN HACIOĞLU DOĞRU**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAZI BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN BAKTERİYAL LEVAN  
ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURKAN ÖZTÜRK

Tez Danışmanı

PROF. DR. NURCİHAN HACIOĞLU DOĞRU

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimince desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2022-4205

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca mesleki tekamlmde büyük emeği olan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Nurcihan HACIOğLU DOğRU'ya, FYL-2022-4205 nolu proje ile tez çalıŐmamı destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Furkan ÖZTÜRK  
anakkale, Kasım 2023



## ÖZET

### BAZI BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN BAKTERİYAL LEVAN ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Furkan ÖZTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU

03/11/2023, 80

Levan, birçok mikroorganizma tarafından üretilen ekzopolisakkarit fruktan polimeridir. Film oluşturma yeteneği, esneklik, yenilenebilirlik, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi özellikleriyle biyoteknolojik uygulamaları önem kazanmıştır. Bu çalışmada, 5 farklı bakteri izolatının levan üretimi %5 sükröz ilaveli Nutrient Broth (NB) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Üretilen levanın biyopolimer yapısı şeker testi ve NMR, FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. En yüksek levan üretimi *Brachybacterium nesterenkovii* NY-3 (2,806 g/L) bakteri izolatından elde edilmiş olup levan üretim optimizasyonuna bu izolatla devam edilmiştir. *B. nesterenkovii* NY-3 tarafından üretilen levanın antibakteriyal kumaş ve antifungal film koruyucu olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir. %20 (v/v) levan içeren boya örnekleri 7., 14. ve 21. gün periyotların da fungal büyümeyi engellemiş olup antifungal film koruyucu etkinliği tanımlanmıştır. %65 pamuk- %35 polyester yapısındaki levan ile muamele edilip kurutulan kumaş örneklerinin antibakteriyal etkinliği agar plaka ve kantitatif test yöntemleri ile belirlenmiştir. %20 (v/v) ve %10 (v/v) levan ile muamele edilen kumaşlar *S. aureus* ATCC 6538 karşı antibakteriyal aktivite gösterirken, levan ile muamele edilmiş kumaşların hiçbiri *K. pneumoniae* ATCC karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Levan, Biyopolimer, Antibakteriyal, Antifungal Boya, Tekstil

## ABSTRACT

### BACTERIAL LEVAN PRODUCTION AND OPTIMIZATION FOR SOME BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Furkan ÖZTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Biology Science

Advisor: Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU

03/11/2023, 80

Levan is an exopolysaccharide fructan polymer that can be produced by many microorganisms. Its biotechnological applications have gained importance with its features such as film formation ability, flexibility, renewability, biocompatibility and biodegradability. In this study, levan production of 5 different bacterial isolates was carried out in Nutrient Broth (NB) medium supplemented with 5% sucrose. The biopolymer structure of the produced levan was characterized by sugar test, NMR and FTIR analyses. The highest levan production was obtained from the bacterial isolate *Brachybacterium nesterenkovii* NY-3 (2.806 g/L) and levan production optimization continued with this isolate. The antibacterial activity of the levan produced by *B. nesterenkovii* NY-3 was determined the by the potential of levan for use as a antimicrobial fabric and antifungal film preservative. Paint samples containing 20% (v/v) levan inhibited fungal growth on the 7th, 14th, and 21st days, and its antifungal film preservative effect was defined. The antibacterial activity of 65% cotton- 35% polyester fabric samples impregnated with levan and dried were determined by quantitative test methods and agar plate. Fabrics treated with 20% (v/v) and 10% (v/v) levan showed antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 6538, while none of the fabrics treated with levan showed antimicrobial activity against *K. pneumoniae* ATCC 4352.

**Keywords:** Levan, Biopolymer, Antibacterial, Antifungal Dye, Textile

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI .....	i
ETİK BEYAN .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### GİRİŞ

### İKİNCİ BÖLÜM

#### KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Mikrobiyal Ekzopolisakkarit .....	6
2.2. Biyopolimer.....	8
2.2.1. Levan Biyopolimeri .....	11
2.2.2. Levan Biyopolimerinin Fiziksel Özellikleri .....	12
2.2.3. Levan Biosentezi.....	13
2.2.4. Levanın Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanım Potansiyeli.....	17
2.3. Levan Antimikrobiyal Etkinliği.....	17
2.4. Antimikrobiyal Tekstil Uygulamaları .....	19
2.5. Antimikrobiyal Koruyucular ve Boyalar .....	22

### ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

#### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Levan Sentezinde Kullanılan Bakterilerin İzolasyonu .....	25
3.2. Levan Biyopolimerin Eldesi.....	25
3.2.1. Sentezlenen Levanların Tanımlanması ve Yapısal Karakterizasyonu...	26

3.3. Levan Antifungal Film Etkinliğinin Belirlenmesi.....	28
3.3.1. Spor Süspansiyonun Hazırlanması .....	28
3.3.2. Antifungal Film Potansiyelinin Test Edilmesi.....	29
3.5. Tekstil Ürününün Antibakteriyal Etkinliğinin Belirlenmesi .....	30
3.5.1. Tekstil Ürününün Levan Biyopolimeri ile Muamelesi .....	31
3.5.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanışı .....	31
3.5.3. Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	32

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakteri İzolatlarının Tanımlanması .....	34
4.2. Levan Biyopolimeri Üretimi .....	34
4.2.1. Sentezlenen Levan Biyopolimerlerinin Tanımlanması.....	37
4.2.2. Sentezlenen Levan Biyopolimerlerinin Karakterizasyon Bulguları .....	37
4.4. Levan Biyopolimerinin Antifungal Film Aktivite Bulguları.....	45
4.5. Tekstil Ürününün Antibakteriyal Etkinliğinin Belirlenmesi .....	49

## BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Levan Üretim Optimizasyonu .....	60
5.2. Levan Antifungal ve Antibakteriyal Aktivitesi .....	61
KAYNAKÇA .....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	I



## SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
BPD	Biyosidal Ürünler Direktifi
°C	Santigrat Derece
DNA	Deoksiribonükleik asit
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
NA	Nutrient agar
HCl	Hidroklorik asit
kDa	Kilodalton
mL	Mililitre
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient Brtoh
PFPHA	Potasyum ferrisiyanür Polihidroksialkanoatlar
RNA	Ribonükleik asit
TSA	Triptik Soy Agar

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Bakteriyal izolatların elde edildiği toprak örneklerinin istasyon bilgileri	25
Tablo 2	İzolatların en yakın tür ve benzerlik oranı (%)	34
Tablo 3	EN 16492 standartına göre aşılardan 7 gün, 14 gün ve 21 gün sonra fungal büyümenin filtre alanına göre derece tablosu	48
Tablo 4	Farklı levan konsantrasyonlarında fungal gelişim bulguları (7-14-21. gün)	48
Tablo 5	<i>S. aureus</i> inokulum süspansiyonu yoğunluğu ve <i>S. aureus</i> 'un referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ve temas süresi sonrası değerleri	52
Tablo 6	%20 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{20}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	52
Tablo 7	%10 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	53
Tablo 8	%5 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_5$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	53
Tablo 9	%3 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_3$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	54
Tablo 10	<i>K. pneumoniae</i> inokulum süspansiyonu yoğunluğu ve <i>K. pneumoniae</i> 'nin referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ve temas süresi sonrası değerleri	54
Tablo 11	%20 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>K. pneumoniae</i> 'e karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{20}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	55
Tablo 12	%10 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>K. pneumoniae</i> 'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri	55
Tablo 13	%5 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın <i>K. pneumoniae</i> 'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_5$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat)	

ortalama logaritmik indirgeme ( $T_i$ ) miktarı ve G değeri ortalama  
logaritmik indirgeme ( $T_i$ ) miktarı ve G  
değeri

56

**Tablo 14** %3 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaşın *K. pneumoniae*'ye karşı  
antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama  
logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat)  
ortalama logaritmik indirgeme ( $T_i$ ) miktarı ve G değeri

56



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1.	<i>Brachybacterium nesterenkovii</i> NY-3 tarafından üretilen biyopolimer	26
Şekil 2.	<i>Penicillium purpurogenum</i> ve <i>Aspergillus niger</i> kültürleri ve spor süspansiyonu hazırlanışı	29
Şekil 3.	Filtre kağıtlarının şartlandırma işlemi	30
Şekil 4.	<i>S. aureus</i> ATCC 6538'nun Triptik Soy Agar (TSA) besiyerindeki görüntüsü	31
Şekil 5.	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352 TSA besiyerindeki görüntüsü	31
Şekil 6.	İzole edilen mikroorganizmalardan üretilen levan miktarı	35
Şekil 7.	İzolatlardan elde edilen levanın <sup>1</sup> H NMR spekturumu	38
Şekil 8.	<i>B. nesterenkovii</i> NY-3 straininden elde edilen levanın FTIR spekturumu	39
Şekil 9.	Çeşitli azot kaynaklarının levan üretimine etkisi	40
Şekil 10.	Çeşitli pH değerlerinin levan üretimine etkisi	42
Şekil 11.	Farklı sıcaklık değerlerinin levan üretimine etkisi	43
Şekil 12.	Farklı sukroz miktarlarının levan üretimine etkisi	44
Şekil 13.	Farklı karbon kaynaklarının levan üretimine etkisi	47
Şekil 14.	Referans antimikrobiyal olmayan boya 7. gün fungal gelişimi	47
Şekil 15.	%5, % 10 ve % 20 levan konsantrasyonu 7. gün fungal üreme görüntüleri	47
Şekil 16.	Referans antimikrobiyal olmayan boya 7. gün fungal gelişimi	48
Şekil 17.	<i>S. aureus</i> ve <i>K. pneumoniae</i> levan ile muamele edilmiş kumaşları maruz bırakılması sonrası logaritmik indirgeme değerleri	57

# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

Polimerler, günümüzde modern yaşamın neredeyse her alanına dokunmakta, yüksek yaşam kalitesini güvence altına almaktadır. Ticari malzeme olarak günlük yaşam kullanımlarından, elektronik, makine, iletişim, ulaşım, eczane ve tıp gibi alanlarda son derece gelişmiş malzemeler olarak endüstri ve teknoloji kullanımlarına kadar birçok alanda vazgeçilmezdirler. Önemli endüstriyel ürünlerin temelini oluşturan petrol kaynaklı polimerlerin kullanım bulduğu yelpaze genişliği ve endüstriyel üretimi gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Günümüzde ticari olarak kullanılmakta olan bu polimerlerin birçoğunun dayanıklı yapısı nedeniyle doğada bozulmadan uzun yıllar kalabilmesi çevre sorunları oluşturmaktadır. Son yıllarda küresel polimer pazarı çeşitli son kullanım endüstrilerindeki talep artışı nedeniyle yükselişe geçmiş olup; polimer kullanımı kaynaklı depolama alanlarında biriken atık miktarının artması ve atıkların dünya genelinde geri dönüşümü için enerji gereksinimi düşünüldüğünde atıkların hem ekonomik hem çevresel etkileri endişe yaratmaktadır.

Son yıllarda, yüksek petrol fiyatları ve toplumun daha yeşil ve daha temiz ürünleri benimseme talebi, biyolojik olarak yenilenebilir, biyobozunur polimerlere ve bunları üretmek için sürdürülebilir teknolojilerin kullanımına olan ilginin artmasına neden olmuştur. Bu perspektifte bu malzemelerin ekonomik olarak gerçekleştirilmesine yönelik strateji olarak EPS üretimi ve biyopolimer araştırmaları önem kazanmıştır (Hernández vd., 2014; Karthikeyan vd., 2015; Sarilmiser vd., 2015).

Mikrobiyal üretim, çevresel etkileri atlatmak ve yüksek kalitede nihai ürün elde etmek için tanımlanmış ve tekrarlanabilir üretim parametreleri gibi, bitki veya makro yosun türevi ürünlere göre çeşitli avantajlar gösterir. Ayrıca bitkisel preparatlardan elde edilen polisakkaritlere oranla yüksek verimlilik gösterirler. Bu sebeplerden dolayı önemli biyolojik aktivitelere ve endüstriyel ürün olma potansiyeline hizmet eden üstün yapısal özelliklere sahip mikrobiyal polisakkaritlere veya biyopolimer üretimine yoğunlaşılmalıdır. Mikroorganizmalar, hücre dışı polimerik maddeler veya ekzopolisakkaritler (EPS) olarak bilinen ortamda yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler salgırlar (Cruz vd., 2020).

EPS'ler, şeker birimlerinden oluşan ve mikroorganizmalar tarafından çevresel ortama salgılanan yüksek moleküler ağırlıklı (10-30 kDa), yüksek oranda şeker birimlerinden oluşan polimerler olarak tanımlanır. Bu doğal, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, mikroorganizmaları yalnızca Antarktika ekosistemleri, tuzlu göller, jeotermal kaynaklar veya derin deniz, hidrotermal menfezleri gibi çevresel aşırılıklara karşı korumakla kalmaz, aynı zamanda bağışıklık tepkisi, yapışma (adhesion), enfeksiyon (Poli vd., 2011; Jones vd., 2014) gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda ve sinyal iletimi, biyofilm oluşumu, biyolojik kirlilik ve çekirdek algılama, besin depolama, mikroorganizma hareketliliğinde önemli role sahiptir (Cruz vd., 2020).

Biyopolimerler, EPS'nin kimyasal bileşiminde yüksek oranda bulunan yapısal kısımlarıdır. "Biyopolimer" terimi kullanılarak tanımlanabilecek çok çeşitli materyaller vardır ancak yine de genellikle mikroorganizmalar, bitkiler, algler gibi biyolojik kaynaklardan türetilen veya üretilen materyalleri ifade eder. Aynı zamanda bitkisel yağlar, şekerler, reçineler, proteinler, amino asitler vb. gibi biyolojik kaynaklardan sentetik kimya ile de üretilen materyallere de atıfta bulunabilir. Bunun yanı sıra iki ya da daha fazla biyopolimerin karıştırılması ile de üretilen kompozit ürünlerde biyopolimer olarak nitelendirilmektedir (Yorum ve Uğraşkan, 2017).

Geleneksel ürünlerin sahip olduklarına kıyasla biyopolimerlerin antimikrobiyal, antikanser, antibiyofilm, antiinflamatuar, antioksidan, immünomodülatör gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca biyopolimer soğuk suda çözünme, pH kararlılığı, depolama kararlılığı, iyonik tuz uyumluluğu, metaller, yüzey parçacıkları ve diğer polimerlerle kimyasal reaksiyonlara karşı hassas olmaları, su buharı, oksijen geçirgenliği, yüksek termostabilite göstermeleri nedeniyle emülgatörler, stabilizatörler, bağlayıcılar, jelleştirici maddeler, pıhtılaştırıcılar, yağlayıcılar, film oluşturucular, koyulaştırıcı maddeler ve süspanse edici maddeler olarak kullanım alanı bulmuş olup çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için potansiyel barındırmaktadırlar. Bu durum çeşitli endüstriyel, farmasötik ve tıbbi uygulamalarda kullanımını arttırmak için biyopolimerlerin kimyasal yapı üstünlüğü ve biyolojik aktivitelerinin tanımlanmasını gerekli kılmıştır (Domzał-Kedzia vd., 2023).

Levan, tekrarlayan fruktoz birimlerinden meydana gelen bir biyopolimerdir. Levan yapısında ki ana zincir levan'ı eşsiz bir biyopolimer yapmaktadır. Levan biyopolimeri, karbonhidratın furanoz formunda bulunduğu birkaç doğal polimerden biri olma özelliğini taşımaktadır (Divya ve Sugumaran, 2015; Srikanth vd., 2015a).

Levanın antifungal, antitümör, antiinflamatuvar, antioksidan, antibiyofilm gibi biyolojik aktivitelerinin olduğu birçok araştırmada gösterilmiş olup maliyeti yüksek ve ulaşılabilirliği oldukça sınırlı hammadde olması nedeniyle geniş kullanım alanı bulmamaktadır. Levanın 1 gramı 408- 500 € değerinde olmasına karşın; biyomedikal, ilaç, gıda ve yem (örn. Su ürünleri yetiştiriciliği) gibi sektörlerde çevre dostu ürünlere artan ihtiyaç, levan'ın da aralarında olduğu biyoürünleri kapsayan yeni bir ticari pazarı yaratmaktadır (Domzał-Kedzia vd., 2023).

Enfeksiyon kontrolünde başlıca ajanlar olan antimikrobiyal ajanlar aynı zamanda gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisi başta olmak üzere üretim tesislerinde, çeşitli ürünlerde koruyucu ajan olmanın yanısıra atık kontrolü, kanal sistemlerinde biyofilm kontrolü ve standart hijyen koşullarının korunabilmesi amacıyla çeşitli kullanım alanlarına sahiptirler. Kullanım yelpazesinin bu genişliği yaygın kullanımını doğurmuş olup bakterilerde kimyasal antimikrobiyal direnç oluşumuna sebep olmuştur (Onbaşlı vd., 2017). Aynı zamanda günümüzde kullanımı zorunlu olan antimikrobiyal ürünlerin üretiminde kullanılan kimyasallar ciddi çevresel zararlar ve biyoakümülyasyona sebep olmaktadır. Kimyasal üretim ve ürün kullanımını sınırlamak amacıyla yeşil üretim stratejileri benimsenmelidir (Russell, 1999).

Kimyasal antimikrobiyal ajanların yaygın kullanımı tekstil sektöründe de karşımıza çıkmaktadır. Antimikrobiyal tekstillerin kullanımı, patojenlerin büyümesini kontrol etmeye veya öldürmeye yardımcı olabilir ve enfeksiyonların tekstiller yoluyla yayılmasını sınırlayabilir. İnsanların toplu yaşam alanları arasında bulunan konaklama merkezleri, okul ve kreş gibi alanlarda enfeksiyon bulaşma riskinin yüksek olması; bu tip kullanım alanlarında özellikle tekstil ürünlerde antimikrobiyal ajan kullanımını gerekli kılmıştır. Antibakteriyel kumaşlar, bu tür bakterilerin büyümesini ve yayılmasını önleyerek hem doktorların hem de hastaların sterilizasyonun önemli olduğu hastanelerde enfeksiyonlara karşı güvende olmalarını sağlar. Antimikrobiyal tekstil son ürün eldesinde, sentetik,

organik ve polimer yapıda ki antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Tekstil sektöründe kullanılan antimikrobiyal ajanlar kuaterner amonyum bileşikleri (QAC'ler), halojen içeren bileşikler (flor veya klor, N-halaminler veya triklosan içeren moleküller), guanidin içeren polimerler (poliheksametilen viniguanit), fosfo- ve sülfö- türevleri içeren polimerler, fenol polimerleridir. Kullanımı yaygın kimyasal maddelerin tekstil üretim proseslerine dayanıklılığı ve kumaşda dokunsal ve mekaniksel özelliklerini değiştirmeme avantajlarının yanısıra hızlı biyodegradasyona uğramadığından dolayı insan ve çevre için toksik olması, cilt irritasyonuna ve hassasiyetine sebep olması gibi dezavantajları da mevcuttur (Zhang, 2016). Levan polimeri termostabilite, elastisite, yüksek biyolojik aktivite, düşük toksisite gibi özellikleriyle tekstil ürünlerinde kullanım alanı bulmaktadır. Buna karşın literatürde tekstil ürünlerinde jelatin, kitosan, aljinat kullanım potansiyeline dair çok sayıda araştırma mevcutken; levan kullanımı ile alakalı literatür bilgisi oldukça sınırlıdır (Ristic, 2017).

Ürünlerin depolama sürecinde kullanılan koruyucular, film, ahşap, polimerize materyal olarak sınıflandırılmaktadır. Koruyucular, bir materyalin korunmasına yönelik olarak herhangi bir mikrobiyal bulaşın olmasını engelleyen veya bulaşın yaşamına engel olan materyallerdir. Boyalar, uzun süre raf ömrüne sahip olabilmesi için kutu içi koruyucu sınıfında ki ajanları içerdikleri gibi, antimikrobiyal boyalar biyosidal ajanları da içermektedir (ECHA, 2023). Boya üretme tesisinde kutu içi boyalarda ham maddeler veya çeşitli kirlilik kaynakları yoluyla mikrobiyal kontaminasyon sonucunda renk değişikliği, koku, gaz oluşumu, azalan stabilite, pH değişimi ve viskozite azalması gibi bozulmalar meydana gelebilir. Bu nedenle, endüstriyel olarak uzun kap içi kullanım ömrü sağlamak için kutu içi koruyucu gereklidir. Kutu içi koruma (PT-6) için biyositlerin kullanımı kaynaklı kanserojenik, toksik ve potansiyel olarak insan sağlığını etkileyen ajanlar yerine, toksik etkisi olmayan, çevre dostu, doğal biyopolimer kullanımı yeni mevcut endüstriyel yaklaşım olmakla birlikte kitosan veya oligosakkarit türevleri kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Levan biyopolimerinin boyalarda kutu içi koruyucu olarak kullanım potansiyeli belirlenmemiştir.

Bu çalışmada bakteriyel levanın beş farklı bakteri izolatu tarafından sentezi, en yüksek üretim yapan bir izolatuın kültüre dayalı optimum levan üretim koşullarından bazıları tanımlanmış olup, levanın tekstil materyallerinde antibakteriyel ajan olarak ve



boya, plastik vb. sızdırmaz malzemelerde antifungal film koruyucu ajan olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir.



## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Mikrobiyal Ekzopolisakkarit (EPS)

Birçok mikroorganizma, tekrarlayan şeker birimlerinden oluşan hücreyi çevreleyen polisakkaritler üretir. Mikroorganizmalarda, genel olarak biyolojik işlevlerine göre hücre içi depolama polisakkaritleri (glikojen), dış zarda esas olarak immünojenik özellikleri belirleyen lipopolisakkaritler (LPS) olarak bulunurlar ve hücre yüzeyi ile ilişkili ayrı bir yüzey tabakası (kapsül) oluşturan kapsüler polisakkaritler (KPS'ler) olarak salgılanırlar. Levan, ksantan, sfingan, aljinat, selüloz vb. gibi hücre yüzeyine gevşek bir şekilde bağlı hücre dışı polisakkaritler yani EPS olarak gözlemlenirler (Schmid vd., 2015).

EPS'ler çeşitli endüstriyel, farmasötik ve tıbbi uygulamalara sahip olduğu bildirilmektedir. Özellikle son yıllarda, patojen mikroorganizmalar, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ticari antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel kullanımına yanıt olarak direnç geliştirmiştir. Bu durum, bazı antibiyotiklerin istenmeyen yan etkilerinin ve daha önce nadir görülen enfeksiyonların sıklığının artmasına sebep olmuş olup, bilim insanlarının yeni antimikrobiyal madde araştırmalarını zorunlu kılmıştır. Bu bağlamda çeşitli organizmalardan elde edilen polisakkaritlerin önemli patojenlere karşı antimikrobiyal, antifungal antitümör, antiinflamatuvar, antioksidan, antibiyofilm gibi biyolojik aktivitelerinin olduğu birçok araştırmada gösterilmiş (Zhang vd., 2017) ve doğal biyoaktif ilaçlar olarak önemli bir potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir (Elsakhawy vd., 2017).

Hücre dışı polimer matrisi, hidrasyonun ve biyofilmin yapısal bütünlüğünün korunması için çok önemlidir. *Lactobacillus plantarum* WLPL04'den izole edilen EPS'nin biyofilm oluşumuna karşı aktivitesinde, *Pseudomonas aeruginosa* CMCC 10104 vb bakterilere karşı anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Fakat araştırmacılar farklı kaynaklardan izole edilen *L. plantarum* strainlerinin patojenlere karşı farklı özgül EPS'lere sahip olabileceği sonucuna varmışlardır (Liu vd., 2017).

