

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
(LAB) İZOLASYONU, MOLEKÜLER METOTLARLA TANIMLANMASI
VE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hümevra İSPİRLİ

Haziran - 2016

BAYBURT

**ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
(LAB) İZOLASYONU, MOLEKÜLER METOTLARLA TANIMLANMASI
VE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ**

Hümevra İSPİRLİ

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Birinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayla ARSLANER
İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ**

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
(LAB) İZOLASYONU, MOLEKÜLER METOTLARLA TANIMLANMASI
VE EKZOPOLİSAKARİT (EPS) ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hümevra İSPİRLİ

2016

BAYBURT

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAY SAYFASI

Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi

Yrd. Doç. Dr. Ayla ARSLANER ve Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ danışmanlığında, Hümeýra İSPİRLİ tarafından hazırlanan bu tez çalışması 13/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Bülent ÇETİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hüseyin SERENCAM

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayla ARSLANER

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Özlem ÇAKIR

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.


Prof. Dr. Rabîl AYAZOĞLU

Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bu çalışmada şahsıma ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Hümevra İSPİRLİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN (LAB) İZOLASYONU, MOLEKÜLER METOTLARLA TANIMLANMASI VE EKZOPOLİSAKARİT (EPS) ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ

Hümeyra İSPİRLİ

Bayburt Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Birinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayla ARSLANER
İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ

Geleneksel fermente ürünlerin üretimde rol alan Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nin endüstriyel anlamda starter olarak kullanılabilmesi o ürünün tat, yapı, aroma gibi özelliklerini oluşturan biyokimyasal faaliyetlerindeki çeşitliliğe ve ilgili metabolitleri üretme yeteneklerine bağlıdır. LAB türlerinin fermantasyon sırasında *in situ* olarak ekzopolisakkaritleri (EPS) üretmeleri hem ürünün fizikokimyasal niteliklerinde önemli gelişimlere neden olur hem de üreten türün çevresiyle etkileşimi çerçevesinde fonksiyonel sonuçlar oluşturabilir. Bu bağlamda bu tezin amacı Erzincan Tulum peynirinden EPS üreticisi starter olabilecek LAB türlerini izole etmek, bu türlerde homopolimerik ve heteropolimerik *eps* genlerini açığa çıkarmak ve bu türlerin ürettikleri EPS'yi karakterize etmektir.

Bu tez kapsamında tulum peyniri örnekleri Erzincan ili merkezi ve köylerinden toplanmış ve LAB türleri izole edilerek tanımlanmıştır. Tulum peyniri örneklerinden *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus garvieae* ve *Lactobacillus crustorum* suşları izole edilmiş ve bu türlerde *eps* genlerinin PCR ile tespiti tulum peyniri izolatlarının türlere göre değişmekle birlikte homopolimerik *gff* geni ve heteropolimerik EPS genlerini taşıdığı gösterilmiştir. Yapılan EPS üretim testleri bu türlerde EPS üretim miktarının birbirine yakın olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca seçilen bu türlerin EPS üretim kabiliyetlerinin farklı besiyeri ortamında değiştiği görülmüştür. Tulum peyniri izolatlarının ürettiği şeker gruplarının ortaya konması açısından türler pastörize süt ve %3 laktozlu MRS broth da geliştirilmiş ve EPS izolasyonu gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi tulum peyniri izolatlarının sadece glukoz içeren EPS ürettiklerini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar geleneksel olarak üretilen Erzincan Tulum peyniri üretiminde rol alan türler açısından EPS üretiminin önemini ortaya koymaktadır.

2016, 104 sayfa

Anahtar kelimeler: Tulum peyniri, LAB, Ekzopolisakkarit, *Eps* genleri

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) FROM ERZINCAN TULUM CHEESE, DETERMINATION BY MOLECULAR METHODS AND GENETICALLY DETERMINING OF THEIR EXOPOLYSACCHARIDES (EPS) PRODUCTION POTENTIAL

Humeyra ISPIRLI

Bayburt University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Department of Food Engineering
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayla ARSLANER
Second Supervisor: Asst. Prof. Dr. Enes DERTLI

The potential use of lactic acid bacteria (LAB) involved in the production of traditional fermented products as starter cultures depends on the diversity of their biochemical activities that play role on taste, structure, flavor properties of these products and their ability to produce relevant metabolites. The in situ exopolisaccharide (EPS) production characteristics of LAB during the fermentation both results in substantial improvement in the physicochemical properties of the final product and also play roles in the interaction of these species with their environment that may result in functional outcomes. In this respect, the aim of this thesis was to isolate LAB species with EPS production characteristics that might be the starter culture for Ezincan Tulum cheese productino, to investigate the presence of homopolymeric and heteropolymeric *eps* genes in these species and to characterize the EPS produced by these species.

In this thesis, tulum cheese samples were collected from Erzincan and its villages and LAB species were isolated and identified from these cheeses. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus garvieae* and *Lactobacillus crustorum* strains were isolated from cheeses samples and PCR detection of *eps* genes in these species revealed the presence of both homopolymeric and heteropolymeric *eps* genes in these species. The EPS production tests revealed that these species produced similar levels of EPS. It was observed that EPS production levels of the selected strains altered in different media conditions. In order to reveal the sugar groups produced by tulum cheese isolates, these species were grown in pasteurized milk and MRS broth containingsg 3% lactose and EPSs were isolated. HPLC analysis of the EPSs revealed that all strains produced EPS that included only glucose. These results demonstrate the importance of EPS production in LAB species that have a significant impact on Erzincan Tulum cheese production.

2016, 104 pages

Keywords: Tulum cheese, LAB, Exopolysaccharides, *Eps* genes

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca hem bilimsel hem de hayat tecrübesi ile bana her zaman yardımcı olan, bilimsel çalışma anlayışını ve iç disiplinini örnek aldığım, değerli hocam ve eř danışmanım Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye bana her alanda ışık tuttuğu için içtenlikle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Fatma Nur DEMİRBAŞ'a, hayatım boyunca madi manevi desteklerini yanımda hissettğim canım aileme ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca eğitim giderlerimi karşılayan TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na sonsuz teőekkürler.

Hümeyra İSPİRLİ

Haziran /2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iiix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 Erzincan Tulum Peynirinin Genel Özellikleri.....	6
2.2 Peynir Endüstrisindeki Laktik Starterlerin Başlıca Grupları	8
2.2.1 Mezofilik starter kültürler	8
2.2.2 Termofilik starter kültürler.....	9
2.2.3 Non-Starter Laktik Asit Bakterileri.....	10
2.3 Peynirde Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Peynir İçin Önemi	10
2.3.1 Asit üretimi	11
2.3.2 Proteolitik aktivite.....	11
2.3.3 Lipolitik aktivite.....	12
2.3.4 Tat ve aroma bileşikleri oluşumu	12
2.3.5 Antimikrobiyal özellik	13
2.4 Mikrobiyal Polisakkaritler	13
2.5 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler.....	15
2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Sentezlenen Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi	20
2.7 Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit Üretiminin Genetiği	25

2.8 Ekzopolisakkarit Biyosentezini Etkileyen Faktörler.....	32
2.9 Tezin Amacı.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1 Materyal	35
3.1.1 Erzincan tulum peyniri örnekleri	35
3.1.2 Besiyerleri	35
3.1.3 Primerler.....	36
3.2 Yöntem.....	38
3.2.1 Tulum peyniri örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler	38
3.2.1.1 Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı	38
3.2.1.2 Maya ve küf sayımı.....	38
3.2.1.3 Laktokokların sayımı	38
3.2.1.4 Laktobasillerin sayımı	39
3.2.2 Tulum peyniri örneklerinde yapılan fiziksel ve kimyasal analizler	39
3.2.2.1 Kurumadde tayini.....	39
3.2.2.2 Yağ tayini	39
3.2.2.3 Tuz tayini	40
3.2.2.4 Titrasyon asitliği tayini	40
3.2.2.5 pH tayini.....	41
3.2.2.6 Protein tayini	41
3.2.3 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu	41
3.2.3.1 Kültür ortamı.....	41
3.2.3.2 Bakteriyel suşlar ve büyüme koşulları	41
3.2.4 Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması	42
3.2.5 Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması.....	42
3.2.5.1 Fenotipik tanımlama.....	42

3.2.5.1.1 Koloni morfolojisi	42
3.2.5.1.2 Gram boyama	42
3.2.5.1.3 Katalaz testi	42
3.2.5.2 Genotipik olarak Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması	43
3.2.5.2.1 Genomik DNA izolasyonu	43
3.2.5.2.2 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon	43
3.2.5.2.3 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.....	44
3.2.5.2.4 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü	46
3.2.5.2.5 PCR ürünlerinin saflaştırılması	47
3.2.5.2.6 Dizi analizi	48
3.2.6 İzole edilen bakterilerin filogenetik analizi.....	48
3.2.7 Homopolimerik ve heteropolimerik eps üretimi için gerekli <i>gtf</i> / <i>ftf</i> ve <i>p-gtf</i> genlerinin tespiti	48
3.2.8 EPS genleri tespit edilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması	48
3.2.8.1 Süt ortamında geliştirilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması	48
3.2.8.2 %3 Laktozlu MRS ortamında geliştirilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması	49
3.2.9 Fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim miktarı analizi	50
3.2.10 Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	52
4.1 Tulum Peyniri Örneklerine Ait Bazı Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	52
4.1.1 Peynir örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı	52
4.1.2 Peynir örneklerinin maya ve küf sayısı.....	53
4.1.3 Peynir örneklerinde Laktokokların sayısı	53
4.1.4 Peynir örneklerinde Laktobasillerin sayısı.....	54
4.2 Tulum Peyniri Örneklerinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları	54

