



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROBİYOTİK POTANSİYELE SAHİP LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN HETEROPOLİSAKKARİT
ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ali SOYUÇOK

BURDUR, 2016

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROBİYOTİK POTANSİYELE SAHİP LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN HETEROPOLİSAKKARİT
ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ali SOYUÇOK


Danışman: Doç. Dr. Gül den BAŞYİĞİT KILIÇ


BURDUR, 2016


YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Ali SOYUÇOK tarafından Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ yönetiminde hazırlanan “Probiyotik Potansiyele Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Heteropolisakkarit Üretim Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/04/2016

Prof. Dr. Zübeyde ÖNER (Başkan)
Süleyman Demirel Üniversitesi..........(İmza)

Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ (Jüri Üyesi)
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi..........(İmza)

Yrd. Doç. Dr., Melike BARAN EKİNCİ (Jüri Üyesi)
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi..........(İmza)

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

.....
Yrd. Doç. Dr. İ. İskender SOYASLAN

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARINA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Probiyotik Potansiyele Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Heteropolisakkarit Üretim Özelliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin;

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

25/ 04 / 2016

Ali SOYUÇOK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her safhasında tecrübesi ile bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesi, yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında ayrıca gerekli laboratuvar imkanlarının sağlanmasında desteğini esirgemeyen danışmanım hocam Sayın **Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ**'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Sayın **Yrd. Doç. Dr. İlhan GÜN**'e, tezimin deneysel kısımlarında yardımcı olan Sayın **Yrd. Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY**'a, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Sayın **Mert SUDAĞIDAN**'a ve desteklerinden dolayı **Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına**,

Çalışmam boyunca yardımlarından dolayı değerli arkadaşlarım **Mahmut DOĞANTÜRK, Orhan YAVUZ, Seda TAHTACI, Sevdâ DARCAN** ve **Sedef YÜCE**'ye,

Yüksek Lisans eğitimim için beni destekleyen **2210-D Sanayiye Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı**'na,

0239-YL-14 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen **Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü**'ne,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, manevi ve maddi desteklerini hep hissettiğim annem **Raziye SOYUÇOK**, babam **İsmail SOYUÇOK**, kardeşim **Burak SOYUÇOK** ile ailemin tüm bireyelerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisan, 2016

Ali SOYUÇOK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ekzopolisakkaritlerin Bileşimi ve Yapısı	4
2.2. Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi	7
2.2.1. Sitoplazma İçine Şeker Taşınımı	7
2.2.2. Şeker-1-Fosfatların Sentezi.....	7
2.2.3. Şeker Nükleotidlerin Sentezi ve Tekrarlayan Yapıların Polimerizasyonu	8
2.3. EPS Üretimini Etkileyen Faktörler	8
2.4. EPS Üretim Enzimleri	9
2.5. EPS'nin Teknolojik Özellikleri	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Kültürlerin Hazırlanması.....	15
3.2.2. Hücre Sayısının ve Biyokütle Miktarının Tespiti	15
3.2.3. Moleküler Tekniklerle <i>eps</i> Genlerinin Tespiti	16
3.2.3.1. DNA İzolasyonu.....	16
3.2.3.2. Primer Seçimi ve Sentezi	16
3.2.3.3. PZR Karışımının Hazırlanması	16
3.2.3.4. PZR Koşulları ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	17
3.2.4. EPS'nin Ekstraksiyonu ve Miktarının Belirlenmesi	17
3.2.5. Toplam Şeker Miktarının Tespiti	18
3.2.6. Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	24
4.1. LAB Sayımı, Biyokütle ve pH Sonuçları	24
4.2. <i>eps</i> Genlerinin Varlığı.....	29
4.3. Toplam Şeker Miktarı	34
4.4. EPS'nin Ekstraksiyonu ve Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi	39
5. SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	45
Ek-1: Çözeltiler	59
Ek-2: Laktik asit bakterilerinin liyofilizasyon tartımı sonuçları	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. EPS biyosentezi ile ilgili primer çiftleri.....	10
Şekil 3.1. Toplam şeker tayini için glukoz kalibrasyon grafiği	19
Şekil 3.2. Standartların kromatogramı	19
Şekil 3.3. Standart fruktoz kalibrasyon grafiği	20
Şekil 3.4. Standart glukoz kalibrasyon grafiği	20
Şekil 3.5. Standart sukroz kalibrasyon grafiği	21
Şekil 3.6. Standart ramnoz kalibrasyon grafiği	21
Şekil 3.7. Standart mannoz kalibrasyon grafiği	22
Şekil 3.8. Standart galaktoz kalibrasyon grafiği	22
Şekil 3.9. Standart laktoz kalibrasyon grafiği	23
Şekil 4.1. 100 bp DNA ladder ve 1 kb DNA ladder (Fermentas)	30
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus</i> suşlarının fruktansukraz gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü	31
Şekil 4.3. <i>E. faecium</i> suşlarının glikoziltransferaz gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü	32
Şekil 4.4. Numune kromatogramı	39

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Standartlara ait LOD ve RT değerleri	19
Çizelge 4.1. <i>L. plantarum</i> türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)	24
Çizelge 4.2. <i>L. fermentum</i> türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)	24
Çizelge 4.3. <i>Enterococcus</i> türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)	25
Çizelge 4.4. <i>L. plantarum</i> türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L)	25
Çizelge 4.5. <i>L. fermentum</i> türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L).....	26
Çizelge 4.6. <i>Enterococcus</i> türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L)	26
Çizelge 4.7. <i>L. plantarum</i> türlerine ait pH sonuçları.....	27
Çizelge 4.8. <i>L. fermentum</i> türlerine ait pH sonuçları	27
Çizelge 4.9. <i>Enterococcus</i> türlerine ait pH sonuçları.....	28
Çizelge 4.10. <i>L. plantarum</i> türlerine ait PZR sonuçları	33
Çizelge 4.11. <i>L. fermentum</i> türlerine ait PZR sonuçları.....	34
Çizelge 4.12. <i>Enterococcus</i> türlerine ait PZR sonuçları	34
Çizelge 4.13. <i>L. plantarum</i> türlerine ait toplam şeker miktarları	37
Çizelge 4.14. <i>L. fermentum</i> türlerine ait toplam şeker miktarları.....	37
Çizelge 4.15. <i>Enterococcus</i> türlerine ait toplam şeker miktarları	38
Çizelge 4.16. <i>L. plantarum</i> türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g)	39
Çizelge 4.17. <i>L. fermentum</i> türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g).....	40
Çizelge 4.18. <i>Enterococcus</i> türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g)	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
g	: Gram
GRAS	: Generally recognized as safe (Genellikle güvenilir kabul edilen)
kDa	: Kilo-Dalton
KOB	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
LAB	: Laktik asit bakterileri
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
PEP	: Fosfoenolpirüvat
PTS	: Fosfotransferaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonları
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TCA	: Triklorasetik asit
UDP	: Üridin difosfat
UDP-GalNAc	: Üridin 5 difosfo N-asetilglukozamin disodyum
UDP-GlcNAc	: Üridin difosfat N-asetilglukozamin

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Probiyotik Potansiyele Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Heteropolisakkarit Üretim Özelliklerinin Belirlenmesi

Ali SOYUÇOK

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ

Nisan, 2016

Çalışmamızda, daha önceki çalışmalarda insan dışkı örneklerinden izole edilmiş, 16S rRNA dizi analizi ile genetik tanısı gerçekleştirilmiş ve probiyotik özellikleri araştırılmış 20 adet *Lactobacillus plantarum*, 15 adet *L. fermentum*, 19 adet *Enterococcus faecium* ve 1 adet *E. durans* suşları materyal olarak kullanılmıştır. Bu izolatların EPS üretim özellikleri kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiş ve EPS üreten enzimlerinin varlığı da araştırılmıştır. *L. plantarum*, *L. fermentum* ve enterokok suşları sırasıyla $8,2 \times 10^4$ - $7,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ - $2,4 \times 10^7$ ve $2,1 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ KOB/mL arasında belirlenmiştir. pH değerleri MRS sıvı besiyeri ve L-SDM besiyeri olmak üzere iki farklı ortamda ölçülmüştür. *L. plantarum* ile enterokok suşlarının pH değerlerinin MRS besiyerinde LSDM'ye göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. *L. fermentum* için bu durum tam tersine olup L-SDM'de daha düşük pH değerleri ölçülmüştür. Yapılan çalışmada 35 adet *Lactobacillus* türünden 25 adedi fruktansukraz pozitif, 20 adet *Enterococcus* türünden ise 18 adedi glikoziltransferaz pozitif bulunmuştur.

L. plantarum AC21-1031 ve AK4-11 suşlarının biyokütleleri sırasıyla 22,93 ve 13,58 g/L'dir. Toplam şeker miktarı glukoz cinsinden ifade edilmiş olup yüksek şeker üretimi *L. plantarum* AB16-65 ile *L. fermentum* AC18-87'de 136,61 ve 135,55 glukoz cinsinden mg/L'dir.

Biyokütle ve şeker üretimi en yüksek 6 adet *L. plantarum* suşu, 8 adet *L. fermentum* suşu ve 6 adet *E. faecium* suşu olmak üzere toplamda 20 adet Ramnoz, fruktoz, mannoz, glukoz, galaktoz ve sukrozun ortalama değerleri 104, 58 µg/g, 18,26 µg/g, 8,05 µg/g, 21,05 µg/g, 15,81 µg/g ve 16,56 µg/g olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: LAB, ekzopolisakkarit, heteropolisakkarit

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0239-YL-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Determination Of Exopolysaccharide Production Properties of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria

Ali SOYUÇOK

Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gül den BAŞYİĞİT KILIÇ

April, 2016

In our study, twenty *Lactobacillus plantarum*, fifteen *L. fermentum*, nineteen *Enterococcus faecium* strains along with one *E. durans* strain which were previously isolated from the fecal samples of human feces, subject to genetic identification via 16S rRNA sequence analysis as well as probiotic property investigation were used as material. EPS production characteristics of these isolates were determined as qualitatively and quantitatively and the presence of EPS-producing enzymes was investigated. Cell counts of *L. plantarum*, *L. fermentum* and enterococci strains were determined respectively as $8,2 \times 10^4$ – $7,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ - $2,4 \times 10^7$ and $2,1 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$ CFU/mL. pH values of MRS and L-SDM medium were measured. pH values of *L. plantarum* and enterococci strains in MRS medium were higher in comparison with that of L-SDM medium whereas the pH values of *L. fermentum* strains in MRS medium were lower in comparison with the L-SDM medium. It was found that 25 of all *Lactobacillus* species were fructansucrase positive and 18 of all *Enterococcus* species were glycosyltransferase positive. Biomass of *L. plantarum* AC21-1031 and *L. plantarum* AK4-11 strains were 22,93 and 13,58 g/L respectively. Total sugar amount was expressed as glucose equivalent. The highest sugar amount of sugar produced was by *L. plantarum* AB16-65 and *L. fermentum* AC18-87. According to the results of this study, 6 *L. plantarum* strains, 8 *L. fermentum* strains and 6 *E. faecium* strains were used in the analysis of monosaccharide with the highest production of sugar and biomass. Mean values of rhamnosus, fructose, mannose, glucose galactose and sucrose were 104, 58 µg/g 18,26 µg/g 8,05 µg/g 21,05 µg/g 15,81 µg/g and 16,56 µg/g respectively.

Keywords: LAB, exopolysaccharide, heteropolysaccharide

The present M.Sc. Thesis was supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects of Mehmet Akif Ersoy University under the Project number of 0239-YL-14.

1. GİRİŞ

Probiyotik yaşam için anlamına gelen ve genellikle insanlar ve hayvanlar için yararlı etkiler gösteren bakterileri tanımlamakta kullanılır. Uzmanlar tarafından probiyotik terimi "yeterli miktarda tüketilmeleri sonucu konakçı üzerinde olumlu sağlık etkileri yaratan canlı mikroorganizmaları" ifade etmektedir (FAO/WHO 2001).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için; insanlardan izole edilmiş suşlardan seçilmesi, patojen olmaması, mide-bağırsak sisteminde probiyotik etkinin oluşabilmesi için mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olması, patojenlerle rekabet edebilmesi için bağırsak epitellerine tutunabilmesi veya agregasyon oluşturabilmesi, antimikrobiyal maddeler üretmesi, bağışıklık sistemini ve metabolik aktiviteleri desteklemesi gibi özelliklere sahip olması gereklidir (Tuomola vd. 2001; Ouwehand vd. 2002; Grmanova vd. 2010).

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde sadece asit üreterek gıdaların bozulmasını önlemekle kalmaz son ürünün duyu özelliklerinin gelişmesinde katkı sağlar (Wood 1997). LAB az yağlı peynirlerin, sütlü tatlıların, yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinin tekstürünün gelişmesinde önemli rol oynar (De Vuyst ve Vanningelgem 2003). Ürünlerde tekstürün gelişmesinde hücre dışına salgılanan şeker polimerleri veya ekzopolisakkaritler (EPS)'in önemli olduğu belirtilmektedir (De Vuyst ve Degeest 1999; Duboc ve Mollet 2001; Ruas-Madiedo vd. 2002). EPS'ler yüksek molekül ağırlığına sahip biyobozunur polimerler olup (Vijayabaskar vd. 2011) geniş bakteri spektrumu tarafından salgılanmaktadır. EPS'ler sindirim sistemindeki bakteriler tarafından parçalanamadıkları için prebiyotik özellik göstermektedir. Hücre duvarına bağlanan EPS'lere kapsüller ekzopolisakkarit, ortamda serbest halde bulunanlar ise mukoz ekzopolisakkarit olarak sınıflandırılmaktadır (Petersen 2000; Laws ve Marshall 2001a). EPS'ler üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmayıp; fermente süt ürünlerinin stabilitesini, reolojisini ve tekstürel yapısını geliştirirken, hücreyi faj saldırılarına, toksik bileşiklere, ozmotik strese ve kurumaya karşı korumaktadır. Aynı zamanda biyofilm oluşumu ve hücrenin katı yüzeylere tutunmasında da etkili olmaktadır (De Vuyst ve Degeest 1999; Broadbent vd. 2001). Genellikle gıda endüstrisinde doğal viskozite arttırıcı ve tekstür geliştirici yani doğal kıvam arttırıcı maddelere yoğun ilgi gösterilmektedir (Duboc ve Mollet 2001; Sutherland 2001). Bu amaçla bitkisel karbonhidratlar (nişasta, pektin ve sakız zıncığı), hayvansal hidrokolloidler (jelatin ve kazein) ve bakteriyel biyopolimerler (ksantam ve jellan) kullanılmaktadır (Sutherland 2001). Mikrobiyal

EPS'lerin yosun ve bitki kaynaklı EPS'lere karşı üstün özellikleri vardır (Nwodo vd. 2012). EPS'lerin tekstil, petrol arıtma, madencilikte metal ayırma, endüstriyel atık arıtma, ilaç üretme, kozmetik, tıp ve gıda sanayisi gibi geniş bir yelpazede birçok kullanım potansiyeli vardır (Decho 1990; Freitas vd. 2011).

Son on yılda ekstremofillerden sentezlenen EPS'ler rapor edilmiştir. Bu EPS'lerin kompozisyonu, yapı, sentezlenme ve fonksiyonel özellikleri farklılıklar göstermektedir. Yoğun olarak araştırılmakta olan bu konuların henüz az bir kısmı sanayiye taşınabilmektedir. Çoğunlukla termofil ve halofil olan arkea cinslerinde EPS üretimi rapor edilmiştir. Arkea ve bakterilerin termofil cinsleri sıcak bölgeler ve kaplıcaların yüzeyi ve dipleri gibi termal ekosistemlerden izole edilebildiği için, bu ortamlar mikrobiyal EPS üreticileri için önemli kaynaklardır. Termofil arkea türleri arasında *Thermococcus* ve *Sulfolobus*'un EPS sentezlediği belirtilmiştir (Nicolaus vd. 1993; Hartzell vd.1999). Bejar vd. (1998) *Halmonas eurihalina* türünün 19 halofilik suşunun EPS üretimini karakterize etmeye çalışmıştır. Pawar vd. (2013) tuzlu topraktan izole ettikleri bakterilerin EPS üretimini araştırmışlardır. *Aureobasidium pullulans* (West 2000; Wu vd. 2012) ve *Penicillium* türleri (Sandford1979; Kohama vd. 1974; Nehad ve El-Shamy 2010; Jansson ve Lindberg 1980; Kogan vd. 2002) ile *Lyngbya stagnina* (Jindal vd. 2013) ve *Oscillatoria formosa* (Jindal vd. 2011) küf ve siyonabakter türleride EPS üretmektedir. Yapılan bir çalışmada ise *Alcaligenes faecalis*'in EPS üretimi rapor edilmiştir (Kaur vd. 2013).

Gıda endüstrisinde kullanılan ve genellikle güvenilir kabul edilen (GRAS) statüsünde olan LAB tarafından üretilen EPS'ler sinerezisi önlemek ve fermente süt ürünlerinin viskozitesini ve tekstürünü geliştirmek için güvenli katkı maddesi olma potansiyeline sahiptir. İşletmeler GRAS statüsünde yer alan fonksiyonel başlatıcı kültürlerin gıdalarda kıvam arttırıcı olarak kullanılmasını tercih etmektedir (De Vuyst 2000). Üstelik LAB'ların ürettikleri bazı EPS'ler tüketici sağlığına yararlar sunar. LAB'ların EPS üretimi üzerine pek çok araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle termofil türler üzerinedir. Ancak EPS üreten mezofil bakteriler üzerine de giderek artan bir ilgi vardır (Tallon vd. 2003). Bu ilginin sebebi termofillerin ürettikleri EPS'lerin miktarının yüksek olmasına rağmen veriminin mezofillere kıyasla düşük olmasıdır (Mozzi vd. 2006). *L. plantarum* mezofil LAB'lar arasında en sık izole edilen ve fermente gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan türdür. *L. plantarum* probiyotik özelliğinden dolayı üzerine en çok araştırılan LAB türlerinden biridir (Bengmark 2001). Bazı suşları bağırsak mukozasında antimikrobiyal madde sentezleyerek ve patojenlerle yarışarak potansiyel patojen mikroorganizmaların sayısını azaltır veya yok eder (Adlerberth vd. 1996). Bu

yüzden EPS üreten *L. plantarum* suşlarına olan ilgi, GRAS statüsünde yer almaları, tekstür geliştirici olmaları ve probiyotik özellik göstermelerinden dolayı artmaktadır.

Bu tez kapsamında daha önceden insan dışı örneklerinden izole edilmiş, 16S rRNA dizi analizi ile genetik tanısı gerçekleştirilmiş ve probiyotik özellikleri araştırılmış 20 adet *Lactobacillus plantarum*, 15 adet *L. fermentum*, 19 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. durans* suşu ile çalışılmıştır (Başyigit 2004; Başyigit Kılıç ve Karahan 2010; Başyigit Kılıç vd. 2013). Bakterilerin EPS üretim özellikleri kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiş ayrıca *eps* gen bölgelerinin varlığı da araştırılmıştır. Gerek kalitatif gerekse kantitatif yolla en iyi EPS üreten 6 adet *L. plantarum*, 8 adet *L. fermentum* ve 6 adet *E. faecium* suşlarının ürettikleri şekerlerin kompozisyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekzopolisakkaritlerin Bileşimi ve Yapısı

Polisakkaritler gıdalarda stabilizatör, emülgatör, jelleştirici veya su bağlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Nişasta, galaktomannan, pektin, karreganan ve aljinat gibi bitki ve yosunlardan elde edilen polisakkaritler gıda sanayisinde kullanılan polisakkaritlerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Freitas vd. 2011). Son yıllarda bitki ve yosunlardan üretilen polisakkaritlere alternatif olarak çok düşük konsantrasyonda bile viskoz çözelti oluşturmaları ve pseudoplastik yapıya sahip olmaları nedeniyle mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin kullanımına olan ilgi artmaktadır (Becker vd. 1998).

EPS'ler, mikroorganizma tarafından salgılanan çevre dostu doğal polimerlerdir. EPS'ler son ürünler içerisinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip EPS'ler tekrarlayan yüzlerce veya binlerce disakkaritlerden ve/veya oligosakkaritlerin polimerizasyonu ile oluşmaktadır (Cerning 1995). EPS'ler, D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadir olarak N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması sonucu açığa çıkan yapılardır (Duboc ve Mollet 2001). Mikrobiyal EPS'ler doğada iyonik veya iyonik olmayan formda bulunabilir ve suda çözünebilir (Liang ve Wang, 2015). Molekül büyüklükleri genel olarak 10 kDa ile 200 kDa arasında değişmekte bazen de 1000 kDa'ya çıkabilmektedir (Vaningelgem vd. 2004). EPS'lerin üretici mikroorganizma tarafından enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmadığı bilinmesine rağmen bu moleküllerin fizyolojik rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. EPS'ler hücre tanıma ve etkileşimi, yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma gibi çeşitli fonksiyonlarda görev alır. Alg ve bitkilerden elde edilen pektin, selüloz ve alginat gibi polisakkaritler gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Gram negatif bakterilerden sentezlenen ksantam ve jellan gibi diğer biyopolimer maddeler genellikle doğal kıvam arttırıcı olarak tanımlanır. LAB tarafından üretilen EPS'ler genellikle süt sanayisinde fermente ürünün teknolojik özelliklerinin geliştirilmesinde ve fonksiyonel ürünün üretilmesi için kullanılır (Werning vd. 2012). EPS'ler mikroorganizmaların çevresini saran polimer yapılardır. Hücre dışında bulunan karbonhidratlar, proteinler, peptitler EPS'lerin ortamdan zor ayrılmasına neden olur (Cerning 1995). EPS üreten mikroorganizmaların geliştiği ortam ve optimum şartlar EPS'nin kalitesini ve verimini etkilemektedir. Bu faktörlerin arasında karbon ve azot kaynakları, ortamda bulunan moleküller, mineral tuzlar, iz elementler, mikroorganizma cinsi, sıcaklık, pH ve oksijen konsantrasyonu önemlidir (Nicolaus vd. 2010).