Safılaştırılmış EPS, 75, 100, 150 ve 200 µg/disk olmak üzere farklı konsantrasyonlarda ayarlanmış ve Gram pozitif bakteriler (*Bacillus subtilis* NRRL B-941 ve *S. aureus* NRRL B-767), Gram negatif bakteriler (*P. aeruginosa* NRRL B 23 ve *E. coli* NRR-B 210), mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* Y-2034 ve *Candida albicans* NRRL Y-477) ve küfler (*Aspergillus niger* NRRL 3 ve *Fusarium oxysporum* NRRL 26406) olmak üzere oldukça geniş mikroorganizma grubuna karşı antimikrobiyal potansiyeli test edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalara karşı EPS'nin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Mohamed vd., 2018).

*Bacillus cereus* ve *Brachybacterium* sp. olmak üzere iki EPS üreticisi deniz bakterisi izole edilmiş ve üretilen iki EPS'inde antimikrobiyal aktiviteleri hem Gram pozitif bakterilere (*Lysinibacillus* ve *Paenibacillus* sp.) hem de Gram negatif bakterilere (*Pseudomonas* sp., *E. coli*) karşı taranmış ve inhibisyon bölgelerinin varlığı gösterilmiştir (Orsod vd., 2012).

*L. plantarum* bakterisinden ekstrakte edilen 12 ekzopolisakkaritin enterik patojen *Shigella flexneri* bakterisine karşı antibiyofilm aktivitesi incelenmiştir. Buna göre *L. plantarum* EPS'nin *S. flexneri*'nin hücre dışı polimerik matriksinde polisakkarit üretimini azalttığı ve *S. flexneri* tarafından biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca EPS yapısındaki gallik asidin, polisakkarit sentezine bağlı mdoH gen ekspresyonunu baskılayarak *S. flexneri*'nin biyofilm oluşumunu inhibe edebileceği bildirilmiştir (Song vd., 2020).

*Anoxybacillus pushchinoensis* G11 tarafından üretilen EPS'nin *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 10231 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 test kültürlerine karşı adezyon öncesi antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Genç vd., 2021).

*Lactiplantibacillus* sp. izolatu tarafından üretilen EPS, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiş olup *Lactococcus* sp.'den üretilen EPS'nin ise *B. cereus* ve *S. aureus* türlerine karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tarannum vd., 2023).

## 2.2. Biyopolimer

Biyopolimerler, doğal kaynaklardan üretilen polimerlerdir. Biyolojik materyallerden kimyasal olarak sentezlenebilirler veya canlı organizmalar tarafından biyosentezlenebilirler. Tüm biyopolimerler, sitoplazmada, hücrelerin çeşitli bölmelerinde veya organellerinde, sitoplazmik membranda veya hücre duvarı bileşenlerinde, hücrelerin yüzeyinde veya hatta hücre dışı olarak enzimatik süreçlerle sentezlenir. Bir biyopolimerin sentezi tek parça halinde başlatılabilir veya bir hücrenin başka bir bölümünde devam ettirilebilir. Biyopolimer terimi kullanılarak tanımlanabilecek çok çeşitli materyaller vardır. Mikrobiyal ve bitkisel kaynaklar ile yağlar, şekerler, proteinler gibi biyolojik maddelerde bu amaçla kullanılabilir. Bunun yanı sıra iki ya da daha fazla biyopolimerin karıştırılması ile üretilen kompozit ürünlerde biyopolimer olarak nitelendirilmektedir (Yorum ve Uğraşkan, 2017).

Biyopolimer konfigürasyonu kendini tekrar etme özelliğinde olup, metaller, yüzey parçacıkları ve diğer polimerlerle kimyasal reaksiyonlara karşı hassastır (Etemadi vd., 2003). Ayrıca kendiliğinden kompakt şekilde katlanarak kompleks yapısal çeşitlilik kazanmayla birlikte farklı biyolojik işlevler kazanırlar. Pek çok biyopolimer, özellikle proteinler, tek dağılımlıdır (monodispers). Yani tüm moleküllerin aynı derecede polimerizasyona veya nispi moleküler kütleyle sahip olduğu tek tip polimerlerdir ve 1'e eşit bir polidispersite indeksine (PDI, bir polimerin moleküler ağırlık dağılımının genişliğinin bir ölçüsü) sahiptirler (Gupta ve Nayak, 2015). Soğuk suda çözünme, pH kararlılığı, depolama kararlılığı, iyonik tuz uyumluluğu gibi önemli fiziksel özelliklere sahip doğal biyopolimerler mevcuttur. Ayrıca degradasyonu sağlanan biyopolimerler tarım sektöründe doğal gübre olarak kullanılmakta böylece kimyasal tarım uygulamalarını da azaltmaktadır (Say vd., 2017).

Bir polimerin kendisinin sergilediği temel ve doğal özellikler ile yapısı ve kimyasal bileşimi temelinde geniş bir özellik genişliği gösterirler. Yoğunluk, biyopolimerin çeşidi ve bileşenlerine göre farklılaşan doğal özelliklerinden biridir. Biyopolimerler, petrol türevi polimerlere kıyasla daha yüksek yoğunluk katsayısına sahiptirler. Ayrıca biyopolimerlerin sahip olduğu ve yoğunluk derecesine de katkıda bulunan diğer bir özellik katısal yapının düzeninin derecesini ifade eden kristalliktir. Kristallik yoğunluk dışında sertlik, şeffaflık ve

difüzyon üzerinde önemli etkiye sahiptir. Özellikle kristallik biyopolimerin çözünürlük üzerine etkisi materyal olarak kullanımı için önemlidir. Çünkü çözünürlük için, düşük kristallikteki polimerler yüksek olanlara göre çözünmeye karşı daha duyarlıdır. Tek bir biyopolimer farklı kristalleşme değerleri biyopolimerin fiziksel özelliklerinin değişimine katkı sağlar. Biyopolimerlerin sahip olduğu diğer bir farklı özellik su ve oksijen geçirgenliğidir. Su buharı ve oksijene geçirgenlik açısından, polimer filmler hem su buharına hem de oksijene karşı daha az geçirgen olabilirken su buharına karşı düşük geçirgenlik, ancak oksijene karşı yüksek geçirgenliğe veya oksijene daha az geçirgenken su buharına karşı büyük ölçüde geçirgen olabilmektedirler (George, 2020).

Biyopolimerler, tarih boyunca çeşitli alanlarda kullanılmış olmasına rağmen petrokimyasal hammaddelerin ucuz olması ve bu hammaddelerden üretilen malzemelerin toplum ihtiyaçlarını karşılayacak hızda çeşitlenmesi ile levanın petrol türevi ürünlere göre kullanımı daha az olmuştur. Son yıllarda, yüksek petrol fiyatları ve toplumun daha yeşil ve daha temiz ürünleri benimseme endişesi, biyolojik olarak yenilenebilir polimerlere ve bunları üretmek için sürdürülebilir teknolojilerin kullanımına olan ilginin artmasına neden olmuş ve bu perspektifte bu malzemelerin ekonomik olarak gerçekleştirilmesine yönelik strateji olarak biyopolimer araştırmalarının önemi artmıştır (Hernández vd., 2014). Yapılan araştırmalar 2018 yılında 500 adet olan biyopolimer işletmesinin 2020 yılında 5000 adede yükseleceğini dolayısıyla plastik üretim endüstrisinin %25-30'unu kapsayacağı ortaya koymaktadır (Hamamcı ve Aktaş, 2018). Biyopolimerler, doğal (polisakkaritler, alginat, kitosan gibi doğal malzeme bazlı doğal ve kontrollü koşullarda üretilen) ve sentetik (fiziksel ve mekanik nitelikleri yinelenen) olarak ikiye ayrılırlar (Hamamcı ve Aktaş, 2018).

Sentez kaynaklarına göre doğal polimerler; biyokütle ve tarımsal ile mikroorganizma kaynaklı, sentetik biyopolimerler ise biyoteknoloji ürünü ve petrol kaynaklı olarak ayrılmaktadır.

Bu biyopolimerler geleneksel olarak kimyasal yapılarına göre altı ana sınıfa ayrılır: RNA ve DNA gibi nükleik asitler, proteinler ve polipeptitler gibi poliamidler, selüloz ve nişasta gibi polisakkaritler, lignin gibi polifenoller, doğal kauçuk gibi poliizoprenoidler ve polihidroksialkanoatlar (PHA) gibi polioksoesterlerdir (Bhatia, 2023).

Ayrıca doğal biyopolimer ve sentetik biyopolimer uygulamalarının birleştirildiği ve bu amaçla üretimde mikroorganizmaların kullanıldığı yeni çalışmalar hızlanmıştır. Özellikle moleküler yöntemlerle mikroorganizmalardan yararlanarak hedeflenen şablonlu biyopolimer üretim yöntemleri geliştirilmiştir. Böylece kimyasal üretim stratejilerine kıyasla daha kontrollü polimerasyon yapılması amaçlanmaktadır (Schultz, 2017). Ayrıca tüm organizmaların yaşam süreçlerinin merkezinde yer alan, hücresel ve moleküler tanıma, sinyal iletimi, bağışıklık tepkisi gibi anahtar roller oynayan polipeptitler, oligosakaritler ve nükleik asitler gibi doğal polimerleri taklit eden doğal olmayan biyopolimer sentezi son zamanlarda gelişmekte olan kombinatorik stratejinin kullanıldığı tekniklerle yapılmaktadır. Bu sentetik biyopolimerlerin yapısı tanımlanarak bileşik kitaplıkları oluşturulmaktadır. Böylece milyonlarca bileşiği içeren bu kütüphaneler taranıp bu moleküllerin biyolojik işlevleri test edilerek, ilaç keşfi ve dizaynı için potansiyel yöntemler geliştirilmektedir (Cho vd., 1993).

İlaç keşfi olarak ilgi uyandıran ve geliştirilmeye çalışılan bu yöntemler doğal yolla yani çevreye duyarlı üretim yöntemleriyle biyopolimer sentezi yapan organizmaların, sentezlenen biyopolimerin üretim verim koşulları, hedef biyopolimerin karakterizasyonu ve düşük maliyette endüstriyel kullanım potansiyeli belirlenerek mümkün olacaktır. Böylece doğal biyopolimer sınırlılığı olarak karşımıza çıkan doğada hedef biyopolimerin bilinen bolluğu da artırılmış olacak, böylece kimyasal polimerizasyon teknikleri kullanım gerekliliği azalacak ve ilaç tasarımı için yeni tekniklerin uygulanmasına hizmet edecektir. Zaman ve teknoloji ilerledikçe, uygun sentez stratejileriyle biyopolimerlerin petrol bazlı emsallerinin yerini almasıyla birlikte doğal biyopolimer sentez verimliliği ve ürün saflıklarının kabul edilebilir seviyede olmasıyla birlikte ek fırsatlar ortaya çıkaracağı düşünülmektedir (Hernández vd., 2014). Ek olarak biyopolimer kompozit malzemeler dış implantı olarak düşük mekanik özelliklerine rağmen, işleme esneklikleri, optimal gözeneklilik, metallere daha hafif olma ve biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ekstra hücresel matriks benzeri destek sağladıkları gibi avantajları nedeniyle in vivo ve in vitro olarak test edilmekte ve ideal implant materyalleri olmaları amacıyla pozitif stratejiler geliştirilmektedir.

Biyopolimerlerin çok çeşitli kullanım alanlarından biride nükleer enerji atıkları ve toksik ağır metalleri yok etme amaçlı yenilikçi teknolojilerde kullanılmalarıdır. Bu özellikleri farklı kimyasal maddelerle yüksek rekasiyon afinitelerinin olmasındandır. (Etemadi vd., 2003).

Sürdürülebilir biyoteknoloji ve biyoekonomi için çeşitli biyoteknolojik ürün eldesinde biyopolimerleri kullanmanın istisnai ve yenilikçi yolları araştırılmakta olup yüksek miktarda mikrobiyal biyopolimer üretimine odaklanılmaktadır. Mikroorganizmaların diğer organizmalara kıyasla düşük maaliyetli ve hızlı üretime imkan vermeleri ile üretilen mikrobiyal biyopolimerin bitki ve alglerden üretilenlere kıyasla yüksek biyolojik aktivite ve çeşitli fizikokimyasal özellikler göstermesi mikrobiyal biyoüretim stratejilerinin benimsenmesine neden olmuştur (Jing vd., 2011)

### **2.2.1. Levan Biyopolimeri**

Levan tarihi, 1870-1881 yıllarında Lipmann tarafından keşfedilmesiyle başlamış olup, ardından 1902'de Greig-Smith ve Steel tarafından okalipütüs salgısından izole edilen mikroorganizmalar tarafından üretilen levan polimerleri bildirilmiştir. Hemen takip eden dönemde (1870-1940), bu alandaki araştırma çalışmaları, özellikle Almanya, İngiltere ve Fransa'da levanın biyosentezi, üretimi ve toplanması üzerine odaklanmıştır. 1930'lardan başlayarak, mikrobiyal levan üretimi ve polimer uygulamaları için yeni bir ufuk açılmış ve özellikle ABD'de polisakkaritler için ticari bir pazar gelişmeye başlamıştır (Gupta vd., 2011; Zhang vd., 2014; Srikanth vd., 2015a).

Levanın biyosentezi levansükraz (EC 2.4.1.10, sükroz: 2,6- $\beta$ -D-fruktan 6- $\beta$ -D-fruktosiltransferaz) aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Levansükraz fruktozil grubunu polifruktoz (fruktan) zincirine aktararak sükrozdan mikrobiyal ekzopolisakkarit olan levayı katalize etmektedir. Bu enzim, özellikle fruktosiltransferazlar olmak üzere glikosiltransferazlar ailesine ait enzimlerdendir. Glikosiltransferazlar (EC 2.4), aktive edilmiş glikozil gruplarının donör karbonhidratlardan alıcı moleküllere transferini katalize eder. Polisakkaritlerin biyosentezinde veya modifikasyonunda ve birçok organik bileşiğin oligosakkarit türevlerinin üretiminde önemli bir rol oynarlar (Koşarsoy Ağçeli, 2017).

Levansükrazlar, hem gram-negatif hem gram pozitif bakterilerde bulunabilmekte olup özellikle Gram-pozitif bakteriler arasında yaygın bir şekilde dağıldığı bildirilmiştir (Khandekar vd., 2014).

Levan bitkilerde, fruktosil birimleri arasında hem  $\beta$ - (2 → 6) hem de  $\beta$ - (2 → 1) fruktofuranosidik bağlarla karışık levan tipi FOS yapısında bulunmaktadır. Bakteriyel levan ise bitkisel levanlara göre daha yüksek molekül ağırlığında, tipik olarak  $\beta$ - (2 → 6) bağlanma göstermektedir (Hendy ve Wallace, 1993; Anderson vd., 2004). Sonuç olarak levanın moleküler ağırlığı, polimerizasyon derecesi ve tekrar eden birimin dallanması gibi yapısal farklılıklar kaynağa bağlıdır. Bitkilerden elde edilen levanlar, mikroorganizmalar tarafından üretilenlerden çok daha küçüktür, genellikle moleküler ağırlıkları 2000 ila 33000 Dalton (Da) arasında değişmektedir (Srikanth vd., 2015a). Diğer taraftan, mikrobiyal levanların moleküler ağırlıkları 2 ila 100 milyon Da arasında değişmektedir (Srikanth vd., 2015a). Bakteriyel levanların moleküler ağırlıklarının çok daha yüksek olması, çoklu dallanmadan kaynaklanmaktadır.

### **2.2.2. Levan Biyopolimerinin Fiziksel Özellikleri**

Levan, dallanmış moleküler yapısı ve ana zincirde  $\beta$ -(2.1) bağlarına sahip olması sebebiyle oda sıcaklığında, suda yüksek çözünürlüğe sahip amfifilik bir polimer olmakla birlikte sıcaklık uygulamasıyla çözünme hızı artan bir polimerdir (Kang vd., 2009; Gupta vd., 2011; Öner vd., 2016).

Çözünürlüğüne ek olarak diğer bir üstün fiziksel özelliği benzer moleküler ağırlığa sahip diğer polisakkaritlere kıyasla düşük içsel viskoziteye sahip olmasıdır. 0,07 ile 0,18 dL/g arasında düşük iç viskoziteye sahip levan, bu özelliği ile kompakt yapıda bir polimerdir. Ayrıca, levanın viskozitesi asidik koşullarda stabil olmayıp; 4-11 pH aralığında stabil olduğu bildirilmiştir (Kang vd., 2009). Genel olarak, sulu çözeltilerdeki levan viskozitesi, çeşitli tuzlar mevcut olduğunda artırılabilir, ancak artan sıcaklıkla önemli ölçüde azalır (Han, 1990). Diğer EPS'lere kıyasla farklı sıcaklık ve pH'a sahip ortamlarda kararlılığını sürdürmektedir. 225 °C civarında bir bozunma noktasına sahip olmakla birlikte asidik ve alkali ortamlarda stabildir. Ayrıca iyi biyouyumluluğun yanı sıra tuzlarla uyumlu ve yüksek su tutma kapasitesine sahiptir (Becker vd., 2005; Sima vd.,



2011; Bostan vd., 2014; Öner, vd, 2016). Levan, farklı test koşulları altında mekanik ve reolojik özellikleri ile düşük viskozite ve psödoplastik davranışın tipik özelliklerini göstermiştir (Küçükaşık vd., 2011). Bununla birlikte, gliserol gibi diğer polimerlerle karıştırıldığında elastik yapıya sahip olmakta, mekanik kuvvetlere karşı yapışma özelliği göstermektedir (Barone ve Medynets, 2007).

### **2.2.3. Levan Biyosentezi**

Levanın, geniş fonksiyonel özellikleri sebebiyle geniş bir potansiyel endüstriyel uygulama yelpazesine sahip homopolisakkarit olduğu kabul edilmektedir. Son yıllarda levanın ticari üretimine karşı ilgi artmaktadır (Gupta vd., 2014; Sarilmiser vd., 2015).

Medikal ve ilaç sektörlerinde levan, özellikle biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve film oluşturma kabiliyeti nedeniyle birçok uygulamada yer bulmaktadır (Barone ve Medynets, 2007; Shih vd., 2010; Silbir vd., 2014). Levan polimerleri, yoğunlaştırıcılar, kapsülleme ajanları, tıbbi kullanımlar için ve bazı uygulamalarda petrokimyasalların ikamesi olarak potansiyel endüstriyel uygulamalara sahiptir (Hangit ve Clarke, 1990). Ayrıca levan, düşük oksijen geçirgenlik özelliklerinden dolayı gıdalar ve farmasötikler için yenilebilir kaplama malzemeleri olarak da kullanım potansiyeline sahiptir (Kaplan vd., 1993).

Kozmetik ürünlerde bir formülasyon yardımcısı olarak levanın mükemmel hücre çoğalması, cildi nemlendirici etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca saç bakım ürünlerinde levan türevleri de kullanılabilir (Shih vd., 2010; Gupta vd., 2011; Sezer vd., 2011; Fattah vd., 2012; Divya ve Sugumaran, 2015; Srikanth vd., 2015a).

Karbon, nitrojen, mikro ve makro elementleri içeren kültür ortamının bileşimi, bakteriyel polisakkarit sentezi için önemlidir. Levan üretim ortamına önceden oluşturulmuş levanın eklenmesi levan oluşumunu hızlandırabilir ve levanın nihai verimini artırabilir, ancak önceden oluşturulmuş levanın varlığı bakteriyel levan üretimi için gerekli değildir. Ayrıca ilk levan konsantrasyonu, homojen yüksek moleküler ağırlıklı levan üretimini etkiler (Han, 1990).

Genel olarak karbon kaynağı, mikrobiyal fermantasyon yoluyla levansükraz üretiminde önemli bir rol oynar. Örneğin genellikle, artan sükroz konsantrasyonu ile levan oluşumu artmakta olup sükroz konsantrasyonu genellikle üretimi hedeflenen levan moleköl ağırlılığının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Tian vd., 2011; Zhang vd., 2014). *B. subtilis* NRC 33a'dan levansükraz aktivitesi sonucu üretilen levanın moleköl ağırlılığını kontrol etmede test edilen faktörler arasında sükroz konsantrasyonunun en önemli etken olduğu gösterilmiştir (Abdel-Fattah vd., 2005). *Bacillus circulans*, *Bacillus amyloliquefaciens* (Tian vd., 2011), *Bacillus* sp. (Belghith vd., 2012) ve *Geobacillus stearothermophilus* (Inthanavong vd., 2013) bakterileriyle yapılan farklı çalışmalarda levansükraz üretimini iyileştirmek için indükleyici olarak sükroz gerektiği ve çok düşük konsantrasyonda sükroz veya sükroz yokluğunda levansükraz üretiminin durduğu bildirilmiştir. Levansükraz, sükrozdan mikrobiyal levan üretmek için anahtar enzimdir ve sükroz takviyesi genellikle fermantasyon sırasında levansükraz ekspresyonunu indükler (Srikanth vd., 2015a). Tek başına sükroz takviyesinin *B. subtilis* NRC 33a'nın levansükraz üretimi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur (Abdel-Fattah vd., 2005).

Levansükraz üretimi de nitrojen kaynağından etkilenir. *B. amyloliquefaciens* (Tian vd., 2011), *B. subtilis* NRC 33a (Abdel-Fattah vd., 2005) ve *Bacillus* sp. (Belghith vd., 2012) bakterilerinin levansükraz üretmek için maya ekstraktına ihtiyaç duydukları bunun aksine *Geobacillus stearothermophilus*'tan yüksek seviyede levansükraz üretimi için maya ekstraktı yerine pepton veya tripton içeren ortam gerektiği bildirilmiştir (Inthanavong vd., 2013).

Kültür sıcaklığı ve metal iyonları gibi diğer bazı faktörlerinde, levansükraz üretimi üzerinde de belirgin etkiler gösterdiği bilinmekte olup türe özgü üretim verimliliği uygulanan metal iyonu ve inkübasyon sıcaklığına göre farklılık göstermektedir. *B. subtilis* NRC 33a'dan levansükraz üretimi için optimum sıcaklık ve takviye edilmiş metal sırasıyla 30 °C ve Mg<sup>2+</sup> (Abdel-Fattah vd., 2005) olarak saptanmışken *Bacillus* sp. bakterisinin optimum sıcaklık ve metal ihtiyacı 50 °C ve Fe<sup>2+</sup> (Belghith vd., 2012) olarak bildirilmiştir.

*Azotobacter vinelandii* D-08'in, yüksek derecede toksik ağır metalleri ve radyonüklitleri adsorbe edebilen bir hidrojel bileşeni olarak kullanılması için melas ve damıtma atığı ile sağlanan ortamlarda yetiştirilmesinden elde edilen levanın özellikleri

incelenmiş ve %5 melas ve %2-15 damıtma atığı içeren kültür ortamının, levansakaraz ve levanın verimli sentezi için en uygun koşul olduğu bildirilmiştir. Özellikle melas ve %10 damıtma atığı kullanılarak kültüre edilen bakterilerin levansükraz aktivitesine bağlı olarak sentezlenen levan, HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve Kızılötesi spektroskopisi (IR) ile karakterize edilmiştir. Yüksek ve düşük molekül ağırlığına sahip iki farklı levan yapısı tanımlanmıştır (Shutova vd., 2021).

Bu araştırmalar neticesinde levanın ağır metaller ve radyonüklitleri içerdiği bilinen uranyum cevherinin üretimi ve zenginleştirilmesi için atomik santrallerden ve tesislerden gelen endüstriyel, çok bileşenli atık suların arıtılması için kullanılması önerilmekte olup ağır metal iyonlarının atık sudan uzaklaştırılması ve endüstriyel faaliyetler sonucu büyük bir çevre sorunu olarak karşımıza çıkan toksik metalle kontamine olmuş toprakların iyileştirilmesi için kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Shutova vd., 2021).