4.3 Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	57
4.4 İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	57
4.4.1 Laktik Asit Bakterilerinin fenotipik tanımlanması	57
4.4.2 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon	58
4.4.3 LAB türlerinin 16S rRNA genlerinin tanımlanması	60
4.5 Tulum Peynirinden İzole Edilen LAB ve Diğer Türler	61
4.6 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi	62
4.7 Tulum Peyniri İzolatlarında Homopolimerik ve Heteropolimerik <i>eps</i> Genlerinin Taranması	65
4.8 Fenol-Sülfirik Asit Testi İle Belirlenen EPS Üretim Miktarı	72
4.9 Tulum Peyniri İzotları Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Yapısal Karakterizasyonu	73
5. SONUÇ	79
KAYNAKLAR	82
EKLER	98
EK 1 <i>Lactobacillus plantarum</i> DP1'in 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	98
EK 2 <i>Lactobacillus paracasei</i> DP3'ün 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	99
EK 3 <i>Lactobacillus brevis</i> DP6'nın 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	100
EK 4 <i>Lactobacillus brevis</i> DP40'ın 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	101
EK 5 <i>Lactobacillus plantarum</i> TP44'ün 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	102
EK 6 <i>Weissella paramesenteroides</i> TP49'un 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram	103

EK 7 *Lactococcus garvieae* TP110'un 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren
Kromatogram..... 104

ÖZGEÇMİŞ..... 105



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram
×g	Yerçekimi İvmesi
kb	Kilobayt
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
N	Normalite
pH	Asitlik Bazlık Birimi
s	Saniye
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
Da	Dalton

Kısaltmalar

Ac, A	Asetil
ATP	Adenozin Trifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz Çifti

C	Karbon
CPS	Kapsüler Polisakkarit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
dTDP	Timidin Difosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
<i>F</i>	Furanoz
FTF	Fruktoziltransferaz
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
Gal	Galaktoz
Glc	Glukoz
GlcNAc	N- Asetil-Glukozamin
GRAS	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
GTF	Gluktoziltransferaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IBD	İltihabi Bağırsak Hastalığı
Kob	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LPS	Lipopolisakkarit
mRNA	Mesazcı RNA
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe
NJ	Neighbour-joining
<i>p</i>	Piranoz
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato Dextrose Agar
PG	Peptidoglikan Tabaka
RAPD	Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimerik DNA
Rha	Ramnoz

RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trikloroasetik Asit
TE	Tris-EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı
UDP	Üridin Difosfat
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1** *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. parabuchneri* ve *L. hilgardi* tarafından üretilen glukoz birimlerinden oluşan homopolisakkarit dekstranların kimyasal yapısı.....16
- Şekil 2.2** *L. rhamnosus* RW-9595M ve R (Glc, Glukoz; Gal, Galaktoz; Rha, Ramnoz and *p*, piranoz) tarafından üretilen glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluşan tipik heteropolimerik EPS yapısı.....17
- Şekil 2.3** LAB'nin birincil EPS yapısı: a, *Lactobacillus* spp. G-77 (homopolisakkarit); b, *Lactobacillus helveticus* TY1-2; c, *Streptococcus thermophilus* SFi12; d, *Lactobacillus acidophilus* LMG9433; e, *Lactococcus lactis rhamnosus* KL37B (heteropolisakkarit). Glc, glucoz; Gal, galactoz; GlcNAc, N-acetil-glukozamin; Rha, ramnoz; Ac, A, asetil; *p*, piranoz şekli; *f*, furanoz şekli; D- ve L- konfigürasyonunu gösterir.....18
- Şekil 2.4** Sitoplazmada laktoz, galaktoz ve glukozun dönüşümü yoluyla LAB'ın EPS üretiminin detaylı şematik gösterimi. Bazı modifikasyonlarla uyarlanmıştır. (PEP-PTS: Fosfoenol piruvat: karbonhidrat fosfo-transferaz sistemi).....21
- Şekil 2.5** *L. lactis* NIZO'nun EPS biyosentez modeli.....23
- Şekil 2.6** GTF'lerin genel yapısının şematik gösterimi; A) N-ucu sinyal bölümü, B) değişken bölge, C) katalitik alan, D) gluklan bağlayıcı alan.....26
- Şekil 2.7** (A) *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 ve (B) *S. thermophilus* Sfi6'ların *eps* gen kümelerinin organizasyonu ve varsayılan fonksiyonel mekanizmaları.....27
- Şekil 3.1** Bu çalışma kapsamında toplanan keçi derisinde olgunlaştırılmış tulum peyniri örneği.....35
- Şekil 3.2** 16S geni.....45
- Şekil 3.3** Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.....47
- Şekil 3.4** Fenol sülfirik asit testinde kullanılan standart eğri.....50
- Şekil 4.1** İzole edilen bakterilerin gram boyama görüntüsü.....58
- Şekil 4.2** Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....59
- Şekil 4.3** Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....59
- Şekil 4.4** Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....60

Şekil 4.5 16S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü.....	61
Şekil 4.6 Tulum peyniri izolatlarının 16S rRNA sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuş Dendogram. Filogenetik analiz Mega7 ile gerçekleştirilmiştir.....	64
Şekil 4.7 Seçilen izolatlarda Dextran genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	66
Şekil 4.8 Seçilen izolatlarda <i>epsA</i> genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	67
Şekil 4.9 Seçilen izolatlarda <i>epsB</i> genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	68
Şekil 4.10 Seçilen izolatlarda <i>epsEFG</i> genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	69
Şekil 4.11 Seçilen izolatlarda G-*-Bact-a-F-36/ G-*-Bact-a-R-27 genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	69
Şekil 4.12 Seçilen izolatlarda G-Lr-Bact-a-F-26/ G-Lr-Bact-b-R-20 genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü	70
Şekil 4.13 Pastörize süt içerisinde geliştirilen türlerin ürettiği EPS'e ait görüntü.....	74
Şekil 4.14 <i>Lactobacillus plantarum</i> DP1 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	74
Şekil 4.15 <i>Lactobacillus paracasei</i> DP3 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	75
Şekil 4.16 <i>Lactobacillus plantarum</i> TP44 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	75
Şekil 4.17 <i>Weissella paramesenteroides</i> TPS49 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	75
Şekil 4.18 <i>Lactobacillus plantarum</i> DPL1 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.	75
Şekil 4.19 <i>Lactobacillus paracasei</i> DPL3 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.	76
Şekil 4.20 <i>Lactobacillus brevis</i> DPL6 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.	76
Şekil 4.21 <i>Lactobacillus crustorum</i> DPL11 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.	76
Şekil 4.22 <i>Lactobacillus brevis</i> DPL40 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.	76

- Şekil 4.23** *Lactobacillus plantarum*TPL44 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.77
- Şekil 4.24** *Weissella paramesenteroides* TPL49 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.77
- Şekil 4.25** *Lactococcus garvieae*TPL110 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.77



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Süt endüstrisinde kullanılan mezofilik kültürler.....	9
Çizelge 2.2 Süt endüstrisinde kullanılan termofilik kültürler.....	9
Çizelge 3.1 Tez çalışması boyunca kullanılan primerler.....	37
Çizelge 3.2 RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı.....	44
Çizelge 3.3 RAPD-PCR analizi için oluşturulan PCR şartları.....	44
Çizelge 3.4 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR karışımı.....	46
Çizelge 3.5 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları.....	46
Çizelge 4.1 Peynir örneklerinin bazı mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	52
Çizelge 4.2 Peynir örneklerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait bazı istatistiksel analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.3 Tulum peynirinden elde edilen izolat sayıları.....	57
Çizelge 4.4 Tulum peyniri izolatlarının örneklerdeki dağılımı.....	62
Çizelge 4.5 Tulum peyniri izolatlarında homopolimerik ve heteropolimerik EPS üretiminin <i>gtf</i> , <i>dexreu</i> , <i>lev</i> ve <i>epsA</i> , <i>epsB</i> , <i>epsDE</i> ve <i>p-gtf</i> primelleri ile taranması.....	71
Çizelge 4.6 Aerobik koşullar altında tulum peyniri izolatlarının 37°C'de EPS üretim seviyeleri.....	73

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan peynir; süt ürünleri içerisinde en çok üretilip, tüketilen ve üzerinde en çok çalışma yapılan temel gıdalardandır. Dünyada 2000'den fazla peynir çeşidi olduğu bilinmekle beraber bu peynirlerin birçoğunun birbirine yakın üretim tekniğine sahip olduğu ve birçoğunun yalnızca belirli bir coğrafi bölgede üretildiği ve üretildiği yerde tüketildiği bilinmektedir. Çeşitlerinin fazlalığı, tüketicinin tercihlerine cevap verebilmesi bakımından oldukça önemlidir. Ülkemizde de 100'den fazla peynir çeşidinin bulunduğu (Çakmakçı, 2011) ve üretilen sütün yaklaşık %23'ünün peynir yapımında kullanıldığı belirtilmektedir (Tekinşen ve Nizamlıoğlu, 1993). Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre, üretilen peynirlerin yaklaşık %60'ını Beyaz peynir, %15'ini Kaşar ve %15'ini Tulum ve Mihaliç peynirleri oluştururken kalan %10'luk kısmı ise diğer yöresel peynirler oluşturmaktadır (Hayaloğlu, 2008).