EPS'ler iki gruba ayrılırlar. Bunlardan birincisi tek tip monosakkaritten meydana gelen homopolisakkaritler (HoPS), diğeri ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından oluşan ve her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit içeren heteropolisakkaritler (HePS)'dir (Şimşek ve Çon, 2003; Welman ve Maddox, 2003). Homopolisakkaritler sadece bir monosakkaritin tekrar etmesiyle (genellikle glukoz ve fruktoz), heteropolisakkaritler en az iki farklı monosakkarit grubunun tekrar etmesiyle oluşurlar (De Vuyst vd. 2001; Laws vd. 2001b; Mozzi vd. 2006; Dan vd. 2009). Homopolisakkaritler temelde 4 gruba ayrılmaktadır; α -D-glukanlar, β -D-glukanlar, β -D-fruktanlar ve poligalaktanlar (De Vuyst vd. 2001; Monsan vd. 2001). Homopolisakkaritler hücre içi veya dışında bulunan glukansukraz ve fruktansukraz enzimleri sayesinde sırayla glukoz veya fruktanlara çevrilerek yüksek miktarlarda salgılanırlar (Monsan vd. 2001; Moulis vd. 2006). Homopolisakkaritler glukansukraz aktivitesi sonucu, heteropolisakkaritler glukoziltransferazların aktivitesi sonucu oluşur (Dan vd. 2009).

Heteropolisakkaritler ise kimyasal kompozisyonu, monomer oranı, tekrarlayan grupların moleküler yapısı ve ağırlıklarına göre çok çeşitli yapılarda üretilebilmektedir (De Vuyst ve Degeest 1999; Van Kranenburg vd. 1999; De Vuyst vd. 2001; Werning vd. 2006). Tekrar birimi genellikle farklı oranlarda olsa D-glukoz, D-galaktoz ve L-ramnoz birleşimini içerir. Nadirde olsa L-fukoz, D-riboz, g-glukoronik asit, D-pelargonik asit'e ilaveten gliserol ve pirüvat bulunmaktadır (Doco vd. 1990; Robijn vd. 1996a; Robijn vd. 1996b; Low vd. 1998; van Casteren vd. 2000; Navarini vd. 2001; Faber vd. 2002; Higashimura vd. 2000; Van Calsteren vd. 2002). Ayrıca sn-gliserol-3-fosfat, N-asetil-aminoşekerler, fosfat ve asetil grupları gibi farklı formlarda azda olsa bulunabilir (Laws vd. 2001b). LAB tarafından üretilen polimerlerin çoğu bu özelliktedir. *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) ve *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* (*Str. thermophilus*) heteropolisakarit üreten başlıca LAB türleridir.

Probiyotik bakteriler insan ve hayvan ekosisteminde önemli rol oynamaktadır. Bu bakteriler beslenme, fiziksel ve terapötik özellikler üzerine etkilidir. Bu yararlı özelliklerinin etki mekanizması bu bakterilerin metabolik son ürünlerine dayanır (Naidu vd. 1999). EPS'ler gıda ve ilaç sanayisinde ayrıca dolgu maddesi olarak inşaat sanayisinde kullanılmaktadır (Kaur vd. 2013). Fermente süt ürünleri ve yoğurt üretiminde düzgün yapı ve tekstürün oluşması için ekzopolisakkaritlerin gerekli olması EPS'lerin rolünü iyice anlamamızı sağlamıştır. EPS üretemeyen organizmalara modifiye ettirilerek üretebilir hale gelmesi tüketicilerin güvensizliği ve birçok Avrupa ülkelerindeki yasal düzenlemelerden dolayı sınırlandırılmıştır (Van der Meulen vd. 2007). Bakteriyel polisakkaritler kimyasal

kompozisyonundan dolayı farklılaşabilirler. LAB tarafından üretilen glukansukrazlar glikozid-hidrolaz 70 ailesi içerisinde yer almaktadır (Bounaix vd. 2009). Bu enzimlerle üretilen glukozlar 4 gruba ayrılırlar; (i) dekstran, (ii) mutan, (iii) alternan ve (iv) reuteran (Korakli ve Vogel 2006). Glikozid- hidrolaz 68 ailesi tarafından fruktansukraz tarafından üretilen fruktanların iki tipi; levan ve inulin'dir (Tieking ve Gänzle 2005; Korakli ve Vogel 2006; van Hijum vd. 2006). Moleküler büyüklükleri ve yapısı gibi temel ölçütlere ek olarak buldukları konum ve kompozisyonları polisakkaritlerin özelliklerini etkilemektedir. EPS'nin karakteristiği ve miktarı; karbon ve azot kaynakları ve inkübasyon şartları gibi faktörlerden etkilenebilir (Cerning 1990; Degeest ve De Vuyst 1999; De Vuyst vd. 2001; Mozzi vd. 2003; Torino vd. 2005).

Süt endüstrisinde düzgün olmayan yapının oluşumu yanı sıra EPS üreten mikroorganizmaların genetik seviyelerindeki kararsızlık bilinen bir sorundur (Cerning 1990; Cerning 1994). Uygun inkübasyon sıcaklıklarında bile viskozite uzun inkübasyon sürelerinde bozulabilir (Cerning 1990; Cerning 1994; Macura ve Townsley 1984). Bu nedenle, viskoz yapının oluşmasını sağlayan suşların zamanla tekrar seçilerek mutasyonun önlenmesi ile bakterilerin EPS üretim özellikleri korunmuş olur. Mezofil LAB'lar EPS üretimi bulunan bir plazmidle ilişkilendirilir ve genetik bir kararsızlığın olması bu plazmidin kaybı olarak nitelendirilir (Macura ve Townsley 1984; Vedamuthu ve Neville 1986; von Wright ve Tynkkynen 1987; Neve vd. 1988; Vescovo vd. 1989). Yapılan çalışmalarda çok sayıda mukoz plazmidler tanımlanmıştır (Vedamuthu ve Neville 1986; von Wright ve Tynkkynen 1987; Neve vd. 1988; Vescovo vd 1989; van Kranenbug vd 1995). Vedamuthu ve Neville (1986) ile von Wright ve Tynkkynen(1987)'nin yaptıkları çalışmada mukoz plazmidleri *Lc. lactis* subsp. *cremoris*'ten, mukoz plazmidleri içermeyen *Lc. lactis* suşlarına transfer edebilmeyi başarmışlardır ve böylelikle mukoz plazmidlerinden yoksun suşlar viskoz yapıyı oluşturmayı başarabilmişlerdir. Diğer taraftan termofil LAB'larda ise EPS üretimi plazmid varlığıyla ilişkilendirilmemiştir (Cerning 1990; Cerning 1994). EPS sentezi için gerekli genlerin kromozomda yerleşmiş olduğu görülmektedir. *L. bulgaricus* ve *Str. thermophilus* için yukarıda bahsedilen her iki durumda geçerli olabilir (Mollet ve Delley1990; Roussel vd. 1994; Germond vd. 1995; Guedon vd. 1995).

LAB tarafından üretilen EPS'ler genellikle süt sanayisinde fermente ürünün teknolojik özelliklerinin geliştirilmesinde ve fonksiyonel ürünün üretilmesi için kullanılır (Werning vd. 2012).

2.2. Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi

EPS'lerin biyosentezi farklı büyüme fazlarında organizma ve çevre koşullarına bağlı olarak meydana gelmektedir (Cerning 1995). Biyosentez üzerine olan çalışmalar yeterli olmayıp EPS biyosentezinin anlaşılması için yoğun çalışma gerekmektedir. Homopolisakkaritler bakteriler tarafından ekstraselüler enzimler veya hücre yüzeyinde bulunan enzimler tarafından sentezlenir. Ancak heteropolisakkaritlerin sentezi daha karmaşıktır (Welman ve Maddox 2003). Heteropolisakkaritler sitoplazmik membranda hücre arası oluşmuş öncül maddeleri kullanılarak üretilmektedir. EPS sentezinde enzim ve düzenleyici proteinleri kodlayan genler görev yapmaktadır. Nükleotid fosfatlar EPS biyosentezi için öncül maddelerdir (Boels vd. 2001). Biyosentez 4 aşamada meydana gelmektedir.

2.2.1. Sitoplazma İçine Şeker Taşınımı

Mono ve disakkaritler mikroorganizmaların temel karbon kaynağıdır. Bu karbon kaynakların ortamdaki sitoplazmaya taşınımı birçok farklı kontrol proteinleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Şeker moleküllerinin hücre içine taşınması 3 farklı taşımayla yapılır. İlk taşıma sisteminde, ATP hidrolizi şeker taşıyan ATPaz tarafından şeker bağlanmaktadır. İkinci taşıma sisteminde, iyonlar ve diğer çözünenler alınır. Fosfoenolpirüvat (PEP)- Fosfotransferaz sistemi (PTS) üçüncü taşıma sistemi olup mikroorganizmalardaki en önemli şeker taşıma mekanizmasıdır. PEP-PTS sistemi çeşitli şeker substratlarının bağlanması, membrandan geçmesi ve taşınması ayrıca fosforilasyonundan sorumlu protein gruplarını içerir. Bu sistemde pirüvatkinaz enzimi PEP'yi pirüvata dönüştürerek bir fosfat grubu salınır. Laktozda ise iki yol mevcuttur. Her iki durumda da β -galaktosidaz varlığında glukoz ve galaktoz oluşturabilir veya laktoz-6-fosfat'ın fosfo- β -galaktosidaz varlığıyla galaktoz-6-fosfat ve glukoz oluşturabilmektedir. Glukoz glikolitik yolu veya fosfoketolaz yolu ile parçalanır (De Vust ve Degeest, 1999; Jolly vd. 2002; Welman ve Maddox, 2003).

2.2.2. Şeker-1-Fosfatların Sentezi

Çoğu şeker glikolizis sırasında şeker-6-fosfatlara dönüştürülerek indirgenir. Birkaç şeker-6-fosfatlar fosfoglukomutaz enzimiyle şeker-1-fosfatlara dönüştürülür. Şeker-1-fosfatlar UDP-glukoz ve dTDP-glukoz gibi şeker nükleotidlerin sırasıyla UDP-glukoz pirofosforilaz ve dTDP-glukoz pirofosforilaz oluşması için temel ürünlerdir. Galaktoz Leloir yolu ile galaktoz-1-fosfat aracılığıyla glukozla dönüştürülür. Şeker

nükleotidlerindeki ikinci ara madde fruktoz-6-fosfatın aminoşekerler aracılığıyla UDP-GlcNAc ve UDP-GalNAc oluşmasıdır. GDP-fukoz, fruktoz-6-fosfattan fruktoz-mannoz metabolizması aracılığıyla oluşur (Jolly vd. 2002; van Kranenburg vd. 1999)

2.2.3.Şeker Nükleotidlerin Sentezi ve Tekrarlayan Yapıların Polimerizasyonu

EPS biyosentezinde görev alan 2 gen grubu vardır. Bunlardan ilk grup şeker nükleotidlerin sentezlenmesini, ikinci grup ise EPS biyosentezinin gerçekleştirilmesini sağlar. İlk gen grubunun 'house keeping' olarak adlandırılmasındaki neden EPS biyosentezi için gerekli ve EPS için spesifik olmamasıdır. Şeker nükleotidleri şeker, yağ asidi ve nükleotid mekanizmasını içeren çeşitli metabolik yollarda gerekli olduğu için dikkat çekmektedir. EPS'ler UDP-glukoz, UDP-galaktoz ve dTDP-ramnoz'un öncül maddelerinden sentezlenmektedir. Bütün bu şeker nükleotidlerin öncül maddeleri glukoz-1-fosfattan galU, galE, rfbA, rfbB, rfbC, ve rfbD tarafından kodlanan bir dizi enzimler tarafından sentezlenmektedir. *Str. thermophilus* Sfi 6 (Stingele vd. 1996) ve *Lc. lactis* NIZO B40 (van Kranenburg vd. 1997)'dan EPS üretilmesini ve salgılanmasını sağlayan gen kümeleri tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. *Str. thermophilus* Sfi 6 suşunda EPS spesifik gen kümesi kromozom tarafından kodlanmakta olup 14,5 kb büyüklüğünde ve 13 gen kümesi içermekte, *Lc. lactis* NIZO B40'da ise plazmid tarafından kodlanmakta, 12 kb büyüklüğünde ve 14 gen kümesi içermektedir. EPS biyosentezi enerji tüketen bir süreç olup ve şekerin şeker fosfatlarına dönüşmesi için 1 ATP gerekmektedir (Madhuri ve Prabhakar 2014).

2.3. EPS Üretimini Etkileyen Faktörler

EPS'nin sentezlenmesi ve salgılanması farklı büyüme fazları boyunca meydana gelir ve sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi gelişme şartlarından etkilenir. Laktik asit ve propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin verimi gelişmenin dolaylı bir fonksiyonudur. Yapılan çalışmalar EPS'nin düşük sıcaklıklarda daha yüksek olduğunu göstermiştir. *Str. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un 42 °C'deki EPS üretimi'nin 32 ve 37 °C'deki EPS üretiminden düşük olduğu (Schellhaass 1983; Tegatz 1990; Mozzi vd. 1995) mezofil LAB bakterileri 30 °C yerine 25 °C'de inkübe edildiklerinde EPS üretiminin yaklaşık % 50 arttığı belirtilmiştir (Cerning vd. 1992). Bazı *Lc. lactis* subsp. *cremoris* suşları için 18 °C gibi düşük sıcaklık değerinin EPS sentezini artırmak uygun bulunduğu ifade edilmiştir (Kontusaari ve Forsen 1988). *Propionibacterium acidipropionici*

tarafından 25 °C’de üretilen EPS miktarı optimum sıcaklıkta üretilen EPS miktarından yüksek olduğu tespit edilmiştir (Racine vd. 1991).

Süt ve tahıl içeren fermantasyon ortamları daha hızlı ve kolay EPS izolasyonuna izin verir ve tek tek bileşenlerin EPS üzerine etkilerinin araştırılmasında kolaylık sağlar (Cerning 1995). *L. bulgaricus* bulunan ortama hidrolize kazein ilave edildiğinde EPS üretiminin ve gelişmenin arttığı rapor edilmiştir (Garcia-Garibay ve Marshall 1991). Schellhaass (1983)’e göre termofil ve mezofil LAB için ortamda bulunan kazein ve tahıl proteinlerinin varlığının gelişme ve EPS üretimine etkisi yoktur. Kazeinin EPS üretimini teşvikletici etkisi olduğu ancak *L. bulgaricus*’un gelişimini desteklemediği belirtilmiştir (Cerning 1986). Yapılan çalışmada *L. bulgaricus*’un ürettiği EPS miktarı sütte ve filtrelenmiş sütte aynı olmakla birlikte *Str. thermophilus* için aynı durum söz konusu değildir (Cerning vd. 1990).

2.4. EPS Üretim Enzimleri

Heteropolisakkaritler ve β -glukanlar glikoziltransferazlar tarafından nükleotid şekerlerin substrat olarak kullanılmasıyla üretilir. α -glukanlar ve fruktanlar glukansukrazlar tarafından sentezlenir. Sentezde büyüyen polisakkarit zincirine glukoz veya fruktoz bağlanması için sakkarozun glikozidik bağ enerjisini kullanması mümkündür. Ayrıca maltoz ve izomaltoz alınması durumunda bu enzimler oligosakkarit sentezleyebilir (Monsan vd. 2001). α -glukan polimerlerini sentezleyen enzimler glukansukrazlar (GS), fruktan sentezleyenler ise fruktansukraz (FS)’lar olarak isimlendirilir. Glikoziltransferazların aksine GS ve FS glikozil-hidrolazlar (GH)’la evrimsel, yapısal ve mekaniksel ilişkili transglikozidazlar, GH’nin ailelere sınıflandırılmasına göre (amino asit dizilerine göre) GS ve FS sırasıyla GH70 ve GH68 aileleri içerisinde yer almaktadır. (Henrissat vd. 1996). GS ve FS enzimleri aynı substrat üzerinde birbirine oldukça benzer reaksiyonları katalizlemelerine rağmen amino asit dizileri ve protein yapıları büyük benzerlikler göstermez (Korakli ve Vogel 2006). FS enzimlerinin mekanizması üzerine yeterli bilgi bulunmamaktadır. Fruktan biyosentezi çoklu uzama mekanizması tarafından büyüyen fruktan zincirine fruktoz ilave edilerek gerçekleşmektedir. Transfruktasilasyon hem nükleofilik hemde asidofilik ortamda ara fruktozil enzimlerine kovalent bağlarının oluşması aracılığıyla meydana gelir (Sinnott 1991; Monsan vd. 2001). Sukrozdan α -glukan biyosentezleyen ekstraselüler glikoziltransferaz (*gtf*) enzim aktivitesi çeşitli laktobasil türlerinde belirlenmiştir. Dizi analizleri laktobasillerin *gtf* genlerinin büyük varyasyonuna

sahip olduğu belirtmiş ve *Leuconostoc* ve *Streptococcus* suşları için gözlemlenenlerle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Krajl vd. 2003).

Glikoziltransferazlar prokaryot ve ökaryotlarda bulunan enzimlerdir. Oligosakkaritlerin, polisakkaritlerin ve glikokonjugatların biyosentezinde görev alır (Lairson vd. 2008). EPS üretiminden sorumlu çeşitli gen bölgeleri Şekil 2.1’de verilmiştir.

Gen bölgesi	F-primer 5'-3'	R-primer 5'-3'	Referans
EpsA	TAGTGACAACGGTTGTA CTG	GATCATTATGGAC TGTCAC	Low vd. 1998
Glikoziltransferaz	GAYGARYTNCNCARYT NWKNAAYGT	TGCAGCYTCWGC CACATG	Mozzi vd. 2003
Glukansukraz	GAYAAYWSIAAYCCIRYIGT IC	ADRTCICCRTARTAI AVIYKIG	Krajl vd. 2003
Fruktansukraz	GAYGTITGGGAYWSITG GC	TCITYYTCRTCISW IRMCAT	Tieking vd. 2003
EpsB	CGTACGATTCGTACGAC CAT	TGACCAGTGACA CTTGAAGC	Deveau ve Moineau 2003
Glizoziltransferaz	TCATTTTATTCGTAAAA CCTCAATTGAYGARYTN CC	AATATTATTACGA CCTSWNAYYTGC CA	Provencher vd. 2003
Glikoziltransferaz	TTGCCAAATATTGGAGG GGT	TTAATAGGCTCC AGTTGGA	Provencher vd. 2003
Glikoziltransferaz	CGGTAATGAAGCGTTTC CTG	GCTAGTACGGTA GACTTG	Werning vd. 2006
Fruktansukraz	GAYRTYTGGGAYWSNT GGC	GCWGANCCNGAC CATTSTTG	Bounaix vd. 2009
Dekstransukraz	GCATCTTCAATACTTG AGG	CATGACTTGTTGG CATAGC	Galle vd. 2010
Dekstransukraz	TGTGGATTCAGGACACC GTA	GGTTCAATCACG GCTAACG	Malang vd. 2015

Şekil 2.1. EPS biyosentezi ile ilgili primer çiftleri

2.5. EPS'nin Teknolojik Özellikleri

Gıda ürünlerinin çoğunun üretiminde yüksek molekül ağırlığına sahip polisakkaritler kıvam arttırıcı, stabilizatör, viskozite arttırıcı, emülsifiye edici ve jelleştirici

özelliklerinden dolayı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu polisakkaritlerin çoğu bitkisel (pektin, selüloz) ve yosun (alginat, karajenan) kaynaklıdır (Kleerebezem vd. 1999). Patojen *Xanthmanas campestris* ve *Sphingomonas paucimobilis*'ten elde edilen sırasıyla ksantam ve jellan FDA tarafından onaylanmış alternatif kıvam arttırıcı olarak kullanılabilen gıda katkılarıdır (Laws ve Marshall 2001a). Güvenilir miktarlar tüm gıda uygulamaları için uygun olmamasına rağmen, yeterli miktarda reolojik özellikleri ve sağlık üzerine destekleyici özellikleri geliştirir. Gıda katkı maddesi olarak kullanılacak bakteriyal polisakkaritlerin patojen olmayan bakteriler tarafından üretilmesi gerekmektedir. LAB'ların GRAS statüsünde yer alması ve ürettikleri EPS'lerin ise bir gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmesini sağlamıştır (Ruas-Madiedo vd. 2008). LAB gıda maddelerinde metabolik aktiviteleri ve bakteriyosin üretimi ve asit arttırıcı gibi koruyucu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (Wood 1997; Kuipers vd. 1998).