Levansükraz, genellikle polimerizasyon ve sükroz hidrolizi reaksiyonları için farklı sıcaklık değerleri optimum olup, düşük sıcaklıklar genellikle polimerizasyon reaksiyonunu desteklerken, yüksek sıcaklık koşulları sükroz hidrolizini desteklemektedir. *Pseudomonas syringae* pv. için optimum sıcaklık değeri levan sentezi için yaklaşık 18 °C iken, sükroz hidrolizi için 60 °C'dir (Hettwer vd., 1995).

Üretilen levanın moleküler ağırlığı genellikle reaksiyon sıcaklığı tarafından kontrol edilir. *Bacillus licheniformis* RN-01 bakterisinin, 50 °C'de levansükrazı ana ürün olarak yüksek moleküler ağırlıklı levan (612 kDa) üretirken, 30 °C'de düşük moleküler ağırlıklı levan (11 kDa) ürettiği saptanmıştır (Nakapong vd., 2013).

*B. licheniformis*'den izole edilen levanın dalak lenfositinin proliferasyonunu önemli ölçüde uyarabildiği ortaya konmuştur. EPS'nin fare splenositleri için doğrudan mitojenik olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2010).

*Acetobacter xylinum*'dan elde edilen levanın optimizasyonu incelenmiş ve en yüksek levan üretim koşullarının 10 g/L azot, pH 6,8, levan konsantrasyonu 0,1- 0,4 g/L arasında ve 50- 60 g/L sükroz konsantrasyonunda olduğu saptanmıştır. Ekstrakte edilen levanın antioksidan aktivitesi 1 mg/mL'de (w/v) konsantrasyonda %81,26; 1,25 mg/mL

konsantrasyon ise %100 olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar izole edilen levanın farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için güçlü bir antioksidan olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda *A. xylinum* NCIM 2526'dan üretilen levanın protein (BSA) kullanılarak gerçekleştirilen in vitro anti-inflamatuar uygulamasıyla 0,25 mg/mL konsantrasyonda inhibe edici etki %71,18 olarak gözlenmiş ve standart ilaçlarla karşılaştırıldığında yüksek anti-inflamatuar etkinlik bildirilmiştir (Srikahnt vd., 2015b).

Levanlar ticari olarak önemli bir ölçekte üretilmemektedir ve fizyolojik veya sağlık etkileri hakkında yalnızca sınırlı veri mevcuttur. Buna rağmen ratlar üzerinde yapılan araştırmalarda levan diyeti yapılan tedavinin kalpte sırasıyla %40 ve %28 oranında süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerini arttırarak, plazma antioksidan enzim aktivitelerini olumlu yönde değiştirdiği ve levan ile beslenen rat grupların toplam kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterolünü yüksek oranda azalttığı gösterilmiştir. Bu potansiyel antioksidan etkileri sebebiyle levan oksidatif strese bağlı metabolik hastalıkların tedavisi için umut verici olabilir (Dahech vd., 2013). Bununla birlikte levan tip fruktanların fizyolojik etkilerini değerlendirmek için insan klinik deneyleri şu ana kadar çok sınırlıdır.

Marx, vd. (2000), levanı Bifidobakterilerin büyümesi için yeni bir karbonhidrat kaynağı olarak incelemişler ve bazı *Bifidobacterium* sp. strainlerinin levan oligosakkaritler üzerinde iyi gelişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna karşın Niv, vd. (2012), 8 hafta boyunca 11,25 g levanla zenginleştirilmiş günlük 500 mL doğal portakal suyu tüketiminin, aynı miktardaki levan içermeyen doğal portakal suyuna kıyasla, 48 kişinin kilo, gastrointestinal semptomlar ve metabolik profilleri üzerindeki etkisini araştırmış, iki tür meyve suyunun çalışılan parametreler üzerindeki etkisinde önemli bir fark saptanmamıştır. Levan tüketiminin bağırsak alışkanlığı, serum lipid seviyeleri, gastrointestinal semptomlar ve kan basıncı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir.

Dal Bello, vd. (2001), *Lactobacillus sanfranciscensis*'ten elde edilen levan tipi ekzopolisakkaritlerin, in vitro deneylerde bifidojenik özellikler gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Kang, vd. (2003), levan tüketiminin vücut yağ birikimi, serum lipid kompozisyonu, kan trigliserid seviyesine etkisini araştırmak amacıyla Koreli kadınlar üzerinde 12 hafta

boyunca levan diyeti uygulamışlardır. Deney dönemi boyunca deneklerin serum glikoz seviyelerinin normal sınırlar içinde olduğu, deney sonucunda ise levan diyetinin kilo, vücut yağı, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit seviyelerini kontrol etmede etkili olduğu gösterilmiştir.

Diğer çalışmalarda ise levanın karaciğer, böbrekler, pankreas ve kalp dokusunun alloksan kaynaklı diyabetik sıçanlarda hasardan korunmasında ve enzimatik savunmayı arttırmada etkili olduğu saptanmıştır (Dahech vd., 2013; Srikanth vd., 2015a).

#### **2.2.4. Levanın Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanım Potansiyeli**

#### **2.3. Levanın Antimikrobiyal Etkinliği**

Yüksek molekül ağırlıklı, düşük molekül ağırlıklı ve difruktoz dianhidrit olmak üzere üç farklı levan bileşiğinin antibakteriyel aktivitesi, dünya çapında gıda bozulmalarına ve gıda kaynaklı hastalıklara sıklıkla sebep olan patojenlere karşı test edilmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı levan, %1'lik bir konsantrasyonda *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *P. aeruginosa*'nın büyümesini etkili bir şekilde inhibe etmiştir. %3'ün üzerindeki konsantrasyonlardaki düşük molekül ağırlıklı levan, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* büyümesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Yüksek moleküler ağırlıklı levanın %5 konsantrasyonu ise *B. subtilis*, *S. typhimurium* ve *E. aerogenes* bakterilerine karşı etkili antimikrobiyal aktivite göstermemiş olup, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *P. aeruginosa* karşı yüksek oranda antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Difruktoz dianhidrit %3 üzerindeki konsantrasyonlarda, *E. aerogenes* dışında test edilen patojenik bakterilerin çoğunun büyümesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (Byun vd., 2014).

Levan Kapaklı Gümüş Nanopartiküllerin (AgLeNP) ilaç salınım sistemi araştırılmış ve bakterisidal etkinliği incelenmiştir. Gram-pozitif bakterileri temsil etmesi adına *B. subtilis* ATCC 6051 ve Gram-negatif bakteri olarak ise *E. coli* K12 strainine karşı bakteristatik etkinliği test edilmiş olup, her iki grup üzerinde antagonistik aktivitesi saptanmıştır. Etkinlik konsantrasyonu incelendiğinde AgLeNP'lerin peptidoglikan duvarı

nedeniyle Gram-pozitif için daha az etkili olduğu görülmüştür (González-Garcinuño vd., 2019).

*Zymomonas mobilis* NRRL B-1402 tarafından üretilen ticari levan ile *B. subtilis* tarafından üretilen levanın bakteri strainleri ve gıda ürünlerinden izole edilen fungus türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalar en yüksek levan konsantrasyonu olan 40 mg/mL’de bile inhibisyon etkisi gözlenmediğinden her iki levan ürünü için herhangi bir MİK değeri belirlenememiştir (Gökmen vd., 2020).

Levan’ın antibakteriyel etkinliğı *S. aureus* ATCC 33592 ve *E. coli* ATCC 25922’ye karşı değerlendirilmiştir. Sırasıyla 1 cm ve 0,8 cm’lik inhibisyon zon oluşturdıkları görülmüştür. Ek olarak, her iki strain da >256 µg/mL MİK değeri tespit edilmiştir (Bouallegue vd., 2020).

Diğer bir araştırmada *Pseudomonas mandelii* tarafında üretilen levanın antibakteriyel aktivitesi *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* ve *A. niger* test kültürlerine karşı değerlendirilmiştir. 100 µg/mL konsantrasyona sahip levanın *E. coli* ve *S. aureus*’a karşı inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmesine karşın, *C. albicans* ve *A. niger*’ e karşı antifungal etki göstermemiştir. 200 µg/mL konsantrasyondaki levanın ise hem antibakteriyel hem antifungal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (Koşarsoy ve Cihangir, 2020).

*P. mandelii* tarafından üretilen levanın antibiyofilm aktivitesi test edilmiş olup; levanın 100, 200, 500 ve 1000 µg/mL olmak üzere tüm konsantrasyonlarının *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* ve *K. pneumoniae* test mikroorganizmalarına karşı antibiyofilm aktivitesi saptanmıştır (Koşarsoy ve Cihangir, 2020).

Levan temelli antimikrobiyal film kompozitleri son yıllarda önemli araştırma konusu haline gelmiştir. *Paenibacillus polymyxa* kullanılarak üretilen levan ile bentonit ve uçucu yağlar kullanılarak oluşturulan film kompozitinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Koşarsoy Ağçeli vd., 2022). Diğer bir araştırmada ise levan ve chia tohumu müsilağlarının nanokompozitlerinin antimikrobiyal film özellikleri araştırılmış ve

antibakteriyel özellik gösterdiklerine rağmen antifungal etkinlik göstermedikleri tespit edilmiştir (Koşarsoy Ağçeli, 2022a). Ayrıca toz devekuşu yumurta kabuğu ve levan kullanılarak hazırlanan film örneklerinin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Koşarsoy Ağçeli, 2022b).

*Halomonas elongata* 153B tarafından üretilen levanın 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarının antibiyofilm ve antimikrobial etkinliği test edilmiş ve uygulama yapılan tüm konsantrasyonlarda *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *C. albicans* ATCC 10231 test kültürlerine karşı antibiyofilm ve antimikrobiyal etkinlikleri olduğu gözlenmiştir (Altıntaş vd., 2023).

*P. polymyxa* HCT33-3 (0,50, 0,25 ve 0,10 g/mL konsantrasyonlarda) ve *Erwinia herbicola* tarafından üretilen ticari levanın (0.50 g/mL konsantrasyonda), *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 2921, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90029 ve *A. niger* kültürlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. *P. polymyxa*'dan elde edilen levan tüm bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterirken; *E. herbicola*'dan elde edilen saf levan ise sadece *A. niger* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir (Koşarsoy Ağçeli ve Günan, 2023).

#### **2.4. Antimikrobiyal Tekstil Uygulamaları**

Son yıllarda koruyucu, dekoratif ve teknik tekstil ürünlerinin üretiminde tekstillerin antimikrobiyal bitim işlemleri son derece önemli hale gelmiştir ve bu doğrultuda tüketici talebi artmıştır. Bu tür tekstillerin kullanımı, ilaç, tıp, mühendislik, tarım ve gıda endüstrilerindeki farklı uygulamalara genişletmek için fırsatlar sağlamıştır. Antimikrobiyal tekstil ürünleri, tekstil ürünlerinin nem, besin ve sıcaklığa bağlı olarak yoğunlaşan bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalara karşı duyarlılığa sahip olmasıyla birlikte biyolojik bozulmanın engellenebilmesi sebebiyle kullanım avantajı sağlamaktadır. Tekstil ürünlerinde mikroorganizma kolonizasyonu neticesinde meydana gelen biyolojik bozulma sonrası kötü kokuya, lif renginin solmasına ve malzemenin bozulmasına sebep olmaktadır. Tekstil materyallerinde ki biyolojik bozulma mikroorganizma türü, tekstil materyalinin kimyasal bileşimi, moleküler yapı ve polimerizasyon derecesine bağlıdır. Genel olarak, selülozik lifler mikroorganizmaların saldırısına en yatkın olanlardır. *Cytophaga*, *Bacillus*,

*Cellulomonas*, *Clostridium*, *Cellvibrio*, *Sporocytophaga* cinsi bakterilerin selülozik lifli kumaşları sıklıkla degrade ettiği bilinmektedir. Ana polimer maddesi keratin olan yün ürünlerinin degradasyonundan çoğunlukla *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces* grubu bakterilerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda hidrofilik doğal ve rejenere tekstil lifleri, mikroorganizmaların büyümesine karşı daha savunmasızdır. Sentetik lifler ise mikrobiyal kolonizasyon riskine daha az sahiptir (Harmsen vd., 2021).

Tekstil sektöründe antimikrobiyal bitim işlemi uygulanmış tekstil ürünlerinin sektörel hedeflerinden önemli bir kısmı medikal alanları hedef almaktadır. Medikal tekstiller tıp bilimleri ve uygulamalarında, yara bandları, pansuman malzemeleri, sargı bezleri, hijyen ürünleri, cerrahi kıyafetler, implante malzeme üretimi vb. hizmet sağlamada kullanılmaktadır. Antimikrobiyal tekstiller, hastane ve bakım ortamlarında enfeksiyon bulaşmasını azaltma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca antimikrobiyal özellikler, ürünlerin kullanım performans ve ömrünü arttırıp, bu kumaşlarda hoş olmayan kokuların oluşumunu da azaltabilmektedirler.

Antimikrobiyal tekstillerin medikal alanda kullanımının yaygınlaşması sonrası kullanım amacı ve tekstil ürünlerinin sınıflandırılmasında karmaşa oluşmuştur ve buna karşı düzenleyici uygulamalar gerçekleşmiştir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), antimikrobiyal tekstil ürünlerini düzenleme getirmek amacıyla görüşmeler sağlanmış ve antimikrobiyal tekstil ürünlerinin tek amacı münhasıran eşyayı veya maddeyi korumak olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal tekstil ürünlerinin tedavi amacı güdebilmesi için antimikrobiyal tekstil ürününün tıbbi cihaz olarak FDA kaydına sahip olması gerekliliği ile sınırlandırılmıştır.

Tekstil ürünlerindeki antimikrobiyal uygulamalar, kullanıcıları tıbbi ve hijyenik sorunlara neden olabilen patojenik veya koku oluşturan mikroorganizmalardan ve istenmeyen estetik değişikliklerden veya çürümeden kaynaklanan hasarlardan korur. Mevcut tekstil sektöründe, tekstil ürünlerine uygun antimikrobiyal ajanların uygulanma miktarı önemli ölçüde artmıştır. Bu antimikrobiyal ajanlar, kimyasal yapıları, etkinlikleri, uygulama yöntemleri ile insan ve çevre üzerindeki etkilerinin yanı sıra maliyet açısından da farklılık gösterir (Gao ve Cranston, 2008).



Antimikrobiyal tekstillere olan talep sadece tıbbi tekstiller için değil aynı zamanda spor kıyafetleri, gıda ambalajları, ev mobilyaları, otomotiv tekstilleri, hava filtreleri, su arıtma sistemleri ve diğerleri için ağırlık kazanmıştır (Gao ve Cranston, 2008; Morais vd., 2016; Montazer ve Harifi, 2017).

Tekstil uygulamaları için birçok kimyasal madde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, antibakteriyel ajanlar bakterisidal ya da bakteristatik olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Tekstilde kullanılan hemen hemen tüm ticari antimikrobiyal ajanlar bakterisidallerdir. Genel bakterisidallerin mekanizması, hücre duvarına zarar vermeyi, hücre zarı geçirgenliğini engellemeyi ve enzimlerin aktivitesini veya lipidlerin sentezini inhibe etmeyi amaçlamaktadır. Tüm bu fonksiyonlar mikroorganizmanın hayatta kalması için gereklidir. Antimikrobiyal ajan olarak sıklıkla karşılaşılan kimyasallar metal tuzları (örneğin, gümüş), kuaterner amonyum bileşikleri (QAC), halojenli fenoller (örneğin, triklosan), polibiguanid (örneğin, Polyhexamethylene biguanide (PHMB), kitosan ve N- bazlı kimyasallardır. Mevcut sektörde farklı teknolojiler kullanılarak birçok antibakteriyel ürün ve kimyasal mevcut olup geliştirilmeye çalışılmaktadır (Akarşlan ve Altınay, 2017).

Çinko, kobalt ve bakır gibi metaller geçmiş yıllarda tekstiller için antibakteriyel ajanlar olarak bazı uygulamalara sahipken, *E. coli*'ye karşı MİK değeri 0,05 - 0,1 mg/L olan gümüş hala tekstil uygulamalarında özellikle yara ile ilişkili medikal uygulamalarda en yaygın kullanılan metaldir (Purwar ve Joshi, 2004). Ayrıca, bu metal insan vücudunda diğer ağır metallere göre daha az toksiktir ve solunum, yutma veya dermatolojik yollarla maruz kalma riski daha düşüktür (Lansdown vd., 2006).

AgNP'nin insan hücreleri için gümüş iyonundan çok daha az toksik olduğu bilinmektedir (Kittler vd., 2009). AgNP ile muamele edilmiş kumaşların antimikrobiyal etkinliğini koruduğunu bildirilmiştir (Bozacı, 2013).

Geleneksel olarak yüksek antimikrobiyal etkilerine rağmen, sentetik maddeler insan sağlığına zararlıdır. Sonuç olarak, doğal veya güvenli yardımcı maddeler, tekstil malzemelerinin işlevselleştirilmesi için sentetik olanlara alternatif olarak görülmektedir. Kitosan, antikanser, nontoksik, biyobozunurluğu ve biyoyumumluluğu olan bir

polisakkarittir (Song vd., 2013; Pan vd., 2019). İlk olarak tekstillerde boya koyulaştırıcı olarak kullanılan kitosan, lif yüzeyinde homojen bir kaplama filmi oluşmasına neden olarak lifin yüzey özelliklerini geliştirir ve kumaş ile boyalar arasındaki itmeyi azaltarak boya emilim oranını önemli ölçüde artırır. Ayrıca kitosan, özellikle antibakteriyel özellik olmak üzere güçlü bulunabilirlik, düşük maliyet avantajları ile de tekstil alanında yaygın olarak antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Kitosana kıyasla kitosan oligosakkarit (COS), nispeten daha düşük moleküler ağırlık ve daha güçlü suda çözünürlük avantajlarına sahip olmasıyla birlikte antibakteriyel ve antiviral aktiviteye sahiptir (Lan vd., 2023).

Antimikrobiyal tekstil sektöründe antimikrobiyal ajan olarak kitosan biyopolimeri ve Np uygulamalarına odaklanılmış olup, metal ve metal oksit nanoparçacıklarının biyopolimerlerle kombinasyonu önemli araştırma konularındandır (Petkova vd., 2014; Türemen vd., 2021; Faheem vd., 2023). Levan biyopolimerinin antimikrobiyal ajan olarak tekstil sektöründe kullanımı ile ilgili ise araştırma mevcut değildir.

## **2.5. Antimikrobiyal Koruyucular ve Boyalar**

Toplum veya hastane enfeksiyonları, dünya çapında önemli sayıda ölüme yol açmakta olup halk sağlığı açısından tedirgin edici boyuta ulaşmıştır. Sağlık hizmetiyle ilişkili patojenler, hasta ortamında yaygındır ve yatak korkulukları, kapı kolları, tıbbi ekipman, masalar vb. gibi çok çeşitli cansız yüzeylerde birikerek bulaştığı bilinmektedir. Mikroorganizmalarla kontamine olmuş yüzeylerde bu canlılar uzun süre canlı kalabilmekte ve bu yüzeylere temas sonucunda da çapraz enfeksiyonlar oluşabilmektedir. Potansiyel olarak çapraz kontaminasyonu azaltmanın bir yolu, insanların günlük faaliyetleri sırasında dokunduğu nesnelere mikrobisidal hale getirmektir (Van Doremalen vd., 2020)

Boyalar çevre koşullarına karşı bariyer görevi görmesi için çeşitli kimyasal maddeler içermek zorundadırlar. Temel olarak duvar boyaları boyaların yapışma veya bağlanma özelliklerini sağlayan bağlayıcılar, pigmentler, bağlayıcının, pigmentin ve katkı maddelerinin moleküler formda veya kolloidal dispersiyon formunda birleşmesini sağlayan çözücüler ve amaca ve kullanım alanına göre çeşitlendirilen katkı maddelerinden

oluşmaktadır. Bağlayıcı olarak akrilik, polivinil asetat, epoksi, çözücü olarak ksilen, tolüen, ketonlar ve genellikle düşük konsantrasyonlarda katkı madderi bulundurlar (Brock vd., 2000).

Katkı maddeleri, boyalar veya kaplamalarda belirli bir işlevi olan veya spesifik bir özellik kazandıran kimyasallar olarak tanımlanır. Genellikle ağırlıkça %0,1-5 konsantrasyonda kullanıldığı gözlenen boya katkı maddeleri, yüzey aktif maddeler, dağıtıcı, kurutucu, reolojik, plastikleştirici, kabuklanma önleyici, köpük önleyici kimyasal maddeler, korozyon inhibitörleri, stabilizatörler ve katalizörleri ifade etmekte olup, önemli katkı maddelerinin arasında biyosidal kimyasallar gelmektedir (Brock vd., 2000).

Boyaların oluştuğu kimyasallara sıklıkla soluma ve cilt teması ile maruz kalınmakta olup, özellikle boyanın hazırlanması sırasında, bileşenlerin (pigmentler, genişleticiler, reçineler, katkı maddeleri) tartılması, bunların karıştırma ekipmanına yüklenmesi, öğütücülere çözücülerin eklenmesi, boyanın yüzeye uygulanması gibi manuel işlemleri içeren işlemlerde meydana gelmektedir. İçerdikleri kimyasallar sebepli genotoksik, kanserojenik olduğu ve akyuvarların, T lenfositlerinin seviyesini azaltma gibi hematolojik değişikliklere de yol açtığı bilinmektedir. (Kim vd., 1999). Bazı ülkelerde boyaların içerdiği kimyasallar azaltılmış veya değiştirilmiş olmasına rağmen dünya geneldi tehlikeli kimyasal içeriğe sahip boyalar kullanılmaktadır (IARC, 2006).

Su bazı boyalar organik maddeler içermesi sebebiyle mikroorganizmalar için ideal bir büyüme ortamını temsil eder. Artık monomerlerin ve organik solventlerin içeriğinin azalması nedeniyle, yeni formülasyonlarda mikrobiyal kontaminasyon riski daha yüksektir. Film koruyucu olarak kullanılan ajanlar, boyalarda, kaplamalarda mikroorganizmaların büyümesini, boyaya eklenen ağırlıkça %1'in altındaki konsantrasyonlarda kimyasal biyositlerle engellemektedir. Kutu içi koruyucular, boyayı, üretim, nakliye ve depolama sırasında mikrobiyal büyümeye karşı korur. Bu amaç için yaygın olarak kullanılan maddeler formaldehit, alkoller, aminler ve amidler, izotiazolinonlar ve kloroasetamid gibi N, S -heterosiklik bileşiklerdir. Antimikrobiyal film koruyucular ise uygulanan boyayı bakteri, küf, yosun veya yosun saldırılarına karşı korur. Bu amaç için halihazırda kullanılan maddeler arasında çeşitli kükürt ve azot içeren kimyasallar, ditiyokarbamatlar, tioftalimid türevleri, benzimidazol türevleri ve tryalkil bileşikler gibi siklik bileşikler

kullanılmaktadır. Ek olarak organik cıva bileşikleri gibi ekolojik açıdan tehlikeli maddeler yer alabilmektedir (Brock vd., 2000). Buna karşın antimikrobikrobiyal boyalarda kullanılan toksik kimyasallar yerine biyolojik olarak parçalanabilir, toksik olmayan antimikrorobiyal ajanlara yönelinmelidir.

Boyalar ve kaplamalar için endüstriyel açıdan yararlı bir bağlayıcıya dönüştürülmesi sebebiyle bitkisel tohum yağları, lignin ve kitosan bazlı poliüretan gibi biyolojik kaynaklardan üretilen yapılar katılmakta ve böylece boyalarda kullanılan kimyasal olararı azaltılabilmektedir (Ghost ve Urban, 2009; Karak, 2016).



## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Levan Sentezinde Kullanılan Bakterilerin İzolasyonu

Levan sentezinde kullanılan bakteri izolatları, “TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Desteği Programı” kapsamında Eylül 2020’de sonuçlandırılan “Nikel İçeren Topraklardan İzole Edilen Bakteriler İle Bazı Ağır Metallerin Biyoremediasyonu” başlıklı projede elde edilen ve Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU’nun kişisel kültür koleksiyonunda muhafaza edilen strainler arasından seçilmiştir.

Mart 2020’de yapılan arazi çalışmalarında alınan toprak örneklerinden elde edilen izolatların yukarıda bahsi geçen proje kapsamında kültürel ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan bu strainlerden canlandırma sonrası en fazla mukoid özellik gösteren ve büyük kubbe morfolojisine sahip olan 5 tanesi levam üretim potansiyellerinin belirlenmesi için seçilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1

Bakteriyal izolatların elde edildiği toprak örneklerinin istasyon bilgileri

İzolat Kodları	Örnek Alınan Bölge	Rakım	Coğrafi Koordinat Bilgisi
2N11			
2N12			
2NB14	Sarımsaklı köprü,	55 m	39.840.276 N
2N17	Kendirlik mevki		26.320.107 E
2N110			

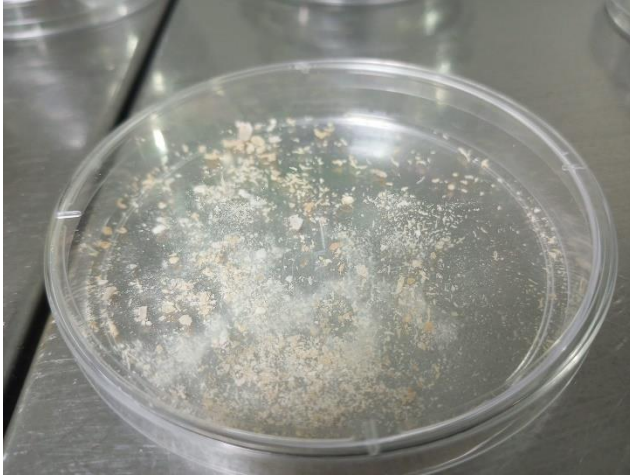
Tez kapsamında levam üretimi için kullanılan bu izolatların gliserol stoklarından Nutrient agar (NA) içeren petri kaplarına pasajlamaları yapılarak, 37 °C’de 24 saat inkübasyon koşullarında canlandırılmaları yapılmıştır.

#### 3.2. Biyopolimerin Eldesi

Bakteriyal izolatların levam üretiminde kullanılabilmesi için 50 mL steril Nutrient Broth (NB) ortamına bir öze dolusu bakteri kültürü inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat

120 rpm'de inkübe edilmiştir. Bu erlenlerin içeriği için standart inokulum olarak  $7 \times 10^6$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon sonunda elde edilen bakteri kültürü (%10 v/v) levan üretimi için 50 mL %5 sukroz ilaveli NB besiyerinde mezofil koşullarda 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Fermantasyon süresinin sonunda, her bir şişeden 10 mL kültür alınmış ve 4000 rpm'de 15dk santrifüj işlemiyle kültür sıvıdan ayrılmıştır. Süpernatant ayrılarak üzerine 1:2 oranında etanol ilave edilmiş, pH 10'da 60 dakika 37 °C'de inkübe edilerek polimer çöktürülmüştür. Daha sonra sıvı 10000 rpm'de 10 dk santrifülenerek etanol ortamdan uzaklaştırılmış ve çöken polimer kurutma işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 1) (Abou-Taleb vd., 2014).



Şekil 1. *Brachybacterium nesterenkovii* NY-3 tarafından üretilen biyopolimer

### 3.2.1. Sentezlenen Levanların Tanımlanması ve Yapısal Karakterizasyonu

İzolatlardan elde edilen biyopolimerin levan olma potansiyeli ilk aşama olarak fruktoz varlığı Potasyum ferrisiyanür (PF) şeker testi ile belirlenmiştir. Önceki adımda üretilen biyopolimer peletleri, 100 °C'de su banyosunda bir saat boyunca %0,5 (v/v) HCl kullanılarak hidrolize edilmiştir (Moussa vd., 2017). Daha sonra sodyumhidroksit (%20) sulu çözelti içinde 1 mL PF (10 mg/mL), 1 mL hidrolize levana (1 mg/mL) ilave edilmiş ve içerik nazikçe çalkalanmıştır. Renk değişimi gözlenmiş ve oluşan yeşilimsi sarı rengin kaybolma zamanı not edilmiştir. Renk kaybolması 2 dk gerçekleşmesi levan varlığını göstermiştir. Kontrol olarak fruktoz ve glukoz kullanılmıştır (Srikanth vd., 2015a).

Elde edilen polimerin levana olup olmadığının anlaşılması için *B. nesterenkovii* NY-3 straininden elde edilen levana proton analizi ( $^1\text{H}$  NMR) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) yapılmış ve bulgular literatürdeki levana verileriyle karşılaştırılmıştır (Jathore, 2012; Srikanth vd., 2015b).

### **3.3. Levana Üretiminin Optimizasyonu**

Levana üretim optimizasyonu denemeleri için tez kapsamında standart inkübasyon (37 °C 48 saat) koşullarında en yüksek levana eldesinin yapıldığı *Brachybacterium nesterenkovii* NY-3 bakterisi seçilmiştir. Bu bakterinin seçilmesinin bir diğer nedeni ise yapılan literatür taramalarında bu strainle levana üretimine dair çalışmaların sınırlı olduğunun saptanmasıdır (Díaz-Cornejo vd., 2023). Fermentasyon süreçlerinde optimizasyon için tek seferde tek parametre optimizasyonu stratejisi kullanılmıştır.

Üretim besiyeri içeriği (g/L);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,0 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g), sukroz (100 g) maddelerinden oluşmakta olup; bakteri inokülasyonu ise 1 McFarland standardında %10 (v/v) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Mousa vd., 2017).

#### **3.3.1. Farklı Azot Kaynaklarının Levana Sentezine Etkisi**

Bu amaçla literatür bilgileri ışığında (Koşarsoy Ağçeli, 2017) üre, maya özütü, tripton, pepton ve amonyum oksalat olmak üzere beş farklı ticari azot kaynağı seçilmiştir.

Tüm optimizasyon parametreleri için bakteri inokülasyonundan sonra inkübasyon koşulları 48 saat 37 °C’de 150 rpm olarak belirlenmiş olup sürenin sonunda levana miktarı g/L olarak belirlenmiştir.

#### **3.3.2. Farklı pH Değerlerinin Levana Sentezine Etkisi**

Uygun pH değeri belirlemek için inokülant üretim besiyerinde 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pH değerlerinde inkübe edilmiştir.

### **3.3.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Levan Sentezine Etkisi**

Optimum üretim sıcaklık değerini belirlemek için 25 °C, 30 °C, 37 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.4. Farklı Sukroz Miktarlarının Levan Sentezine Etkisi**

Farklı sukroz içeriğine sahip besiyerlerinin (%1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30) 48 saat inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.5. Levan Üretiminde Uygun Karbon Kaynağının Belirlenmesi**

Standart besiyerine karbon kaynağı olarak %15 oranında Glukoz, Fruktoz, Sukroz, Mannitol eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir.

## **3.4. Levan Biyopolimerinin Antifungal Film Etkinliğinin Belirlenmesi**

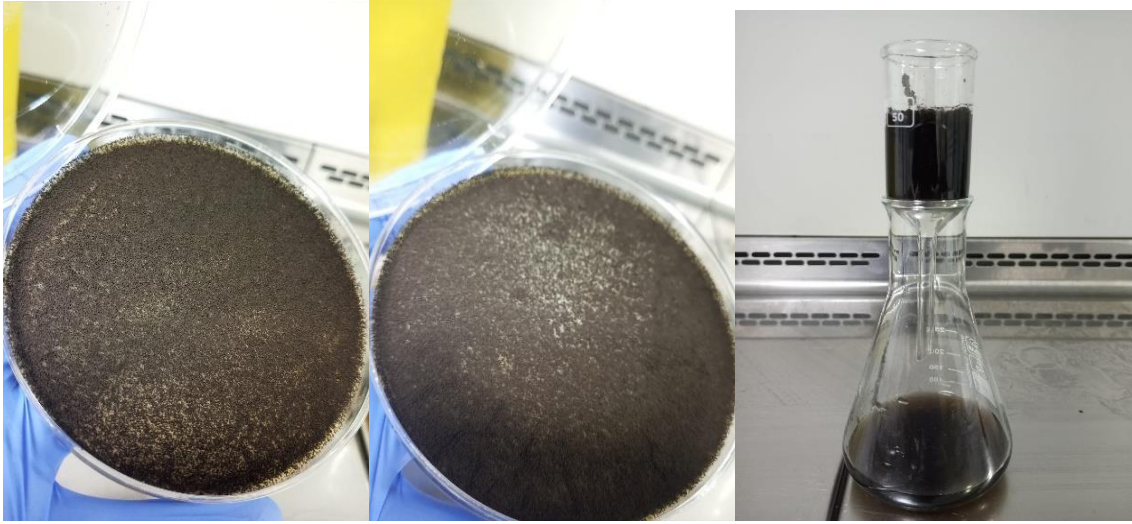
Levan biyopolimerinin antifungal film etkinliğinin belirlenmesi EN 15457 (Boyalar ve vernikler- Bir kaplamada mantarlara karşı film koruyucuların etkinliğinin denemesi için laboratuvar yöntemi) referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Standart kapsamında, dış ortamda (*Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma violaceae*, *Ulocladium atrum*) ve iç ortamda kolonize olma ihtimali yüksek fungus (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Stachybotrys chartarum*, *Penicillium purpurogenum* ve *Rhodotorula mucilaginosa*) türlerinin ikisinin çalışılması önerilmektedir (EN 15457, 2022). Etkinliğin değerlendirilmesinde referans olarak iç çephe boyası kullanılacağından *P. purpurogenum* ve *A. niger* suşları seçilerek test gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.1. Spor Süspansiyonun Hazırlanması**

*P. purpurogenum* DSM 62866 ve *A. niger* DSM 12634 suşları %3 malt, %1,5 agar içeren kültür ortamında 7 gün inkübe edilmiştir. Her bir strain agar üzerine 5 mL %0,05 Polisorbitat 80 Solüsyonu içeren steril su aktarılarak drigaski ile kültür yüzeyinden sporlar ayrılmıştır. Elde edilen spor süspansiyon bir erlene aktarılmıştır. Spor süspansiyonları hif



yapılarının ve sporların birbirinden ayrılması amacıyla 5 g cam boncukla 1 dakika boyunca çalkalanmıştır. Homojenize edilmiş süspansiyon sinterlenmiş süzgeçten 3 kez süzülmüştür. Elde edilen süspansiyon 400x büyütmede spor yapıları ve süspansiyonda hif varlığı incelenmiştir. Her iki strain içinde spor sayısı hemositometre ile sayıldıktan sonra, her bir mikroorganizmadan eşit oranda karıştırılarak spor sayısı  $10^6 - 10^7$  spor/mL olacak şekilde steril su ile ayarlanmıştır. Spor karışımının spor yoğunluğu istenilen yoğunluğa ayarlandıktan sonra seri dilüsyon yapılarak Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerine dublike olarak 1 mL inoküle edilmiş ve Petriler  $24 \pm 2$  °C'da 7 gün inkübe edilerek koloni sayıları kaydedilmiştir (Şekil 2) (EN 15457, 2022).

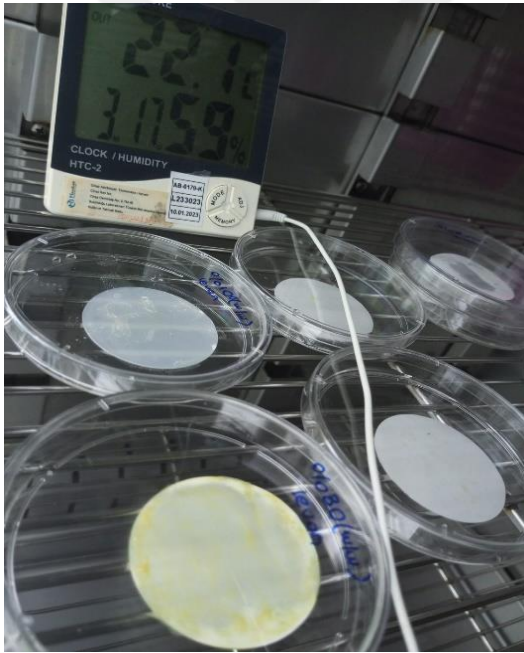


Şekil 2. *P. purpurogenum* DSM 62866 ve *A. niger* DSM 12634 kültürleri ve spor süspansiyonu hazırlanışı

### 3.4.2. Antifungal Film Potansiyelinin Test Edilmesi

Levan solüsyonunun antifungal film potansiyeli EN 15457 standardı modifiye edilerek belirlenmiştir. Levan %10 (w/w) konsantrasyonda hazırlanmış gliserol solüsyonu ile çözdürülmüştür. Hazırlanan levan solüsyonu, antimikrobiyal olmayan beyaz iç mekân boyasına, levan miktarı %3-5-10-20 son konsantrasyonda olacak şekilde eklenmiştir. Biyosidal etkisi olmayan filtre kâğıdı üzerine (%3-5-10-20) levan içeren boya örneklerinin kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ek olarak levan içermeyen boya ile kaplama işlemi yapılmıştır. Kaplama yapılan filtre kağıdının antifungal etkinliği olmadığını gösterilmesi amacıyla kaplama yapılmamış steril filtre kağıtları hazırlanmıştır. Uygulama görmüş ve

görmemiş filtre kağıtları 5 gün boyunca  $23 \pm 2$  °C’de ve  $50 \pm 5$  bağıl nemde yatay konumda şartlandırılmıştır (Şekil 3). Şartlandırmadan sonra, boya ile kaplanmış tüm filtreler UV ile steril edilmiştir. Steril edilmiş levan solüsyonu, agar yüzeyinin merkezine steril bir cımbız ile kaplanmış yüzey yukarı bakacak şekilde, hava boşluğu kalmadan yerleştirilmiştir. 0,2 mL mix spor süspansiyonu boya işe kaplanmış ve kaplanmamış filtrelere inoküle edilmiştir ve filtre üzerine eşit olacak şekilde yayılmıştır. Süspansiyonun üreme kontrolü amacıyla üç adet sadece agar besiyerine inoküle edilmiş ve süspansiyon drigalski ile agar üzerine yayılmıştır.  $24 \pm 2$  °C’de 7 gün inkübe edilerek koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Kaplanmış ve kaplanmamış filtreler de  $24 \pm 2$  °C’de inkübasyona aynı anda kaldırılmış olup standart kapsamında değerlendirme ölçeği dikkate alınarak 7, 14 ve 21 gün inkübasyon süresi sonrası mantar büyümesinin filtre kâğıdı alanının yüzde kaçını kapsadığı belirlenerek kaydedilmiştir (EN 15457, 2022).



Şekil 3. Filtre kağıtlarının şartlandırma işlemi

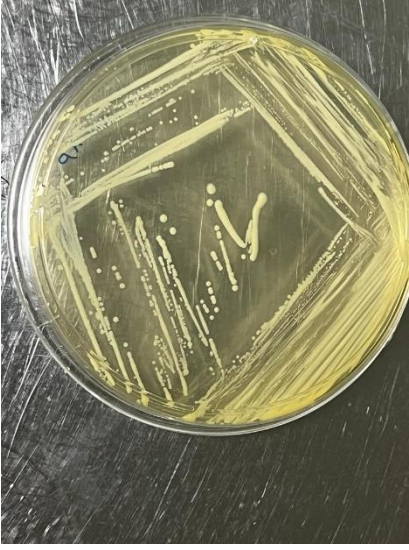
### 3.5. Tekstil Ürününün Antibakteriyal Etkinliğinin Belirlenmesi

#### 3.5.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanışı

*S. aureus* ATCC 6538 (Şekil 4), *K. pneumoniae* ATCC 4352 (Şekil 5) kültüründen bir öze dolusu alınmış ve süspansiyon besiyeri (1/500 NB) hazırlanmıştır.



Şekil 4. *S. aureus* ATCC 6538'nun Triptik Soy Agar (TSA) besiyerindeki görüntüsü



Şekil 5. *K. pneumoniae* ATCC 4352 TSA besiyerindeki görüntüsü

### 3.5.2. Tekstil Ürününün Levan Biyopolimeri ile Muamelesi

%65 pamuk-%35 polyester içeriğine sahip seçilmiş kumaşlara %10 (w/w) konsantrasyonda hazırlanmış gliserol solüsyonu ile %3-5-10-20 levan konsantrasyonu ayarlanmıştır. Test örnekleri  $50\pm 2$  mm x  $50\pm 2$  mm ebadında ve en fazla 10 mm kalınlığına ayarlanarak hazırlanmış levan solüsyonları steril petri içerisinde kumaş tamamen emilim sağlayacak miktarda aktararak 2 saat beklenmiştir. Levan solüsyonu emdirilen kumaş ayrı bir petriye alınarak  $37\pm 2$  °C'de 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuruma süresi sonrası

kumaşların bir kısmı ISO 20743 test protokolü için kumaşların bir kısmı 0,40 g±0,05 g olacak şekilde kesilmiştir (ASTM E2149, 2020; ISO 20743,2013; JIS L 1902,2015).

### 3.5.3. Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin tespiti ISO 20645:2004 protokolüne ve JIS L 1902:2015'den Hale yöntemine dayalı olarak yapılmıştır. ISO 20645 yönteminde tekstil numuneleri iki agar tabakası arasına yerleştirilmiştir. 10±0.1 mL NA dökülen petriye besiyeri donduktan sonra levam ile muamele görmüş ve hiçbir muamele görmemiş kumaşlar steril pens ile yerleştirilmiştir. Üzerine 5,0±0,1 mL NA ve 6,0x10<sup>5</sup> kob/mL bakteri karışımı aktarılıp agar ortamının katılaşması beklenmiş ve 37±2 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Eş zamanlı olarak Hale yöntemi gerçekleştirilmiş olup 1x10<sup>7</sup> kob/mL ayarlanmış bakteri süspansiyonları NA'ya eklenerek 1,0±0,1 mL yayma plak yöntemiyle ekim gerçekleştirilmiştir. Muamele görmüş ve hiçbir muamele görmemiş tekstil numuneleri üzerine yerleştirilerek 24 saat 37±2 °C'de inkübe edilmiştir (ISO 20645, 2004; JIS L 1902, 2008). Tekstil ürünlerindeki levamın besiyerine difuze olmaması durumunda levam biyopolimeri ile muamele edilmiş tekstil ürünleri "ISO 20743-Tekstil ürünlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi" test metodu uygulanarak bulunmuştur. Antimikrobiyal uygulama görmüş (A) ve antimikrobiyal uygulama görmemiş (U) altışar adet test örnekleri 0,40 ±0,05 g olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan test örnekleri UV ile steril edilmiştir. Daha sonra test örneklerinin üzerine 0,2 mL test süspansiyonu ilave edilmiş olup A ve U örneklerinden 3'er tanesinin üzerine 20 mL Soybean Casein Lecithin Polysorbate (SCDLP) Broth besiyeri eklendikten hemen sonra Maximum Recovery Diluent (MRD) ile seri ondalık dilüsyonları yapılmıştır. SCDLP Broth ve ondalık dilüsyonlardan membran filtrasyon yapılarak filtreler TSA'a yerleştirilmiştir. Petriler 37±2° C'de 24-48 saat inkübasyon sonunda geri kazanılan mikroorganizma sayısı, uygulama görmemiş tekstil ürününün temas anı (U<sub>0</sub>) ve uygulama görmüş tekstil ürününün temas anı (A<sub>0</sub>) olarak belirlenmiştir. Temas sonrası levam ile muamele edilmiş ve edilmemiş kumaşlar 37±2 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve aynı işlem gerçekleştirilmiştir. Temas süresi sonrası membran filtrasyon gerçekleştirilip, membran filtre yerleştirilen petriler 37±2 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrası uygulama görmemiş tekstil ürününün temas süresi sonrası (U<sub>t</sub>) ve uygulama görmüş tekstil ürününün temas anı (A<sub>t</sub>) bakteri sayısı gerekli dilüsyon katsayısı

hesaba katılarak hesaplanmıştır. Levan ile muamele edilmiş kumaşın antibakteriyel etkinliği ISO 20743 metoduna göre Formül 1.1, 1.2 ve 1.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antibakteriyal Aktivite Değeri} = F - G \quad (1.1)$$

$$F = \lg C_t - \lg C_0 \quad (1.2)$$

$$G = \lg T_t - \lg T_0 \quad (1.3)$$

- $\lg C_t = 3$  adet U örneğinin temas süresi sonrasındaki bakteri sayısının ortalama değerinin logaritması
- $\lg C_0 = 3$  adet U örneğindeki temas anı bakteri sayısının ortalama değerinin logaritması
- $\lg T_t = 3$  adet A örneğinin temas süresi sonrasındaki bakteri sayısının ortalama değerinin logaritması
- $\lg T_0 = 3$  adet A örneğindeki temas anı bakteri sayısının ortalama değerinin logaritması

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Bakteri İzolatlarının Tanımlanması

Toprak örneklerinden elde edilen izolatlardan %5'lik sukroz içeren TSA'da inkübasyondan sonra en fazla mukoid özellik gösteren ve kubbe şeklinde görünümüne sahip 5 bakteri izolatı seçilmiş ve bu izolatlar moleküler identifikasyona tabi tutulmuşlardır. 16S rDNA gen dizi analizleri sonrası informatik araçlarda benzerlik oranları dikkate alınarak bakteri izolatları tür düzeyinde belirlenmiştir. İzolatların en yakın tür ve benzerlik oranı Tablo 2'de verilmiştir.

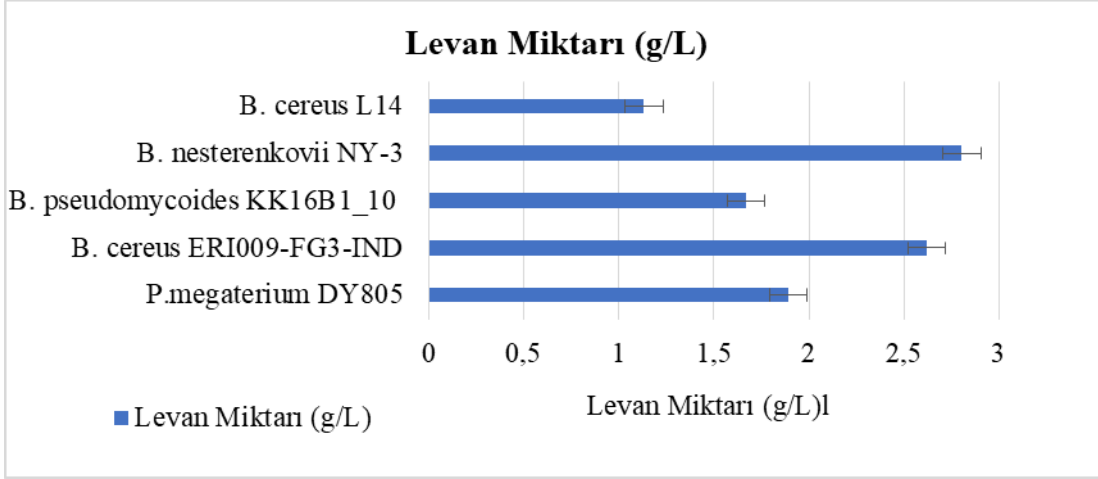
Tablo 2

İzolatların en yakın tür ve benzerlik oranı (%)

İzolat Kodu	Bakteri straini	Benzerlik Oranı (%)
2N11	<i>Priestia megaterium</i> DY805	99.76
2N12	<i>Bacillus cereus</i> ERI009-FG3-IND	95.53
2NB14	<i>Bacillus pseudomycooides</i> KK16B1_10	99.53
2N17	<i>Brachybacterium nesterenkovii</i> NY-3	100
2N110	<i>Bacillus cereus</i> L14	99.29

#### 4.2. Levan Biyopolimeri Üretimi

Moleküler tanımlamaları yapılan *P. megaterium* DY805, *B. cereus* ERI009-FG3-IND, *B. pseudomycooides* KK16B1\_10, *B. nesterenkovii* NY-3 ve *B. cereus* L14 bakteri strainleri sırasıyla 1,892 g/L, 2,620 g/L, 1,670 g/L, 2,806 g/L ve 1,132 g/L levan biyopolimeri üretmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. İzole edilen mikroorganizmalardan üretilen levan miktarı

*Bacillus* türleri, gelişmiş adaptasyon mekanizmaları nedeniyle çeşitli habitatlardan izole edilebilen, gram pozitif, basil morfolojisinde, endosporlu aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Bu üstün fiziksel özellikler *Bacillus* türlerinin fermantasyon yoluyla üretim yapmasında kilit rol oynamaktadır. Literatürde birçok *Bacillus* straininin yüksek çeşitlilik ve oranda ekzopolisakkarit yapıda biyopolimer üreticisi olduğu bildirilmiştir (Sojan vd., 2023).