Tulum peyniri Türkiye'de Trakya bölgesi hariç diğer bütün bölgelerde üretilen bir peynir çeşidimiz olup (Karacabey ve Uraz, 1974; Karaibrahimoğlu ve Üçüncü, 1988) üretildikleri bölgelere göre farklı isimlerle anılmaktadırlar. Tulum peynirlerinin yaygın olarak bilinenleri Erzincan Tulum peyniri, Çimi Tulum peyniri (Antalya), Divle Tulum peyniri (Karaman), Afyon Tulum peyniri (Afyon), Kargı Tulum peyniri (Çankırı, Çorum), Isparta Tulum peyniri (Isparta), Selçuklu Tulum peyniri (Konya) ile yapılışı ve muhafazası diğer tulum peynirlerinden çok farklı olan İzmir (salamuralı) Tulum peyniridir (Çakmakçı ve Çakır, 2012).

Erzincan Tulum peyniri ülkemizde Beyaz peynir ve Kaşar peynirinden sonra en çok üretilen peynir çeşididir ve bu peynirlerle kıyaslandığında daha yüksek ekonomik değere sahiptir (Çakmakçı vd, 2008). Erzincan Tulum peyniri özellikle üretildiği dağlık bölgelerde, üretilen sütün değerlendirilmesini sağladığı gibi, ekonomik yönden de üreticisine yüksek gelir sağlaması ve ülkemiz için dış satıma çok uygun bir peynir çeşidi olması gibi önemli özelliklere sahiptir (Töral, 1969; Akyüz, 1981).

Erzincan Tulum peyniri, genellikle koyun sütünden üretilmekte olup, bazen koyun sütüne keçi veya inek sütü de karıştırılarak da üretilmektedir. Kaliteli Erzincan Tulum peyniri, beyaz veya krem renkte, kolay dağılmayan (plastik özellikte), ağıza alındığında eriyerek kendine özgü tereyağı aroması kolaylıkla hissedilen, kurumadde ve yağ oranı yüksek, yarı sert, homojen yapıda, belirgin asidik ve ransit tatta olan bir peynir çeşidimizdir (Kurt vd, 1991a,b; Çakmakçı vd, 2009).

Tulum peyniri önceden yöresel olarak, küçük çapta üretilmekteyken besin değerinin çok yüksek olması ve her kesim tüketicinin beğenisini kazanması sonucu daha çok miktarlarda üretilmeye başlanan, tereyağı fiyatında satılan ve ihracatı yapılan peynirler arasında gösterilmektedir (Çakmakçı, 2010).

Kaliteli ve standart Erzincan Tulum peynirini sürekli olarak piyasadan temin etmek oldukça zordur. Bunun en büyük nedenlerinden biri Erzincan Tulum peynirinin yapımında standart bir üretim sisteminin bulunmamasıdır (Karaibrahimoğlu ve Üçüncü, 1988; Ceylan, 1998; Şengül, 2001; Çakmakçı, 2011).

Geleneksel fermente gıdaların özgün tekstürü, tadı, kokusu ve görünüşünün oluşmasında yöresel hammaddenin yanı sıra, oldukça etkili olan Laktik Asit Bakterileri (LAB) karbonhidratların fermantasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit üreten, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, düşük GC içeriğine sahip (%50'den az), zorunlu olarak fermentatif, aerotolerant veya anaerobik bakteri grubudur. LAB'leri kompleks besinsel gerekliliğe sahiptirler (karbonhidratlar, amino asitler, peptitler, yağ asitleri, vitaminler), bu nedenden ötürü fermente gıdalar gibi zengin besinsel ortamlarda bulunurlar ve bu ürünlerin oluşmasında temel olarak görev alırlar ve bakteri grupları arasında GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilen) statülerinden dolayı son derece önemlidirler (Tannock, 2004). Ayrıca günümüzde probiyotik olarak adlandırılan organizmaların büyük çoğunluğu LAB grubunun üyesidir. Laktik asit bakterileri genel olarak ürünlere kendine has tat, koku ve yapı kazandırmanın yanı sıra ürettikleri metabolitler ile koruyucu özelliğe sahiptirler. Son yıllarda birçok LAB türü ekzopolisakkaritler (EPS) olarak adlandırılan hem gıda maddelerinin yapısını stabilize eden hem de üreten türün canlılığının devamı açısından önem arz eden biyopolimerleri üretmeleri açısından dikkat çekmişlerdir.

Polisakkaritler dünyadaki en önemli biyolojik polimerlerdendir. Bu polimerlerin canlılar için enerji depo materyali olmak ve bakteri hücreleri de dahil olmak üzere hücre duvarlarının yapısını oluşturmak gibi birçok hayati fonksiyonları bulunmaktadır (Badel vd, 2011). Bakteriler de dahil olmak üzere birçok prokaryotik ve ökaryotik organizma hücre duvarlarının bileşiminde bulunmayan hücre-dışı ekzopolisakkaritler olarak adlandırılan polisakkaritler üretme kabiliyetindedirler. Ekzopolisakkarit terimi temel olarak hücre çeperi dışında bulunacak şekilde üretilen polimerleri ifade eder (Sutherland, 2001). Bakteriler teknolojik ve endüstriyel uygulamalar için ekzopolisakkarit üretiminden sorumlu temel organizmalardır (Öner, 2013).

Ekzopolisakkaritler hücreye sıkı bir şekilde bağlanmış kapsül formunda olan kapsüller EPS veya hücreye gevşekçe bağlı veya tamamen hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritler olarak iki formda olabilir. Kimyasal yapıları açısından mikrobiyal EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılırlar. Homopolisakkaritler glukoz veya fruktoz olmak üzere sadece tek tip şeker monomerinden oluşurlar. Heteropolisakkaritler ise birden fazla farklı şeker ünitelerinden, dallanmış şekerlerden, diğer organik ve inorganik moleküllerden oluşabilirler. Bu monomerler arasındaki glikozidik bağların niteliği birçok özgün EPS yapısının oluşmasına neden olmaktadır (Broadbent vd, 2003; De Vuyst ve Degeest, 1999; Kumar vd, 2007).

Gıda endüstrisi açısından ekzopolisakkaritler vizkoziteyi artırıcı, stabilize ve emülsifiye edici özelliklerinden ötürü son derece önem arz etmektedirler (Kanmani vd, 2011). Hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritlerin gıda sanayisinde temel kullanım amacı bu tür özelliklerin sağlanmasıdır. Bu amaca yönelik olarak kullanılan EPS'lere dekstranlar, ksantan, jellan, pullulan, maya glukanları ve bakteriyel aljinatlar örnek olarak gösterilebilir (Wang vd, 2008). Bakteriyel EPS'ler bakteri hücrelerinin antibiyotiklerden, kurumadan, faj ataklarından ve dış ortamlardan korunmasında ve biyofilm oluşumunda önem arz etmektedirler (Badel vd, 2011; Gauri vd, 2009; Lebeer vd, 2008). Bunun yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar bakteri hücrelerini çevreleyen EPS'lerin bağışıklık sisteminin uyarılması ve düzenlenmesi, antitümör, antiviral, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğunu göstermiştir (Liu vd, 2010; Pan ve Mei, 2010).