EPS'ler süt ürünlerinin tekstürü, ağız hissi, lezzet algısı ve yapısının korunmasında önemli rol oynar ve Kuzey Avrupa, Doğu Avrupa ve Asya'da fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanımı oldukça yaygındır. Fermente sütlerin üretiminde EPS üreten bakteriler geniş ölçüde kullanılmaktadır (De Vuyst vd. 2001; Ruas-Madiedo vd. 2002; Ruas-Madiedo ve Zoon 2003). İskandinav ülkelerinde 'langmjolk', 'lonfil' ve 'viili' gibi yoğurda benzer fermente süt ürünlerinin yanı sıra kefir, yoğurt ve düşük yağlı mozzarella ve çedar peyniri de bu ürünlere örnek verilebilir. (Ricciardi ve Clementi 2000; de Vuyst vd. 2001; Ruas-Madiedo vd. 2008). Özellikle Fransa ve Hollanda'da yoğurt üretiminde tekstür oluşumunu destekleyici katkı maddelerinin ilavesine izin verilmediği için, EPS üreten LAB kullanımı oldukça yaygındır. EPS üreten farklı türlerin kullanımı, üretilen EPS'nin cinsi, fermantasyon şartları ve toplam kuru madde içeriği gibi sebepler viskoziteyi etkilemektedir. Ayrıca viskozite sadece EPS miktarından etkilenmez, biraz daha farklı bir yapıya sahip EPS içeren bileşenlerden de etkilenmektedir. Viskozite ve EPS arasındaki kompleks ilişki zaman önce tanımlanmıştır (Schellhaass ve Morris 1985; Tegatz ve Morris 1990). Mukoz EPS'ler sadece kazeinle etkileşmeyip aynı zamanda bakteri yüzeyine tutunur. EPS ve bakteri etkileşimi ile su salma meydana gelir. Bu yüzden pıhtısı kırılmış yoğurt üretiminde önem teşkil etmektedir (Cerning 1995). LAB tarafından üretilen EPS'lerin tat ve tekstür üzerine faydaları iyi bilinmektedir. Çünkü LAB süt ürünlerinin teknolojik özelliklerini geliştirmek için polimerler üretmektedir. Gıdalara ilave edildiklerinde kıvam arttırıcı, stabilizatör, emülsifiye edici, jelleştirici ve su bağlayıcı olarak görev yapar (Kimmel vd. 1998). İlave edildikleri süt ve süt ürününün korunmasını sağlar ayrıca lezzet ve aroma gibi duyuşal özelliklerini geliştirir (Macedo vd. 2002).

Hassan vd. (1996) tarafından yapılan araştırmada jelleştirici kültürlerle üretilen yoğurtların su salma oranlarında azalma gözlenmiştir. Ticari kültüre (% 1,5) ek olarak EPS retimi belirlenmiş *L. bulgaricus* B3 ve *Str. thermophilus* W22 suşları ile üretilen yoğurtlarda daha yüksek EPS retimi olduğunu ifade etmişlerdir. Viskozite değerleri aınsındanda bu suşların kullanıldığı yoğurtların daha kıvamlı olduğu belirtilmiştir (Gürsoy vd. 2006). Van Geel- Schutten vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada EPS üretimleri incelenen 182 adet *Lactobacillus* suşundan 60 tanesinin EPS ürettiği, bunlardan 17 suşun EPS üretiminin 100 mg/L'den fazla olduğu belirtilirken, EPS retimi için en uygun bileşenin sakkaroz olduğu kaydedilmiştir. Faber vd. (1998) *Str. thermophilus* Rs ve St suşları tarafından 135 mg/L ve 127 mg/L EPS üretildiği belirtmiştir. Kılıç vd. (2003) tarafından ise *L. bulgaricus* IFR2772 ve *Str. thermophilus* IFR859 suşlarının EPS miktarlarının sırasıyla 0,262 mg/mL ve 0,374 mg/mL olduğu kaydedilmiştir.

Shihata ve Shah (2002) proteolitik özellikteki *L. bulgaricus*'un ticari ABT başlatıcı kültürler (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* türleri ve *Str. thermophilus*) ile birlikte kullanıldığında yoğurt özellikleri üzerine etkilerini incelemişler ve bu kültürlerin farklı kombinasyonlar şeklinde kullanılması ile yoğurt örneklerindeki EPS miktarının 2,76 - 3,64 g/100 g arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Tahıl kaynaklı *L. frumanti* TMW 1.103 ve bağırsak kaynaklı *L. sanfranciscensis* LHT 2590 suşlarının sukroz içeren ortamda EPS retimlerinin sırasıyla 0,5 g/kg ve 2 g/kg olduğu tespit edilmiştir (Tieking vd. 2003). Purwandari vd. (2007) *Str. thermophilus* ST 285 ve ST 1275 suşlarını kullanarak, farklı sıcaklıklarda ürettikleri set tipi yoğurtların depolama süresi boyunca teknolojik ve reolojik özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan alışmada ST 1275 suşu ile üretilen yoğurtların asitliliğinin daha hızlı geliştiği, düşük sineresiz ve yüksek akış indeksine sahip olduğu belirtilmiştir. EPS alkol fermantasyonu ile hazırlanan içeceklerin duyuusal özellikleri üzerinde bir takım olumsuzluklar meydana getirmektedir. EPS reten LAB elma şarabı (Fernandez vd. 1996), zm şarabı (Llauberes vd. 1990) ve bira (Van Oevelen ve Verachtert 1979) yapımında kullanıldığında viskoz, kalın tekstürü ve yağlılık hissinden dolayı snme ve yağlılığa sebep olmuştur. Bu snme ve yağlılık ürünün tadını istenmeyen şekilde değiştirdiği için hoş olmayan his vermiştir. Ekşi hamur fermantasyonu pişirmede aromanın ve tekstürün geliştirilmesinde, raf ömrünün artmasında ve minerallerin biyoyarayışlığında önemli rol oynar (Hammes ve Ganzle 1998; Clarke ve Arendt 2005). Fermantasyon sırasında laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, uçucu bileşiklerin ve antimikrobiyal maddelerin sentezi gibi birçok metabolik aktivite gerekleşiş (Gobbetti vd. 2005). Hamur fermantasyonu sırasında diğer bir metabolik aktivite EPS retimidir

(Korakli vd. 2001; Tieking vd. 2003; Di Cagno vd. 2006; Lacaze vd. 2007; Van der Meulen vd. 2007). Hamurda EPS üreten LAB kullanıldığında hamur reolojisi ve ekmek tekstürünün geliştirme potansiyeli olduğunu ayrıca hidrokolloidlerin yerine alabileceği veya hidrokolloid kullanımını azaltacağı rapor edilmiştir (Tieking vd. 2003; Tieking vd. 2005; Lacaze vd. 2007).

EPS hem son ürünün tekstürünü ve reolojik özelliklerini geliştirerek, hem de su bağlayarak stabilizatör olarak sinerezisi sınırlandırır. Fiziksel ve teknolojik özellikleri EPS polimerlerinin kimyasal kompozisyonu, moleküler büyüklüğüne, miktarına, dallanmış yapılarına, molekül sertliğine ve 3 boyutlu yapısına bağlı olarak değişmektedir. Fiziksel karakteristiklerine ilaveten EPS ve çeşitli yapılar arasındaki etkileşimler son ürünün gelişmesine katkı sağlarlar. Bu yüzden yapılan çalışmalar fermente süt ürünlerinin reolojik özelliklerini EPS miktarı ile ilişkilendirilmiştir (de Vuyst vd. 2001; Duboc ve Mollet 2001; Folkenberg vd. 2006).

Düşük ortam maliyetleri ve kolay izolasyon yöntemleri gibi oluşumlar EPS'lerin gıda katkı maddeleri olarak uygulamaları için gereklidir. Bu nedenle LAB tarafından üretilen EPS'ler bitki veya GRAS statüsünde yer almayan bakteriler tarafından üretilen biyopolimerlerin kullanımına alternatif olmaktadır. Özellikle heteropolisakkarit üreten LAB süt sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri ürünün tekstür ve duyu özelliklerini geliştirir. Fırıncılık sanayisinde ekşi hamur üretiminde *Lactobacillus* veya *Weissella* tarafından üretilen glukan ve fruktan kullanımı yaygınlaşmaktadır (Tieking vd. 2003). Tahıl kaynaklı substratların kullanılması durumunda yüksek besin değerine sahip ve çözünebilir ve çözünmez diyet lifi içeren ürün haline gelmesiyle fermente süt ürünlerine alternatif olarak değerlendirilmektedir (Angelov vd. 2005; Martensson vd. 2005).

Yapılan bir çalışmada *Pediococcus parvulus* 2.6 ve *L. diolivorans* G77 suşları yulaf kaynaklı substratta gelişip, EPS üretebilmiş ayrıca fermente ürünün tekstür ve viskozitesini geliştirmiştir (Martensson vd. 2003). *P. parvulus* 2.6 tarafından sentezlenen β -glukanın teknolojik analizinde potansiyel doğal kıvam artırıcı olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Velasco vd. 2009).

Farklı *P. parvulus* suşlarının bulunduğu ortamların viskozitelerindeki farklılıklar üretilen β -glukanın moleküler kütlesi ve temel yapısındaki farklılıklara dayandırılmaz (Garai-Ibabe vd. 2010). EPS ve ortamın mikro yapısı arasındaki EPS konfirmasyonu ve etkileşimi gibi diğer faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle, muhtemelen yakın gelecekte, β -glukan üreten LAB'ların süt olmayan fermente gıdaların hazırlanmasında

kullanılması planlanmaktadır. Ayrıca jelleştirme özelliğinden dolayı β -glukanın gıda katkı maddesi olarak kullanılabilceğı ifade edilmiştir (Werning vd. 2012).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada insan dışkı örneklerinden izole edilmiş, 16s rRNA dizi analizi ile genetik tanısı gerçekleştirilmiş ve probiyotik özellikleri araştırılmış 20 adet *Lactobacillus plantarum*, 15 adet *L. fermentum*, 19 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. durans* suşu kullanılmıştır (Başyiğit, 2004; Başyiğit Kılıç ve Karahan, 2010; Başyiğit Kılıç vd., 2013).

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültürlerin Hazırlanması

Dondurulmuş stok kültürden 0,5 ml alınarak 10 ml de MAN Rogosa Sharp (MRS) besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C’de 18 saat inkübe edilerek stok kültürler, EPS üretiminin belirlenmesi için laktoz-semi-defined medium (L-SDM) besiyerine inoküle etmek için hazırlanmıştır.

L-SDM besiyerinin içeriği; 36 g/l laktoz monohidrat (Merck, Almanya), 10 g/L kazein peptonu (Merck, Almanya), 5 g/l maya nitrojen bazı (Fluka, Hindistan), 1 g/l Tween 80 (Merck, Almanya), 5 g/l sodyum asetat (Merck, Almanya), 0.2 g/l magnezyum sülfat heptahidrat (Merck, Almanya) ve 0,05 g/l manganez sülfat monohidrat (Merck, Almanya) ile hazırlanmıştır (Mende vd. 2012).

3.2.2. Hücre Sayısının ve Biyokütle Miktarının Tespiti

Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi ve pasajlanmasında da Man Rogosa Sharp (MRS, Merck, Almanya) sıvı besiyeri kullanılmıştır. MRS agar besiyeri MRS sıvı besiyerine % 1,5 agar-agar (Merck, Almanya) ilave edilerek hazırlanmıştır. Biyokütlenin hesaplanması ve EPS saflaştırılmasında Lactose semi-defined medium (L-SDM) kullanılmıştır.

Türbiditesi McFarland 0,8’e ayarlanmış kültürlerden L-SDM besiyerine % 1 oranında inokülasyon yapıp, 37 °C’de 18 saat inkübasyondan sonra gelişen bakterilerden hücre sayılarını belirlemek amacıyla seri dilüsyonlardan MRS agar besiyerine Damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır. Aynı zamanda MRS ve L-SDM sıvı besiyerlerindeki 37 °C ve 18 saat sonunda gelişen 55 adet LAB’ın pH değerleri pH metre (Mettler Toledo, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür.

Biyokütlenin belirlenmesi amacıyla 40 ml L-SDM besiyerinde gelişmiş 18 saatlik kültür 1900 x g'de 20 °C'de 15 dakika santrifüjlendikten (Allegra® X-22 Ambient Benchtop Centrifuge, Beckman Coulter, ABD) sonra, hücreler iki kere 10 ml steril destile ultra saf su ile yıkanmıştır. Liyofilize (Christ Freeze Dryer - Alpha 1-2 LD, Almanya) edilerek tartılmıştır (Mende vd., 2012).

3.2.3. Moleküler Tekniklerle *eps* Genlerinin Tespiti

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen DNA 75 µl yıkama çözeltisi içerisinde toplanmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Çözündürülen DNA örneklerinin saflıkları ve miktarları nanodropta (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, ABD) 260 ve 280 nm'de ölçülerek tespit edilmiştir.

3.2.3.2. Primer Seçimi ve Sentezi

Lactobacillus türleri Fruktansukraz (Tieking vd. 2003), *Enterococcus* türleri ise glikoziltransferaz (Provencher vd. 2003) gen bölgesine spesifik primerler ile taranmıştır.

Fruktansukraz-F: 5'-GAYGTITGGGAYWSITGGC-3'

Fruktansukraz-R: 5'-TCITYYTCRTCISWIRMCAT-3'

Glikoziltransferaz F: 5'-TCATTTTATTCGTAACCTCAATTGAYGARYTNCC-3'

Glikoziltransferaz R: 5'-AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA-3'

Primer çiftleri BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. (Ankara) tarafından sentezlenmiştir.

3.2.3.3. PZR Karışımının Hazırlanması

PZR karışımının hazırlanması Mozzi vd. (2006) çalışmalarının optimizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 25 µl PZR karışımı için; DNA 2.5 µl, 10X KCl Buffer 2.5 µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD), 25mM MgCl₂ 2.5 µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD), steril deiyonize su 14 µl, F-primer 0.5 µl, R-primer 0.5 µl ve dNTP karışımı (2mM her biri için) 2.5 µl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Primer dizilerindeki GC oranlarının farklı olması sebebiyle ilave edilen *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimleri farklı miktarlarda

ilave edilmiştir. *Taq* DNA polimeraz *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türleri için sırasıyla 7.5 ve 2.5 U kullanılmıştır.

3.2.3.4. PZR Koşulları ve Agaroz Jel Elektroforezi

PZR çalışmaları için Bio-Rad T100 Thermal Cycler kullanılmıştır. Fruktansukraz ve glikoziltransferaz gen bölgeleri için sırasıyla 95 °C 5 dakika, (95 °C 45 saniye, 42.4 °C 90 saniye, 72 °C 45 saniye) x 35 döngü, 72 °C 7 dakika ve 95 °C 3 dakika, (95 °C 45 saniye, 55°C 60 saniye, 72 °C 45 saniye) x 35 döngü, 72 °C 7 dakika protokolleri kullanılmıştır.

PZR ürünleri beklenen ampikon boyutuna göre %1-2 agaroz (Sigma, ABD) jelde 1XTAE buffer (0.04 M Tris-asetate, 0.001 M EDTA) içerisinde hazırlanarak yatay elektroforez sisteminde (Bio-Rad) 90 V'de 40 dakika yürütülmüştür. 100 bp DNA ladder (Fermentas SM0242) ve 1 kb DNA ladder (Fermentas SM0311) kullanılmıştır. Toksik olmayan GelRed (Biotium) boyası ile boyanan jel, görüntüleme sisteminde (Bio-Rad, Gel Doc Ez Imager) görüntülenmiştir.

3.2.4. EPS'nin Ekstraksiyonu ve Miktarının Belirlenmesi

EPS'nin ekstraksiyonu ve miktarının belirlenmesi amacıyla biyokütle ve şeker üretimi en yüksek 6 adet *L. plantarum* suşu (AC10-40, AB16-65, AC21-1031, AK4-11, AK6-27 ve BK10-48), 8 adet *L. fermentum* suşu (AB5-18, BB16-75, AC18-87, BB19-90, AK2-8, AK5-22, AK6-26 ve BK10-44) ve 6 adet *E. faecium* suşu (BK9-42, AB19-95, AK4-16, BK8-36, BK11-50 ve 98) seçilmiştir

EPS ekstraksiyonu Tallon vd. (2003) tarafından belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu amaçla 50 ml'lik MRS sıvı besiyerinde 37 °C'de geliştirilen 18 saatlik aktif kültür 15.000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir (Sigma 2-16KL, Almanya). Hücreler % 0,5'lik NaCl (Merck, Almanya) çözeltisi ile yıkanarak, tekrar santrifüjlenmiştir. Hücrelere 10 ml 1M NaCl (Merck, Almanya) ilave edilip, 40 W'da 3 dakika sonikasyon uygulaması yapılmıştır. Bu karışım 30 dk'da 5000 x g'de santrifüjlenmiş ve çözünmeyen maddeler uzaklaştırılmıştır. Süpernatanttan EPS'ler 2 hacim soğuk %96'lık etanol ile çöktürülerek, distile suya karşı diyalize (Visking ® dialysis tubing 36/32, Almanya) bırakılmış sonra, liyofilize edilmiştir. Liyofilize örnekler son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde distile su ile çözündürülmüştür. EPS sıcak fenol ekstraksiyon uygulaması ile saflaştırılmıştır (Westphal ve Jann, 1965). Ultra saf doyurulmuş fenol tamponu, her örneğin hacmine eşit olacak şekilde örneklerle dağıtılmıştır. Örnekler 70 °C su banyosunda 70 dakika inkübe

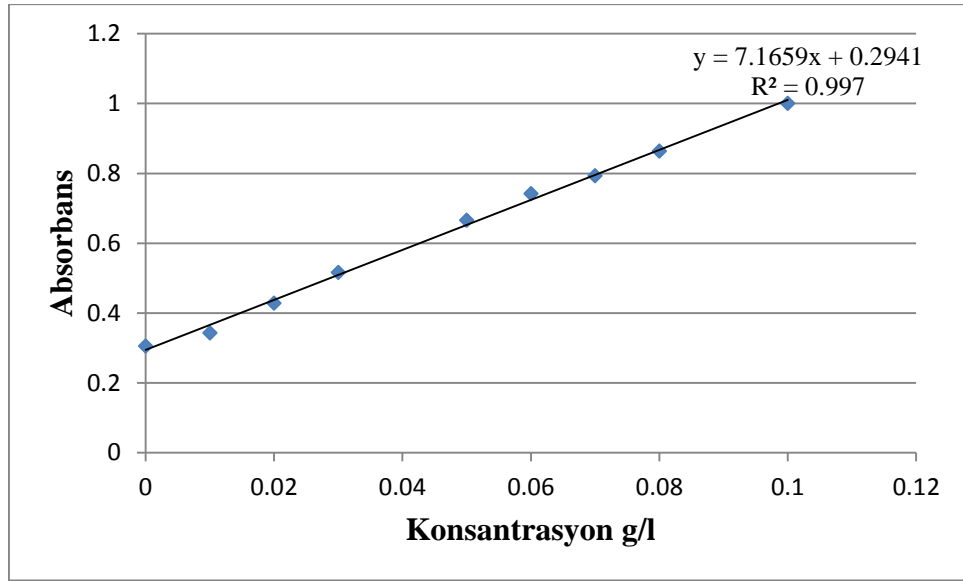
edilmiş, 30 dakika boyunca buz üzerinde soğutulan örnekler 4 °C'de 5000 x g'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Sulu kısım süzildükten sonra örnekler tekrar liyofilize edilip ve tartılmıştır.

3.2.5. Toplam Şeker Miktarının Tespiti

Toplam şeker miktarının belirlenmesi amacıyla MRS besiyerinde 37 °C'de geliştirilmiş 18 saatlik kültür su banyosunda 15 dakika kaynatılmıştır. Kültür oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne 1 ml örnek alınıp, üzerine 900 µl %85'lik TCA (Triklorasetik asit, Molekula, İngiltere) ilave edilmiştir. 13000 x g'de 25 dakika santrifüjleme işleminden sonra, süpernatant uzaklaştırılmış ve etil alkol (Merck, Almanya) ilave edilip tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Santrifüjleme sonunda etanol hızlıca ve dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pellet 1 ml ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür.

EPS miktarını belirlemek için glukoz (Merck, Almanya) standart kurvesi ile fenol-sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır. 0,1 g glukoz 1 L ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Deiyonize su ile glukoz çözeltisi çeşitli oranlarda (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 ve 0:10) karıştırılarak farklı konsantrasyonlar elde edilmiştir. Steril inoküle edilmemiş besiyeri kör olarak kullanılmıştır. Bütün deneyler iki paralelli yapılmıştır.