Bu çalışmada 4 farklı bakteri türü (5 farklı strain) izole edilmiş olup kültürel yöntemde levan üretim miktarları belirlenmiştir. Levan ürettiği tespit edilen 5 organizmanın 4'ünün *Bacillus* türü olduğu tanımlanmıştır. Literatürde *P. megaterium*, *B. cereus* ve *B. pseudomycooides* türlerinin biyopolimer üretim potansiyeline dair çalışma saptanamamış olup ilk kez bu çalışma kapsamında levan biyopolimeri ürettikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus reuteri*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus* türleride dahil olmak üzere farklı çok sayıda *Bacillus* türünün levan üretme kapasitelerinin olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Zhang vd., 2014; Bouallegue vd., 2020). Bu çalışma kapsamında *Bacillus* genusu üyesi strainlerin ortalama 1.83 g/L levan biyopolimeri ürettiği tespit edilmiştir.

*B. subtilis* strainlerinin yüksek oranda levan üretimi gerçekleştirdiği bilinmektedir (Shih vd., 2010; dos Santos vd., 2013; Mummaleti vd., 2022).

*B. subtilis* NRRL B-447, *B. subtilis* NRRL B-675, %15 sükroz içeren besi ortamında 10 gün 170 rpm çalkalamalı inkübasyon koşulunda levan üretmiştir. Her iki strainde 10 g/L levan üretmekte olup, aynı inkübasyon koşullarında *B. subtilis* NRRL B-744a ise 15g/L levan üretmiştir. Buna karşın *B. subtilis* NRRL B-577 ve *B. subtilis* NRRL B-644 izolatları aynı inkübasyon koşullarında levan üretimi gerçekleştirmemiştir (Han vd., 1996).

*Bacillus* türlerinde levan üretim miktarları çeşitlilik göstermektedir (Han vd., 1996). *Priestia megaterium* DY805, *B. cereus* ERI009-FG3-IND, *B. pseudomycoides* KK16B1\_10, ve *B. cereus* L14 levan üretme miktarı *B. subtilis* levan üretim miktarına göre az olmakla birlikte, biyopolimer üretim miktarı besi ortamı bileşenleri, inkübasyon süresi ile doğrudan etkili olup, besi ortamını oluşturan bileşenler miktarı veya inkübasyon süresi ile doğrusal olmayan bir çeşitlilik göstermektedir (Han vd., 1996; Nasir vd., 2020).

*Bacillus polymyxa* levan üretimi besi ortamının içerdiği sükroz oranına göre 7,1-57,3 g/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek levan miktarı (57,3 g/L) yaklaşık %8 sakkaroz içeren ortamda gerçekleşirken, daha yüksek sükroz konsantrasyonlarında verim düşmüştür. %10-12-16 sükroz içeren ortamda sırasıyla 40,2 g/L, 36,0 g/L ve 32,0 g/L levan ürettiği tespit edilmiştir (Han vd., 1996).

Araştırmamızda ise *P. megaterium* DY805, *B. cereus* ERI009-FG3-IND, *B. pseudomycoides* KK16B1\_10, ve *B. cereus* L14 strainlerinden elde edilen levan üretim miktarları standart inkübasyon koşullarında elde edilen sonuçlardır. Bu strainlerden elde edilen levan üretim miktarlarının farklı inkübasyon koşullarında daha yüksek olma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Bununla birlikte çalışmada yer alan strainlerden *B. cereus* ERI009-FG3-IND straininin, *P. megaterium* DY805, *B. pseudomycoides* KK16B1\_10 ve *B. cereus* L14 strainlerine kıyasla sırasıyla %38,62, %56,89 ve %131,86 daha fazla levan üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır. En düşük levan ise *B. cereus* L14'den elde edilmiştir.



*Brachybacterium* genusu, Actinobacteria sınıfına ait hareketsiz, spor oluşturmeyen, Gram pozitif, kok veya basıl morfolojisine sahip; aynı zamanda EPS üretme potansiyelide gösteren bakterileri kapsamaktadır (Orsod vd., 2012).

*Brachybacterium paraconglomeratum* türünün en yüksek EPS üretimi pH 7,0 ye ayarlanmış 500 g/L sükröz içeren besiyerinde 28 °C, 72 saat inkübasyon koşulunda 45,23 g/L olarak saptanırken; aynı türün 37 °C’de 24 saat inkübasyonunda EPS üretimi 2,13 g/L olarak bildirilmiştir (Aleksandra vd., 2017).

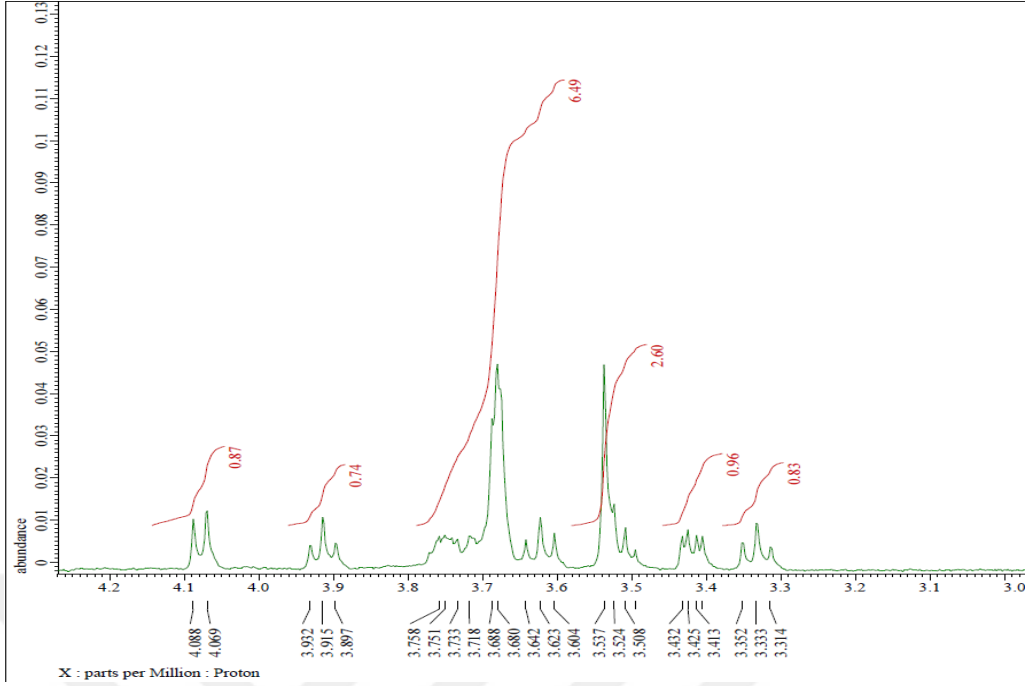
*B. nesterenkovii* NY-3 straininin standart inkübasyon koşullarında (%5 sukroz ilaveli NB, pH 7, 48 saat) levan üretimi ise 2,81 g/L olarak saptanmıştır (Díaz-Cornejo vd., 2023).

#### **4.2.1. Sentezlenen Levan Biyopolimerlerinin Tanımlanması**

5 farklı strainden PF şeker testi ile yapılan tanımlama işleminde renk kaybolması *P. megaterium* DY805, *B. cereus* ERI009-FG3-IND, *B. pseudomycoides* KK16B1\_10, *B. nesterenkovii* NY-3 ve *B. cereus* L14 test bakterilerinden sırasıyla 45 s, 38 s, 50 s, 53 s ve 49 s’de tespit edilmiştir. Pozitif kontrol fruktozda 10 s’de sarı-yeşil renk kaybolurken; negatif kontrol olarak kullanılan glukoz solüsyonu soluk yeşil renk olarak sabitlenmiştir. Bu durum her bir strain için mikrobiyal ürünlerin levan polimeri olduğunu kanıtlamıştır (Srikanth vd., 2015).

#### **4.2.2. Sentezlenen Levan Biyopolimerlerinin Karakterizasyon Bulguları**

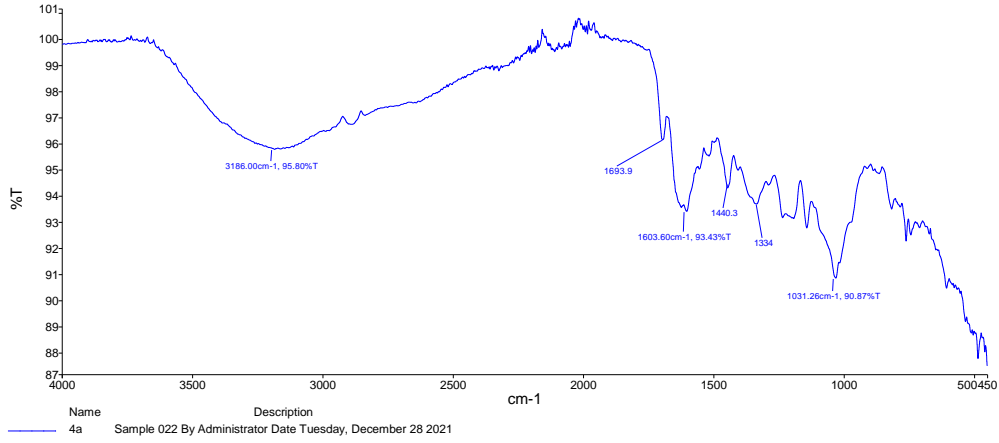
*B. nesterenkovii* NY-3 straininden sentezlenen levan polimerlerinin, <sup>1</sup>H NMR görüntüleri hizmet alımı şeklinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM)’nden temin edilmiştir. Saflaştırılmış levanın <sup>1</sup>H NMR spektrumu (Şekil 7), levanın oluşturucu monomeri olarak fruktozla ilgili altı adet proton sinyali göstermiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrum rezonanslarının 3.3 ve 4.2 ppm arasında olduğu görülmüş olup; sinyal aralığı *B. nesterenkovii* NY-3 üretilen fruktanın (2 → 6) fruktofuranosid birimlerine sahip levana olduğunu göstermiştir.



Şekil 7. *B. nesterenkovii* NY-3 straininden elde edilen levainın <sup>1</sup>H NMR spekturumu

<sup>13</sup>C NMR ve <sup>1</sup>H NMR spektroskopisi, levainın karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan analiz yöntemleridir. Nükleer manyetik rezonans spektrumları, küçük moleküller için son derece benzersiz, iyi çözünen, analitik olarak izlenebilir ve sıklıkla tahmin edilebilir özelliklere sahiptir. NMR spektroskopisi, birincil yapı (dahil stereo kimya), şeker konformasyonu, yerine koyulan grupların stoikiyometrisi ve karışımdaki bireysel şekerlerin oranı gibi yapısal özellikleri belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca örnekteki belirli "fonksiyonel grupların" varlığı hakkında detaylı bilgi sağlar. <sup>13</sup>C NMR spektrumu, yapının karbon atomlarını temsil eden belirli kimyasal kaymaları verir (Srikanth vd., 2015).

Çalışmamızda optimizasyon çalışmalarında kullanılan *B. nesterenkovii* NY-3 straininden elde edilen levainın FTIR analizi Erzurum Atatürk Üni. Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'da hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiş olup, sentezlenen levana ait FTIR görüntüsü Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. *B. nesterenkovii* NY-3 straininden elde edilen levanın FTIR spekturumu

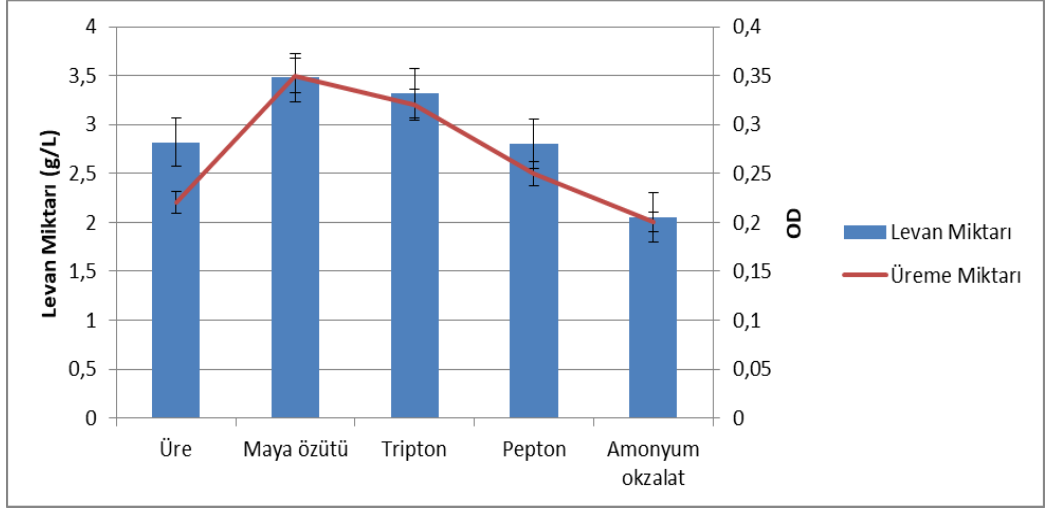
FTIR spektroskopisinin prensibine göre, belirli kimyasal bağlar kızılötesi enerjileri belirli frekanslarda veya dalga boylarında absorbe eder. Bu, bileşiklerin IR absorpsiyonlarının spektral konumlarına dayanarak, bileşiklerin temel kimyasal yapılarının belirlenmesine yardımcı olur. Levanın FTIR spektral konumları kullanılarak kolayca karakterize edilebilir (Schmitt ve Flemming, 1998). Levanın FTIR karakterizasyonu öncelikle hidroksil germe titreşimi, C-H germe titreşimi, karbonil C-O germe titreşimi, polisakkaridin glikozidik bağlanması (C-O-C) gerilimi ve şeker ünitelerinin furan halkasının varlığını gösterir.

Yapılan NMR ve FTIR analizleri ve literatürdeki veriler (Barone ve Medynets, 2007; Mamay vd., 2015; Koşarsoy Ağçeli, 2017) ile analiz sonuçları kıyaslandığında levan sentezinin başarılı olduğu görülmektedir.

### 4.3. Levan Üretiminin Optimizasyonu Bulguları

#### 4.3.1. Farklı Azot Kaynaklarının Levan Sentezine Etkisi

Farklı azot kaynaklarında levan üretimi sırasıyla maya özütü (3,48 g/L) > tripton (3,32 g/L) > üre (2,82 g/L) > pepton (2,80 g/L) > amonyum okzalit (2,05 g/L) olarak belirlenmiştir (Şekil 9). Levan sentezi ile bakteriyal üreme miktarı arasında doğrusal bir ilişkide saptanmıştır.



Şekil 9. Çeşitli azot kaynaklarının levan üretimine etkisi

*P. mandelii*'nin yüksek miktarda levan üretimi için farklı azot kaynaklarının (üre, maya özütü, amonyum nitrat, pepton, tripton, amonyum karbonat, malt özütü, amonyum sülfat, kazein, amonyum oksalat) etkisi, 48 saatlik inkübasyon koşullarında araştırılmıştır. En yüksek levan miktarı (16,6 g/L) azot kaynağı olarak maya özütü kullanılan inkübasyonda elde edilmiştir. Maya özütünden sonra en yüksek miktara (14,32 g/L) triptonun sebep olduğu görülmüştür. Diğer azot içeren kaynakların levan üretim miktarını artırma oranı ise sırayla, üre (10,08 g/L), pepton (10 g/L), amonyum oksalat (6,32 g/L), amonyum nitrat (3,76 g/L), kazein (2,48 g/L), malt özütü (2 g/L), amonyum sülfat (1,6 g/L), sodyum nitrat (1,12 g/L) bildirilmiştir (Koşarsoy Ağçeli, 2017). Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde sırasıyla maya özütü ve tripton içeren ortamda olduğu literatürden farklı olarak en düşük üretimin ise amonyum oksalat içeren ortamda olduğu görülmektedir.

*Z. mobilis* B-14023 kültürünün levan üretimi için mısır dik likörü, maya ekstraktı, pepton, tripton, malt şurubu, üre gibi farklı azot kaynakları kullanılmış ve en yüksek levan üretimi ( $5,52 \pm 0,23$  g/L) 2,5 g/L maya özütü içeren ortamda saptanmıştır (Silbir vd., 2014).

*B. licheniformis* NS032'nin levan üretimi için en iyi nitrojen kaynağının belirlenmesi amacıyla 24, 48 ve 96 saat inkübasyon koşullarında da pepton, maya özütü, et özütü, sodyum nitrat, amonyum sülfat ve maya ve et özütü kombinasyonu test edilmiş olup; en yüksek levan üretimi organik kaynaklardan maya özütü/et özütü karışımı ve

inorganik kaynaklar arasında amonyum klorür ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Kekez vd., 2015). 37 °C’de 24 saat 150 rpm dinamik inkübasyon koşullarında *B. licheniformis* BK AG21 straininin levan üretim besiyerine azot kaynağı olarak maya özütü, üre, sığır özütü, tripton, pepton, amonyum sülfat, amonyum klorid ve sodyum nitrat konulmuş ve maya özütü içeren ortamda bakteriyel üremenin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Mamay vd., 2015).

Maya özütü, et özütü ve malt nitrojen kaynaklarının *B. subtilis* MTCC 441 straininin levan üretimine etkisi incelenmiş ve maya özünün en iyi nitrojen kaynağı olduğu bulunmuştur. 100 g/L sükroz konsantrasyonunda, pH 7.0, 150 rpm inkübasyon koşullarında 2 g/L konsantrasyonda maya özütünün levan üretimi için optimal değerler olduğu tanımlanmıştır. Maya özütü ve et ekstraktında levan üretimi sırasıyla 0,20 g/L ve 0,15 g/L olarak bildirilmiştir (Chidambaram vd., 2019).

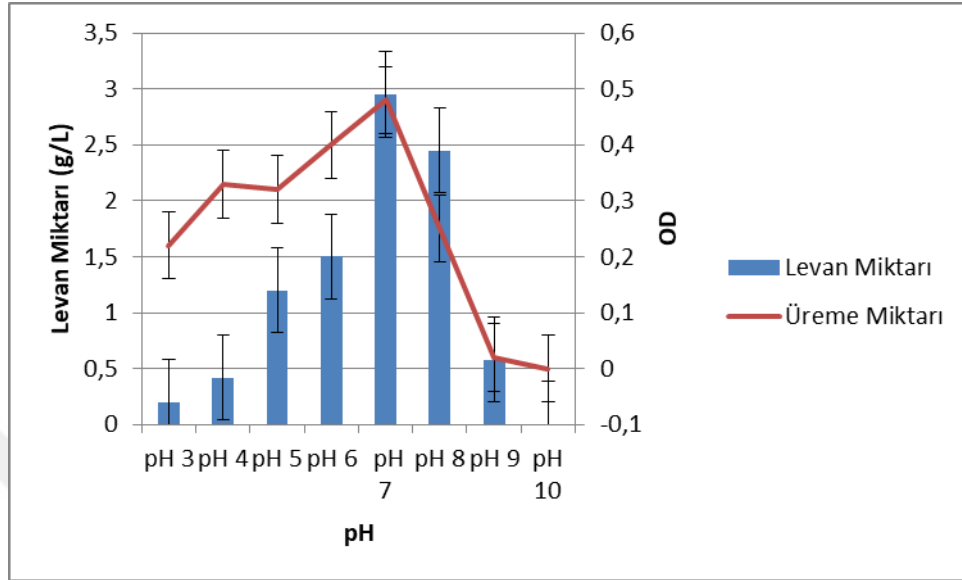
Diğer bir çalışmada farklı seviyelerde maya ekstraktı, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve sükrozun *Z. mobilis*’in levan biyopolimer üretimi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Nitrojen ve potasyum fosfat kaynağı olarak maya ekstraktının *Z. mobilis* tarafından üretilen levan miktarı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Buna karşın maya ekstraktının ortamda ki sükroz etkisini desteklemekte olduğu ve iki faktör arasındaki etkileşimin üretilen levan miktarına %29,51 oranında katkı sağladığı bildirilmiştir (Taran vd., 2020).

Kümes hayvanı atıklarından elde edilen tavuk tüyü peptonunun *B. subtilis* MTCC 441 straininin levan üretimine etkisi incelenmiş olup, ortama eklenen pepton miktarının levan üretimini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir. 100 g/L sükroz içeren kültür ortamında, 37 °C, 150 rpm, 20 saat inkübasyon koşulunda 2 g/L CFP ile eklenen kültürdeki levan verimi, 0,26 ± 0,04 g levan/g sükroz olarak tespit edilmiş olup; pepton konsantrasyonunun artması, mikrobiyal üremede artış olmasına rağmen daha az levan üretimine sebep olmuştur (Veerapandian vd., 2020).

#### **4.3.2. Farklı pH Değerlerinin Levane Sentezine Etkisi**

Optimum üreme için gerekli pH değerini saptamak için inokulant üretim besiyerinde farklı pH değerlerinde inkübe edilmiş (Şekil 10) ve pH 7’de en yüksek

verimlilik belirlenmiştir. Bununla birlikte pH 10'da üreme olmamış, dolayısıyla levan üretimi saptanamamıştır.



Şekil 10. Çeşitli pH değerlerinin levan üretimine etkisi

*Microbacterium laevaniformans* türünün levan üretiminde kültür ortamının pH değerindeki azalmanın levan üretimindeki etkisi incelenmiştir. Levan üretim optimizasyonunda ilk pH değeri 7,0'a ayarlanmış ve 24 saat inkübasyon sonrası 6,8'e düşmüştür. Besiyerinin pH düşüşü inkübasyon süresi uzadıkça yüksek oranda düşmüştür. pH düşüşünün, levan üretiminde de azalmaya neden olduğunu göstermiş olup *M. laevaniformans*'nin optimum levan üretme pH değerinin 6,0 olduğu tespit edilmiştir (Moosavi –Nasab vd., 2010).