Peynir dünyada üretimi yapılan en önemli fermente ürünlerden biri olması münasebetiyle LAB türlerinin en önemli kaynağıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar fermente ürünlerden EPS üretim kabiliyeti gösteren LAB türlerinin izolasyonu ve EPS üreten türlerin starter kültür olarak kullanılabilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Tulum peyniri kendine has karakteristiklerinden dolayı ülkemiz açısından en önemli ticari peynirlerin başında gelmektedir. Bununla birlikte hala bu peynirin standart yöntemlerle üretilmesi noktasında ihtiyaç duyulan ülkemize özgü starter kültürlerin geliştirilmesine ve bu peynirin mikrobiyotasının açığa çıkarılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim yapılan bir çalışmada starter kültür ilavesi ile hazırlanan tulum peyniri örneklerinde starter kültür kullanılmayan örneklere göre istenmeyen mikrobiyal grupların daha az olduğu gösterilmiştir (Ateş ve Patır, 2001). Aynı araştırmacılar tulum peyniri üretiminde *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* + *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* karışımı starter kültürün istenen nitelikte tulum peyniri elde edilmesi için kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Dolayısıyla geleneksel yollarla yüzyıllardır üretilen bu peynir türümüzden starter kültür niteliğinde yeni türlerin izole edilebilmesi oldukça önemlidir. Başka bir çalışmada Erzincan ve çevresinden toplanan tulum peynirleri örneklerinden tam 240 adet LAB türü izole edilmiş olup bunların %92,08'inin *Lactobacillus*, %7,08'inin *Pediococcus* ve %0,83'ünün *Leuconostoc* cinslerine ait olduğu bulunmuştur (Şengül ve Çakmakçı, 2003). Bu çalışma tulum peynirinin mikroflorasının ne kadar zengin olabileceğinin gösterilmesi açısından oldukça dikkat çekicidir. Bu çalışmaya paralel başka bir çalışmada ise tulum peyniri florasının %48,5 oranında laktobasil, %32,7 oranında enterokok, %15,8 oranında laktokok ve %3,0 oranında streptokoktan oluştuğu gösterilmiştir (Öner vd, 2004). Yine diğer bir çalışma tulum peynirinin olgunlaşması esnasında *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* türlerinin hakim olabileceğini göstermiştir (Öksüztepe vd, 2005). Aynı zamanda başka bir çalışmada olgunlaşma sonunda tulum peyniri örneklerinden laktobasillere ilave olarak az da olsa *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerine de rastlanıldığı vurgulanmıştır (Gürses ve Erdoğan, 2006). Tulum peynirlerinin olgunlaşması sırasında kullanılan ambalaj materyalinin de bu peynirin mikroflorası üzerinde rol oynayabileceği gösterilmiş ve LAB dağılımının kullanılan materyale bağlı olarak

olgunlaşma boyunca değiştiği kaydedilmiştir (Çakmakçı vd, 2008). Bu çalışmaların yanı sıra tulum peynirinde istenmeyen birçok mikroorganizma grubunun da bulunabildiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla hem ürünün bütün karakteristiklerini etkileyebilecek düzgün bir floranın oluşumu hem de sağlık açısından herhangi bir sakınca doğurmayacak nitelikte ürün elde edilebilmesi amacıyla tulum peynirinden starter nitelik taşıyabilecek EPS üreten LAB türlerinin izolasyonu son derece elzemdir.

Bu bağlamda bu tez çalışması kapsamında geleneksel yollarla üretilen Erzincan Tulum peynirinden LAB türleri izole edilmiş ve moleküler metotlarla tanımlanmıştır. Takiben seçilen türlerde EPS üretiminden sorumlu homopolimerik ve heteropolimerik *eps* genleri PCR işlemi ile tespit edilmiş ve bu türlerde EPS üretim miktarı ve üretilen EPS'in monosakkarit kompozisyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Erzincan Tulum peynirinin oluşumunda rol alan LAB türlerinin ve bu türlerin EPS üretiminin ortaya çıkarılması açısından önem taşımaktadır. Aynı zamanda yeni türlerin bulunmasına paralel olarak gelecek çalışmalarla ticari açıdan tulum peynirinin üretiminin standardizasyonuna yönelik olarak yapılması planlanan faaliyetler bu tezin bir diğer önemli yönünü yansıtmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Erzincan Tulum Peynirinin Genel Özellikleri

Erzincan Tulum peyniri, tulum peynirlerinin en bilineni olup üretim miktarı açısından Türkiye'nin 3. sırada olan bir peynir çeşididir. Yarı sert karakterde olan peynir, Erzincan, Erzurum, Tunceli, Bingöl ve Elazığ illeri yaylalarında koyun sütünden geleneksel yöntemlerle üretilmekte olup, 3 ay ile 1 yıl gibi uzun bir olgunlaşma dönemine sahiptir ve bu süreler içinde tüketilmektedir (Çakmakçı, 2011). Erzincan Tulum peyniri Erzincan Sanayi ve Ticaret Odası tarafından 2000 yılında coğrafi işaret olarak koruma altına alınan ilk peynirimiz olup, peynirin tanımı Türk Patent Enstitüsü tarafından "Erzincan'ın yüksek rakımlı, 90–100 çeşit bitki zenginliğine sahip yaylalarında beslenen Karaman koyunundan yılın beşinci ve dokuzuncu ayları arasında alınan süttten özel işleme yapılan peynir" olarak tanımlanmıştır (Çakır, 2012).

Akyüz (1981) tarafından Erzincan Tulum peynirinin yapılışı ve bileşimi üzerine yapılan bir araştırmada, Erzincan, Tunceli ve Elazığ illerinde piyasadan elde edilen 26 adet peynir örneğinde yapılan çeşitli fiziksel ve kimyasal analizlerin sonucu ortalama olarak, kurumadde oranı %62,71, kurumadde yağ oranı %55,73, protein oranı %21,54 ve kurumadde de tuz %7,27 olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde, peynirin ortalama bileşimi Çakır (2011) tarafından kurumadde: %56,47, yağ oranı: %28,72, tuz oranı: %2,48, titrasyon asitliği: %0,90, pH değeri: %4,59 olarak verilirken, Şengül (2001), tarafından yapılan bir araştırmada ise tulum peynirlerinin fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları ortalama olarak, kurumadde oranı %55,44, yağ oranı %29,82, tuz miktarı %3,08, titrasyon asitliği %0,87, pH değeri 5,21, toplam protein %18,35 olarak bulunmuştur.

Erzincan Tulum peynirinin yapılışı, duyuusal, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine yapılan bir başka araştırmada ise; Erzurum ili ve çevresindeki Şavak peyniri işleyen göçebelere ve Erzincan ili ve çevresindeki yaylalardaki üreticilerden toplanan 26 adet peynir örneğinde yapılan çeşitli fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları ortalama olarak, kurumadde %53,21, yağ miktarı %28,20, protein oranı %18,51, kül

oranı %4,73, tuz oranı %3,44, % asitlik değeri %1,83 olarak bulunmuştur (Kurt vd, 1991b).

Bostan (1991), farklı tarihlerde İstanbul piyasasından elde ettiği 38 örnekten, keçi derisinde pazarlanan peynirler ile plastik bidonlarda bulunan peynirlerin duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine yaptığı araştırmada; keçi derisinde pazarlanan peynirler ile plastik bidonlarda bulunan peynirler arasında mikroorganizma potansiyeli açısından belirgin bir farklılık olmadığını belirtmiştir.

Erzincan tulum peynirinin bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine Çakır (2011) tarafından yapılan araştırmada, Erzincan ilindeki farklı satış noktalarında, plastik bidon ambalajlarda tüketime sunulan 20 adet tulum peynirlerinde yapılan mikrobiyolojik analiz sonuçları ortalama olarak TAMB sayısı 7,94 log kob/g, maya küf sayısı 4,54 log kob/g, koliform bakteri sayısı 2,81 log kob/g olarak bulunmuştur.

Arıcı ve Şimşek (1991) tarafından, kültür kullanımının tulum peynirlerinin duyusal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada kontrol amacıyla çiğ süttten üretilen tulum peynirlerinin 16. haftada yüksek oranda koliform bakteri ve koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus* içerdiği tespit edilmiştir.

Şengül (2001), tulum peyniri örneklerinde ortalama $1,1 \times 10^8$ kob/g TAMB, <10 , kob/g – $3,5 \times 10^5$ kob/g arasında koliform bakteri, ortalama $1,7 \times 10^5$ kob/g maya-küf, en az <10 kob/g en çok $6,1 \times 10^3$ kob/g *Staphylococcus aureus*, ortalama $2,9 \times 10^5$ kob/g lipolitik mikroorganizma, ortalama $4,0 \times 10^5$ kob/g proteolitik bakteri tespit etmiştir.

Arslaner (2008) tarafından yalnızca çiğ koyun sütü kullanılarak üretilen tulum peyniri örneklerinde araştırılan koagülaz (+) *Staphylococcus aureus* sayısı, 90. günde 3,33 log kob/g olarak tespit edilmiştir.

Kurt vd (1991a), tulum peyniri üzerinde yapmış oldukları araştırmada LAB sayısını en az $1,8 \times 10^5$ kob/g, en çok $3,8 \times 10^7$ kob/g ve ortalama $8,6 \times 10^6$ kob/g olarak belirlemişlerdir. Şengül (2001) yaptığı bir araştırmada tulum peynirinde bulunan LAB

sayısını en az $3,6 \times 10^5$ kob/g, en çok $3,6 \times 10^8$ kob/g ve ortalama $3,3 \times 10^7$ kob/g olarak bulmuştur.

Erzincan Tulum peyniri üretiminde, tulumun peynir ambalajlama materyali olarak karakteristik bazı özellikler taşımasına rağmen peynirde mikrobiyal kalite yönünden önemli dezavantajlar taşıdığı ve tulumla alternatif olarak peynir olgunlaştırılmasında birinci derecede selüloz içerikli kılıfın kullanılabileceği belirtilmiştir (Arslaner, 2008).