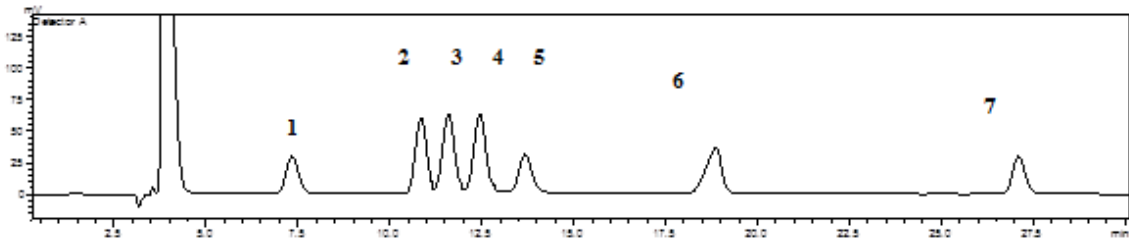
Kurve çizmek için glukoz-su karışımından 1 ml alınıp 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Örneğin üzerine önce 0,5 ml %5'lik fenol çözeltisi ilave edildikten sonra dikkatlice 5 ml sülfirik asit (Merck, Almanya) ilave edilmiştir. Tüpler 30 °C'de 20 dakika bekletilmiş olup sonra 490 nm absorbans değeri ölçülerek (T8+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd. İngiltere) kurve elde edilmiştir (Dubois vd., 1956).



Şekil 3.1. Toplam şeker tayini için glukoz kalibrasyon grafiği

3.2.6. Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi

Örneklerin hazırlanması 3.2.4. kısımda belirtildiği gibi, liyofilize edilen örneklerden yaklaşık 0,5 g tartılarak 1 mL mobil faz (metanol:su, 80:20) içerisinde çözüldürülerek 0,45 mikron filtreden geçirilerek yapılmıştır. Analizde LC20 AT pompaya sahip RID-10 A dedektörlü Shimadzu Prominence Marka HPLC (Tokyo, Japonya) sistemi kullanılmıştır. Analiz 1,3 ml/dk akış hızında, 20 µl enjeksiyon hacminde, 30 °C kolon sıcaklığında olmuştur. Kolon firması olarak CTO-10ASVp ve Inertsil NH2-5 µm 250 mm *4,6mm kolonu kullanılmıştır. Sonuçlar LC Solution bilgisayar paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Miktar tayini için kullanılan şeker standartları; glukoz, mannoz, galaktoz, ramnoz, fruktoz, sukroz ve laktozdur. Her örnek için 2 paralelli analiz yapılmıştır (Anonim 2008). Sonuçlar mg/L olarak ifade edilmiştir. Standart kromatogramı ve standartların alıkonma süreleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1).



Şekil 3.2.Standartların kromatogramı (1: ramnoz, 2: fruktoz, 3: mannoz, 4: glikoz, 5: galaktoz, 6: sukroz ve 7: laktoz)

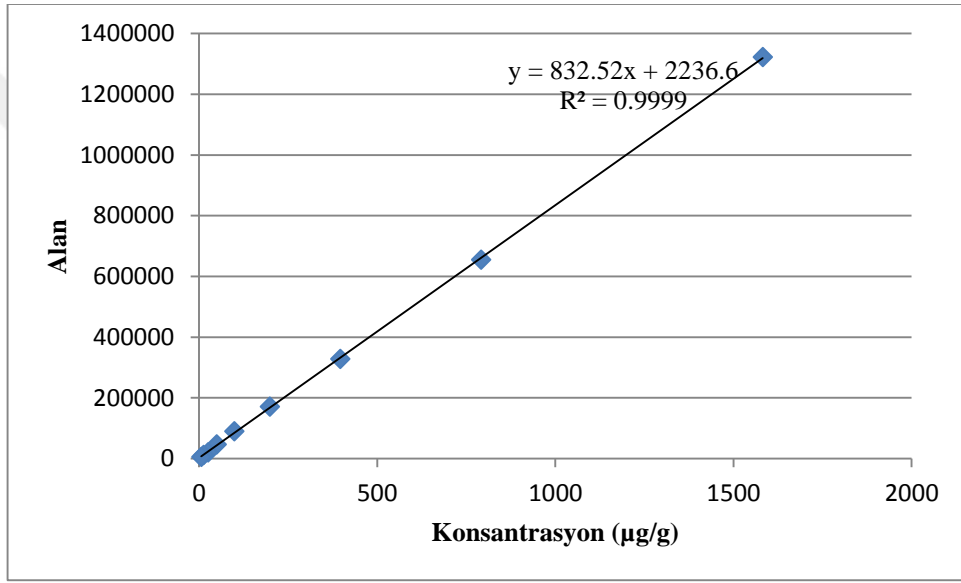
Çizelge 3.1. Standartlara ait LOD ve RTdeğerleri

Bileşen	LOD ^a (ppm)	RT ^b (dk)
Ramnoz (1)	2,26	7,5
Fruktoz (2)	1,82	10,8
Mannoz (3)	0,85	11,4
Glukoz(4)	2,11	12,6
Galaktoz (5)	3,80	13,6
Sukroz (6)	2,70	18,7
Laktöz (7)	1,52	27,3

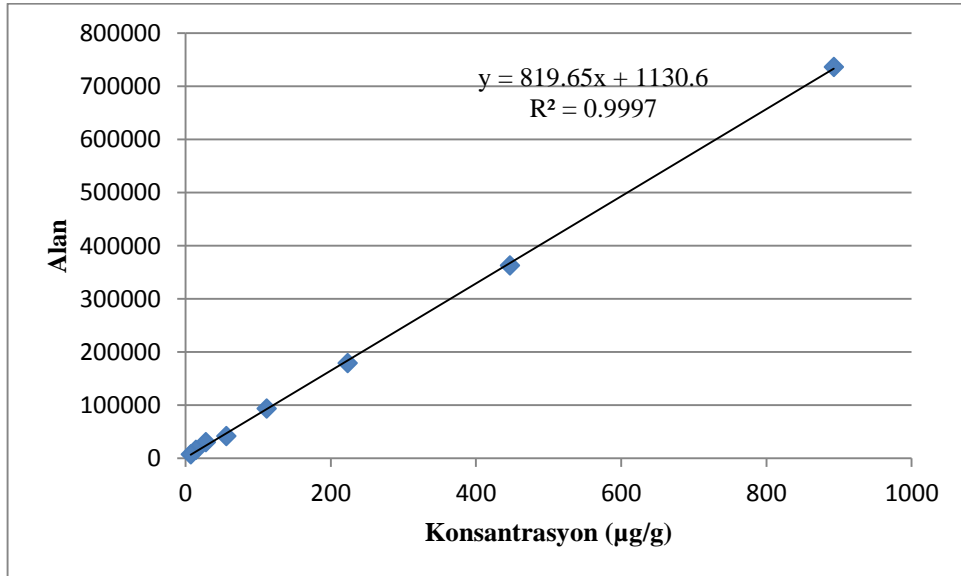
^aLOD: Deteksiyon sınırı

^bRT: Alıkonma süresi

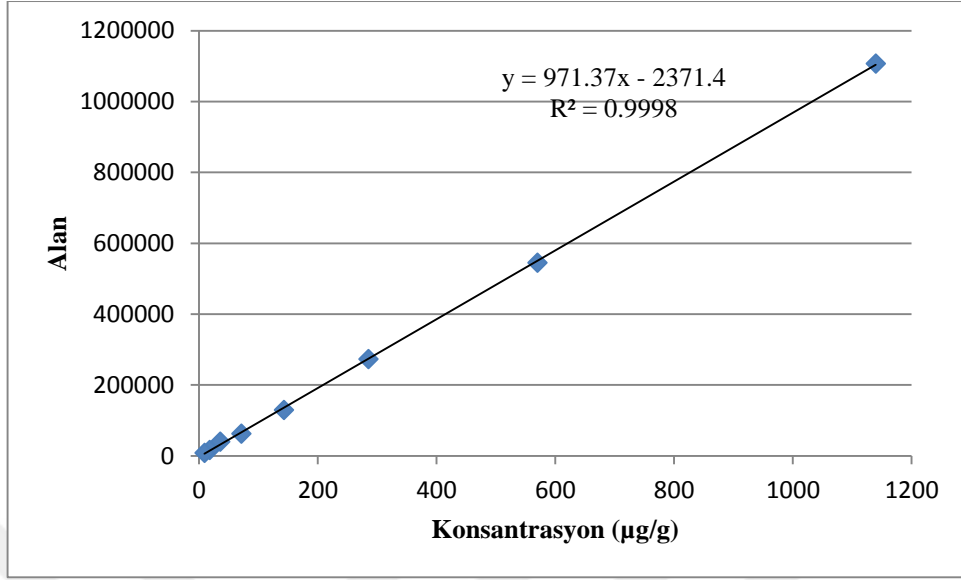
Şekerlere ait kalibrasyon grafikleri aşağıda verilmiştir. (Şekil 3.3.-Şekil 3.9.)



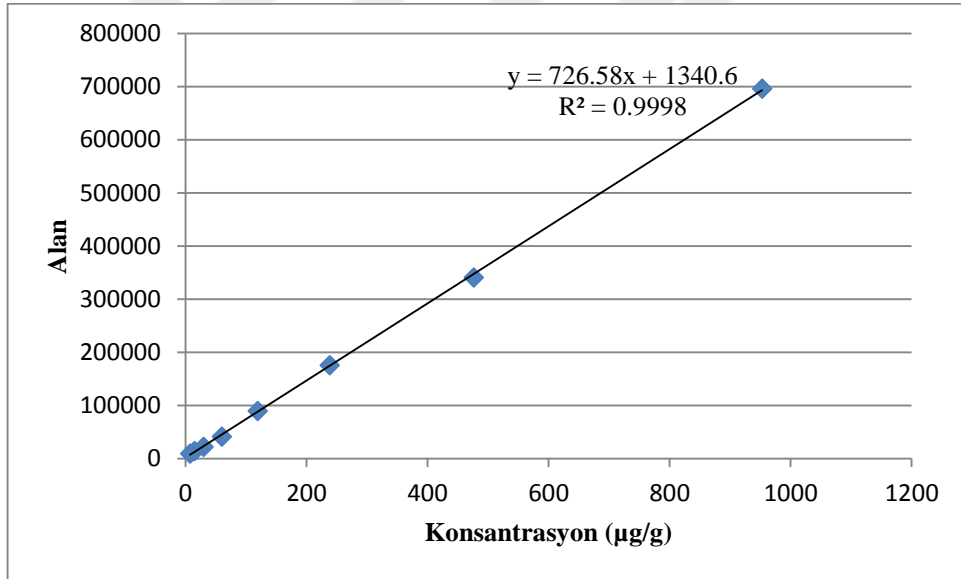
Şekil 3.3. Standart fruktoz kalibrasyon grafiği



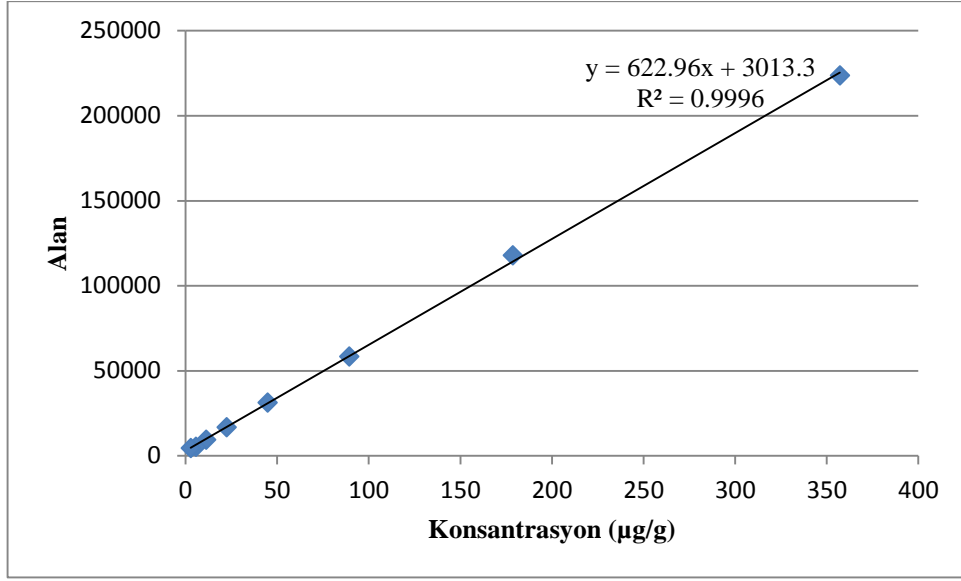
Şekil 3.4. Standart glukoz kalibrasyon grafiği



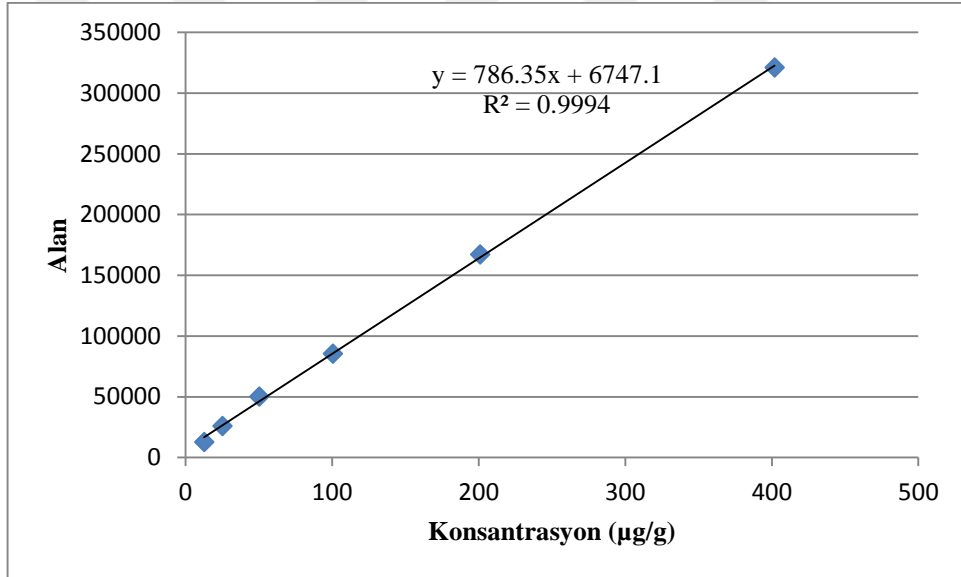
Şekil 3.5. Standart sukroz kalibrasyon grafiği



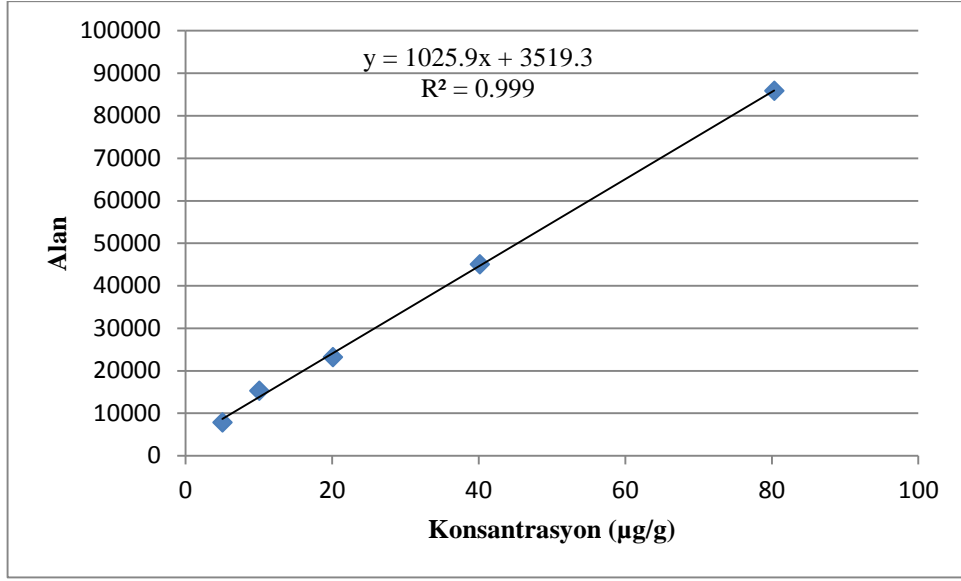
Şekil 3.6. Standart ramnoz kalibrasyon grafiği



Şekil 3.7. Standart mannoz kalibrasyon grafiği



Şekil 3.8. Standart galaktoz kalibrasyon grafiği



Şekil 3.9. Standart laktoz kalibrasyon grafiği

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. LAB Sayımı, Biyokütle ve pH Sonuçları

LAB'dan 3.2.2 belirtildiği şekilde uygun dilüsyonlardan MRS agar'a ekim yapılmıştır. *L. plantarum*, *L. fermentum* ve enterokok suşlarının sayım sonuçları sırasıyla sırasıyla $8,2 \times 10^4$ – $7,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ – $2,4 \times 10^7$ ve $2,1 \times 10^6$ – $1,1 \times 10^7$ KOB/mL arasında belirlenmiştir. Çalışılan *L. plantarum* suşlarının 10 adedinin sayım sonucu 10^6 , 9 adedinin 10^5 , 1 adedinin ise 10^4 KOB/mL düzeyinde tespit edilmiştir. *L. fermentum* suşlarının 5 adedi 10^7 düzeyinde iken, kalanı 10^6 KOB/mL düzeyindedir. Enterokok suşlarından ise sadece *E. faecium* AK2-8 10^7 düzeyinde belirlenirken diğerleri 10^6 KOB/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1. *L. plantarum* türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)

Bakteri ismi	Hücre Sayısı	Bakteri ismi	Hücre Sayısı
<i>L. plantarum</i> AA-1-2	$5,3 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> BC18-81	$8,3 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AC3-10	$6,2 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AC18-82	$3,3 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AC3-14	$7,0 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AB20-961	$5,5 \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> AB6-25	$6,8 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AC21-101	$7,0 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AC3-27	$2,6 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AC21-1031	$4,9 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AB7-35	$1,1 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AK4-11	$7,8 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AC10-40	$8,2 \times 10^4$	<i>L. plantarum</i> AK6-27	$6,7 \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> AA13-59	$6,0 \times 10^6$	<i>L. plantarum</i> AK7-28	$2,8 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AB16-65	$3,1 \times 10^5$	<i>L. plantarum</i> AK8-31B	$1,9 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> AA17-73	$4,8 \times 10^5$	<i>L. plantarum</i> BK10-48	$1,9 \times 10^6$

Çizelge 4.2. *L. fermentum* türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)

Bakteri ismi	Hücre Sayısı	Bakteri ismi	Hücre Sayısı
<i>L. fermentum</i> AC3-13	$5,9 \times 10^6$	<i>L. fermentum</i> AK5-22	$1,0 \times 10^7$
<i>L. fermentum</i> AB5-18	$6,5 \times 10^6$	<i>L. fermentum</i> AK6-26	$5,5 \times 10^6$
<i>L. fermentum</i> AB5-20	$1,5 \times 10^7$	<i>L. fermentum</i> BK10-44	$7,6 \times 10^6$
<i>L. fermentum</i> BB16-75	$1,4 \times 10^7$	<i>L. fermentum</i> BK10-46	$3,5 \times 10^6$
<i>L. fermentum</i> AC18-87	$2,3 \times 10^7$	<i>L. fermentum</i> BK13-56	$2,5 \times 10^6$
<i>L. fermentum</i> BB19-90	$5,2 \times 10^6$	<i>L. fermentum</i> AK4-180	$2,0 \times 10^6$
<i>L. fermentum</i> AB21-107	$2,4 \times 10^7$		
<i>L. fermentum</i> AK2-8	$6,7 \times 10^6$		
<i>L. fermentum</i> AK3-10	$8,9 \times 10^6$		

Çizelge 4.3. *Enterococcus* subsp. türlerine ait sayım sonuçları (KOB/mL)

Bakteri ismi	Hücre Sayısı	Bakteri ismi	Hücre Sayısı
<i>E. durans</i> AB7-32	3,2 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> AC21-105	3,6 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> BC8-36	2,1 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> AK4-14	5,4 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AK2-8	1,1 x 10 ⁷	<i>E. faecium</i> AK4-16	8,4 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AK2-7	5,4 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> 50B	7,7 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AB7-30	8,5 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> AK6-24	6,2 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AB16-66	5,9 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> BK8-36	5,9 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AA13-51	3,4 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> BK10-47	6,2 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AB16-66	2,3 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> BK11-50	6,6 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> BK9-42	6,5 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> BC18-78	5,2 x 10 ⁶
<i>E. faecium</i> AB19-95	5,1 x 10 ⁶	<i>E. faecium</i> 98	6,2 x 10 ⁶