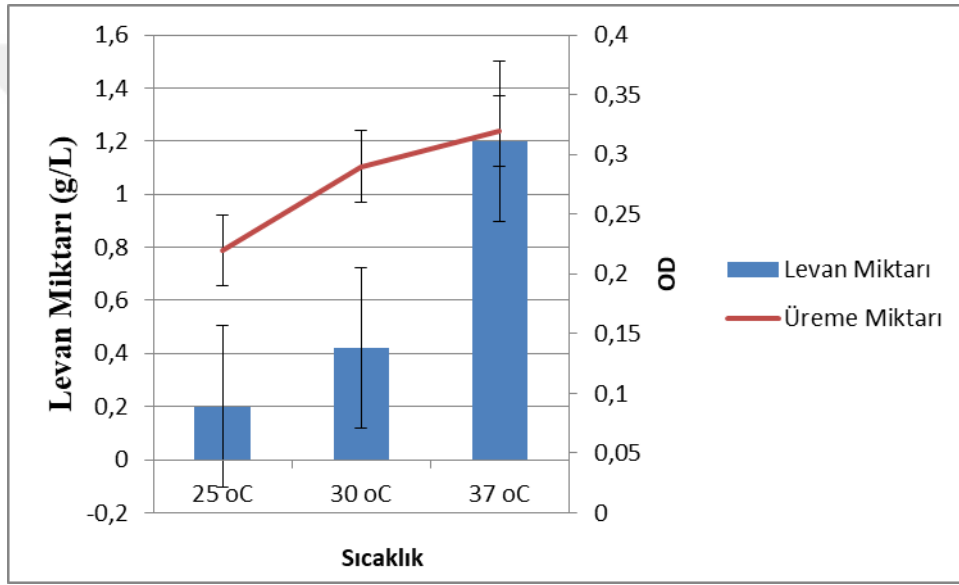
*Z. mobilis* B-4286 (Ananthalakshmy ve Gunasekaran, 1999) ve toprak izolatu *Pseudomonas brassicacearum*'un (Shanter AL-Qaysi ve Thabit, 2016) en yüksek levan üretimi, sırasıyla pH 5'te (150 g/L sukrozda 14,5 g/L), pH 7,8'de  $7,77 \pm 0,05$  g/L olarak bildirilmiştir.

Koşarsoy Ağçeli (2017), *P. mandelii* bakterisinin levan üretiminde optimum pH'ın 8 olduğunu ve pH 10'da üreme tespit edilemediğini bildirmiştir.

Levansükraz, sükrözün dönüşümünü katalize ederek levan üretimi gerçekleştirir. Nedeniyle, *Bacillus siamensis* türünün levan biyosentez işleminde levansükraz aktivitesinin pH'ya duyarlılığı belirlenmiştir. Levansükraz, fosfat tamponunda pH değerleri 6,0 ile 8,0 arasında önemli aktivite göstermiştir (Phengnoi vd., 2022).

#### 4.3.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Levan Sentezine Etkisi

En yüksek levan üretiminin 37 °C'de olduğu belirlenmiştir (Şekil 11). Bununla birlikte sıcaklık düşüşü ile birlikte levan üretiminde de azalma görülmüştür.



Şekil 11. Farklı sıcaklık değerlerinin levan üretimine etkisi

Levan üretimi için gereken optimum sıcaklığın 25°C ile 37°C arasında değişmekte olduğu bilinmektedir (Tieking vd., 2005).

*P. syringae* pv. *phaseolicola* maksimum levan üretimi 44 g/L olarak 30 °C sıcaklıkta olduğu tespit edilmiş ve bu sıcaklığın üzerinde levan üretiminde ani düşüş gözlenmiştir (Kasapis vd., 1994).

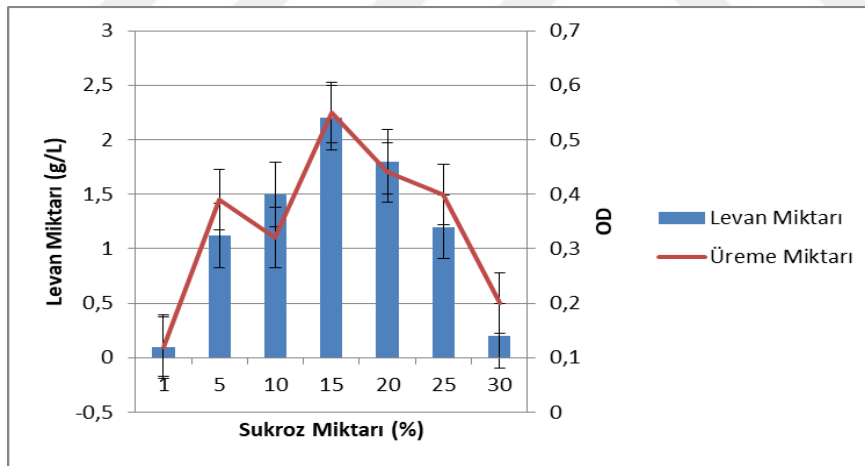
Benzer şekilde Koşarsoy Ağçeli (2017) ve Ernandes ve Garcia-Cruz (2011), sırasıyla *P. mandelii* ve *Z. mobilis* CCT 4494 bakterileri ile yaptıkları çalışmalarda

optimum levam üretim sıcaklığını 37 °C olarak saptarken; Melo, vd. (2007), bu sıcaklığı 20 °C olarak bildirmişlerdir.

Ek olarak *P. polymyxa* HCT33-3 suşunun inkübasyon sıcaklığının levam üretim kapasitesinin hem çalkalamalı hem de statik koşullarda etkisi test edilmiş ve sonucumuza paralel olarak en yüksek levam üretim verimi 37 °C statik inkübasyon koşullarında elde edilmiştir (Kosarsoy-Agçeli,2023)

#### 4.3.4. Farklı Sükroz Miktarlarının Levam Sentezine Etkisi

Farklı sükroz konsantrasyonlarından en yüksek verimlilik %15'lik sükroz miktarında elde edilmiştir (Şekil 12). En düşük üreme ve levam üretimi ise %1'lik sükroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Benzer veriler, Koşarsoy Ağçeli (2017) tarafından kaydedilmiş olup araştırmacı sükroz konsantrasyonunun levam verimliliği üzerinde yüksek önem sahip olduğunu bildirmiştir.



Şekil 12. Farklı sükroz miktarlarının levam üretimine etkisi

*Acinetobacter nectaris*'ten levam üretimine sükroz konsantrasyonunun etkisi incelenmiş ve 120 g/L sükroz içeriğinde 2,5 g/L; 270 g/L sükroz içeriğinde ise 1,5 g/L olarak tespit edilmiştir. *A. nectaris*'ten levam üretimi, sükroz konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı tespit edilmiştir. Sükroz konsantrasyonunun *B. atrophaeus* levam verimi üzerinde ise net bir etkisi bildirilmemiştir (González-Garcinuño vd., 2017).

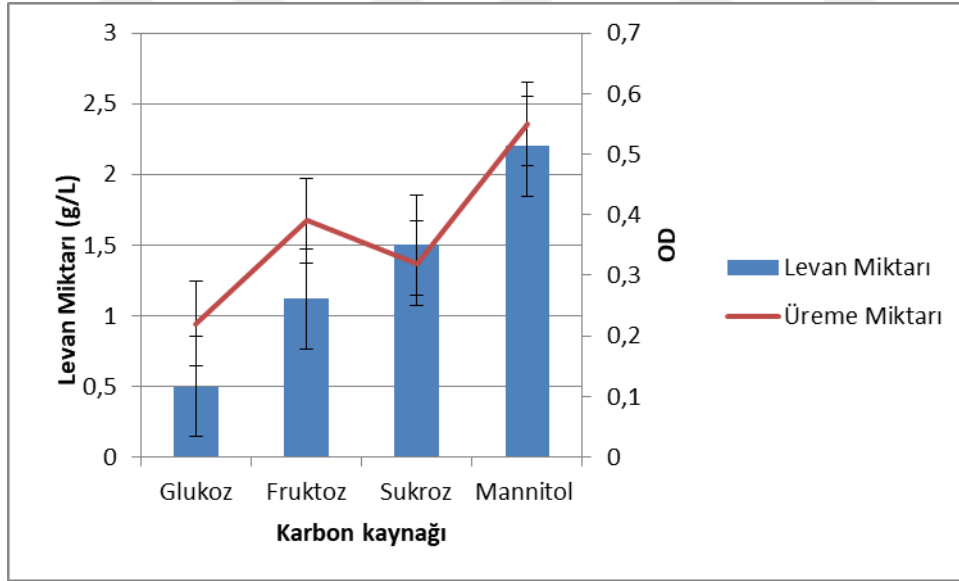


*B. siamensis*'in %5-10-20 sükröz içeren ortamdaki levansükraz aktivitesi incelendiğinde, %30 (g/L) sakkaroz içeren bir kültür ortamında arttığı ve en yüksek aktiviteyi 24 saat inkübasyonda gösterdiği bildirilmiştir (Phengnoi vd., 2022).

Elde ettiğimiz bulguları doğrular nitelikte, literatür bilgileri *B. subtilis* ile levan üretiminde yüksek sukroz miktarının levan üretimini pozitif yönde etkilediğini ortaya koymuştur (Kang vd., 2009; Shih vd., 2011). Ek olarak *P. agglomerans* ZMR7'nin levan üretimi için optimal inkübasyon sıcaklığının 35 °C olduğu bildirilmiştir (Al-Qaysi vd., 2021). Bu bilgiler zengin sukroz içerğinin levan optimizasyonunda önemli basamaklardan olduğunu kanıtlamaktadır.

#### 4.3.5. Levan Üretiminde Uygun Karbon Kaynağı Bulguları

Levan üretiminde karbon kaynağı çeşitlerinden en yüksek verimin mannitol ilavesiyle elde edildiği saptanmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Farklı karbon kaynaklarının levan üretimine etkisi

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter xylinus* KCCM 4143171, *Burkholderia cepacia* BTS13 ve *P. mandelii* bakterileriyle levan üretiminde de en etkin karbon kaynağı mannitol olarak saptanmıştır (Meneses vd., 2011; Koşarsoy Ağçeli, 2017).

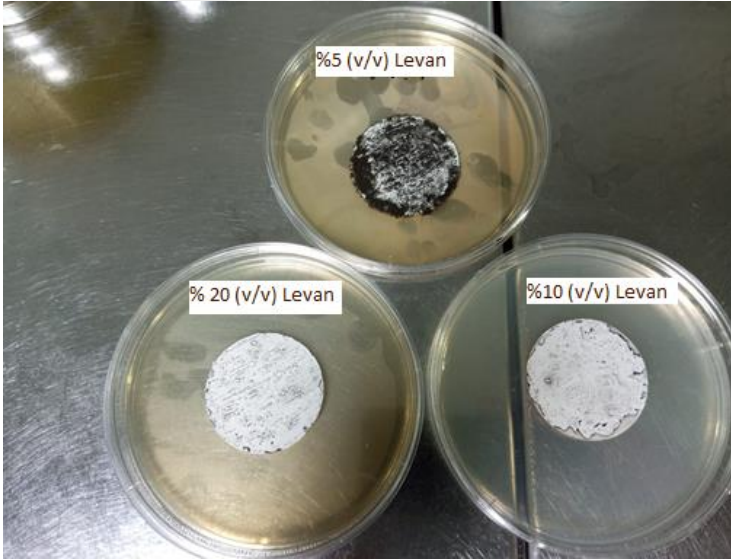
*Halomonas smyrnensis* AAD straininin mannitolün levan biyosentezi üzerindeki uyarıcı etkisi incelenmiş olup, 50 g/L sükröz içeren fermantasyon ortamına 30 g/L mannitol ilavesinin sükröz hidroliz hızını arttırmasına bağlı olarak levan üretiminde iki kat artırdığı tespit edilmiştir. *H. smyrnensis* AAD, 50 g/L sükröz içeren fermantasyon ortamına 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L ve 30 g/L mannitol eklenmesi sonucu sırasıyla 3,10 g/L, 4,99 g/L, 4,38 g/L, 5,17 g/L, 6,60 g/L konsantrasyonlarında levan üretimi tespit edilmiştir (Sarilmiser vd., 2015).

#### **4.4. Levan Biyopolimerinin Antifungal Film Aktivite Bulguları**

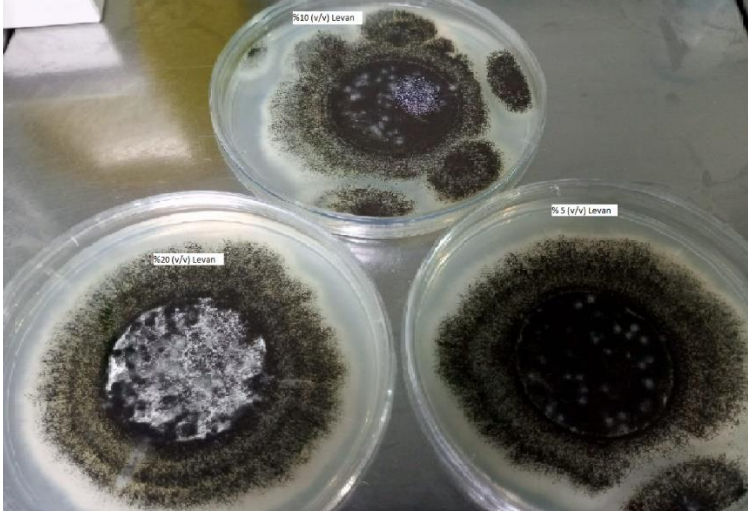
%3-5-10-20 levan içeren iç çephe boyasının *P. purpurogenum* DSM 62866 ve *A. niger* DSM 12634 antifungal etkinliği tüm test kriterleri sağlanarak belirlenmiştir. Analiz kapsamında kullanılan kaplama yapılmamış filtre kağıdının antifungal etkinliği 7. gün, 14. gün ve 21. gün de incelenmiş olup her üç periyotta da filtre kağıdının %100'ünü fungus kaplamış olup kullanılan filtre kağıdının antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4). Pozitif kontrol olarak referans boya kullanılmış olup; 7. gün, 14. gün ve 21. gün periyotlarında fungal gelişim tüm paralellerin %100 olduğu görülmüştür. Böylece levan içermeyen boyanın antifungal aktivite göstermediği ispatlanmıştır. %20 levan içeren içeren iç çephe boyasının 7. 14. ve 21. gün'de filtre kâğıdı yüzeyinin <%50 alanını kaplamış olup antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kaplama yüzdesi hesaba katılarak her periyot ve her paralel için TS EN 15457 değerlendirme sayı sistemine göre sonuçlar kaydedilmiştir. 0, 1, 2, 3 ve 4 sayılarının ifade ettiği filtre kaplama oranları Tablo 3'de verilmiştir (Şekil 14-15-16).



Şekil 14. Referans antimikrobiyal olmayan boya 7. gün fungal gelişimi



Şekil 15. %5 (v/v), % 10 (v/v) ve % 20 (v/v) levan konsantrasyonlarının 7. gün periyodunda ki fungal büyüme görüntüleri



Şekil 16. %5, % 10 ve % 20 levan konsantrasyonu 7. gün fungal üreme görüntüleri

Tablo 3

EN 16492 standartına göre aşılardan 7, 14 ve 21 gün sonra fungal büyümenin filtre alanına göre derece tablosu

Derecelendirme	Üreme olan yüzde alanı değerlendirme
0	Numunenin yüzeyinde büyüme gerçekleşmemiştir.
1	Numune yüzeyinde %10'dan az büyüme olmuştur.
2	Numunenin yüzeyinde %10'dan fazla %30' dan az büyüme olmuştur.
3	Numune yüzeyinde %30'dan fazla %50'den az büyüme olmuştur.
4	Numune yüzeyinde %50'den fazla %100'e kadar büyüme olmuştur.

Tablo 4

Farklı levan konsantrasyonlarında fungal gelişim bulguları (7-14-21. gün)

Levan Konsantrasyonu (v/v)	Fungus Gelişim İzleme Periyotları		
	7. gün	14. gün	21. gün
<b>%3</b>			
A	4-4-4	4-4-4	4-4-4
B	4-4-4	4-4-4	4-4-4
C	4-4-4	4-4-4	4-4-4
D	4-4-4	4-4-4	4-4-4
<b>%5</b>	<b>7. gün</b>	<b>14. gün</b>	<b>21. gün</b>
A	3-3-3	4-4-4	4-4-4
B	4-4-4	4-4-4	4-4-4
C	4-4-4	4-4-4	4-4-4
D	4-4-4	4-4-4	4-4-4
<b>%10</b>	<b>7. gün</b>	<b>14. gün</b>	<b>21. gün</b>
A	0-0-0	4-4-4	4-4-4
B	4-4-4	4-4-4	4-4-4
C	4-4-4	4-4-4	4-4-4
D	4-4-4	4-4-4	4-4-4
<b>%20</b>	<b>7. gün</b>	<b>14. gün</b>	<b>21. gün</b>
A	0-0-0	1-1-1	3-3-2
B	4-4-4	4-4-4	4-4-4
C	4-4-4	4-4-4	4-4-4
D	4-4-4	4-4-4	4-4-4

A: Levan ile muamele edilmiş; B: Levan ile muamele edilmemiş filtre; C: Kaplamasız filtre kağıdında fungal büyüme; D: İnokulasyon besiyerindeki üreme

Antimikrobiyal boyaların temel amacı, mikrobiyolojik kolonizasyonu ve genellikle biyosit adı verilen aktif maddelerin eklenmesi nedeniyle daha fazla büyümeyi önlemek veya engellemektir (Bellotti vd., 2015). Sonuçlarımız doğrultusunda %5, %10 ve %20 konsantrasyonda levan içeren boyaların düşük veya yüksek fungus büyümesine etkisi olduğu görülmüştür.

Biyopolimer temelli film koruyucu formülasyonlarının kullanım potansiyeli bulunduğundan farklı bileşen kombinasyonlarının antifungal etkinliği test edilmiştir. Pullulan, kitosan, kollajen ve jelatin vb. gibi polisakkaritler ve proteinler, farklı özelliklerinden dolayı antifungal filmlerin üretimi için mükemmel malzemeler olarak kabul edilmiştir. Pullulan/kollajen/ZnO-NP bileşenine sahip filmler için maksimum 18 mm'lik inhibisyon bölgesi ile *A. niger*'e karşı antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Bailore, 2021). Biyosentez yöntemiyle elde edilen ürünlerin iç, dış veya ahşap boyalarına antifungal aktivite kazandırma potansiyelinin test edilmesi son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır (Putri vd., 2023).

#### 4.5. Tekstil Ürününün Antibakteriyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Levan ile muamele edilmiş kumaşlar ISO 20645:2004 protokolüne ve JIS L 1902:2008'den *Hale* yöntemine göre test edildiğinde her iki yöntem sonucunda %3, %5, %10, %20 konsantrasyonlarının hiçbiri *S. aureus* ATCC 6538 ve *K. pneumoniae* ATCC 4352 test bakterilerine karşı zon oluşturmamıştır.

ISO 20743 standart metoduna göre yapılan analiz sonucunda %20, %10, %5 ve %3 levan ile muamele edilmiş kumaşların *S. aureus* ATCC 6538 ve *K. pneumoniae* ATCC 4352 suşlarına bakterisidal aktivitesi kantitatif olarak tespit edilmiştir.

*S. aureus* inokulum süspansiyonu yoğunluğu ve *S. aureus*'un referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ( $t = 0$ . Saat) sonrası logaritmik indirgeme ( $C_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $C_t$ ) miktarı ve F (referans kumaşta mikroorganizma üreme oranı) değeri Tablo 5'de verilmiştir. *S. aureus* inokulum süspansiyon miktarı  $1.0 \times 10^5$  ile  $3 \times 10^5$  kob/mL aralığında olup, üç paraleller arası logaritmik fark  $<1$  ve referans kumaş F değeri  $>1$  olarak tespit edilerek ISO 20743 kriterlerini sağlamıştır.

Uygulama görmüş test örneğindeki temas anı ve temas süresi arasındaki logaritmik farka levan ile muamele edilmemiş kumaşlarda temas süresi içerisinde *S. aureus*'un logaritmik artışı hesaba katılarak logaritmik indirgeme hesaplanmıştır. %20 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik

değerler Tablo 6’da verilmiştir. %10 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 7’de verilmiştir. %5 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 8’de verilmiştir. %3 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 9’da verilmiştir. %20, %10, %5 ve %3 levan içeren kumaşlar *S. aureus*’u 24 saat temas süresinde sırasıyla 2.10 log, 1.40 log, 0.97 log ve 0.56 log indirgemıştır.

*K. pneumoniae* inokulum süspansiyonu yoğunluğu ve *K. pneumoniae*’nin referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ( $t = 0$ . Saat) sonrası logaritmik indirgeme ( $C_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $C_t$ ) miktarı ve F (referans kumaşta mikroorganizma üreme oranı) değeri Tablo 10’da verilmiştir. *K. pneumoniae* inokulum süspansiyon miktarı  $1.0 \times 10^5$  ile  $3 \times 10^5$  kob/mL aralığında olup, üç paraleller arası logaritmik fark  $<1$  ve referans kumaş F değeri  $>1$  olarak tespit edilerek ISO 20743 kriterlerini sağlamıştır.

Uygulama görmüş test örneğindeki temas anı ve temas süresi arasındaki logaritmik farka levan ile muamele edilmemiş kumaşlarda temas süresi içerisinde *K. pneumoniae*’nin logaritmik artışı hesaba katılarak logaritmik indirgeme hesaplanmıştır. %20 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 11’de verilmiştir. %10 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 12’de verilmiştir. %5 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 13’de verilmiştir. %3 (v/v) levan içeren üç paralelli olarak test edilen kumaşların temas anı ve temas sonrası logaritmik değerler Tablo 14’de verilmiştir. %20, %10, %5 ve %3 levan içeren kumaşlar *K. pneumoniae*’ye sırasıyla 0,60 log, 0,35 log, 0,22 log ve 0,18 log indirgemıştır.