Ayrıca, Erzincan tulum peyniri üretiminde kullanılan koyun sütünün bu peynire has arzu edilen karakteristik aromayı önemli derecede etkilediği ve bu nedenle üretimde koyun sütünün tercih edilmesinin faydalı olacağı bildirilmiştir (Arslaner, 2008).

Erzincan Tulum peynirinin bileşimi ve mevcut üretim tekniği üzerine yukarıda bahsedildiği gibi birçok araştırma yapılmıştır. Özellikle piyasadan elde edilen tulum peyniri örneklerinin kalite niteliklerinin belirlendiği araştırmalarda, hammadde, üretim koşulları ve ambalaj materyalinden kaynaklanan tüm dezavantajların ortadan kaldırılması için Erzincan Tulum peynirinin standart ve modern bir üretim teknolojisi ile üretilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

2.2 Peynir Endüstrisindeki Laktik Starterlerin Başlıca Grupları

2.2.1 Mezofilik starter kültürler

Mezofilik kültürler, genel olarak homofermentatif ve heterofermentatif Laktokok türlerinden oluşan ve optimum gelişme sıcaklıkları 18-30°C arasında değişen kültürler olup 45°C'nin üzerinde gelişme gösteremezler. Bu kültürler, çoğunlukla çeşitli yayık altı esaslı içeceklerin eldesinde, ekşi kremadan tereyağı üretiminde, olgunlaştırılmadan tüketilebilen taze peynir çeşitleri ile çok sayıda yarı sert ve sert tip peynirlerin imalatında kullanılırlar. Ayrıca bazı peynir çeşitlerinin yapımında mezofil Laktobasillerden de yararlanılmaktadır (Üçüncü, 2010).

Çizelge 2.1 Süt endüstrisinde kullanılan mezofilik kültürler (Wegner, 1981; Spreer, 1988)

Mikroorganizmalar	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Kullanılan Ürünler
<i>Lactococcus lactitis</i> subsp. <i>lactis</i>	28...32	
<i>Lactococcus lactitis</i> subsp. <i>cremoris</i>	22...30	Tereyağı,
<i>Lactococcus lactitis</i> subsp. <i>diacetilactis</i>	28...32	yayıkaltı içecekleri,
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	~25	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	~25	çeşitli peynirler

2.2.2 Termofilik starter kültürler

Termofilik kültürler, yoğurt ve benzeri süt ürünleri ile yapımları sırasında pıhtısı veya telemesi ısıtılan sert tip peynir çeşitlerinin üretiminde kullanılırlar. Mezofilik kültürler gibi termofilik kültürler de pH değerini düşürerek, antimikrobiyal ve gelişmeyi önleyici diğer maddeler üreterek bakterisidal özellik gösterirler. Glikolitik ve proteolitik aktiviteleri Laktik Streptokoklara kıyasla daha yüksektir ve özellikle termofil Laktobasiller proteini aminoasitlere kadar parçalayabilirler (Üçüncü, 2010).

Çizelge 2.2 Süt endüstrisinde kullanılan termofilik kültürler (Wegner, 1981; Spreer, 1988).

Mikroorganizmalar	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Kullanılan Ürünler
<i>Streptococcus thermophilus</i>	38...40	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	40...45	Yoğurt ve pıhtısı
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	40...45	haşlanan çeşitli
<i>Lactobacillus helveticus</i>	42	peynirler
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	~37	

2.2.3 Non-Starter Laktik Asit Bakterileri

Peynirin olgunlaşmasında non-starter laktik asit bakterileri (NSLAB)'nin rolü tamamen aydınlatılmamıştır, ancak son dönemde özellikle süt ürünlerindeki Enterokok'ların NSLAB olarak fonksiyonları üzerinde durulmaktadır. Bu türler olgunlaşma sürecinde proteolitik ve lipolitik faaliyetleri neticesinde ürünün tat, yapı ve aromasının gelişmesinde önemli roller oynayabilmektedir. Bununla birlikte bazı türlerin zaman zaman kötü lezzet gelişimi gibi kusurlarada neden olabileceği vurgulanmaktadır (Fenelon vd, 1999).

2.3 Peynirde Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Peynir İçin Önemi

Süt ürünlerinin yapımında genel ilke, sütün bileşiminde bulunan temel besin maddeleri olan, başta laktoz olmak üzere protein ve yağın belirli düzeylerde parçalanmasına dayanır. Bu durumda en önemli görev kültür mikroorganizmalarına yani laktik asit bakterilerine düşmektedir. Bu bakterilerden ürünler bazında, belirli oranda laktik asit ile tat ve aroma maddeleri oluşturmaları, belli düzeyde proteoliz gerçekleştirmeleri, antimikrobiyal etkinlik göstererek istenmeyen ve patojen bakterilerin etkinliklerini sınırlamaları ve bazı ürünler için polisakkarit oluşturmaları beklenmektedir. Bu işlevleri mikroorganizmalar gerçekte, kendilerinin gelişme ve çoğalmaları için gereksinim duydukları besin maddelerini sağlamak amacıyla yaparlar (Üçüncü, 2010).

Peynirin kendine özgü tat, koku ve yapısı üzerine, üretimde kullanılan sütün çeşidi, uygulanan teknolojik işlemler, olgunlaşma süre ve sıcaklığı gibi faktörlere ilaveten starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların türü de etkili olmaktadır. Mikroorganizmalar sütte bulunan protein, laktoz ve süt yağını kullanarak meydana getirdikleri metabolitlerle peynirlerin tat, koku ve yapısının oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle süte starter kültür olarak katılan veya sütün doğal mikroflorasında bulunan laktik asit bakterileri peynir yapımını önemli derecede etkilemekte ve peynirin kalitesi üzerine önemli derecede etki etmektedir (Şengül, 2001).

2.3.1 Asit üretimi

Laktik asit bakterileri peynirde en çok kullanılan kültürler olup (Kosikowski, 1978; Cogan ve Daily, 1987; Gilliland, 1988) temel işlevleri asit oluşturmak ve aynı zamanda lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktır (Tunail ve Köşker, 1986; Özalp, 1988; Olson, 1990). Genellikle şekerleri fermente ederek karakteristik fermentasyon ürünü olan laktik asit üreten laktik asit bakterileri aşağıdaki gibi iki guruba ayrılmaktadırlar.

Heterofermentatif LAB: Metabolik faaliyetleri sonucu heksozlardan CO₂, laktik asit, asetik asit üretenler.

Homofermentatif LAB: Heksoz şekerlerin fermentasyonu sonucu esas olarak laktik asit üretenler.

Laktik asit bakterileri laktik asit üreterek pH'yı düşürmek, diasetil gibi aroma maddeleri üretmek, peynirin olgunlaşmasını sağlamak ve istenmeyen mikroorganizmaları inhibe edici maddelerin üretimi gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Al-Zoreky ve Sandine, 1991; Hammes ve Tichaczek, 1994).

Süte starter olarak katılan veya doğal olarak bulaşan laktik asit bakterilerinin peynirin yapımı ve olgunlaşmasındaki en önemli işlevlerinden biri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Oluşan laktik asidin, sütün peynir mayasıyla pıhtılaşması, peynir altı suyunun ayrılması, yapı ve lezzetin gelişmesi, ürünün patojenlere karşı korunması ve ürün dayanımının artırılması üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Diğer bir ifadeyle, laktik asit bakterilerinin faaliyeti sonucu artan asitlik peynir yapımını her yönden etkilemekte ve dolayısıyla peynirin bileşimi ve kalitesi üzerinde belirleyici olmaktadır (Fox vd, 1990).

2.3.2 Proteolitik aktivite

Starter kültürlerin teknolojik yönden önemli işlevlerinden biri de proteolizdir. Proteoliz, diğer bir anlatımla mikroorganizmaların salgıladıkları proteolitik enzimlerle proteinlerin parçalanması, starter bakterilerin asit oluşturma işlevi ve de ürünün duyuşal özellikleri açısından oldukça önemlidir (Üçüncü, 2010).

Çoğu LAB'nin sahip olduğu proteolitik aktivite, hem bu mikroorganizmaların gelişmeleri açısından hem de özellikle süt ürünlerinde tekstür ve lezzet oluşumu

açısından da büyük önem taşımaktadır (Van Den Berg vd, 1993). LAB türlerindeki birçok proteinaz ve peptidaz enzimlerinin kompleks etkisi toplam proteolitik aktiviteyi oluşturmaktadır (Kamaly ve Marth, 1989).

Olgunlaşma süresince meydana gelen proteoliz; LAB ve tesadüfe bağlı olarak bulunan diğer mikroorganizmalar, süt enzimleri ve süt proteinazlarınca gerçekleştirilen kompleks bir prosesdir (Scolari vd, 1996).

Starter kültürlerin proteolitik enzimleri (proteinazlar ve peptidazlar) peynirlerin duyuşsal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Bahsi geçen enzimler, peynir mayası enzimleri ile birlikte, kazeini kısmen hidrolize ederek peynirde dokusal değişmelere neden olurlar. Aynı zamanda, bu etkinlikler sonucu oluşan peptitler ve aminoasitler, çeşitli kimyasal değişimlere uğrayarak peynir lezzetine katkıda bulunan yeni bileşikler oluştururlar ve peynirde bulunan ikincil floranın gelişmesine ve beslenmesine yardımcı olurlar (Üçüncü, 2010).