Yapılan araştırmada *L. plantarum* suşları içerisinde *L. plantarum* AC21-1031'in 22925 ve *L. plantarum* AK4-11'in 13575 mg/L ile en yüksek biyokütleyle sahip olduğu, diğer suşlarda biyokütle miktarının 225 ile 975 mg/L arasında değiştiği, sadece *L. plantarum* AC18-82'nin biyokütlesinin 25 mg/L olduğu tespit edilmiştir. *L. fermentum* suşlarının biyokütle miktarı ise 650 ile 3375 mg/L arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Çalışılan 15 adet suşun 5 adedinin biyokütle miktarı 650 - 900 mg/L arasında değişirken, diğerleri 1050 – 3775 mg/L arasında belirlenmiştir. *Enterococcus* suşlarının ise 225 ile 650 mg/L ile diğer türlere kıyasla daha düşük EPS üretim yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. *L. plantarum* türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L)

Bakteri ismi	Biyokütle	Bakteri ismi	Biyokütle
<i>L. plantarum</i> AA-1-2	275	<i>L. plantarum</i> BC18-81	500
<i>L. plantarum</i> AC3-10	825	<i>L. plantarum</i> AC18-82	25
<i>L. plantarum</i> AC3-14	225	<i>L. plantarum</i> AB20-961	550
<i>L. plantarum</i> AB6-25	325	<i>L. plantarum</i> AC21-101	800
<i>L. plantarum</i> AC3-27	675	<i>L. plantarum</i> AC21-1031	22925
<i>L. plantarum</i> AB7-35	425	<i>L. plantarum</i> AK4-11	13575
<i>L. plantarum</i> AC10-40	525	<i>L. plantarum</i> AK6-27	425
<i>L. plantarum</i> AA13-59	300	<i>L. plantarum</i> AK7-28	250
<i>L. plantarum</i> AB16-65	975	<i>L. plantarum</i> AK8-31B	675
<i>L. plantarum</i> AA17-73	825	<i>L. plantarum</i> BK10-48	800

Çizelge 4.5. *L. fermentum* türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L)

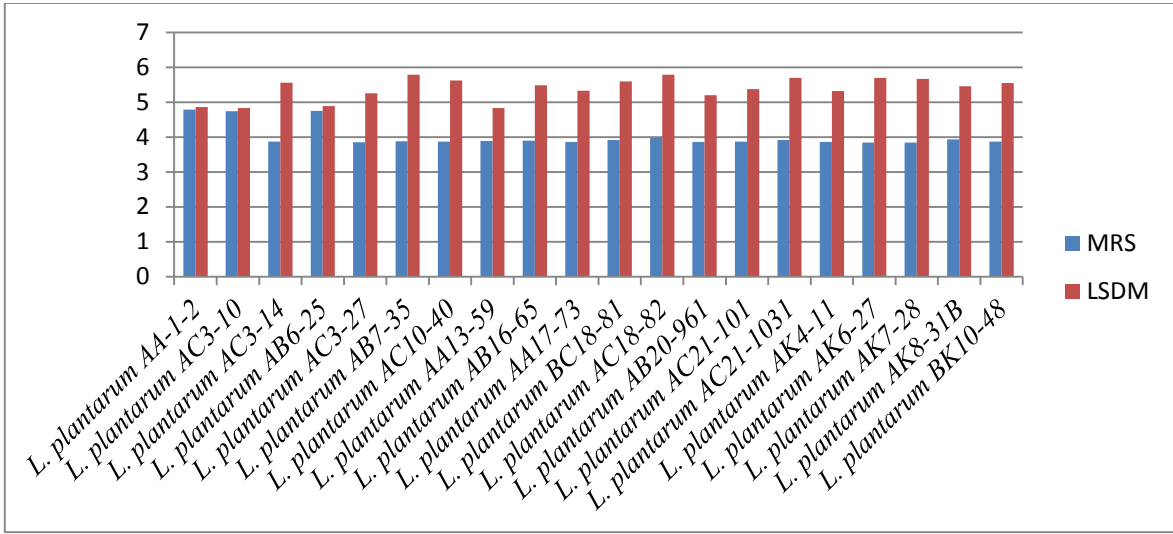
Bakteri ismi	Biyokütle	Bakteri ismi	Biyokütle
<i>L. fermentum</i> AC3-13	1050	<i>L. fermentum</i> AK5-22	2550
<i>L. fermentum</i> AB5-18	1200	<i>L. fermentum</i> AK6-26	1325
<i>L. fermentum</i> AB5-20	900	<i>L. fermentum</i> BK10-44	2050
<i>L. fermentum</i> BB16-75	2275	<i>L. fermentum</i> BK10-46	775
<i>L. fermentum</i> AC18-87	2650	<i>L. fermentum</i> BK13-56	650
<i>L. fermentum</i> BB19-90	3050		
<i>L. fermentum</i> AB21-107	3775		
<i>L. fermentum</i> AK2-8	2400		
<i>L. fermentum</i> AK3-10	725		
<i>L. fermentum</i> AK4-180	750		

Çizelge 4.6. *Enterococcus* subsp. türlerine ait biyokütle sonuçları (mg/L)

Bakteri ismi	Biyokütle	Bakteri ismi	Biyokütle
<i>E. durans</i> AB7-32	225	<i>E. faecium</i> AC21-105	525
<i>E. faecium</i> BC8-36	275	<i>E. faecium</i> AK4-14	600
<i>E. faecium</i> AK2-8	400	<i>E. faecium</i> AK4-16	650
<i>E. faecium</i> AK2-7	475	<i>E. faecium</i> 50B	525
<i>E. faecium</i> AB7-30	275	<i>E. faecium</i> AK6-24	525
<i>E. faecium</i> AB16-66	575	<i>E. faecium</i> BK8-36	475
<i>E. faecium</i> AA13-51	600	<i>E. faecium</i> BK10-47	475
<i>E. faecium</i> AB16-66	375	<i>E. faecium</i> BK11-50	450
<i>E. faecium</i> BK9-42	475	<i>E. faecium</i> BC18-78	575
<i>E. faecium</i> AB19-95	500	<i>E. faecium</i> 98	575

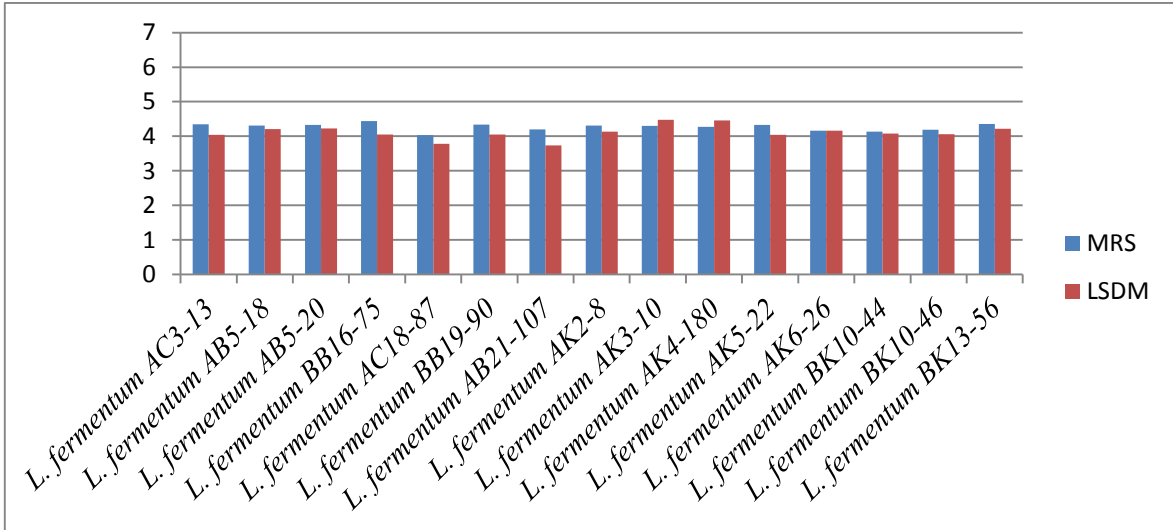
Çalışmamızda pH değerleri MRS ve LSDM sıvı besiyeri olmak üzere iki farklı ortamda ölçülmüştür.

Çizelge 4.7. *L. plantarum* türlerine ait pH sonuçları



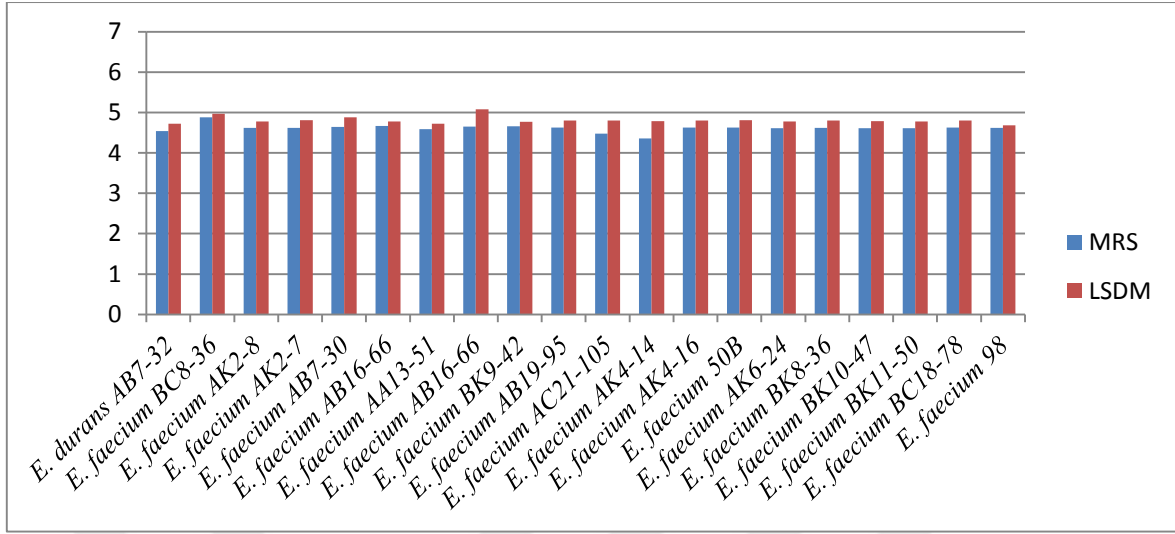
L. plantarum suşlarının hepsinde L-SDM'ye kıyasla MRS sıvı besiyerinde daha düşük pH değerleri gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmada L-SDM ve MRS besiyerlerindeki *L. plantarum* suşlarının pH değerleri 4,84 - 5,79 ve 3,84 - 4,79 ile arasında tespit edilmiştir. *L. plantarum* AA-1-2, *L. plantarum* AC3-10 ve *L. plantarum* AB6-25'in 2 farklı ortamdaki pH değerleri arasındaki önemli bir fark belirlenememiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. *L. fermentum* türlerine ait pH sonuçları



Sadece *L. fermentum* AK3-10 ve *L. fermentum* AK-180'nin pH değerleri MRS'ye nazaran L-SDM sıvı besiyerinde yüksek çıkmıştır. *L. fermentum* AC18-87 ve *L. fermentum* AB21-107'nin L-SDM besiyerinde en düşük pH değerine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.9. *Enterococcus* türlerine ait pH sonuçları



Enterococcus türlerinin L-SDM besiyerinde pH değeri 4,48-4,88 arasında değişirken en düşük pH değeri 4,36 ile *E. faecium* AK4-14'te tespit edilmiştir. MRS'de ise pH değerleri 4,68-5,08 arasında değişmektedir (Çizelge 4.9).

Tieking vd. (2003) yaptıkları çalışmada laktobasillerin pH'yı 24 saat içerisinde 3,5 civarına kadar düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Bu laktobasil türlerinden *L. reuteri* TMW 1.106 ve *L. reuteri* TMW 1.669'un hücre sayısının sırayla 9,38 ve 9,36log₁₀ KOB/g olduğu rapor edilmiştir. Vaningelgem vd. (2004) yaptıkları çalışmada süttten izole ettikleri 25 adet *Str. thermophilus* izolatinin iki farklı ortamda pH ve hücre sayısını araştırmışlardır. Süt tozu içeren besiyerinde sadece iki bakterinin 10⁹ KOB/mL düzeyine ulaştığı, 23 adedinin ise 10⁷ ve 10⁸ KOB/mL arasında olduğu, pH değerlerinin ise 4,3-4,99 arasında değiştiği belirtilmiştir. Maya ekstraktı ve kazein peptonu içeren modifiye besiyerinde ise pH değerinin 4,10-4,68 ve hücre sayısının ise 10⁸-10⁹ KOB/mL arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Mozzi vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada 31 termofil ve mezofil LAB'ın hücre sayısının 10⁷-10⁹ KOB/mL arasında değiştiği ifade edilmiştir. Ayrıca termofil LAB'ın pH değerleri 3,90 - 4,99, mezofil LAB'ın pH değerinin ise 4,08 -5,80 arasında rapor edilmiştir. Termofil ve mezofil LAB için en düşük pH değerlerinin 3,70 ve 3,85 olduğu ifade edilmiştir. Mende vd. (2012)'nin farklı karbon kaynaklarında yaptığı çalışmalar sonucunda en yüksek hücre sayısının 4,5x10⁸ KOB/mL ile 200 mmol/L laktoz içeren besiyerinde elde edildiği, ayrıca bu besiyerindeki pH değerinin 4,38 ile en düşük pH değeri olduğu belirtilmiştir. En yüksek pH değeri 5,59 ile 100 mmol/L glukoz içeren

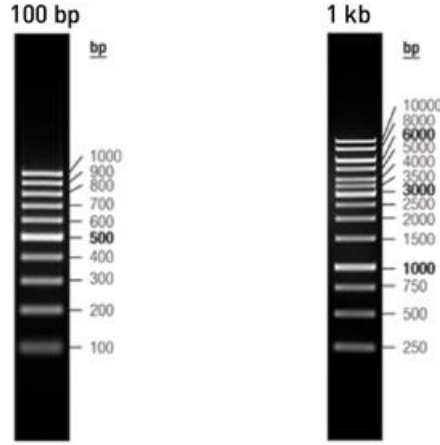
besiyerinde tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda glukoz bulunan besiyerlerinde pH değeri 5,36 - 5,59 arasında belirlenmiştir.

van Geel-Schutten vd. (1998) çeşitli kaynaklardan izole edilmiş 182 adet laktobasil arasından 2 tanesi *L. reuteri* olarak tanımlamıştır. Glukan ve fruktan oluşturan *Lactobacillus* türlerinden başka *Leuconostoc* türleri ve oral streptokoklar rapor edilmiştir. Bağırsak florası ve bağırsaktaki tipik türler arasından izole edilen ve EPS üreten suşlar arasında *Lactobacillus* türleri öne çıkmaktadır. Mozzi vd. (2006) çalışmalarında polisakkarit üreten 31 adet termofil ve mezofil LAB'ın sütte EPS üretimini karakterize etmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında termofillerin pH aralığının 3.83 ile 4.99 olduğu ve en yüksek EPS üretiminin pH 4.5'da ve en düşük EPS üretiminin pH 4.56, 4.69 ve 4.99'da gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Mende vd. (2012) Bulgar yoğurdundan izole edilen *L. bulgaricus* DSM 20081'in EPS üretimini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmayı sabit pH değerinde kesikli ve sürekli bioreaktörlerde gerçekleştirmişlerdir. Fermantasyon sonunda 4 farklı sıcaklık uygulamalarında pH değeri 45 °C'de 4.58, 40 ve 37°C'de 4.08 ve 30°C'de 4.16 olarak tespit edilmiştir. Ibarburu vd. (2015) yaptıkları çalışmada 24 saat sonunda pH değerinin MRS besiyerinde 4,30 ile 4,89 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Wang vd. (2015a) yaptıkları çalışmada pH değerinin ilk 16 saat içerisinde 4,1'e düştüğünü 56. saatte ise 3,8 olduğunu belirlemiştir. Diğer bir çalışmada, ise 16 saatte pH değerinin yaklaşık 4,0'a, 56. saatte ise 3,9'a düştüğü rapor edilmiştir (Wang vd. 2015b). Salazar vd. (2009) yaptıkları çalışmada intestinal mikrofloradan izole ettikleri EPS üreticisi 21 adet suşu genetik olarak tanımlamışlardır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda 11 adet *Bifidobacterium* türü ve 10 adet *Lactobacillus* türü tanımlanmıştır. *L. rhamnosus* E41, E43R, *L. plantarum* H2 ve kontrol grubunun pH değerlerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ölçülen pH değerleri sırasıyla 3,82, 3,76, 3,88 ve 3,97 olarak belirtilmiştir. Ayrıca en yüksek EPS miktarının ise 51,4 mg/100 mL olduğu rapor edilmiştir.

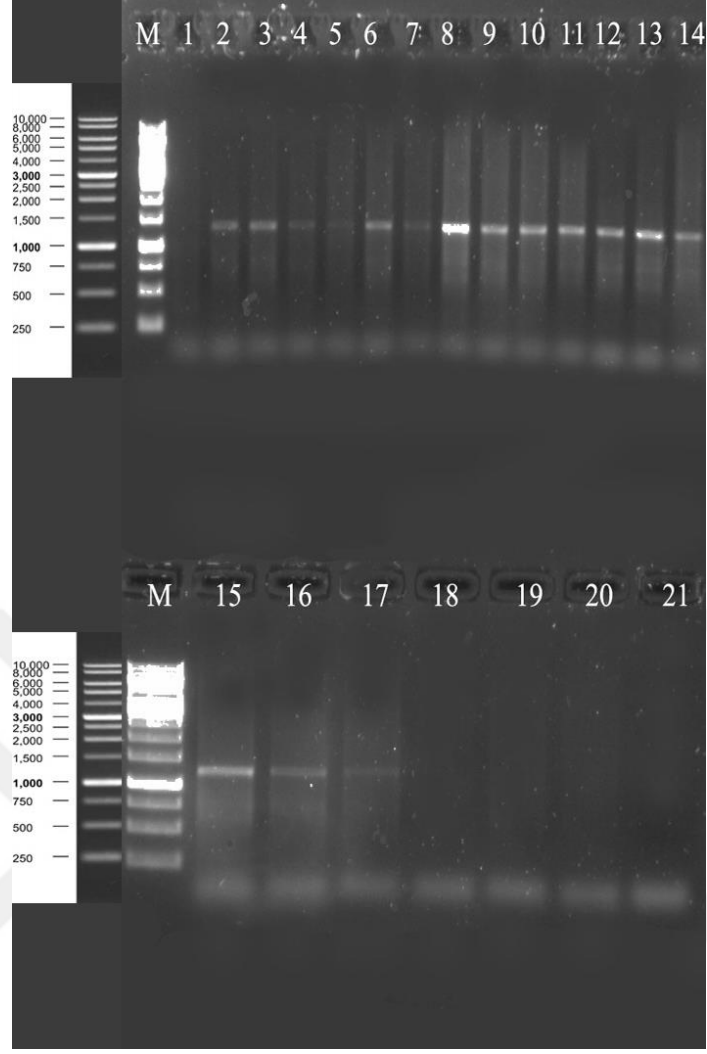
4.2. eps Genlerinin Varlığı

DNA lizatları EPS üretiminden sorumlu gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgelerini belirlemek amacıyla 100 bp DNA ladder (Fermentas SM0242) ve 1 kb DNA ladder (Fermentas SM0311) kullanılmıştır (Şekil 4.4).

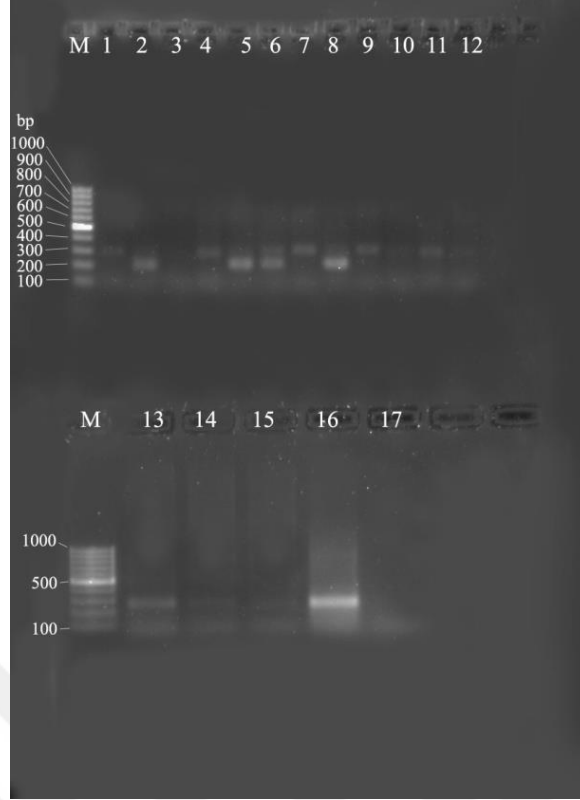


Şekil 4.1. 100 bp DNA ladder ve 1 kb DNA ladder (Fermentas)

İncelenen jel görüntülerinin fruktansukraz gen bölgesi için yaklaşık 1200 bp olduğu, glikoziltransferaz için ise 200-300 bp arasında olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus* suşlarının jel görüntüleri şekil 4.5’de, *E. faecium* türlerine ait jel görüntüleri ise Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Çalışmamızda 20 adet *L. plantarum* suşundan *L. plantarum* AA1-2, AB6-25 dışındaki tüm *L. plantarum* suşlarında fruktan sukraz bölgesi tespit edilmiştir. 15 adet *L. fermentum* suşundan 8 adedinde fruktansukraz gen bölgesi belirlenirken, *L. fermentum* AC3-13, AB5-18, AB5-20, AC18-87, AB21-107, AK3-10 ve BK13-56 suşlarında aranan gen bölgesi tespit edilmemiştir. İncelenen enterokok suşlarından ise sadece *E. faecium* AK2-8 ve BC18-87’de glikoziltransferaz gen bölgesi tespit edilmezken, diğer tüm suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türlerine ait PZR sonuçları Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12’de verilmiştir. Ibarburu vd. (2015) elma suyundan izole edilen iki adet *L. suebicus* suşlarının EPS üretim özelliklerini karakterize etmeye çalışmışlardır. *L. suebicus* CUPV226 ve CUPV225 suşlarının 24 saat sonunda ürettikleri EPS miktarı sırasıyla 44.4 ile 65.8 mg/L ve 48 saat sonunda ürettikleri EPS miktarı sırasıyla 94.9 ile 109.2 mg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca inkübasyon süresinin artmasıyla üretilen EPS miktarının arttığını ifade etmişlerdir.