Tablo 5

*S. aureus* inokulüm süspansiyonu yoğunluğu ve *S. aureus*'un referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ve temas süresi sonrası değerleri

Mikroorganizma suşu		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
İnokulüm (kob/mL)		2,5x10 <sup>5</sup>	
<b>U<sub>0</sub> (Levan ile muamele edilmemiş kumaş)</b>			
Paraleller	kob/referans	log (kob/referans)	C <sub>0</sub>
1.paralel	2.8x10 <sup>5</sup>	5.45	
2.paralel	2.8x10 <sup>5</sup>	5.45	5.45
3.paralel	2.9x10 <sup>5</sup>	5.47	
<b>U<sub>t</sub> (Levan ile muamele edilmemiş kumaş)</b>			
Paraleller	kob/referans	log (kob/referans)	C <sub>t</sub>
1.paralel	3.2x10 <sup>5</sup>	6.51	
2.paralel	3.2x10 <sup>5</sup>	6.51	6.51
3.paralel	3.4x10 <sup>5</sup>	6.53	
F		1.06	

Tablo 6

%20 (v/v) levan ile muamele edilmiş kumaşın *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivitesi (A<sub>20</sub>), temas anı (t = 0. Saat) ortalama logaritmik indirgeme (T<sub>0</sub>) ve temas süresi sonrası (t = 24.saat) ortalama logaritmik indirgeme (T<sub>t</sub>) miktarı ve G değeri

<b>A<sub>0</sub> (%20 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	T <sub>0</sub>
1.paralel	2.2x10 <sup>6</sup>	6.34	
2.paralel	2.4x10 <sup>6</sup>	6.38	6.36
3.paralel	2.3x10 <sup>6</sup>	6.35	
<b>A<sub>t</sub> (%20 (v/v) Levan ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	T <sub>t</sub>
1.paralel	2.1x10 <sup>5</sup>	5.32	
2.paralel	2.0x10 <sup>5</sup>	5.3	5.32
3.paralel	2.1x10 <sup>5</sup>	5.32	
G		-1.04	
		Logaritmik İndirgeme	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (A<sub>20</sub>)</b>		2.1	



Tablo 7

%10 (v/v) levam ile muamele edilmiş kumaşın *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%10 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	6.33
2.paralel	$2.2 \times 10^6$	6.34	
3.paralel	$1.9 \times 10^6$	6.28	
<b><math>A_t</math> (%10 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$1.0 \times 10^6$	6	6.0
2.paralel	$9.0 \times 10^5$	5.95	
3.paralel	$1.1 \times 10^6$	6.04	
G	-0.33		
		Logaritmik İndirgeme	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_{10}</math>)</b>		1.4	

Tablo 8

%5 (v/v) levam ile muamele edilmiş kumaşın *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_5$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%5 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.0 \times 10^6$	6.3	6.33
2.paralel	$2.1 \times 10^6$	6.32	
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%5 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$2.7 \times 10^6$	6.43	6.42
2.paralel	$2.8 \times 10^6$	6.45	
3.paralel	$2.4 \times 10^6$	6.38	
G		0.09	
		Logaritmik indirgeme	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_5</math>)</b>		0.97	

Tablo 9

%3 (v/v) levam ile muamele edilmiş kumaşın *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_3$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%3 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	6.34
2.paralel	$2.1 \times 10^6$	6.32	
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%3 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$6.8 \times 10^6$	6.83	6.85
2.paralel	$7.3 \times 10^6$	6.86	
3.paralel	$7.0 \times 10^6$	6.85	
G		0.5	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_3</math>)</b>		Logaritmik İndirgeme 0.56	

Tablo 10

*K. pneumoniae* inokulüm süspansiyonu yoğunluğu ve *K. pneumoniae*'nin referans (antimikrobiyal olmayan) kumaş temas anı ve temas süresi sonrası değerleri

<b>Mikroorganizma suşu</b>	<b><i>K. pneumoniae</i> ATCC 6538</b>		
<b>İnokulüm (kob/ml)</b>	<b><math>2,8 \times 10^5</math></b>		
<b><math>U_0</math> (Levam ile muamele edilmemiş kumaş)</b>			
Paraleller	kob/referans	log (kob/referans)	$C_0$
1.paralel	$2.0 \times 10^5$	5.3	5.33
2.paralel	$2.2 \times 10^5$	5.34	
3.paralel	$2.0 \times 10^5$	5.34	
<b><math>U_t</math> (Levam ile muamele edilmemiş kumaş)</b>			
Paralelller	kob/referans	log (kob/referans)	$C_t$
1.paralel	$3.0 \times 10^6$	6.48	6.48
2.paralel	$2.9 \times 10^6$	6.46	
3.paralel	$3.1 \times 10^6$	6.49	
F		1,15	

Tablo 11

%20 (v/v) levani ile muamele edilmiş kumaşın *K. pneumoniae*'e karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{20}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%20 (v/v) Levani ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.0 \times 10^6$	6.3	6.33
2.paralel	$2.2 \times 10^6$	6.34	
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%20 (v/v) Levani ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$8.0 \times 10^6$	6.9	6.89
2.paralel	$7.4 \times 10^6$	6.87	
3.paralel	$7.8 \times 10^6$	6.89	
G		0,55	
			Logaritmik İndirgeme
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_{20}</math>)</b>			0.6

Tablo 12

%10 (v/v) levani ile muamele edilmiş kumaşın *K. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%10 (v/v) Levani ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.1 \times 10^6$	6.32	6.33
2.paralel	$2.1 \times 10^6$	6.32	
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%10 (v/v) Levani ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$1.2 \times 10^7$	7.08	7.13
2.paralel	$1.3 \times 10^7$	7.11	
3.paralel	$1.6 \times 10^7$	7.2	
G		0.80	
			Logaritmik İndirgeme
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_{10}</math>)</b>			0.35

Tablo 13

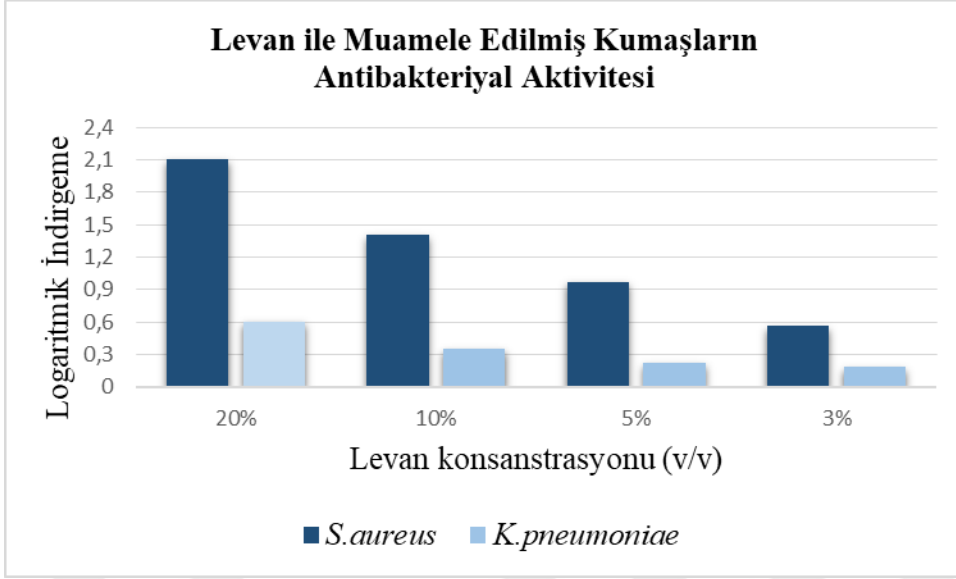
%5 (v/v) levam ile muamele edilmiş kumaşın *K. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_5$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%5 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.2 \times 10^6$	6.34	
2.paralel	$2.4 \times 10^6$	6.38	6.36
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%5 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$1.8 \times 10^7$	7.26	
2.paralel	$1.9 \times 10^7$	7.28	7.29
3.paralel	$2.2 \times 10^7$	7.34	
G		0,93	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_5</math>)</b>		Logaritmik indirgeme 0.22	

Tablo 14

%3 (v/v) levam ile muamele edilmiş kumaşın *K. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ( $A_{10}$ ), temas anı ( $t = 0$ . Saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_0$ ) ve temas süresi sonrası ( $t = 24$ .saat) ortalama logaritmik indirgeme ( $T_t$ ) miktarı ve G değeri

<b><math>A_0</math> (%3 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/muamele edilmiş kumaş	log (kob/muamele edilmiş kumaş)	$T_0$
1.paralel	$2.2 \times 10^6$	6.34	
2.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	6.35
3.paralel	$2.3 \times 10^6$	6.36	
<b><math>A_t</math> (%3 (v/v) Levam ile muamele edilmiş kumaş)</b>			
	kob/referans	log (kob/referans)	$T_t$
1.paralel	$2.0 \times 10^7$	7.30	
2.paralel	$2.1 \times 10^7$	7.32	7.32
3.paralel	$2.2 \times 10^7$	7.34	
G		0.97	
<b>Antibakteriyal Aktivite Değeri (<math>A_3</math>)</b>		Logaritmik İndirgeme 0.18	



Şekil 17. *S. aureus* ve *K. pneumoniae* Levan ile muamele edilmiş kumaşlara maruz bırakılması sonrası logaritmik indirgeme değerleri

Antimikrobiyal tekstil sektöründe antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli olduğu bilinen tek biyopolimer kitosandır. Tekstil alanında kitosan, bakteriyal ve fungal organizmalara karşı yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip geniş spektrumlu bir biyosit olduğu bilinmektedir (Lim vd., 2003).

EN 20743 kapsamında yapılan analizlerde %20 (v/v) konsantrasyonda levan uygulanan kumaş ürünleri *S. aureus*'a karşı 2,10 log indirgemeye neden olmuştur. Antimikrobiyal uygulama görmüş test örneğindeki temas anı ve temas süresi arasındaki logaritmik fark  $>2$  log olması tekstil materyalinin antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir (TS EN 20743, 2021).

Tekstil ürünlerinin antimikrobiyal etkinliğinin testi için kullanılan agar difüzyon yöntemi temelli metotlar bazı antimikrobiyal ajanlar için kullanılamazlar. Antimikrobiyal ajanın tekstile kovalent olarak bağlanması durumunda, bunun agara difüzyonunu önleyen bir inhibisyon bölgesi beklenmemelidir. Ajan agara yayılırsa, inhibisyon bölgesi belirgin hale gelir ve boyutu, antimikrobiyal aktivite potansiyeli veya aktif ajanın salınım hızı hakkında bazı göstergeler sağlar (Pinho vd., 2011; Risti vd., 2011). Bu nedenle çalışmamızda da referans aldığımız ISO 20645 levan etkinliğini belirlemede başarılı sonuç vermemiştir.

Birçok kimyasal antimikrobiyal kumaş bitim işleminde antibakteriyal ajan olarak kullanılmaktadır. Poly(4-vinylpyridine) (PVP), vinilbenziltrimetilamonyum klorür (VBT), tryalkil amonyum klorürler, triklosan, nitrat polieugenol-divinylbenzen (PEDVB-NO<sub>2</sub>), özellikle gümüş, titanyum, çinko, demir ve bakır gibi nano boyutlu metaller ve metal oksitlerin *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'ye karşı etkili olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir (Zhang vd., 2014; Karthik vd., 2017, Prasetya vd., 2023).

Ayakkabı kumaşında TiO<sub>2</sub>'nin Gram pozitif *S. epidermidis* ATCC 14990'e karşı antibakteriyal etkinliği ISO 20743 metodu ile test edilmiş olup; 1.4 g/m<sup>3</sup> konsantrasyonda G değerinin F değerinden büyük olması sebebiyle logaritmik indirgeme negatif olup bakterisidal etkinlik göstermemektedir. 3,7 g/m<sup>3</sup>, 4,1 g/m<sup>3</sup>, 4,6 g/m<sup>3</sup>, 5 g/m<sup>3</sup>, 7 g/m<sup>3</sup> konsantrasyonlarında ise antimikrobiyal aktivite göstermediği, en yüksek logaritmik indirgemenin 3,7 g/m<sup>3</sup> konsantrasyonda 0,59 log olduğu belirlenmiştir. Kumaş sektöründe yaygın kullanım alanı bulan TiO<sub>2</sub> kıyasla levan biyopolimeri gram pozitif olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 6538'e karşı çalışılan tüm konsantrasyonları  $\geq 0,56$  logaritmik indirgeme göstermiştir (Rodriguez vd., 2014).

Son yıllarda antimikrobiyal aktivitesi sebebiyle tekstil materyallerine sıklıkla uygulanan Polyhexamethylene bisguanidin (PHMBG)'in *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı antibakteriyal aktivitesi ISO 20743 kantitatif metodu ile yün, pamuk ve poliakrilonitril kumaş tipleri test edilmiştir. %2 PHMBG her üç kumaş tipinde de  $>3$  log indirgeme göstermiştir (Karanikas vd., 2016). Levan biyopolimeri ise *Klebsiella pneumoniae* karşı düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Polisakkarit sınıfında olmaları ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri açısından levan ile benzerlik gösteren kitosanın tekstillerde uygulanması literatürdeki bazı incelemelerde analiz edilmiştir (Jianhui vd., 2021).

Farklı konsantrasyonlarda kitosan biyopolimeri ile kaplanmış dokuma olmayan selülozik kumaşın *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı antibakteriyal aktivitesi EN 20743 standartı kullanılarak test edilmiştir. %0,5 kitosanın *S. aureus*'a karşı antibakteriyal etkinliği olmadığı, %2 kitosanın zayıf antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu %25 ve %40 kitosan ile kaplanmış kumaş örneklerinin ise *S. aureus*'a karşı bakteriyostatik etkisi olduğu

gösterilmiştir. Farklı biyolojik kaynaklardan izole edilen kitosanların ve nano-Ag ile kaplanmış pamuklu kumaşın *E. coli* ATCC 8739'a karşı antibakteriyel aktivitesi JIS L 1902-2015 Kantitatif standart test yöntemi ile araştırılmıştır. Kerevit ve karides kitosanıyla kaplanan kumaş örneklerinin antibakteriyel aktivite değeri (A), bakteri üreme oranları dikkate alınarak sırasıyla 3,10 ve 5,74 olarak hesaplanmıştır. JIS L 1902-2015'e göre  $A > 3$  olduğundan *E. coli* ATCC 8739'e karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği kabul edilmiştir. Bu durumda kerevit ve karides kitosanı ile kaplanan kumaşlara karşı yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. Karides ve kerevit kitosanıyla nano-Ag kaplanan pamuklu kumaş örneklerinin antibakteriyel aktivite değerleri sırasıyla 5,10 ve 5,37 olarak hesaplanmış olup Kitosan ve nano-Ag kompozit kaplamaların pamuklu kumaşlara güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Erdoğan, 2020).

%7 kitosan ve %7 kitosan ile ursolik asit emdirilmiş tekstil numunelerinin antibakteriyel aktivitesi çalışmada kullanılan ISO 20743 metoduna göre test edilmiş ve *S. aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. %7 kitosan *S. aureus* ATCC 6538'e karşı  $< 2$  logaritmik indirgeme gösterdiğinden antibakteriyel olmadığı tespit edilmiştir. %7 kitosan ile ursolik asit emdirilmiş numunelerin ise *S. aureus* ATCC 6538'e karşı  $> 2$  log indirgediğinden antibakteriyel olarak değerlendirilmiştir. %7 kitosan ve %7 kitosan ile ursolik asit ile muamele edilen her iki numunede gram negatif organizma olarak seçilen *E. coli* ATCC 11229'a karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Hernandez vd., 2023). Kitosan ursolik asit ile desteklendiğinde yalnız gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterirken; yalnız levan biyopolimeri ile muamele edilen tekstil materyalleri gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmanın sonucunda amaçlandığı üzere ağır metal direncine sahip olduğu bilinen bakteri izolatları tür düzeyinde tanımlanmış ve %5 sukroz ilaveli NB besi ortamında başlangıç pH 7,2 ayarlanarak 48 saatlik dinamik inkübasyon koşullarında levan üretim miktarı belirlenmiştir. En yüksek levan üretimi *B. nesterenkovii* NY-3 tarafından gerçekleştirilmiştir.

#### 5.1. Levan Üretim Optimizasyonu

Levan üretim optimizasyonu tek karbon kaynağı olarak sükroz seçilmiş olup üretim prosesi tek konsantrasyon için, belirlenen tek başlangıç pH değeri, tek inkübasyon koşulu ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek levan üretimi amacıyla bu çalışma kapsamın levan ürettiği tespit edilen mikroorganizmaların yüksek verimde üretim gerçekleştirdiği çeşitli inkübasyon koşulları, üreme ortamı kaynakları belirlenmiştir. Levan üretimi optimum koşulları pH 7, 37 °C inkübasyon koşullarında, azot kaynağı olarak maya özütü, %15 konsantrasyonda sükroz ve mannitol varlığında gerçekleştirildiği tespit edilmiştir.

Levan ürettiği tespit edilen izolatların maksimum verimde levan ürettiği optimum kültürel koşulların ve levan üretimini indükleyici anahtar uyarıcıların tanımlanması, levanın düşük maliyetli endüstriyel üretimine zemin hazırlayacağı düşünülmektedir. Ek olarak üretilen levan biyopolimerinin moleküler ağırlık ve dallanma özellikleri gibi moleküler karakterizasyonu yapılmasıyla birlikte eş zamanlı biyolojik aktiviteleri ortaya konmalıdır. Levan üretim prosesini oluşturan saflaştırma ve fraksiyonlama yöntemlerini geliştirmek ve optimize etmek için uygun analitik yöntemler gereklidir. Bu yöntemler, belirli özelliklere sahip bir polimer elde etmek için katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Ticari levan'ın sınırlı miktarı ve yüksek maliyeti, daha geniş bir uygulamaya engel olmakta ve mikrobiyal üretimde sürekli alternatif arayışını gerektirmektedir. Ayrıca endüstriyel levan üretiminde önemli bir husus, üretim süreciyle ilişkili çevresel etkidir. Çözücülerin kullanımı ve bunların daha sonra geri kazanılması, enerji talebini beraberinde getirir. Levan üretim optimizasyonunun bir parçası olan levanın geri kazanımı için klasik



etanol çökeltme yöntemi kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız bu yöntem levana üretim maliyetini yükseltmektedir. Levana geri kazanımı için çevre dostu solventlerin optimize edilmesi üzerine yoğunlaşılmalıdır. Derin Ötektik Çözücüler (DES) daha çevre dostu olmaları ve mikrobiyal polisakkaritlerin çökmesini daha düşük maliyetli gerçekleştirebileceği düşünülmektedir (Seibel vd., 2017).

## 5.2. Levana Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitesi

*B. nesterenkovii* NY-3 tarafından üretilen biyopolimerin antibakteriyel film olarak kullanılma potansiyelleri ve antibakteriyel tekstil ürünlerinde antibakteriyel ajan olarak kullanılma potansiyelleri ECHA-Biyosidal Ürünler Yönetmeliğine İlişkin Rehber doğrultusunda seçilen uygun metodlarla belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda levana içeren boya örneklerinin üzerindeki mantar gelişimi “4” ten düşük olarak derecelendirilmesi, antifungal etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. %20 (v/v) levana içeren boya örnekleri 7., 14. ve 21. gün boyunca antifungal etkinlik göstermiştir. %10 (v/v) levana içeren boya ise 7 gün boyunca yüksek antifungal etkinlik göstermesine karşı 14. ve 21. gün’de antifungal aktiviteye sahip değildir. %5 (v/v) levana içeren boya ise 7. günde düşükte olsa antifungal aktiviteye sahip olmasına rağmen 14. ve 21. gün antifungal aktivite göstermemiştir. %3 (v/v) levana içeren boya örnekleri hiçbir periyotta antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar kapsamında %20 konsantrasyonunda levana biyopolimeri boyalarda kutu içi koruyucular ve film koruyucu olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

Levana güncel olarak boyalarda kullanılan ve fungal oluşumunu önlemeye yönelik çinko oksit, aryum metaborat, titanyum oksit, gümüş iyonu’na göre biyoyumlu, biyobozunur olması sebebiyle avantajlıdır.

Tez çalışması kapsamında ilk uygulanan ISO 20645 ve Hale yöntemi levana ajanının kumaş ürününde antimikrobiyal aktivite tespiti için uygun olmadığı gözlenmiştir. Test sonuçlarında zon oluşmamış olup levana su aktivitesi sebebiyle agara difüze olmadığı düşünülmektedir.

Kantitatif analiz metodu olarak seçilen ISO 20743 standart çalışmasına göre %20 (v/v) levana *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çalışmada test edilen diğer konsantrasyonların *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma %20 (v/v) levana konsantrasyonunun tekstil sektöründe antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal tekstil uygulamaları yaraların mikrobiyal kontaminasyonunu önlemek için antimikrobiyal yara sargısı, bandajlar gibi tıbbi cihaz sınıfında ki ürünlerde kullanımı araştırılmaktadır. Bu bağlamda, iyileşme sürecine yardımcı olma potansiyeline sahip antimikrobiyal kumaş uygulamaları için levana, ISO 10993 standart serisinde gerekli analizler gerçekleştirilerek değerlendirilmelidir. Ek olarak levananın antibakteriyel aktivitesi, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından önerilen farklı yöntemler kullanılarak test edilmelidir.

Antimikrobiyal işlevselliğe sahip tekstil ürünlerinin, antimikrobiyal ajanlar ile işlenmeleri etkinliklerinde ve kararlılıklarında kilit faktördür. Mevcut bitim işlemi dolgu, püskürtme, aşılama, çapraz bağlama, ekstrüzyon tekniklerinin biyopolimer ajanlar ile kullanım durumu tanımlanmalıdır.

Levanın kumaşa uygulama teknikleri geliştirilerek ASTM-E 2149 standardı kapsamında dinamik koşullarda antimikrobiyal aktivite varlığı tanımlanmalıdır. İlgili proses ile belirli periyotlarda yıkama işlemleri gerçekleştirilerek antimikrobiyal etkinliğin süresi ortaya konmalıdır. Yıkamaya karşı dayanıklılık, genel kullanım alanı bulmuş tekstil ürünler ve medikal tekstiller için önemli bir özelliktir. Ek olarak antimikrobiyal özellik kazandırılmış kumaşlarda mukavemet ve kalite kaybı, renk değişimi ve leke oluşumu, hedef tekstil ürününde kullanılan antimikrobiyal ajanın uygunluğu için ortaya konulmalıdır.

## KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A. ve Esawy, M. A. (2005). "Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides". *Current Microbiology*, 51, 402-407.
- Abou-Taleb, K. A., Abdel-Monem, M. O., Yassin, M. H. ve Draz, A. A. (2014). "Nutritional factors affecting levan production by *Bacillus* sp. V8 strain isolated from rhizosphere bean (*Vicia faba*) plant". *Journal of Agricultural Technology*, 10 (4), 899-914.
- Akarşlan, F. ve Altınay, Ö. (2017). "Doğal Antimikrobiyal Maddeler İle İşlem Görmüş Kumaşların Fiziksel ve Antimikrobiyal Özelliklerin İncelenmesi". *Anka E-Dergi*, 2 (2), 35-47. <https://dergipark.org.tr/en/pub/anka/issue/33406/358084>.
- Al-Qaysi, S. A. S., Al-Haideri, H., Al-Shimmary, S. M., Abdulhameed, J. M., Alajrawy, O. I., Al-Halbosiy, M. M., Moussa, T. A. A. ve Farahat, M. G. (2021). "Bioactive Levan-Type Exopolysaccharide Produced by *Pantoea agglomerans* ZMR7: Characterization and Optimization for Enhanced Production". *Journal of Microbiological Biotechnology*, 31 (5), 696-704. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01025>.
- Altıntaş, Ö.E., Toksoy Öner, E., Çabuk, A. ve Aytar Çelik, P. (2023). "Biosynthesis of levan by *Halomonas elongata* 153B: Optimization for enhanced production and potential biological activities for pharmaceutical field". *Journal of Polymers and the Environment*, 31 (4), 1440-1455. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02681-1>.
- Ananthalakshmy, V.K. ve Gunasekaran, P., (1999). "Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 291–298.
- Bailore, N. N., Balladka, S. K., Doddapaneni, S. J. D. S., ve Mudiyanu, M. S. (2021). "Fabrication of Environmentally Compatible Biopolymer Films of Pullulan/Piscean Collagen/ZnO Nanocomposite and Their Antifungal Activity".

*Journal of Polymers and the Environment*, 29(4), 1192–1201. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01953-y>.

Barone, J. R. ve Medynets, M. (2007). “Thermally processed levan polymers”. *Carbohydrate Polymers*, 69 (3), 554-561.

Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H. ve Mejdoub, H. (2012). “Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50 (2), 451-458.

Bellotti, N., Romagnoli, R., Quintero, C., Domínguez-Wong, C., Ruiz, F., ve Deyá, C. (2015). *Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints. Progress in Organic Coatings*, 86, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.03.00>.

Bhatia, S. K. (2023). Microbial biopolymers: Trends in synthesis, modification, and applications. *Polymers*, 15 (6), 1364. <https://doi.org/10.3390/polym15061364>.

Bouallegue, A., Casillo, A., Chaari, F., La Gatta, A., Lanzetta, R., Corsaro, M. M. ve Ellouz-Chaabouni, S. (2020). “Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis and antioxidant activities”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 316-324.

Bozacı, E. (2013). Antimikrobiyal Tekstil Yüzeylerinin Oluşturulabilirliğinin Araştırılması. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Brock T, Groteklaes M, Mischke P (2000). *European Coatings Handbook*, 2nd ed. Hannover: Vincentz Network.

Byun, B. Y., Lee, S. J. ve Mah, J. H. (2014). “Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a multifunctional polysaccharide”. *International*

*Journal of Food Science & Technology*, 49 (1), 238-245.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12304>.

Chidambaram, J. C. A., Veerapandian, B., Sarwareddy, K.K, Mani, K.P, Shanmugam, S.R. ve Venkatachalam, P. (2019). *Studies on solvent precipitation of levan synthesized using Bacillus subtilis MTCC 441*. *Heliyon*, 5(9), e02414–. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02414>.

Cho, C., Moran, E., Cherry, Stephans, J., Fodor, S., Adams, C., ... Schultz, P. (1993). “An unnatural biopolymer”. *Science*, 261 (5126), 1303–1305.  
<https://doi.org/10.1126/science.7689747>.