2.3.3 Lipolitik aktivite

Starter bakteriler ayrıca lipitlerin parçalanmasında da rol oynarlar. Özellikle hücre yüzeyine lokalize olan lipaz enzimlerinin etkinliği ile süt yağı hidrolize olarak yağ asitleri ve gliserine; yağ asitleri de keton, ester ve aldehitlere parçalanırlar ve oluşan bu parçalanma ürünleri de peynir aromasına katkı sağlar.

Laktik asit bakterilerinin lipolitik aktivitesi tür ve cinslere göre farklılık gösterir ve starter bakteriler süt yağını oldukça yavaş hidrolize ederler. Mezofilik starter bakteriler mono ve digliseritleri hidrolize edebildiği halde, tri gliseritler üzerine olan etkileri yetersizdir. Termofilik starter bakteriler ise yeterli düzeyde lipolitik etki gösterirler.

Süt ve süt ürünlerinin birçoğunda serbest yağ asitlerinin oluşumu istenmezken, diğer bileşenlerle birlikte karakteristik peynir aromasını meydana getirdiklerinden dolayı bazı peynir çeşitlerinde bu asitlerin oluşumu arzu edilmektedir (Üçüncü, 2010).

2.3.4 Tat ve aroma bileşikleri oluşumu

Starter bakterilerin diğer önemli bir işlevi de, aroma maddelerini oluşturmalarıdır. Peynirde tat ve kokunun oluşmasında en büyük etken proteoliz sonucu oluşan peptitler,

aminoasitler ve bunların parçalanma ürünleridir. Aminoasitlerden triptofan, glisin, histidin, arginin, asparajin asit, lizin, tirozin ve serin'in koku ve tat üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Üçüncü, 2010).

2.3.5 Antimikrobiyal özellik

Özellikle çiğ süttten işlenmiş ve olgunlaşma sürecini tamamlamamış peynirlerde bazı patojen mikroorganizmaların gelişmesi ve insan sağlığını olumsuz etkileme riski yüksektir. Ancak, peynire süttten gelen veya yapım aşamasında bulaşan patojen mikroorganizmalar ile saprofit bakterilerin gelişimi, etkin bir starter kültür faaliyeti ile engellenebilmektedir. Starter kültürlerin bu özelliği, gelişmeleri sırasında oluşturdukları çeşitli bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Söz konusu bileşiklerden en önemlileri: Laktik asit, asetik asit, sitrik asit, propiyonik asit, hidrojen peroksit, çeşitli uçucu yağ asitleri, antibiyotikler ve bakteriyosinlerdir.

Biyokoruyucular olarak isimlendirilen ve LAB'nin önemli metabolitlerinden olan bakteriyosinler, Gram (+) bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, kısmen dar spektrumda bakterisidal aktivite sergileyen, küçük yapılı, ısıya dayanıklı, aktif proteinlerdir (Thomas ve Wimpenny, 1996). Bunların birçok patojen veya bozulma etkeni Gram pozitif bakterilere karşı bakteriyosidal etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Peynir üretimi açısından önemli LAB türlerinin istenen bir diğer özelliği de ekzopolisakkarit üretimidir ve bu konuya genel bir başlık altında değinilmiştir.

2.4 Mikrobiyal Polisakkaritler

Polisakkaritler, gezegenimizdeki en önemli biyolojik yapılardan biridir. Bu biyopolimerlerin biyolojik olaylar açısından birçok hayati fonksiyonları vardır. Benzer olarak enerji depolama materyali olarak kullanılırlar ve bakterilerin hücre duvarı materyalinin esas komponentlerinden biridirler. Örneğin, teikoik asit, teikuronik asit, lipopolisakkaritler ve peptidoglukan gibi bakteriyel hücre duvarı komponentleri polisakkaritlerden oluşur. Arkea, alg, fungi, bakteri ve mayaları da içeren çoğu prokaryotik ve ökaryotik organizmalar, ekstraselüler polisakkaritler olarak tanımlanan çeşitli farklı yapılı hücre duvarı yapılarını da içine alan polisakkaritleri üretebilirler. Bu terim, dış hücre yüzey tabakası haricinde bakteriyel ve mikrobiyel

hücreler tarafından üretilen polimerleri ifade etmektedir. Bakteriler, teknolojik ve endüstriyel uygulamalarda hücre dışı polisakkaritlerin üretimi için organizmaların ana grubunu oluşturmaktadırlar.

Hücre dışı polisakkaritler kapsüler polisakkaritler (CPS) olarak tanımlanan bakteriyel hücre yüzeyine ya sıkı sıkı tutunabilen ya da ekzopolisakkaritler (EPS) olarak tanımlanan bakteriden tamamen kopan veya bakteriyel hücrelere gevşek bir şekilde bağlanabilen hücre dışını çevreleyen polisakkaritler olarak iki şekilde tanımlanırlar. Mikrobiyel EPSler, kimyasal kompozisyonuna göre heteropolisakkarit ve homopolisakkarit olarak iki gruba ayrılırlar ve yapılarında büyük çeşitlilik gösterirler. Homopolisakkaritler, farklı bağlantılarla tekrarlayan birim yapılarında aynı şeker alt birimlerinden oluşur. Homopolisakkaritler ağıza ait *Streptococci* ve *Escherichia coli* gibi Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin dış kapsül tabakasının bir parçası olabilir ya da *Acetobacter* spp. tarafından üretilen bakteriyel selüloz gibi salgı materyalinin çevresine salgılanabilirler. Mikrobiyal homopolisakkaritlerin en önemli örneklerinden biri dekstrandır. Dekstranlar, tıpta geniş yelpazede uygulama alanına sahiptirler ve *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilirler. Benzer olarak farklı LAB türleri de homopolimerik EPS üretir. Heteropolisakkaritler, iki ya da daha fazla çeşit şeker alt birimleri, substiye şekerler, diğer organik ve inorganik moleküllerin meydana getirdiği tekrarlayan birimlerden oluşurlar. Mikrobiyal heteropolisakkaritlerin yaygın örneği, peptidoglukandır. Peptidoglukan, hücre duvarının esas komponentidir ve N-asetilglukozamin ve N-asetilmüramik asit birimlerinin tekrarlayan ünitelerinden oluşur. EPS'nin yapısal özellikleri ve doğal bileşenlere olan talep nedeniyle son yıllarda özellikle gıda endüstrisi başta olmak üzere kimya, farmasötik ve tıp alanında EPS'e olan ilgi artmıştır. Bakteri hücrelerinin kurumasından, antibiyotiklerden, fagositoz ve faj saldırılarından bakteriyel hücreleri koruma gibi birkaç fonksiyona sahip olan bakteriyel EPS'in biyofilm oluşturmada önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. EPS'ler benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Dekstranlar, ksantan, gellan, pullulan, maya glukanları ve bakteriyel aljinatlar gıda formülasyonlarında yıllardır kullanılan bazı mikrobiyal EPS örnekleridir. Son dönemlerde, EPS'in bağışıklık sistemini olumlu yönde etkilediğine dair yayınlanan veriler EPS'e olan ilgiyi arttırmıştır. EPS'nin

antitümör, antiviral, iltihap söktürücü ve antioksidan ajan gibi önemli rollerinde bulunduğu rapor edilmiştir.

Laktik asit bakterileri, GRAS olarak tanımlandığı için bakteriler arasında en önemli gruptur. Ayrıca, karbonhidrat metabolizmasının son ürünü olarak laktik asit oluşturmaları bu grubun üyelerinin başlıca ayırt edici özelliğidir. LAB'dan elde edilen EPSler, pastacılık sektöründe ve ekmek, peynir, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin duyuşal, tekstür ve reolojik özelliklerini geliştirmek amacıyla gıda endüstrisinde geniş bir alanda kullanılmaktadırlar. Ayrıca, süt ürünlerinin formülasyonlarında daha az yağ kullanımını ve tadın daha iyi algılanmasını sağlamaktadırlar. Böylece EPS kullanımı gıda formülasyonlarındaki toplam maliyeti azaltmaktadır. Buna ek olarak, LAB'den elde edilen EPS'in kan kolesterol seviyesini düşürdüğü, immün sistemi uyarıcı aktiviteye sahip olduğu ve antitümör etkilerinin olduğu sağlık araştırmaları sonucunda rapor edilmiştir.

Geçmiş yirmi yılda, yoğurt gibi süt ürünlerinin teknolojik ve reolojik özelliklerini geliştirmek için süt starter kültürlerinden üretimlerinin araştırılması, biosentez mekanizmaları, yapıları ve yeni polimerlerin belirlenmesi LAB'tan üretilen EPS ile ilgili başlıca yapılan araştırmalardır. EPS alanında son zamanlardaki gelişmeler, konak-bakteri, bakteri-bakteri interaksiyonundaki EPS'in rolleri ve bağırsakta ortak yaşayan bakteriler tarafından üretilen kapsüller EPS'in biosentez mekanizması ve yapısı EPS'e olan ilgiyi daha da arttırmıştır.