Şekil 4.2. *Lactobacillus* suşlarının fruktansukraz gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 1 kb DNA marker, 1: AB6-25, 2: AC3-27, 3: AB7-35, 4: AC10-40, 5: AA13-59, 6: AB16-65, 7: AA17-73, 8: BC18-81, 9: AC18-82, 10: AB20-961, 11: AC21-101, 12: AC21-1031, 13: AK4-11, 14: AK6-27, 15: AK7-28, 16: AK8-31B, 17: BK10-48, 18: BB16-75, 19: AC18-87, 20: AB21-107, 21: negatif kontrol)



Şekil 4.3. *E. faecium* suşlarının glikoziltransferaz gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100 bp DNA marker, 1: AB7-32, 2: BC8-36, 3: AK2-8, 4: AK2-7, 5: AB7-30 6: AB16-66 7: AA13-51 8: AB16-66, 9: AC21-105, 10: AK4-14, 11: 50B, 12: AK6-24, 13: BK10-47, 14: BK11-50, 15: BC18-78, 16: 98, 17: negatif kontrol)

Tieking vd. (2003) hamurdan izole ettikleri 111 izolattan 22 tanesinin yüksek EPS fraksiyonu ürettiğini tespit etmişlerdir. Yaklaşık 800 bp amplicon büyüklüğüne sahip fruktansukraz gen bölgesince taranmıştır. Fruktansukraz pozitif 6 izolattın 4 tanesinin *L. sanfranciscensis* ve 2 tanesinin *L. frumenti* olduğu rapor edilmiştir. Provencher vd. (2003) çeşitli kültür koleksiyonlarından temin ettikleri 44 adet LAB'da glikoziltransferaz gen bölgesinin varlığını araştırmışlardır. *L. rhamnosus* izolatlarının yüzde %94,11'nde pozitif sonuç tespit edilirken, *Str. thermophilus* türlerinde ise glikoziltransferaz gen bölgesine rastlanmamıştır. Glikoziltransferazlar EPS'nin sentezinde önemli rol oynar (Werning vd. 2006). β -D-glukan sentezinden sorumlu glikoziltransferaz gen bölgesini araştırmış, daha önceden β -D-glukan tipi EPS üreten izolatların (Dueñas-Chasco vd. 1997; Dueñas-Chasco vd. 1998; Ibarburu vd. 2005) taradıkları *gtf* genin pozitif olduğunu tespit etmiştir.

Bounaix vd. (2009) yaptıkları çalışmada hamur mayasından izole ettikleri 30 adet LAB suşunu glukansukraz ve fruktansukraz geni açısından taradıklarında 23 izolattın pozitif ve 7 izolattında negatif olduğunu rapor etmişlerdir. *L. sanfranciscensis* 1O12, O31, *Leuconostoc mesenteroides* G15, A9, NRRLB-512F ve ATCC 8293 olmak üzere sadece 6

adet izolat fruktansukraz pozitif bulunmuştur. *Leu. mesenteroides* A9 izolatının fruktansukraz geninin bulunmasına rağmen, fruktan üretimi gözlenmiştir. *Leu. mesenteroides* ve *Leu. citreum* cinslerinin tümünde glukansukraz geninin pozitif olduğu rapor edilmiştir. Bugüne kadar çeşitli LAB'da bulunan EPS gen bölgeleri izole ve karakterize edilmiştir. *Str. thermophilus* (Stingele vd. 1996), *Str. macedonicus* (Jolly vd. 2001), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Dabour vd. 2005) ve *L. bulgaricus* (Lamothe vd. 2002) gibi LAB türlerinin EPS gen bölgelerinde birkaç glikoziltransferaz genlerini içerdiği rapor edilmiştir. Dertli vd. (2015) Vakfikebir ekmeğinin hamurundan 249 adet LAB izole etmiştir. 11 adet farklı tür olmak üzere 49 adet çeşitli LAB cinsi tanımlamışlardır. Araştırmacılar izolatların en az bir tane *eps* gen bölgesini içerdiğini ifade etmişlerdir. İzolatların tümünün glukansukraz pozitif olduğu ayrıca *L. sanfranciscensis* ED5, *L. paralimentarius* E-106, *W. paramesenteroides* N7, *L. paraplantarum* N15, *Leu. psedomesenteroides* N13 ve *W. cibaria* N9 izolatlarının levansukraz pozitif olduğu *L. rossiae* ED1, *L. brevis* ED25, *W. paramesenteroides* N7, *Leu. mesenteroides* N6 ve *L. curvatus* N19 izolatlarının ise *epsA* gen bölgesi bakımından pozitif olduğu belirtilmiştir. *L. brevis* E-25 *epsEFG* pozitif tek izolat olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. *L. plantarum* türlerine ait PZR sonuçları

Bakteri ismi	Fruktansukraz	Bakteri ismi	Fruktansukraz
<i>L. plantarum</i> AA1-2	-	<i>L. plantarum</i> BC18-81	+
<i>L. plantarum</i> AC3-10	-	<i>L. plantarum</i> AC18-82	+
<i>L. plantarum</i> AC3-14	+	<i>L. plantarum</i> AB20-961	+
<i>L. plantarum</i> AB6-25	-	<i>L. plantarum</i> AC21-101	+
<i>L. plantarum</i> AC3-27	+	<i>L. plantarum</i> AC21-1031	+
<i>L. plantarum</i> AB7-35	+	<i>L. plantarum</i> AK4-11	+
<i>L. plantarum</i> AC10-40	+	<i>L. plantarum</i> AK6-27	+
<i>L. plantarum</i> AA13-59	+	<i>L. plantarum</i> AK7-28	+
<i>L. plantarum</i> AB16-65	+	<i>L. plantarum</i> AK8-31B	+
<i>L. plantarum</i> AA17-73	+	<i>L. plantarum</i> BK10-48	+

Çizelge 4.11. *L. fermentum* türlerine ait PZR sonuçları

Bakteri ismi	Fruktansukraz	Bakteri ismi	Fruktansukraz
<i>L. fermentum</i> AC3-13	-	<i>L. fermentum</i> AK5-22	+
<i>L. fermentum</i> AB5-18	-	<i>L. fermentum</i> AK6-26	+
<i>L. fermentum</i> AB5-20	-	<i>L. fermentum</i> BK10-44	+
<i>L. fermentum</i> BB16-75	+	<i>L. fermentum</i> BK10-46	+
<i>L. fermentum</i> AC18-87	-	<i>L. fermentum</i> BK13-56	-
<i>L. fermentum</i> BB19-90	+		
<i>L. fermentum</i> AB21-107	-		
<i>L. fermentum</i> AK2-8	+		
<i>L. fermentum</i> AK3-10	-		
<i>L. fermentum</i> AK4-180	+		

Çizelge 4.12. *Enterococcus* subsp. türlerine ait PZR sonuçları

Bakteri ismi	Glikoziltransferaz	Bakteri ismi	Glikoziltransferaz
<i>E. durans</i> AB7-32	+	<i>E. faecium</i> AC21-105	+
<i>E. faecium</i> BC8-36	+	<i>E. faecium</i> AK4-14	+
<i>E. faecium</i> AK2-8	-	<i>E. faecium</i> AK4-16	+
<i>E. faecium</i> AK2-7	+	<i>E. faecium</i> 50B	+
<i>E. faecium</i> AB7-30	+	<i>E. faecium</i> AK6-24	+
<i>E. faecium</i> AB16-66	+	<i>E. faecium</i> BK8-36	+
<i>E. faecium</i> AA13-51	+	<i>E. faecium</i> BK10-47	+
<i>E. faecium</i> AB16-66	+	<i>E. faecium</i> BK11-50	+
<i>E. faecium</i> BK9-42	+	<i>E. faecium</i> BC18-78	-
<i>E. faecium</i> AB19-95	+	<i>E. faecium</i> 98	+

4.3. Toplam Şeker Miktarı

Araştırmamızda *L. fermentum* suşlarının *L. plantarum* ve *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek miktarda glukoz ürettiği tespit edilmiştir. *L. plantarum* suşlarında glukoz üretimi 38,61 - 136,61 mg/L arasında, *L. fermentum* suşlarında 116,43 – 135,55 mg/L arasında, *E. durans* AB7-32 suşunda 65,38 mg/L, *E. faecium* suşlarında ise 50,80 – 99,02 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bakteriler tarafından üretilen glukoz cinsinden şeker miktarlar Çizelge 4.13, Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15’ de gösterilmiştir.

Farklı araştırmacılar LAB tarafından üretilen EPS miktarının 150 ile 600 mg/L arasında değiştiğini belirtmiştir (De Vuyst vd. 1998; De Vuyst vd. 1999; Duboc vd. 2001). Ancak bu değerler bizim araştırmamızda bulunan değerlerden oldukça yüksektir. Smitinont vd. (1999) *Pediococcus pentasaceus* AP-1 ve *P. pentasaceus* AP-3 izolatlarının EPS üretim miktarlarını sırasıyla 6 ve 2.5 g/L olarak belirtmiştir. Tallon vd. (2003) mısır silajından izole ettiği *L. plantarum* EP56 suşunda 4 farklı sıcaklık değerinin (18, 25, 30 ve 37 °C) ve 5 farklı karbon kaynağının (glukoz, sukroz, laktoz, fruktoz ve galaktoz) EPS üretimine etkisini araştırmıştır. En düşük EPS üretimi glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı 37 °C inkübasyon sıcaklığında 35,6 mg/L olarak belirtilmiştir. En yüksek EPS üretimi ise 25 °C sıcaklıkta laktozun kullanıldığı ortamda 140,2 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Peyniraltı suyu ilave edilmiş kesikli fermentör'de yüksek EPS üreticisi olan *L. rhamnosus* RW-9595M'nin serbest ve bağlı şekilde bulunan hücrelerinin kesikli ve tekrarlı fermentörde hücre sayısı, biyokütle ve EPS miktarı gibi çeşitli özellikleri araştırılmıştır. *L. rhamnosus* RW-9595M'nin 32 saat sonunda ortamdaki karbon kaynağı olan laktozu tamamen tükettiği, ayrıca %8 peyniraltı suyu içeren fermantasyon ortamında serbest *L. rhamnosus* RW-9595M hücrelerinin sayısının $1,3 \times 10^{10}$ KOB/mL ile en yüksek seviyeye ulaştığı gözlemlenmiş ve EPS miktarının 2350 mg/L olduğu belirtilmiştir (Bergmaier vd. 2003).

Yapılan bir çalışmada yeşil zeytinlerden izole edilen *L. pentosus* LPS26'nın farklı fermantasyon şartlarında sentezlediği yüksek ve düşük moleküler ağırlığa sahip EPS'ler araştırılmıştır. Fermantasyon ortamında glukoz, fruktoz, mannitol ve laktoz karbon kaynağı olarak ilave edilmiştir. Glukoz, mannitol ve laktoz'un kaynak olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında EPSA üretimi artarken, fruktoz'un kullanıldığı fermantasyon ortamında ise EPSB üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. *L. pentosus* LPS26'nın glukoz ve laktoz'da ürettiği EPS miktarları sırasıyla 166,0 ve 164,9 mg/L olarak belirlenmiştir. Mannitol ve glukoz'un karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon şartlarında hücre sayısı 2.4×10^9 ve 1.3×10^9 KOB/mL'ye kadar ulaşmış ancak fruktoz ve laktozun bulunduğu ortamda hücre sayısı yaklaşık 4×10^8 KOB/mL olarak belirlenmiştir. Glukoz *L. pentosus* LPS26'nın ürettiği iki EPS yapısında da bulunurken, ramnoz epsA'da mannoz ise epsB'de bulunmuştur (Sanchez vd. 2006).

Mozzi vd. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada yoğurt, peynir, keçi sütü, fermente süt ve sosis gibi gıdalardan 31 adet LAB suşunun EPS üretimi karakterize edilmiştir. 20 adet termofil LAB arasında en yüksek EPS üreticileri *Str. thermophilus*

CRL804 (166 mg/L) ile *L. bulgaricus* CRLS 852 (150 mg/L) olarak belirlenirken, 11 adet mezofil LAB içerisinde en yüksek EPS üretimi ise 110 mg/L ile *E. faecalis* CRL316 suşunda tespit edilmiştir. Zhang vd. (2011) Çin'deki Moğolistan bölgesinde bulunan geleneksel sütlü içecekten izole ettikleri EPS üreticisi *L. fermentum* F6 izolatının muhtemel endüstriyel uygulamalarını araştırmıştır. Yapılan araştırmada % 10 rekonsite süt tozu ilavesi *L. fermentum* F6'nın EPS üretimi için uygun olduğu belirtilmiştir. Süt tozu içeren bu ortama glukoz, galaktoz, laktoz ve fruktoz gibi karbon kaynakları ilave edilmiştir. Glukoz ilavesi EPS üretimini diğer karbon kaynaklarının ilavesinden daha fazla arttırmıştır. Ayrıca % 0,5 peyniraltı suyu proteini ilavesi EPS üretimini yaklaşık iki katına çıkarmıştır. *L. fermentum* F6 suşu % 2 glukoz ve % 0.5 peyniraltı suyu proteini içeren besiyeri ortamında 44,49 mg/L ile en yüksek EPS üretimini gerçekleştirmiştir (Zhang vd. 2011). Yapılan bir çalışmada *Str. thermophilus*'un 3000 mg/L, *L. casei*'nin 490 mg/L, *L. lactis* subsp. *cremoris*'in 600mg/L ve *L.bulgaricus*'un 2100 mg/L EPS ürettiği tespit edilmiştir (Duboc ve Mollet 2001). Hamet vd. (2015) kefirde izole ettikleri 4 adet *L. plantarum*, 9 adet *L. kefiranofaciens* ve 5 tane *L. paracasei* suşlarının EPS üretim miktarının 20 ile 370 mg/L arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Hamet vd. (2015) kefirde izole ettikleri 4 adet *L. plantarum*, 9 adet *L. kefiranofaciens* ve 5 tane *L. paracasei* suşlarının EPS üretim miktarının 20 ile 370 mg/L arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, yaşlıların gaytalarından izole edilen *Bifidobacterium animalis* RH'nin ürettiği EPS'nin yapısı araştırılmıştır. Yüksek performanslı anyon değiştirme kromatografisinde şeker bileşenleri analiz edilmiştir. *B. animalis* RH'nin ürettiği EPSb fraksiyonunun içerisinde; glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnoz tespit edilmiştir (Shang vd. 2013). Bunkoed vd. (2014) çiğ süt, fermente gıda ve meyve sularından 107 tane LAB izole etmiştir. Bu izolatların arasından 27 tanesinin ise EPS ürettiği rapor edilmiştir.. Yapılan bir diğer çalışmada 14 Tibet kefirinden izole edilen LAB suşlarının EPS üretimi karakterize edilmeye çalışılmıştır. *L. plantarum* SKT10 suşunun SDM besiyerinde EPS üretimi 58.66 mg/L iken, sütte 40 mg/L olarak rapor etmiştir (Wang vd. 2015a). Wang vd. (2015a) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Tibet kefirinden izole edilen *L. plantarum* YW11 izolatının inokülasyonun 56. saatinde EPS miktarının 90 mg/L olduğu ve kültür pH'sının 3,9 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. *L. plantarum* türlerine ait toplam şeker miktarları

Bakteri Adı	mg EPS/L (glukoz cinsinden)
<i>L. plantarum</i> AA-1-2	42,47
<i>L. plantarum</i> AC3-10	39,35
<i>L. plantarum</i> AC3-14	81,25
<i>L. plantarum</i> AB6-25	38,61
<i>L. plantarum</i> AC3-27	90,51
<i>L. plantarum</i> AB7-35	101,20
<i>L. plantarum</i> AC10-40	126,26
<i>L. plantarum</i> AA13-59	86,91
<i>L. plantarum</i> AB16-65	136,61
<i>L. plantarum</i> AA17-73	106,08
<i>L. plantarum</i> BC18-81	107,99
<i>L. plantarum</i> AC18-82	98,12
<i>L. plantarum</i> AB20-961	98,39
<i>L. plantarum</i> AC21-101	91,28
<i>L. plantarum</i> AC21-1031	114,55
<i>L. plantarum</i> AK4-11	89,81
<i>L. plantarum</i> AK6-27	110,99
<i>L. plantarum</i> AK7-28	80,18
<i>L. plantarum</i> AK8-31B	79,80
<i>L. plantarum</i> BK10-48	102,51

Çizelge 4.14. *L. fermentum* türlerine ait toplam şeker miktarları

Bakteri Adı	mg EPS/L (glukoz cinsinden)
<i>L. fermentum</i> AC3-13	126,34
<i>L. fermentum</i> AB5-18	138,76
<i>L. fermentum</i> AB5-20	125,02
<i>L. fermentum</i> BB16-75	116,43
<i>L. fermentum</i> AC18-87	135,55
<i>L. fermentum</i> BB19-90	133,71
<i>L. fermentum</i> AB21-107	120,55
<i>L. fermentum</i> AK2-8	121,98

Çizelge 4.14. (devam) *L. fermentum* türlerine ait toplam şeker miktarları

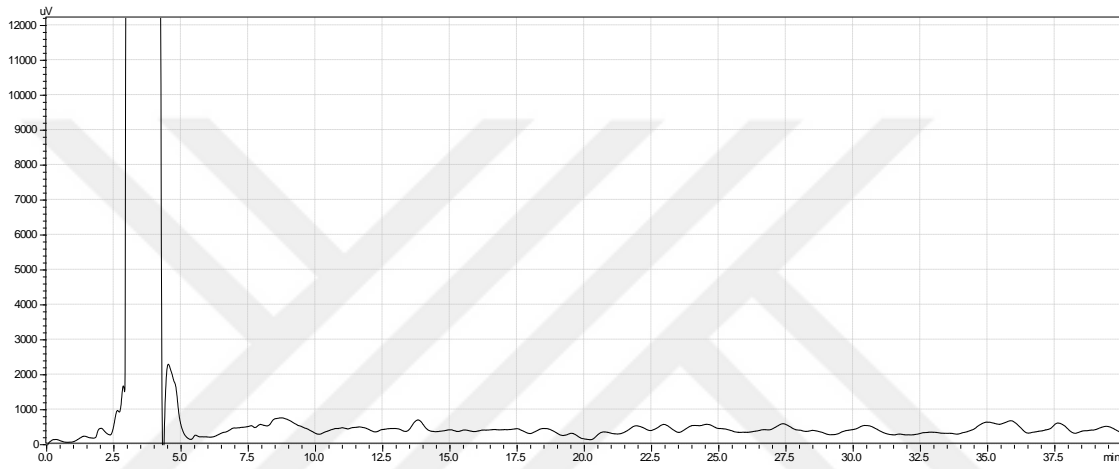
<i>L. fermentum</i> AK3-10	126,48
<i>L. fermentum</i> AK4-180	121,60
<i>L. fermentum</i> AK5-22	128,40
<i>L. fermentum</i> AK6-26	130,36
<i>L. fermentum</i> BK10-44	128,02
<i>L. fermentum</i> BK10-46	124,49
<i>L. fermentum</i> BK13-56	118,11

Çizelge 4.15. *Enterococcus* subsp. türlerine ait toplam şeker miktarları

Bakteri Adı	mg EPS/L (glukoz cinsinden)
<i>E. durans</i> AB7-32	65,38
<i>E. faecium</i> BC8-36	57,55
<i>E. faecium</i> AK2-8	79,48
<i>E. faecium</i> AK2-7	55,91
<i>E. faecium</i> AB7-30	49,68
<i>E. faecium</i> AB16-66	53,99
<i>E. faecium</i> AA13-51	50,80
<i>E. faecium</i> AB16-66	65,74
<i>E. faecium</i> BK9-42	83,28
<i>E. faecium</i> AB19-95	88,35
<i>E. faecium</i> AC21-105	58,79
<i>E. faecium</i> AK4-14	75,37
<i>E. faecium</i> AK4-16	94,58
<i>E. faecium</i> 50B	73,45
<i>E. faecium</i> AK6-24	78,00
<i>E. faecium</i> BK8-36	99,02
<i>E. faecium</i> BK10-47	74,49
<i>E. faecium</i> BK11-50	86,31
<i>E. faecium</i> BC18-78	79,76
<i>E. faecium</i> 98	83,60

4.4. EPS'nin Ekstraksiyonu ve Şeker Kompozisyonunun Belirlenmesi

Bakteriler tarafından üretilen EPS'nin HPLC'de karakterizasyonu amacıyla biyokütle miktarı yüksek ve aranan gen bölgesi pozitif olan 6 adet *L. plantarum* (AC10-40, AB16-65, AC21-1031, AK4-11, AK6-27 ve BK10-48), 8 adet *L. fermentum* (AB5-18, BB16-75, AC18-87, BB19-90, AK2-8, AK5-22, AK6-26 ve BK10-44) ve 6 adet *E. faecium* (BK9-42, AB19-95, AK4-16, BK8-36, BK11-50 ve 98) ile çalışılmıştır. Bakterilere ait liyofilizasyon tartım sonuçları Ek-2'de belirtilmiştir.