Cruz, D., Vasconcelos, V., Pierre, G., Michaud, P. ve Delattre, C. (2020). “Exopolysaccharides from cyanobacteria: Strategies for bioprocess development”. *Applied Sciences*, 10 (11), 3763. <https://doi.org/10.3390/app10113763>.

Dahech, I., Harrabi, B., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., Belghith, H. ve Belghith, K. S. (2013). “Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.058>.

Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C. ve Hammes, W. P. (2001). “In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis”. *Systematic and Applied Microbiology*, 24 (2), 232-237. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00033>.

Díaz-Cornejo, S., Otero, C. M., Banerjee, A. ve Gordillo-Fuenzalida, F. (2023). “Biological properties of exopolysaccharides produced by *Bacillus* spp.”. *Microbiological Research*, 268, 127276.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127276>.

- Divya, J. M. ve Sugumaran, K. R. (2015). "Fermentation parameters and condition affecting levan production and its applications". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (2), 861-865.
- Domzał-Kedzia, M., Ostrowska, M., Lewińska, A., Łukaszewicz, M. (2023). "Recent Developments and Applications of Microbial Levan, A Versatile Polysaccharide-Based Biopolymer". *Molecules*, 28, 5407. <https://doi.org/10.3390/molecules28145407>
- ECHA (2023). Guidance on the Biocidal Products Regulation (2. Cilt). European Chemicals Agency.
- Elsakhawy, T.A., Sherief, F. A. ve Abd-EL-Kodoos, R. Y. (2017). "Marine microbial polysaccharides environmental role and applications: an overview Environ". *Biodiver. Soil Sec.*, 1, 61-70.
- EN 15457 (TS EN 15457). Boyalar ve Vernikler- Bir Kaplamada Mantarlara Karşı Film Koruyucuların Etkinliğinin Denenmesi İçin Laboratuvar Yöntemi.
- Erdoğan, S. (2020). "Textile Finishing with Chitosan and Silver Nanoparticles against *Escherichia coli* ATCC 8739". *Trakya University Journal of Nature Sciences*, 21 (1), 21-32, <https://doi.org/10.23902/trkjnat.641367>.
- Ernandes, F. M.P.G., Garcia-Cruz, C.H. (2011). "Nutritional Requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for Levan Production", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 589–600.
- Etemadi, O., Petrisor, I. G., Kim, D., Wan, M. W. ve Yen, T. F. (2003). "Stabilization of metals in subsurface by biopolymers: Laboratory drainage flow studies", *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 12 (5), 647-661.

- Gao, Y. ve Cranston, R. (2008). "Recent advances in antimicrobial treatments of textiles". *Textile Research Journal*, 78 (1), 60-72.
- Genç, B., Taşkın, M. ve Adıgüzel, A. (2021). "Exopolysaccharide of *Anoxybacillus pushchinoensis* G11 has antitumor and antibiofilm activities". *Archives of Microbiology*, 203, 2101-2118. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02185-x>.
- George, A., Sanjay, M. R., Srisuk, R., Parameswaranpillai, J. ve Siengchin, S. (2020). "A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites". *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>.
- Gökmen, G. G., Silbir, S., Goksungur, Y. ve Kisla, D. (2020). "The effect of microbial levan on the growth of microorganisms: Inhibitory or stimulatory?". *Fresenius Environmental Bulletin*, 29, 1648-54.
- González-Garcinuño, Á., Taberero, A., Sánchez-Álvarez, J.M. (2017). "Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight". *Microb Cell Fact* 16, 91. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0703-z>
- González-Garcinuño, Á., Masa, R., Hernández, M., Domínguez, Á., Taberero, A. ve Del Valle, E. M. (2019). "Levan-capped silver nanoparticles for bactericidal formulations: Release and activity modelling". *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (6), 1502. <https://doi.org/10.3390/ijms20061502>.
- Gupta, S. K., Das, P., Singh, S. K., Akhtar, M. S., Meena, D. K. ve Mandal, S. C. (2011). "Microbial levari, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture". *World Aquaculture*, 42 (1), 61. <https://doi.org/10.1142/9789814360807-0004>.
- Gupta, S. K., Pal, A. K., Sahu, N. P., Saharan, N., Mandal, S. C., Prakash, C., Akhtar, M. S. ve Prusty, A. K. (2014). "Dietary microbial levan ameliorates stress and augments immunity in *Cyprinus carpio* fry (L innaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil". *Aquaculture Research*, 45 (5), 893-906.

- Gupta, P. ve Nayak, K. K. (2015). "Characteristics of protein-based biopolymer and its application". *Polymer Engineering & Science*, 55 (3), 485-498. <https://doi.org/10.1002/pen.23928>
- Hamamcı, B., Çiftçi, M. ve Aktaş, T. (2018). "Yeşil kompozitlerde biyopolimerlerin kullanımının önemi". *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (1), 12-24.
- Harmsen, P., Slottje, C., Baggerman, M., & Sillekens, E. (2021). *Biological degradation of textiles: And the relevance to textile recycling*. Wageningen Food & Biobased Research. <https://doi.org/10.18174/557073>.
- Hernandez, C., Draczyński, Z., Borkowski, D., Kaźmierczak, D. (2023). "Enhanced Antibacterial Properties of Chitosan Fibres". *Preprints*, 2023051651. <https://doi.org/10.20944/preprints202305.1651.v1>.
- Hernández, N., Williams, R. C. ve Cochran, E. W. (2014). "The battle for the "green" polymer. Different approaches for biopolymer synthesis: Bioadvantaged vs. bioreplacement". *Org. Biomol. Chem.*, 12 (18), 2834–2849. <https://doi.org/10.1039/c3ob42339e>.
- Hettwer, U., Gross, M. ve Rudolph, K. (1995). "Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola". *Journal of Bacteriology*, 177 (10), 2834-2839.
- IARC, 2006. Inorganic and organic lead compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 87:1–471.
- Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M. ve Karboune, S. (2013). "Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides". *Biotechnology Progress*, 29 (6), 1405-1415.



ISO 20645:2004. Textile Fabrics- Determination of antimicrobial activity- Agar diffusion plate test from International Organization for Standardization.

Iyer, A., Mody, K. ve Jha, B. (2005). “Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*”. *Marine Pollution Bulletin*, 49 (11), 974–977.

Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V. ve Annapure, U. S. (2012). “Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production”. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1045-1053.

JIS L 1902:2008. Testing for antimicrobial activity and efficacy on textile products. JAFET/JSA from Japanese Industrial Standards.

Jianhui, L., Tian, X., Hua, T., Fu, J., Koo, M., Chan, W. Ve Poon, T. (2021). “Chitosan Natural Polymer Material for Improving Antibacterial Properties of Textiles”. *ACS Applied Bio Materials*, <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00078>.

Jing D., Zengyi S. ve Huimin Z. (2011). Engineering microbial factories for synthesis of value-added products, 38(8), 873–890. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0970-3>.

Jones, S. E., Paynich, M. L., Kearns, D. B. ve Knight, K. L. (2014). “Protection from intestinal inflammation by bacterial exopolysaccharides”. *The Journal of Immunology*, 192 (10), 4813-4820.

Kang, S. A., Jang, K. H., Lee, J. C., Chang, B. I., Lim, Y. A. ve Song, B. C. (2003). “The effects of fructose polymer levan on the body fat accumulation and serum lipid profiles of Korean women”. *Korean Journal of Community Nutrition*, 8 (6), 986-992.

Kang, S.A., Jang, K.H., Seo, J.W ve Kim, K.H. (2009). Levan: Applications and Perspectives, *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*, 145–161.

- Kaplan, D. L., Mayer, J. M., Ball, D., McCassie, J., Allen, A. L. ve Stenhouse, P. (1993). "Fundamentals of Biodegradable Polymers". C. Ching, D. Kaplan ve E. Thomas (ed.). İçinde *Biodegradable Polymers and Packaging*. (s.1-42.). Technomic Publishing: Lancaster, PA.
- Karak, N. (2016). *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials Biopolymers for paints and surface coatings*, 333–368. doi:10.1016/b978-0-08-100214-8.00015-4
- Karanikas, E., Nikolaidis, N. ve Tsatsaroni, E. (2016). "Polyhexamethylene bisguanidine: a new antimicrobial agent for textile applications"., *International Journal of Current Research*, 8 (11), 41705-41710.
- Karthik, S., Siva, P. ve Balu, K. S. (2017). "Acalypha indica-mediated green synthesis of ZnO nanostructures under differential thermal treatment: effect on textile coating, hydrophobicity, UV resistance, and antibacterial activity". *Advane Powder Technology*, 28 (12), 3184–3194.
- Karthikeyan, O. P., Chidambarampadmavathy, K., Cirés S. ve Heimann, K. (2015). "Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45 (15), 1579-1610. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.966422>.
- Kasapis, S., Morris, E. R., Gross, M. ve Rudolph, K. (1994). "Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis". 23 (1), 55–64. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90090-6).
- Kekez, B. D., Gojgic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., Beskoski, V. P. ve Vrvic, M. M. (2015). "High Levan Production by *Bacillus licheniformis* NS032 Using Ammonium Chloride as the Sole Nitrogen

Source” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3068–3083. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1475-8>.

Khandekar, S., Srivastava, A., Pletzer, D., Stahl, A. ve Ullrich, M. S. (2014). “The conserved upstream region of lscB/C determines expression of different levansucrase genes in plant pathogen *Pseudomonas syringae*”. *BMC Microbiology*, 14 (1), 1-11.

Kim, Y., Lee, N. ve Sakai, T. (1999). “Evaluation of exposure to ethylene glycol monoethyl ether acetates and their possible haematological effects on shipyard painters”. *Occupational Environmental Medicine*, 56, 378–382.

Kim, Y. ve Kim, S. H. (2009). “Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379 (2), 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.053>.

Kittler, S., Greulich, C., Köller, M. ve Epple, M. (2009). “Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells”. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 40 (4), 258-264.

Koo, H. N., Hong, S. H., Seo, H. G., Yoo, T. S., Lee, K. N., Kim, N. S., Kim C. H. ve Kim, H. M. (2003). “Inulin stimulates NO synthesis via activation of PKC- $\alpha$  and protein tyrosine kinase, resulting in the activation of NF- $\kappa$ B by IFN- $\gamma$ -primed RAW 264.7 cells”. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14 (10), 598-605.

Koşarsor Ağçeli, G. (2017). Mikrobiyal Biyopolimer Üretimi ve Antimikrobiyal Yüzey Olarak Kullanımının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), Ankara.

Koşarsoy Ağçeli, G. (2022a). “A new approach to nanocomposite carbohydrate polymer films: Levan and chia seed mucilage”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.157>

- Koşarsoy Ağçeli, G. (2022b). “Devekuşu yumurta kabuğu ve nano-levan bazlı yenilebilir biyopolimer kompozit filmlerin geliştirilmesi: Karakterizasyon ve biyoaktivite”. *Polim. Boğa*. 79 (12) 11201–11215. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-04069-y>.
- Koşarsoy Ağçeli, G. ve Günan Yücel, H. (2023). “Levan production by *Paenibacillus polymyxa* immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ SiO<sub>2</sub> nanoparticles using molasses medium with emphasis on the bioactivity”. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02960-5>.
- Koşarsoy Ağçeli, G., Hammamchi, H. ve Cihangir, N. (2022). “Novel levan/bentonit/esansiyel yağ filmleri: Karakterizasyon ve antimikrobiyal aktivite”. *Journal of Food Science and Technology*, 59, 249–256. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05009-4>.
- Lan, J., Chen, J., Zhu, R., Lin, C., Ma, X. ve Cao, S. (2023). “Antibacterial and antiviral chitosan oligosaccharide modified cellulosic fibers with durability against washing and long-acting activity”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231, 123587. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123587>
- Lansdown, A. (2006). “Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use.” U. Hipler ve P. Elsner (ed.). içinde *Biofunctional Textiles and the Skin*. (s. 17-34). Current Problems in Dermatology.
- Lee, J. B., Fukai, T., Hayashi, K. ve Hayashi, T. (2011). “Characterization of fructan from Chikuyo-Sekko-To, a Kampo prescription, and its antiherpetic activity in vitro and in vivo”. *Carbohydrate Polymers*, 85 (2), 408-412.
- Lee, Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Park, C. S. ve Park Y. H., (1997). “Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18 (4), 255–259.

- Levy, J. L., Angel, B. M., Stauber, J. L., Poon, W. L., Simpson, S. L., Cheng, S. H. ve Jolley, D. F. (2008). "Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species". *Aquatic Toxicology*, 89 (2), 82–93.
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. ve Xiao, M. (2010). "Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1". *Bioresource Technology*, 101 (14), 5528–5533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.151>.
- Mamay, W., Deana, A., Rukman, H. (2015). "Isolation and Characterization of Levan from Moderate Halophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* BK AG21". *Procedia Chemistry*, 16, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.055>.
- Marx, S. P., Winkler, S. ve Hartmeier, W. (2000). "Metabolization of  $\beta$ -(2, 6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria". *FEMS Microbiology Letters*, 182 (1), 163-169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08891.x>.
- Melo, I.R., Pimentel, M.F., Lope, C.E., Calazans, G.M.T. (2007). "Application of Fractional Factorial Design to Levan Production by *Zymomonas mobilis*". *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 45– 51.
- Meneses, C.H., S.G., Rouws, L.F.M., Simoes-Araujo, J.L., Vidal, M.S. ve Baldani, J.I. (2011). "Exopolysaccharide Production is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*". *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 24, 1448–1458.
- Mohamed, S. S., Amer, S. K., Selim, M. S. ve Rifaat, H. M. (2018). "Characterization and applications of exopolysaccharide produced by marine *Bacillus altitudinis* MSH2014 from Ras Mohamed, Sinai, Egypt". *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (3), 204-209.

- Moosavi-Nasab, M., Layegh, B., Aminlari, L. ve Hashemi, M.B. (2010). “Microbial production of levan using date syrup and investigation of its properties”. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 44, 1248–1254.
- Moussa, T. A. A., Al-Qaysi, S. A. S., Thabit, Z. A. ve Kadhem, S. B. (2017). “Microbial levan from *Brachybacterium phenoliresistens*: Characterization and enhancement of production”. *Process Biochemistry*, 57, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.008>
- Mummaleti, G., Sarma, C., Kalakandan, S. K., Gazula, H., Sivanandham, V. ve Anandharaj, A. (2022). “Characterization of levan produced from coconut inflorescence sap using *Bacillus subtilis* and its application as a sweetener”. *Lwt*, 154, 112697. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112697>.
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M. ve Pongsawasdi, P. (2013). “High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 30-36.
- Nasir, A., Sattar, F., Ashfaq, I., Lindemann, S. R., Chen, M., Van den Ende, W., Oner, E. T., Kirtel, O., Khaliq, S., Ghauri, M. A. ve Anwar, M. A. (2020). Production and characterization of a high molecular weight levan and fructooligosaccharides from a rhizospheric isolate of *Bacillus aryabhatai*. *LWT*, 123, 109093–. <https://doi.org/j.lwt.2020.109093>
- Niv, E., Shapira, Y., Akiva, I., Rokhkind, E., Naor, E., Arbiv, M. ve Vaisman, N. (2012). Effect of levan supplement in orange juice on weight, gastrointestinal symptoms and metabolic profile of healthy subjects: Results of an 8-week clinical trial. *Nutrients*, 4 (7), 638–647. <https://doi.org/10.3390/nu4070638>
- Noghabi, K. A., Zahiri, H. S. ve Yoon, S. C. (2007). “The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth

conditions and its role in heavy metals absorption”. *Process Biochemistry*, 42 (5), 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.004>.

OECD. (2001). *Strategies for Sustainable Development- Practical Guidance for Development*. OECD: Paris.

Ooi, V.E.C. ve Liu, F. (2000). “Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide–protein complexes”. *Current Medicinal Chemistry*, 7 (7), 715– 729.

Orsod, M., Joseph, M. ve Huyop, F. (2012). “Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. isolated from Asian sea bass (*Lates calcarifer*)”. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8 (3), 170-174.

Pan, H., Zhao, T., Xu, L., Shen, Y., Wang, L. ve Ding, Y. (2020). “Preparation of novel chitosan derivatives and applications in functional finishing of textiles”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 971-976. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.226>.

Prasetya, N. B. A., Sausan, I. S., Ngadiwiyana, I., Sarjono, P. R. (2023). “The synthesis of nitrated copolyeugenol-divinylbenzene as an antibacterial coating agent on cotton fabric”. *American Institute of Physics Conference Series* 2738. <https://doi.org/10.1063/5.0140218>.

Petkova, P., Francesko, A., Fernandes, M. M., Mendoza, E., Perelshtein, I., Gedanken, A. ve Tzanov, T. (2014). “Sonochemical coating of textiles with hybrid ZnO/chitosan antimicrobial nanoparticles”. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6 (2), 1164-1172.

Phengnoi, P., Thakham, N., Rachphirom, T., Teerakulkittipong, N., Lirio, G.A., Jangiam, W. (2022). “Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis”. *Heliyon*, 8, e12137.

- Pinho, E., Magalhães, L., Henriques, Oleivera R (2011). “Antimicrobial activity assessment of textiles: standard methods comparison”. *Annals of Microbiology*, 61, 493–498. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0163-8>.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R. ve Nicolaus, B. (2011). “Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea”. *Archaea*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/693253>.
- Purwar, R. ve Joshi, M. (2004). “Recent developments in antimicrobial finishing of textiles--a review”. *AATCC Review*, 4 (3), 22-26.
- Putri, A. N., Ginting, D., Syaputra, R. F., & Perdana, F. (2023). “Synthesis and characterization of anti-fungal paint production based on bintaro (*Cerbera manghas*) seed extract as additive”. *Journal of Aceh Physics Society*, 12 (1), 1-7.
- Rajkumar, R., Vijayendra, S. V. N. ve Prasad, M. S. (2003). “Optimization of Exopolysaccharides from *Alcaligenes Eutrophus*”. P. L. Soni (ed.). *Trends in Carbohydrate Chemistry*. (s. 212–217). Surya International Publishers: Dehra Dun.
- Rao, M., Bharathi, P. ve Akila, R. A. (2014). “Comprehensive review on biopolymers”. *Sci. Rev. Chem. Commun.*, 4, 61–68.
- Risti, T., Fras, L., Novak, M. (2011). “Antimicrobial efficiency of functionalised cellulose fibers as potential medical textiles. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technology advances”. *Formatex Research Center*, Badajoz.
- Rodriguez, C., Di Cara, A., Renaud, F. N. R., Freney, J., Horvais, N., Borel, R., Puzenat, E.,0 Guillard, C. (2014). Antibacterial effects of photocatalytic textiles for footwear application. *Catalysis Today*, 230, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.12.023>.



- Sarilmiser, K., Ateş, O., Özdemir, G., Arga, K. Y. ve Öner, E. T. (2015). “Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4), 455-463.
- Schmid, J., Sieber, V. ve Rehm, B. (2015). “Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies”. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>.
- Schmitt, J., Flemming, H.C. (1998). “FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41 (1), 1–11.
- Schultz, P. (2017). *Biopolymers Containing Unnatural Amino Acids*. United States.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na’amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H.J., Secchi, M., Castellani, V., Collina, E. (2020). “Selenium Enriched Green Tea Increase Stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in Chitosan Coated Alginate Microcapsules during Exposure to Simulated Gastrointestinal and Refrigerated Conditions”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 406–411.
- Shang, K., Gao, J., Yin, X., Ding, Y. ve Wen, Z. (2021). “An overview of flexible electrode materials/substrates for flexible electrochemical energy storage/conversion devices”. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2021 (7), 606-619. <https://doi.org/10.1002/ejic.202001024>.
- Shankar, T., Palpperumal, S., Kathiresan, D., Sankaralingam, S., Balachandran, C., Kathirvelu, K., Abeer Hashem, A., Alqarawi Abdulaziz, A. ve Abd\_Allah E.A. (2021). “Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: Screening and characterization”. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.030>.
- Shanter AL-Qaysi, S.B.K.A. ve Thabit, Z., A., (2016). “Levan Production Using *Pseudomonas brassicacearum* Isolated from Rhizosphere Soil of Cowpea Farm in Iraq”. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 15, 83–96.

- Sheng, G. P., Yu, H. Q. ve Li, X. Y. (2010). “Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review”. *Biotechnology Advances*, 28, 882-894.
- Shih I.L., Chen L.D. ve Wu J.Y. (2010). “Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate”. *Carbohydr. Polym.* 82:111–117.
- Shih, I. L., Wang, T.C., Chou, S.Z. ve Lee, G.D. (2011). “Sequential Production of Pwo Piopolymers-levan and Poly-lysine by Microbial Fermentation”. *Bioresource Technology*, 102, 3966– 3969.
- Shutova, V. V., Revin, V. V. ve Kalinkina, E. A. (2021). “*Azotobacter vinelandii*’den, ağır metaller ve radyonüklidler için biyosorbentlerin bir bileşeni olarak Levan”. *Appl Biochem Microbiol*, 57, 102–109. <https://doi.org/10.1134/S0003683821010178>.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. ve Goksungur Y. (2014). “Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems”. *Carbohydrate Polymers*, 99, 454-461.
- Sojan, J. M., Licini, C., Marcheggiani, F., Carnevali, O., Tiano, L., Mattioli-Belmonte, M., Maradonna, F. (2023). “*Bacillus subtilis* Modulated the Expression of Osteogenic Markers in a Human Osteoblast Cell Line”. *Cells*, 12, 364. <https://doi.org/10.3390/cells12030364>.
- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y. ve Zhang, G. (2013). “Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039>.
- Song, Y., Sun, M., Feng, L., Liang, X., Song, X., Mu, G., Tuo, Y., Jiang. S. ve Qian, F. (2020). “Antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* 12 exopolysaccharides against *Shigella flexneri*”. *Appl Environ Microbiol*, 86, 00694-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00694-20>.

- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J. ve Uppuluri, K. B. (2015a). “Review on production, characterization and applications of levan”. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102-114.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H. S. S., Harish B.S., Janaki Ramaiah, M. ve Uppuluri, K. B. (2015b). “Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization”. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>
- Taran, M., Lotfi, M., Safaei, M.. (2020). “Optimal conditions for levan biopolymer production and its use in the synthesis of bactericidal levan-ZnO nanocomposite”. *Biotechnologia*, 100. 397-405. <https://doi.org/10.5114/bta.2019.90240>.
- Tian, F., Inthanavong, L. ve Karboune, S. (2011). “Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for the sythesis of levan and fructooligosaccharides”. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (10), 1929- 1938.
- Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. ve Gänzle, M. G. (2005). “Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 66 (6), 655–663. doi:10.1007/s00253-004-1773-5.
- Türemen, M., Demir, A. ve Gökçe, Y. (2021). “The synthesis and application of chitosan coated ZnO nanorods for multifunctional cotton fabrics”. *Materials Chemistry and Physics*, 268, 124736.
- Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E. ve Munster, V. J. (2020). “Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1”. *New England Journal of Medicine*, 382 (16), 1564-1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>.

- Veerapandian, B., Shanmugam, S. R., Varadhan, S., Sarwareddy, K. K., Mani, K. P. ve Ponnusami, V. (2020). "Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low cost supplemental nutrient source". *Carbohydrate Polymers*, 227, 115361. [https://doi.org/ 10.1016/j.carbpol.2019.115361](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115361).
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M. ve Jiang, B. (2014). "Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002". *Carbohydrate Polymers*, 101, 975-981.
- Zhang, Y., Xu, Q., Fu, F. ve Liu, X. (2016). "Durable antimicrobial cotton textiles modified with inorganic nanoparticles". *Cellulose*, 23, 2791-2808.
- Zhang, Y., Wu, Y. T., Zheng, W., Han, X. X., Jiang, Y. H. ve Hu, P. L. (2017). "The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*". *Journal of Functional Foods*, 38, 273-279.