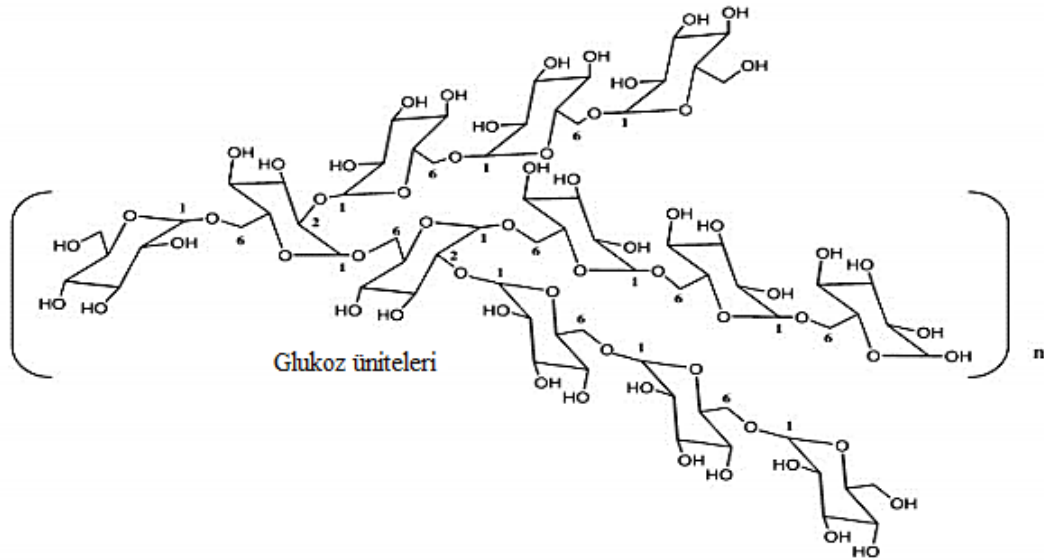
2.5 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler

LAB'leri, hayvan ve insanların mide-bağırsak yolunu içeren ve geniş çeşitlilikte habitatı olan Gram pozitif bakterilerdir. Süt ve diğer fermente gıdalarda önemli bir rol oynamaktadırlar (Remus vd, 2012) ve gıda endüstrisinde sadece gıda fermantasyonları için starter kültür olarak değil, aynı zamanda gıda formülasyonlarında gıda katkısı olarak da kullanılmaktadırlar. Daha da önemlisi, ticari probiyotiklerin büyük çoğunluğu LAB'lerinin üyeleridir. Probiyotikler canlı mikroorganizmalardır ve uygun miktarlarda alındıklarında konakçıya sağlık açısından fayda sağlamaktadırlar. *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* ve yaklaşık olarak 30 *Lactobacillus* suşunda LAB'nin birkaç türünün EPS ürettiği gözlemlenmiştir. Bunlar gıda

endüstrisinde yağ ikamesi, emülgatör, stabilizatör, kalınlaştırıcı ve diğer önemli amaçlar için kullanılmaktadır (Badel vd, 2011; Broadbent vd, 2003). LAB'leri de hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS sentezleyebilmektedirler.

LAB'in homopolisakkaritleri ya glukozlar veya dekstranlar (Şekil 2.1) olarak tanımlanan glukoz ünitesinden ya da fruktanlar veya levanlar olarak tanımlanan fruktoz birimlerinden oluşmaktadırlar (De Vuyst ve Degeest, 1999).

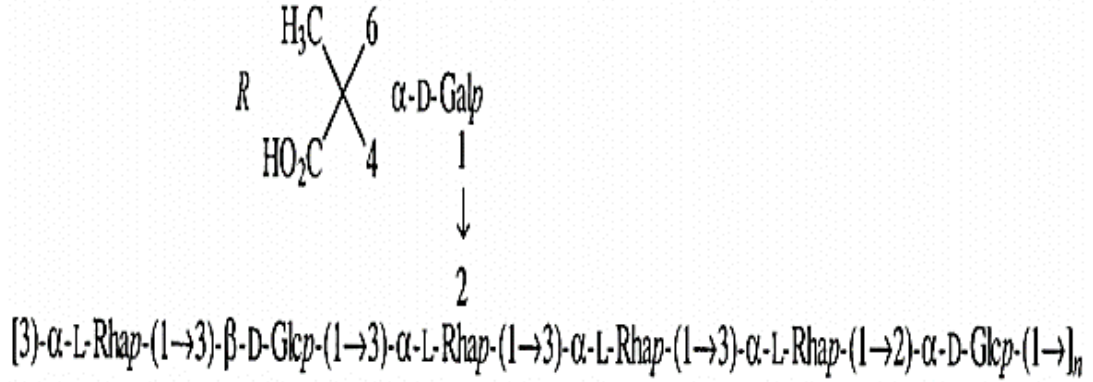
Fruktoz ve glukoz köklerinin dallanma pozisyonu ve glikozidik bağlanmalarının çeşitliliği sonucunda yeni homopolisakkaritler oluşur.



Şekil 2.1 *Lactobacillus fermentum*, *L. sakei*, *L. parabuchneri* ve *L. hilgardi* tarafından üretilen glukoz birimlerinden oluşan homopolisakkarit dekstranların kimyasal yapısı (Badel vd, 2011)

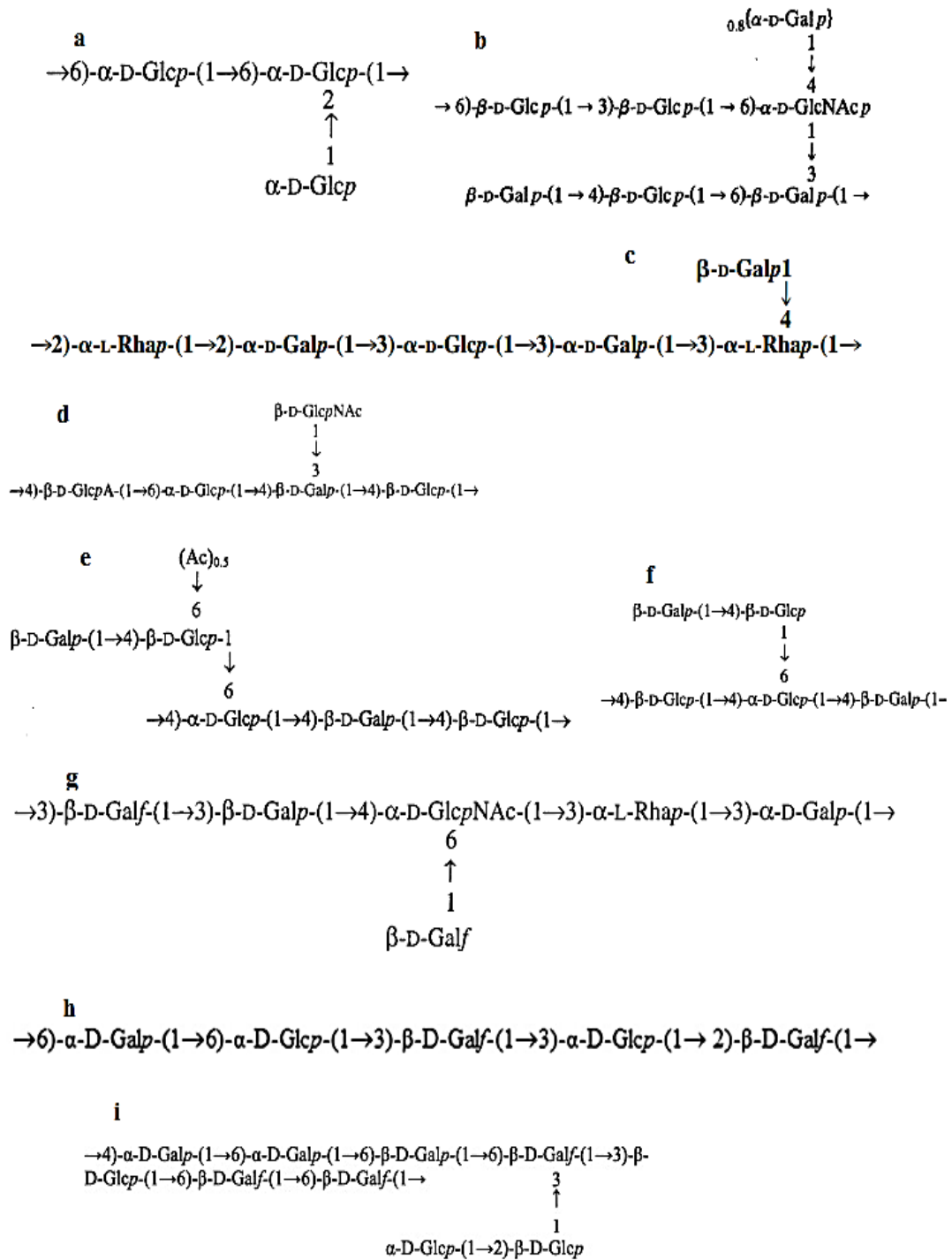
Heteropolisakkaritler farklı şeker monomerlerinden oluşmaktadırlar. Fakat genelde üç ana şeker monomerinden oluşurlar ve bu şekerler ramnoz, glukoz ve galaktozdur (Şekil 2.2) (De Vuyst ve Degeest, 1999). Bununla birlikte heteropolisakkaritlerdeki çeşitlilik monosakkarit sayısının yanı sıra bu monomerler arasındaki bağlantılardan kaynaklanır ve aynı zamanda LAB'lerin heteropolisakkaritlerinin tekrarlayan ana birim yapılarındaki karbonhidrat olmayan komponentleri farklı türler tarafından üretilen farklı EPS'lerin oluşumunu sağlar (Badel vd, 2011). Bir dış katman gibi hücre

yüzeyine sıkıca bağlanmış LAB'nin kapsüler EPS'sini ve çevreye direk olarak salgılanan LAB'nin hücre dışı EPS'sini birbirinden ayırmak önemlidir.