Şekil 4.4. Numune kromatogramı

Monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi, ortamda bulunan EPS'nin cinsi ve miktarının tayini için oldukça önemlidir. Monosakkarit kompozisyonunu belirlemeye yönelik olan çalışmalarda sıklıkla GC ve HPLC kullanılmaktadır. Enzimatik yöntemler genelde tek bir monosakkarit tabanlı iken, kromatografik yöntemler bir ve birden çok monosakkaritin kalitatif ve kantitatif olarak araştırılmasında önemli bir yere sahiptir (Sadıq 2015). 3.2.6'da belirtildiği gibi ekstrakte edilen EPS'ler HPLC'de belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.16, 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.16. *L. plantarum* türlerine ait HPLC sonuçları ($\mu\text{g/g}$)

Bakteri adı	Şekerler					
	Ram ^a	Fru ^b	Man ^c	Glu ^d	Gal ^e	Suk ^f
<i>L. plantarum</i> AC21-1031	5,87	12,77	0,05	21,91	<LOD*	-
<i>L. plantarum</i> BK10-48	664,38	12,04	20,71	14,39	40,57	55,91

Çizelge 4.16. (devam) *L. plantarum* türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g)

Bakteri adı	Şekerler					
	Ram	Ram	Ram	Ram	Ram	Ram
<i>L. plantarum</i> AC10-40	11,27	8,33	8,42	13,53	21,90	-
<i>L. plantarum</i> AK4-11	36,64	31,34	9,37	150,69	9,62	10,25
<i>L. plantarum</i> AK6-27	22,19	2,21	27,43	5,99	<LOD	11,35
<i>L. plantarum</i> AB16-65	13,72	-	-	3,96	<LOD	11,09

<LOD* : Dedeksiyon sınırının altında

- : Tespit edilememiştir.

Ram^a: Ramnoz

Fru^b: Fruktoz

Man^c: Manno

Glu^d: Glukoz

Gal^e: Galaktoz

Suk^f: Sukroz

Çizelge 4.17. *L. fermentum* türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g)

Bakteri adı	Şekerler					
	Ram	Fru	Man	Glu	Gal	Suk
<i>L. fermentum</i> AK5-22	14,83	12,66	5,65	1,20	<LOD	6,80
<i>L. fermentum</i> AK6-26	54,19	6,45	2,11	6,18	<LOD	8,41
<i>L. fermentum</i> AB5-18	53,60	69,62	8,51	3,27	3,51	15,81
<i>L. fermentum</i> AK2-8	605,78	8,23	3,33	3,98	4,34	8,49
<i>L. fermentum</i> AC18-87	104,75	11,25	8,79	9,84	<LOD	22,48
<i>L. fermentum</i> BB19-90	87,59	12,90	<LOD	83,85	<LOD	-
<i>L. fermentum</i> BK10-44	33,18	-	6,12	5,58	<LOD	10,72
<i>L. fermentum</i> BB16-75	128,30	2,31	13,38	6,50	12,70	13,12

Çizelge 4.18. *Enterococcus* türlerine ait HPLC sonuçları (µg/g)

Bakteri adı	Şekerler					
	Ram	Fru	Man	Glu	Gal	Suk
<i>E. faecium</i> 98	16,07	1,64	7,80	4,64	<LOD	11,17
<i>E. faecium</i> BK9-42	15,48	0,70	1,58	5,80	<LOD	38,98
<i>E. faecium</i> BK11-50	23,00	12,22	-	67,54	<LOD	7,88
<i>E. faecium</i> BK8-36	39,12	16,34	<LOD	0,30	<LOD	9,38
<i>E. faecium</i> AK4-16	16,44	69,91	0,18	5,56	<LOD	12,40
<i>E. faecium</i> AB19-95	143,86	38,87	4,22	5,70	<LOD	26,68

Çalışmamızda 6 adet *L. plantarum* suşu, 8 adet *L. fermentum* suşu ve 6 adet *E. faecium* olmak üzere 20 LAB suşundan hiç birinde laktoz tespit edilememiştir. *L. plantarum* AK4-11 suşunun en yüksek glukoz (150,69 µg/g) üretimine sahip olduğu belirlenirken, fruktoz miktarı ise 31,34 µg/g olarak tespit edilmiştir. *L. fermentum* AC3-13 ve *E. faecium* AK4-16 suşları incelenen bakteriler arasında 69 µg/g ile en yüksek fruktoz üretimine sahip türler olarak belirlenmiştir. *L. fermentum* AC18-87 suşunun ramnoz üretimi 104,75 µg/g iken, sukroz üretimi ise 22,48 µg/g olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* BK10-48 suşunun sırasıyla 664,38 µg/g, 40,57 µg/g ve 55,91 µg/g ile en yüksek ramnoz, galaktoz ve sukroz ürettiği, ayrıca 20,71 µg/g ile mannoz üretimi yüksek olan suşlardan biri olduğu tespit edilmiştir. *L. fermentum* AK2-8 suş 605,78 µg/g ile yüksek ramnoz üreten diğer suşlardan biridir. Bu suşun ürettiği diğer şeker miktarları oldukça düşüktür. En yüksek mannoz üretimi 27,43 µg/g ile *L. plantarum* AK6-27 suşunda gözlemlenmiştir. *L. fermentum* BB19-90 suşunda ise 87,59 µg/g ramnoz ve 83,85 µg/g glukoz üretimi tespit edilirken, mannoz, galaktoz ve sukroz üretimi gözlemlenmemiştir. *E. faecium* AB19-95 suşunda ise 143,86 µg/g ramnoz, 38,87 µg/g fruktoz ve 26,68 µg/g sukroz üretimi tespit edilmiştir. *E. faecium* BK9-42 suşu 38,98 µg/g üretimi ile en yüksek sukroz üreten LAB'lardan biridir. Tiekling vd. (2003) ekşi hamurdan izole ettikleri LAB'ın monosakkarit kompozisyonunu karakterize etmişlerdir. Çalışmalarında en yüksek glukoz üretimi 3.58 mmol/kg ile *L. reuteri* TMW 1.106'da tespit edilmiştir. En yüksek fruktoz üreticisi (6.08 mmol/kg) olan *L. sanfranciscensis* LTH2590'nin glukoz üretimi ise 0.44 mmol/kg olarak

rapor edilmiştir. Tallon vd. (2003) mısır silajlarından izole ettikleri *L. plantarum* EP56 izolatının EPS üretimini karakterize etmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında bu bakteri hücrelerine bağlı EPS biriminin glukoz, galaktoz ve N-asetilgalaktozamin'den oluştuğu, hücreden salgılanan EPS biriminde ise galaktoz, ramnoz ve glukoz bulunduğu belirtilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, süttten izole edilen 25 adet *Str. thermophilus* izolatının şeker kompozisyonu araştırılmıştır. 25 adet *Str. thermophilus* izolatının hepsinde galaktoz üretimi tespit edilmiştir. Sadece *Str. thermophilus* ST 111 ve S509 izolatları glukoz üretmemişlerdir (Vaningelgem vd. 2004). Mozzi vd. (2006) çalışmalarında 20 adet termofil LAB ve 11 adet mezofil LAB'ın heteropolisakkarit üretimini araştırmışlardır. 31 adet LAB'dan sadece 6 tanesinde ramnoz üretimi gözlemlendiği rapor edilmiştir. LAB'ların hepsinde galaktoz ve glukoz üretimi tespit edilmiştir. Zhang vd. (2011) *L. fermentum* F6 tarafından üretilen EPS'nin glukoz ve galaktoz'dan oluştuğunu belirlemiştir. *Bacillus subtilis* MTCC121'in monosakkarit kompozisyonunu belirlemeye yönelik yapılan kromatografik bir çalışmada, *B. subtilis* MTCC121'nin şeker kompozisyonu FT-IR, GC-MS ve HPLC'de araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen pikler standartlarla karşılaştırıldığında, *B. subtilis* MTCC121'in glukan, ramnoz ve galaktoz üreticisi olduğu rapor edilmiştir (Vijayabaskar vd. 2011). Malang vd. (2015) geleneksel gıdalardan izole ettikleri *Weisella* türlerinin EPS üretimini karakterize etmişlerdir. Yapılan analizlerde 9 adet *Weisella* türünün hepsinde glukoz üretimi, sadece 3 türde ise fruktoz üretimi gözlemlenmiştir.

Henry ve Prapulla (2014) geleneksel bir içecekten izole edilen 38 adet LAB'ın EPS üretimini araştırmışlardır. Bu izolatlardan en yüksek EPS verimine sahip *L. plantarum*11'nde mannoz ve galaktoz tespit edilmiştir. Ibarburu vd. (2014) elma şarabından izole edilen *L. suebicus* izolatlarının EPS üretimini belirlemişlerdir. Yapılan analizler sonucu F ve P fraksiyonlardaki EPS'lerin galaktoz ve glukoz içerdiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, yaşlıların gaytalarından izole edilen *Bifidobacterium animalis* RH'nin ürettiği EPS'nin yapısı araştırılmıştır. Yüksek performanslı anyon değiştirme kromatografisinde şeker bileşenleri analiz edilmiştir. *B. animalis* RH'nin ürettiği EPSb fraksiyonun içerisinde; glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnoz tespit edilmiştir (Shang vd. 2013). Yapılan diğer bir çalışmada, soya sütüne *L. plantarum* 70810, *L. rhamnosus* 6005 ve ticari yoğurt kültürü ilave edilmiş ve bu bakterilerin gelişmesi araştırılmıştır. *L. plantarum* 70810 kullanılarak üretilen yoğurdun su tutma kapasitesi, viskozitesi ve EPS miktarı diğer kültürler ile hazırlanan yoğurttan yüksek bulunmuştur. *L. plantarum* 70810 suşunun ürettiği 2 EPS fraksiyonunda glukoz, mannoz ve galaktoz

bulunduğu rapor edilmiştir (Li vd. 2014). Dilna vd. (2015) yaptıkları çalışmada ise, *L. plantarum* RJF4 izolatının ürettiği heteropolisakkaritlerin glukoz ve mannozdan oluştuğunu ve bu durumun Ismail ve Nampoothiri (2010)'nin çalışmasına benzerlik gösterdiğini ifade etmiştir. *L. plantarum* 70810 tarafınan üretilen kapsüler EPS'lerin galaktozdan meydana geldiği belirlenmiştir (Wang vd. 2014). Tallon vd. (2003) *L. plantarum* EP56'nın ürettiği EPS'nin temel bileşenlerinin glukoz ve galaktoz olduğunu, Wang vd. (2010) ise *L. plantarum* KF5'in ürettiği EPS'lerde mannoz, glukoz ve galaktoz bulunduğu rapor etmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada, süttten izole edilen 25 adet *Str. thermophilus* izolatının şeker kompozisyonu araştırılmıştır. 25 adet *Str. thermophilus* izolatının hepsinde galaktoz üretimi tespit edilmiştir. Sadece *Str. thermophilus* ST 111 ve S509 izolatları glukoz üretmemişlerdir (Vaningelgem vd. 2004). Mozzi vd. (2006) çalışmalarında 20 adet termofil LAB ve 11 adet mezofil LAB heteropolisakkarit üretimini araştırmışlardır. 31 adet LAB'dan sadece 6 tanesinde ramnoz üretiminin gözlemlendiği rapor edilmiştir. LAB'ın hepsinde galaktoz ve glukoz üretimi belirlenmiştir. Malang vd. (2015) geleneksel gıdalardan izole ettikleri *Weisella* türlerinin EPS üretimini karakterize etmişlerdir. Yaptıkları analizlerde 9 adet *Weisella* türünün hepsinde glukoz üretimi, sadece 3 tanesinde ise fruktoz üretimi gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda, biyokütle ve EPS miktarları arasında bir ilişkisi bulunamamıştır. Bütün LAB'larda farklı miktarlarda EPS üretimi gözlenmiştir. *L. fermentum* suşlarının *L. plantarum* ve *Enterococcus* türlerine kıyasla daha fazla EPS ürettiği tespit edilmiştir.

L. plantarum suşları içerisinde AC10-40, AB16-65, AC21-1031, AK4-11, AK6-27 ve BK10-48 suşları yüksek EPS ve biyokütle üretimine sahip olup, ayrıca moleküler tekniklerle de bir *eps* geni içerdiği belirlenmiştir.

L. fermentum türlerinin içerisinde BB16-75, AK2-8, AK5-22, AK6-26, BK10-44 AB5-18 ve BB19-90 suşlarının EPS üretiminin diğer *L. fermentum* suşlarına kıyasla yüksek olduğu belirlenmiş, bu suşlar içerisinde AK2-8, AB5-18 ve BB19-90 suşlarında bir *eps* geni tespit edilememiştir.

Enterococcus türleri içerisinde *E. faecium* BK9-42, AB19-95, AK4-16, BK8-36, BK11-50 ve 98 suşları EPS ve biyokütle üretimi en yüksek olan, ayrıca bir *eps* geni içeren türlerdir. Biyokütle ve EPS üretimi yüksek olan 20 adet LAB içerisinde sadece *L. plantarum* BK10-48'in ramnoz, mannoz, galaktoz ve sukroz şekerleri yüksek miktarlarda ürettiği belirlenmiştir.

En iyi EPS üreten bakteriler *L. fermentum* AB5-18, *L. plantarum* AB16-65, *L. fermentum* AC18-87, *L. fermentum* BB19-90 ve *L. fermentum* AK6-26 olarak tespit edilmiştir.

Çeşitli kaynaklardan izole edilip kullanılan ekzopolisakkaritler gıda endüstrisinin ihtiyaçlarını cevap verebilmektedir. Ancak gıda sanayisinde bitkisel kaynaklı polisakkaritler kullanılmaktadır. Fakat ekzopolisakkaritler LAB birer metabolitleridir. LAB yaygın olarak fermente gıdaların üretilmesinde kullanılmaktadır. Probiyotik LAB kullanımıyla ürünün fonksiyonelliği artmakla kalmaz konakçı sağlığını geliştirir. Bu anlamda EPS üreten probiyotik LAB kullanımı ürün kalitesini muazzam derecede arttırmaktadır. Ekzopolisakkaritler gerek fermantasyonda ürünün duyuusal özelliklerini geliştirmesiyle gerekse ürünün daha fonksiyonel hale getirmesiyle gıda endüstrisinde yararlı etkileri mevcuttur.

Yapılan araştırmalarda EPS üretimi alkollü içeceklerin fermantasyonu dışında her fermantasyonda istenildiği görülmektedir. Çalışmamız dahilinde yüksek EPS üretimine sahip muhtemel probiyotik LAB tarafından fermente ürünlerin üretilmesi ortalamalarının üzerinde EPS içerğine sahip bir ürün olacağına ve duyuusal özelliklerini geliştireceğini düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adlerberth, I., Ahrné, S. I. V., Johansson, M. L., Molin, G., Hanson, L. A., Wold, A. E., 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2244-2251.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Hristozova, T., Gargova, S., 2005. Application of pure mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85(12) 2134-214
- Başığit Kılıç, G., Karahan, A.G., 2010. Identification of lactic acid bacteria isolated from the fecal samples of healthy humans and patients with dyspepsia and determination of their pH, bile and antibiotic tolerance properties, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18, 220-229.
- Başığit Kılıç, G., Kuleaşan, H., Sömer, V.F., Akpınar, D., 2013. Determination of potential probiotic properties of human originated *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18, 479-485.
- Başığit, G., 2004. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye
- Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi L., 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 145-152.
- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C., Quesada, E., 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of biotechnology*, 61(2), 135-141.
- Bengmark, S., 2001. Pre-, pro-and synbiotics. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 4(6), 571-579.
- Bergmaier, D., Champagne, C. P., Lacroix, C., 2003. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1049-1057.
- Boels, I. C, van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M. de Vos, W. M., 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 723-732.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10889-10897.

- Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Welker, D.L., 2001. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11, 433-439.
- Bunkoed, O., Thaniyavarn, S., 2014. Isolation of exopolysaccharides producing-lactic acid bacteria for fermented milks products. In the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference-TSB2014 (pp. 26-29).
- Cerning, J., 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87,113–130.
- Cerning, J., 1994. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques, p. 309–329. In H. de Rossartand and F. M. Luquet (ed.), Bactéries lactiques, vol. I. Lorica, Uriage, France.
- Cerning, J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le Lait*, 75(4-5), 463-472.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landon, M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters*, 8(9), 625-628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 75, 692-699.
- Clarke, C. I., Arendt, E. K., 2005. A review of the application of sourdough technology to wheat breads. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49, 137– 1161.
- Dabour, N., LaPointe, G., 2005. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SMQ-461. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7414-7425.
- Dan, T., Fukuda, K., Sugai-Bannai, M., Takakuwa, N., Motoshima, H., Urashima, T., 2009. Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), 2656-2664.
- De Vuyst, L., 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 105–112.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vanningelgem, F., Degeest, B., 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 687–707.
- De Vuyst, L., Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23,153–177.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B., 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk

medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1059-1068.

De Vuyst, L., Vaningelgem, F., 2003. Developing new polysaccharides, p. 275–320. In B. M. McKenna (ed.), *Texture in food*, vol. 2. Semi-solid foods. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom.

Decho, A. W., 1990 Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role (s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*, 28, 73-153.

Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O., 2016. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124.

Deveau, H., Moineau, S., 2003. Use of RFLP to characterize *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, 1472–1475

Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gänzle, M., Ciati, R., Gobbetti, M., 2006. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (26), 9873–9881.

Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., Nampoothiri, K. M., 2015. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.

Doco, T., Wieruszkeski, J. M., Fournet, B., Carcano, D., Ramos, R., Loones, A., 1990. Structure of an exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research*, 198, 313–321.

Duboc, P., Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759–768.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

Duen~as-Chasco, M. T., Rodriguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A. M., 1998. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*, 307, 125–133.

Duen~as-Chasco, M. T., Rodriguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A. M., 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, 303, 453–458.

- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Mateo, P. T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A. M., 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, 303(4), 453-458.
- Faber, E. J., van Haaster, D. J., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., 2002. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 8S containing an open chain nononic acid. *European Journal of Biochemistry* 269, 5590–5598.
- Faber, E.J., Zoon, P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*, 310, 269-276.
- FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Fernandez, K., Duenas, M., Irastorza, A., Bilbao, A., Del Campo, G., 1996. Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus* spp. strains isolated from Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*, 59(1), 35-40.
- Folkenberg, D.M., Dejmeek, P., Skriver, A., Guldager, H.S., Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures *International Dairy Journal*, 16(2), 111-118
- Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A., 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., Gänzle, M., 2010. Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5834-5841.
- Garai-Ibabe, G., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L., Fernández de Palencia, P., 2010. Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -D-glucan producing *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains with potential utility in the food industry. *Bioresource Technology*, 101(23), 9254-926.
- Garcia-Garibay, M., Marshall, V. M. E., 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 70, 325-328.
- Germond, J.E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., 1995. A new mobile genetic element in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 248, 407–416.

- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1-3), 57–69
- Grmanova , M., Vlkova , E., Rada, V., Holmutova , I., 2010. Survival of bifidobacteria in adult intestinal tract. *Folia Microbiologica*, 55, 281–285.
- Guedon, G., Bourgoïn, F., Pebay, M., Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J. M., Decaris, B., 1995. Characterization and distribution of two insertion sequences, IS1191 and iso- IS981, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures?. *Molecular microbiology*, 16(1), 69-78.
- Gürsoy, A., Özkaya, F.D., Yıldız, F., Aslım, B., 2006. Ekzopolisakkarit Üretimi Yüksek *Streptococcus thermophilus* W22 ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 Suşlarının Yoğurt Üretiminde Kullanımı. 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, Türkiye. 607.
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., Abraham, A. G., 2015. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 129-135.
- Hammes, W. P., Ganzle, M. G., 1998. Sourdough breads and related products. In *Microbiology of fermented food*, 2nd ed.; Wood, B. J. B., Ed. Elsevier 199-216.
- Hartzell P. L., Millstein J., Lapaglia C., 1999. Biofilm formation in hyperthermophilic archaea. *Methods in Enzymology*, 310,335–349.
- Hassan, A.N., Frank, J.F., Schmidt, K..A., Shalabi, S.I., 1996. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal Dairy Science*, 79, 2098-2103.
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemistry Journal*, 316(2),695-696.
- Henry, D. E., & Prapulla, S. G., 2014. Exopolysaccharide producing lactic acid bacterium from traditional lactic fermented preparations: screening, biosynthesis dynamics, compositional analysis of exopolysaccharide and evaluation of its probiotic potential. *Annals, Food Science and Technology*, 2, 336-344.
- Higashimura, M., Mulder-Bosman, B. W., Reich, R., Iwasaki, T., Robijn, G. W., 2000. Solution properties of Viilian, the exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Biopolymers* 54,143–158.
- Ibarburu, I., Puertas, A. I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M. A., Prieto, A., Dueñas, M. T., 2015. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International journal of food microbiology*, 214, 54-62.

- Ismail, B., Nampoothiri, K. M., 2010. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192,1049–1057.
- Jansson PE, Lindberg B. Structural studies of varianose. *Carbohydrate Research*, 1980;82:97–102.
- Jindal, N., Pal Singh, D., Singh Khattar, J., 2013. Optimization, characterization, and flow properties of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Lyngbya stagnina*. *Journal of Basic Microbiology*, 53(11), 902-912.
- Jindal, N., Singh, D.P., Khattar, J.I.S., 2011. Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoria formosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2139–2146.
- Jolly ,L., Vincent, S. J. F., Duboc, P., Neeser, J. R., 2002. Exploiting EPSs from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 367–374.
- Jolly, L., Stinglele, F., 2001. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 733-745.
- Kaur, V., Bera M.B., Panesar P.S., Chopra H.K.,2013. Production and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Alcaligenes Faecalis* B14 Isolated from Indigenous Soil. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4, 365-374.
- Kılıç, S., 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, no: 542, İzmir. 451 s.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F., Ziegler, G.R.,1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2),659-664
- Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I.C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., de Vos, W.M., 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 357-365.
- Kogan, G., Matulová, M., Michalková, E., 2002. Extracellular polysaccharides of *Penicillium vermiculatum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 452–8.1.
- Kohama, K., Fujimoto, M., Kuninaka, A., Yoshino, H., 1974. Structure of malonogalactan, an acidic polysaccharide of *Penicillium citrinum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 127–34
- Kontusaari, S., Forsen, R., 1988. Finnish fermented milk "Viili": involvement of Iwo cell surface proteins in production 01 slime by *Streptococcus lactis* ssp *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 71, 3197-3202.

- Korakli, M., Rossmann, A., Ganzle, M. G., Vogel, R. F., 2001. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5194–200.
- Korakli, M., Vogel, R. F., 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790-803.
- Krajl, S., van Geel-Schutten, G. H., Van Der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L., 2003. Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in *Lactobacillus* strains. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(4-5), 181-187.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64(1),15-21.
- Lacaze, G., Wick, M., Cappelle, S., 2007. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. *Food Microbiology*, 24 (2), 155–160.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., Withers, S. G., 2008. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Biochemistry*, 77(1), 521.
- Lamothe, G., Jolly, L., Mollet, B., Stingele, F., 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Archives of Microbiology*, 178(3), 218-228.
- Laws, A. P., Marshall, V. M., 2001a. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 709–721.
- Laws, A., Gu, Y., Marshall, V., 2001b. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 19(8), 597-625.
- Liang T. W., Wang S.L., 2015. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp. :production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine Drugs*, 13, 1847-1863.
- Llauberes, R. M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., Fournet, B., 1990. Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*, 203(1), 103-107.
- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahan, D. J., Oberg, C. J., Broadbent, J. R., 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2147–2151.
- Macedo, M.G., Lacroix, C., Champagne, C.P., 2002. Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* rw-9595m in a whey permeate based medium. *Biotechnological Progress*, 18(2), 167-173.

- Macura, D., Townsley, P. M., 1984. Scandinavian ropy milk-identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science*, 67, 735–744.
- Madhuri, K. V., Prabhakar, K. V., 2014. Microbial exopolysaccharides: Biosynthesis and potential applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1401-1410.
- Malang, S. K., Maina, N. H., Schwab, C., Tenkanen, M., Lacroix, C., 2015. Characterization of exopolysaccharide and ropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food microbiology*, 46, 418-427.
- Martensson, O., Biörklund, M., Lambo, M.A., Dueñas-Chasco, M.T., Irastorza, A., Holst, O., Norin, E., Walling, G., Öste, R., Önning, G., 2005. Fermented ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition Research*, 25(5), 429-442
- Martensson, O., Dueñas, M., Irastorza, A., Öste, R., Holst, O., 2003. Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 36(3), 353-357
- Mende, S., Krzyzanowski, L., Weber, J., Jaros, D., Rohm, D., 2012. Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 2, 185–191.
- Mollet, B., M. Delley, M., 1990. A b-galactosidase deletion mutant of *Lactobacillus bulgaricus* reverts to generate an active enzyme by internal DNA sequence duplication. *Molecular Genetics and Genomics*, 227, 17–21.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot R.M., Remaud-Simeon, M., 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.
- Moulis, C.; Joucla, G.; Harrison, D.; Fabre, E.; Potocki-Veronese, G.; Monsan, P.; Remaud-Simeon, M., 2006. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (42), 31254–31267.
- Mozzi, F., Oliver, G., De Giori, G. S., De Valdez, G. F., 1995. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 50, 80-82.
- Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G., 2003. UDP-galactose 4-epimerase: a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 175– 183.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Moreno, M. R. F., de Valdez, G. F., De Vuyst, L., 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing

lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 4431-4435.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A., 1999 Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38,113–126.

Navarini, L., Abatangelo, A., Claudia, B., Conti, E., Bosco, M., Picotti, F., 2001. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi20. *International Journal of Biological Macromolecules*. 28, 219–226.

Nehad, E. A., El-Shamy, A. R., 2010. Physiological studies on the production of exopolysaccharide by fungi. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(6), 1303-1308.

Neve, H., Geis, A., Teuber, M., 1988. Plasmid-encoded functions of ropy lactic acid streptococcal strains from Scandinavian fermented milk. *Biochimie*, 70, 437–442.

Nicolaus B., Kambourova M., Oner E.T., 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145–1158.

Nicolaus B., Manca M. C., Romano I., Lama L., 1993. Production of an exopolysaccharide from two thermophilic archaea belonging to the genus *Sulfolobus*. *FEMS Microbiology Letters*, 109(2-3), 203–206.

Nwodo U. U., Green E., Okoh A. I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 279–289.

Pawar, S. T., Bhosale, A. A., Gawade, T. B., Nale, T. R., 2013. Isolation, screening and optimization of exopolysaccharide producing bacterium from saline soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3, 24-31.

Petersen, B.L., Dave, R.I., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R., 2000. Influence of capsular and ropy exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* on mozzarella cheese and cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 83, 1952-1956.

Provencher, C., LaPointe, G., Sirois, S., Van Calsteren, M.R., Roy, D., 2003. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3299–3307.

Purwandari, U., Shah, N.P., Vasiljevic, T., 2007. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1344-1352.

- Racine, M., Dumont, J., Champagne, C. P., Morin, A., 1991. Production and characterization of the polysaccharide from *Propionibacterium acidipropionici* on whey based medium. *Journal of Applied Microbiology*, 71, 233-238.
- Ricciardi, A., Clement, F., 2000. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science*, 12(1), 23-45.
- Robijn, G. W., Gallego, R. G., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., 1996a. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydrate Research*, 288, 203-218.
- Robijn, G. W., Wienk, H. J. L., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., J. F. G. Vliegthart. 1996b. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydrate Research*, 285, 129-139.
- Roussel, Y., Pebay, M., Guedon, G., Simonet, J. M., Decaris, B., 1994. Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. *Journal of Bacteriology*, 176, 7413-7422.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2008. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, In: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. B. Mayo, P. López, and G. Pérez-Martín (Ed.), 137-166, Research Signpost, ISSN 978-81-308-0250-3, Kerala, India.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., P. Zoon., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Ruas-Madiedo, P., Zoon, P., 2003. Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 213, 245-253.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Ruas-Madiedo, P., 2009. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4158-4168.
- Sánchez, J. I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., Rodríguez, A., 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7495-7502.
- Sandford, P.A., 1979. Exocellular, microbial polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Volume 36. Academic press, Inc; 265-313. ISBN 0-12-007236-X

- Schellhaass, S. M., 1983. Characterization of exocellular slime produced by bacterial starter cultures used in the manufacture of fermented dairy products. PhD diss, University of Minnesota, St Paul, USA.
- Schellhaass, S. M., Morris, H. A., 1985. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting withropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Structure*, 4(2), 279-287.
- Shang, N., Xu, R., Li, P., 2013. Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH. *Carbohydrate polymers*, 91(1), 128-134.
- Shihata, A., Shah, N.P., 2002. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 765-772.
- Sinnott, M.L., 1991. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, 90(7), 1170-1202.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2), 105-111.
- Stingele, F., Neeser, J. R., Mollet, B., 1996. Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of bacteriology*, 178(6), 1680-1690.
- Sutherland, I. W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147 (1), 3-9.
- Şimşek Ö., Çon A. H., “Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve ekzopolisakkaritlerin süt ürünlerindeki fonksiyonları” Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 87-94 s, 22-23 Mayıs, İzmir, 2003
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C., 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712.
- Teggatz, J. A., 1990. Rheological and microstructural characteristics of yoghurt made with exopolymer-producing cultures. PhD diss, University of Minnesota, St Paul, MN, USA.
- Teggatz, J. A., Morris, H. A., 1990. Changes in the rheology and microstructure ofropy yogurt during shearing. *Food Structure*, 9(2), 133-138
- Tieking, M., Gänzle, M. G., 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 79-84.

- Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R.F., Gänzle, M.G., 2005. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 692–702.
- Tieking, M.; Korakli, M.; Ehrmann, M. A.; Gänzle, M. G.; Vogel, R. F., 2003. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2), 945–952.
- Torino, M. I., Mozzi, F., Font de Valdez, G., 2005. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68,259–265.
- TSE, 2008. Bal-Fruktoz, glukoz, sakaroz, turanoz ve maltoz muhtevası tayini - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (hplc) metodu. TS 13359, Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara Türkiye.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen S., 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 393–398.
- Van Calsteren, M. R., Pau-Roblet, C., Be ´gin, A., Roy, D., 2002. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal*, 363,7–17.
- van Casteren, W. H. M., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., 2000. Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydrate Research*, 327, 411–422.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G. F., De Vuyst, L., 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International journal of food microbiology*, 118(3), 250-258.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*, 118 (3), 250–258.
- van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., ten Brink, B., Smith, M. R., Dijkhuizen, L., 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 697–703.
- van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G.H., 2006. Structure-function Relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.

- van Kranenbug, R., Marugg, J. D., de Vos, W., 1995. Genetics of exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*, poster abstr. P-77. In *Abstracts of the Carbohydrate Bioengineering Meeting*, April 23–26, 1995, Elsinore, Denmark. Sintef Unimed, Trondheim, Norway
- Van Kranenburg, R., Vos, H. R., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., de Vos, W. M., 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6347-6353.
- Van Oevelen, D., Verachtert, H., 1979. Slime production by brewery strain of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37, 34–37.
- Vanangelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L., 2004. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is Reflected in their Production and their Molecular and Functional Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2), 900-912.
- Vedamuthu, E. R., Neville, J. M., 1986. Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology*, 51,677–682.
- Velasco, S. E., Areizaga, J., Irastorza, A., Dueñas, M.T., Santamaria, A., Muñoz, M.E., 2009. Chemical and rheological properties of the β -glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1827-1834
- Vescovo, M., Scolari, G. L., Bottazzi, V., 1989. Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Biotechnology Letters*, 2,709–712.
- Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T., Anandapandian, K. T. K., 2011. Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Advances in Biological Research*, 5(2), 71-76.
- von Wright, A., Tynkkynen, S., 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* strains with a single plasmid associated with mucoid phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 53,1385–1386.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., He, C., Yang, Y., Yang, Z., 2015a. Isolation and Characterization of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet Kefir. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(4), 269-280.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., Yang, Z., 2015b. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate polymers*, 125, 16-25.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2014. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International journal of biological macromolecules*, 63, 133-139.

- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X., 2010 . Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903.
- Welman, A.D., Maddox, S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges” *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274.
- Werning, M. L., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Navas, J., López, P., 2006. *Pediococcus parvulus* gtf Gene Encoding the GTF Glycosyltransferase and Its Application for Specific PCR Detection of β -D-Glucan-Producing Bacteria in Foods and Beverages. *Journal of Food Protection*, 69(1), 161-169.
- Werning, M. L., Nácher, M., López, P., de Palencia, P. F., Aznar, R., Notararigo, S., 2012. Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. INTECH Open Access Publisher.
- West, T.P., 2000. Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253. *Journal of Basic Microbiology*, 40, 397–401.
- Westphal, O., Jann, K., 1965. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 83-91.
- Wood, B.J.B., 1997. *Microbiology of fermented food*, Blackie Academic & Professional, ISBN 0-7514-0216-8, London, United Kingdom
- Wu ,S., Chen, J., Pan, S., 2012. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1696–700.
- Zhang, Y. U., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., Yang, Z., 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2080-2091.

EKLER

Ek-1: Çözeltiler

50 X TAE hazırlanışı:

242 g Tris

57,1 mL asetik asit (glacial)

100 mL 0.5 M EDTA (pH 5.8) ölçülerek hacim 1 litreye tamamlanır.

1 X TAE hazırlanışı:

20 mL 50 X TAE alınır ve hacim 1 litreye tamamlanır.

1 M NaCl hazırlanışı:

58,44 g NaCl tartılır ve hacim 1 litreye tamamlanır.

%0,8 NaCl çözeltisinin hazırlanışı:

0,8 g NaCl tartıldıktan sonra 100 mL ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür.

1 X TE çözeltisinin hazırlanışı:

10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

6 X Loading Dye hazırlanışı:

4 g sukroz ve 2.5 mg bromofenol blue 6 mL TE içerisinde çözündürülür ve hacim 10 mL'ye tamamlanır.

% 5 Fenol çözeltisinin hazırlanışı:

5 gr fenol tartılır ve hacim 100 mL'ye tamamlanır.

dNTP karışımının hazırlanışı:

100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP çözeltilerinden 20µL alınır sonra 920 µL ultra saf su ile karıştırılır.

Ringer çözeltisinin hazırlanışı:

1 adet Ringer tablet 500 mL ultra saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanır.

Ek- 2: Laktik asit bakterilerinin liyofilizasyon tartım sonuçları

L. plantarum türlerine ait liyofilizasyon tartım sonuçları

Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)	Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)
<i>L. plantarum</i> AC10-40	31110	<i>L. plantarum</i> AK4-11	41750
<i>L. plantarum</i> AB16-65	26608	<i>L. plantarum</i> AK6-27	20468
<i>L. plantarum</i> AC21-1031	31052	<i>L. plantarum</i> BK10-48	7100

L. fermentum türlerine ait liyofilizasyon tartım sonuçları

Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)	Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)
<i>L. fermentum</i> AB5-18	27725	<i>L. fermentum</i> AK2-8	20888
<i>L. fermentum</i> BB16-75	18760	<i>L. fermentum</i> AK5-22	37630
<i>L. fermentum</i> AC18-87	26223	<i>L. fermentum</i> AK6-26	19265
<i>L. fermentum</i> BB19-90	29250	<i>L. fermentum</i> BK10-44	22080

Enterococcus türlerine ait liyofilizasyon tartım sonuçları

Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)	Bakteri adı	Tartım sonucu (mg/L)
<i>E. faecium</i> BK9-42	26950	<i>E. faecium</i> BK8-36	16305
<i>E. faecium</i> AB19-95	19703	<i>E. faecium</i> BK11-50	29768
<i>E. faecium</i> AK4-16	26625	<i>E. faecium</i> 98	30573

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ali SOYUÇOK
Doğum Yeri ve Yılı : Tavas, 1990



<u>Eğitim Durumu</u>	<u>Yıl</u>
Lise : Hasan Tekin Ada Lisesi, Denizli	2004-2007
Lisans :Atatürk Üniversitesi, Erzurum	2008-2012
Yüksek Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur	2013-2016

<u>Çalıştığı Kurum / Kurumlar</u>	<u>Yıl</u>
-----------------------------------	------------

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

Basyigit Kilic, G., Soyucok, A., Determination of Exopolysaccharide Production Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria (2015). The International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics – IPC2015, 23rd – 25th June 2015 Budapeşte, Macaristan.

Ali SOYUÇOK, Teslime Ekiz, Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ. Ekzopolisakkaritlerin gıda sanayisindeki önemi (2015). İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi 28-30 Nisan 2015, Nevşehir, Türkiye. Kongre Kitabı p. 158 (Poster sunum) (2015).

Ali SOYUÇOK, Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ. Süt kaynaklı olmayan probiyotik gıdalar (2015). İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi 28-30 Nisan 2015, Nevşehir, Türkiye. Kongre Kitabı p. 159 (Poster sunum) (2015).

Soyucok, A., Ekiz, T., BAŞYİĞİT KILIÇ, G., 2016. Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayisindeki Önemi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi Dergisi TARGİD Özel Sayı (2016): 332-344.

TEZ TESLİM KONTROL LİSTESİ

1. Tez metni 21x29,7cm boyutlarında standart, birinci hamur beyaz A4 kağıdına (80-120 gram) hazırlandı mı?
2. Tezin dış kapağı **Ek-1**'e göre hazırlandı mı?
3. Tez dış kapağına 2,5 cm ölçülerinde üniversitenin amblemi yerleştirildi mi?
4. Tez sayfaları lazer yazıcı kullanılarak yalnızca kağıdın tek yüzüne basıldı mı?
5. Tez metninin yazılmasında yazı karakteri olarak **Times New Roman** kullanıldı mı?
6. Yazımda her sayfanın sol kenarında 3cm, diğer kenarlarda 2,5cm boşluk bırakıldı mı?
7. Yazım kurallarında belirtilen satır ve paragraf aralıklarına uyuldu mu?
8. Ana ve ara başlıklar uygun puntoda ve belirtilen özelliklerde yazıldı mı?
9. Sayfa numaralandırılması belirtilen şekilde yapıldı mı?
10. Tezin dış kapağı sonrası boş sayfa konuldu mu?
11. Tezin iç kapağı **Ek-2**'ye göre hazırlandı mı?
12. Jüri onay sayfası **Ek-3**' e uygun olarak yazıldı mı?
13. Etik kurallara uygunluk beyanı **Ek-4**'e uygun olarak hazırlandı mı?
14. Önsöz ve/veya Teşekkür sayfası **Ek-5**' e uygun olarak yazıldı mı?
15. İçindekiler sayfası **Ek-6**' ya uygun olarak hazırlandı mı?
16. Şekil ve Çizelge dizinleri **Ek-7**'ye uygun olarak hazırlandı mı?
17. Simgeler ve kısaltmalar **Ek-8**'e uygun olarak yazıldı mı?
18. Türkçe özet tezin içeriğini yansıtıyor mu?
19. Türkçe özet sayfası **Ek-9**'a göre hazırlandı mı?
20. Türkçe özete önerilen şekilde anahtar kelimeler konuldu mu?
21. Türkçe ve İngilizce özet birbiri ile uyumlu mu?
22. İngilizce özet sayfası **Ek-10**'a göre hazırlandı mı?
23. İngilizce özete anahtar kelimeler konuldu mu?
24. Şekil ve çizelgeler uygun şekilde hazırlandı mı?
25. Şekil ve çizelgelerin üst, alt başlık ve açıklamaları uygun şekilde yazıldı mı?
26. Tez içinde varsa, alıntılar belirtilen şekilde yazıldı mı?
27. Tez içinde varsa, dipnotlar belirtilen şekilde yazıldı mı?
28. Kaynaklar metin içinde doğru şekilde kullanıldı mı?
29. Metin içerisinde kullanılan kaynakların tamamı kaynaklar listesine yazıldı mı?
30. Kaynaklar **Ek-11**'de belirtilen şekilde yazıldı mı?
31. Ekler uygun başlık seçilerek, tez içindeki sunuş sırasına göre ve her biri ayrı sayfadan başlamak üzere, tez arkasında verildi mi?
32. Özgeçmiş sayfası **Ek-12**'ye göre hazırlandı mı?
33. Tez çalışmasından yayın yapıldı mı?

Tez Enstitü'ye teslim için UYGUNDUR.

Öğrenci

Adı Soyadı

Danışman

Unvanı, Adı Soyadı