Şekil 2.2 *L. rhamnosus* RW-9595M ve R (Glc, Glukoz; Gal, Galaktoz; Rha, Ramnoz and *p*, piranoz) tarafından üretilen glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluşan tipik heteropolimerik EPS yapısı (Van Calsteren vd, 2002)

LAB'nin EPS'sine olan asıl ilgi hücre dışı EPS ile ilgilidir ve bunlardan birkaçı dekstranlar gibi ticari ürünlerdir ve bunlar, kimyada jel filtrasyon ve kromatografi işlemlerinde (Sephadex columns); tıpta ise kan plazması ikamesi (Dekstran 70) olarak geniş bir alanda kullanılmışlardır (Badel vd, 2011; Monsan vd, 2001). LAB'lerinin EPS'leri aynı zamanda gıda bilimi ve gıda endüstrisi ile alakalıdır ve vizkozlaştırıcı, stabilize edici, emülsifiye edici maddelerdir. Fermente ve fermente olmayan gıda ürünlerinin tekstürel ve yapısal özelliklerindeki rollerinden dolayı büyük ilgi çekmişlerdir (Remus vd, 2012). LAB'leri tarafından üretilen birincil homopolimerik ve heteropolimerik EPS yapılarının bazı örnekleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 LAB'nin birincil EPS yapısı: a, *Lactobacillus* spp. G-77 (Dueñas-Chasco vd, 1998) (homopolisakkarit); b, *Lactobacillus helveticus* TY1-2 (Yamamoto vd, 1994); c, *Streptococcus thermophilus* SFi12 (Lemoine vd, 1997); d, *Lactobacillus acidophilus* LMG9433 (Robijn vd, 1996a); e, *Lactococcus lactis rhamnosus* KL37B (Gorska-Fraczek vd, 2011) (heteropolisakkarit). Glc, glucoz; Gal, galactoz; GlcNAc, N-acetil-glucozamin; Rha, ramnoz; Ac, A, asetil; *p*, piranoz şekli; *f*, furanoz şekli; D- ve L- konfigürasyonunu gösterir.

Tersine LAB'nin hücre yüzeyi ile bağlantılı olan EPS'in (kapsüler) rolü belirsiz kalmıştır. Kapsüler EPSler, bakteri-bakteri ve bakteri-konak interaksiyonlarında çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Aslında, patojenik bakterilerde kapsüler polisakkarit oluşumundaki rolü kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır ve bu bakterilerin patojenliği, fagositoza bir doğal bariyer görevi gören kapsül oluşumu ile ilgilidir (Garcia vd, 2000). Buna rağmen, LAB'de EPS ile ilişkili olan hücre yüzeyinin kesin görevine henüz karar verilebilmiş değildir. LAB'lerinin EPS ile bağlantılı olan hücre yüzeyinin potansiyel biyolojik rolleri son zamanlarda birkaç çalışmada gösterilmiştir. İltihabi bağırsak hastalığı olan (IBD) farelerin bağırsağından izole edilen bir suş olan *L. johnsonii* 142 den üretilen EPS'in yapısı kısa süre önce tespit edilmiştir. Sağlıklı fareden izole edilen *L. johnsonii* 151 hücresinden EPS'e karşı bir reaksiyon olmazken; IBD'li fareden izole edilen *L. animalis*'in EPS'si, *L. johnsonii* 142'nin bütün hücrelerine karşı antikorları çapraz tepkime göstermiştir (Gorska vd, 2010). Bu olay, IBD'de iltihabi işlemlerle ilgili konak tepkilerini etkileyebilen EPS'in yapısını ortaya koyabilir. Ayrıca, *L. casei* shirota'dan elde edilen EPS, konak sinyalizasyon mekanizmasında EPS'in önemli bir rolünü gösteren makrofajlar, pro-inflamatuar tepkileri baskılamıştır (Yasuda vd, 2008). Diğer bir iyi bilinen probiyotik organizma *L. rhamnosus* GG'dir. Muhtemelen bakteriyel hücre yüzeylerinde adhezyon bölgelerinin ortaya çıkmasından dolayı hücre yüzeyinde galaktozca zengin EPS'i kaybı bağırsak epitelyum hücrelerine bağlanımının artmasına neden olmuş ve bu EPS'nin biyofilm oluşturmada önemli bir rol oynadığı da gözlemlenmiştir (Lebeer vd, 2009).

Benzer şekilde insan bağırsağından elde edilen *L. johnsonii* NCC 533'de kapsüler EPS tabakasının kaybı, rodent bağırsaklarında kalıcılığın azalması ile sonuçlanmıştır (Denou vd, 2008). Bununla birlikte, EPS ile *in vivo* kolonizasyon ve *in vitro* çökme özelliklerinin korelasyon içinde olabileceği rapor edilmiştir (Walter vd, 2008). LAB gibi kommensal bakterilerin kapsüler polisakkaritlerinin rolüyle (Tzianabos, 2000), immün modülasyonunda patojenik bakterilerin kapsüler polisakkaritlerinin rolünün bilinmesi arasında büyük bir farklılık vardır. Ancak yapılan araştırmalar, Bifidobakteriler ve LAB'ın EPS'siyle bağlantılı olan hücre yüzeylerinin immün modülasyonu aktivitelerini de içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Fanning vd, 2012; Hidalgo-Cantabrana vd, 2012). *L. plantarum*'un kapsüler polisakkaritlerinin konakçı immün hücrelerinin immün tepkilerini azalttığı gösterilmiştir.

2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Sentezlenen Ekzopolisakkaritlerin Biyosentezi

Birçok LAB suşu, farklı yapılarda homopolimerik ve heteropolimerik EPS'i geniş bir çeşitlilikte üretir ve bu olay tekrarlayan EPS birimlerinin üretimi için gerekli özel glikoziltransferaz enziminin doğasına bağlıdır. LAB türlerinde EPS üretiminin biyosentez mekanizması oldukça benzerlik gösterebilir (Jolly ve Stinglele, 2001). LAB'de heteropolimerik EPS biyosentezi kompleks bir prosestir. Bu kompleks proses, *eps* gen kümeleri tarafından kodlanan birkaç gen ürünü için özel roller içermektedir. Ayrıca bu proses, birkaç ekspresyonu değişmeyen temel gen ürünlerinin fonksiyonunu da gerektirir (Laws vd, 2001). Benzer şekilde, sitoplazmada ekspresyonu değişmeyen temel gen üretimi, homopolimerik EPS üretimi için bir başlangıç noktasıdır. Fakat yalnızca tek özel gen ürünü heteropolimerik EPS'yle kıyaslanan ürün için gereklidir. EPS üretimi için özel gen kümeleri, *Lactococcus* gibi mezofilik LAB cinsleri için plazmide yerleşmiş durumdayken, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* gibi termofilik cinsler için ise kromozama yerleşmiş durumdadır (Laws vd, 2001). Ayrıca *Lactobacillus casei* CG11'nin EPS üretiminin bir plazmidle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fakat diğer bir *L. casei* suşunun EPS üretiminin kromozomlarla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Dupont vd, 2000; Kojic vd, 1992). EPS biyosentezi için ilk ana element, hücre metabolizmasında katabolik şeker degradesyonunun son ürünü olan glukoz-6-fosfattır (Welman ve Maddox, 2003) (Şekil 2.4).

dönüşür (Welman ve Maddox, 2003). Şeker nükleotidlerinin üretimi için değişik gen kodlayıcı enzimler, farklı LAB suşları için de belirlenmiştir (de Vos ve Vaughan, 1994; De Vuyst ve Degeest, 1999; Grobben vd, 1996; Kleerebezem vd, 1999; Peant vd, 2005). Örneğin, beş *L. rhamnosus* suşunun *eps* kümesinin, prekürsör dTDP-rhamnozun biyosentezi için gerekli genleri barındırdığı gösterilmiştir (Lebeer vd, 2009; Peant vd, 2005). Bu şeker nükleotidleri, monosakkaritlerin polimerizasyonu ve diğer tip monosakkaritleri üretmek için heteropolimerik EPS biyosentezinin şeker ara çevriminde (epimerizasyon, dekarboksilasyon ve dehidrajenasyon) gereklidir (De Vuyst ve Degeest, 1999).

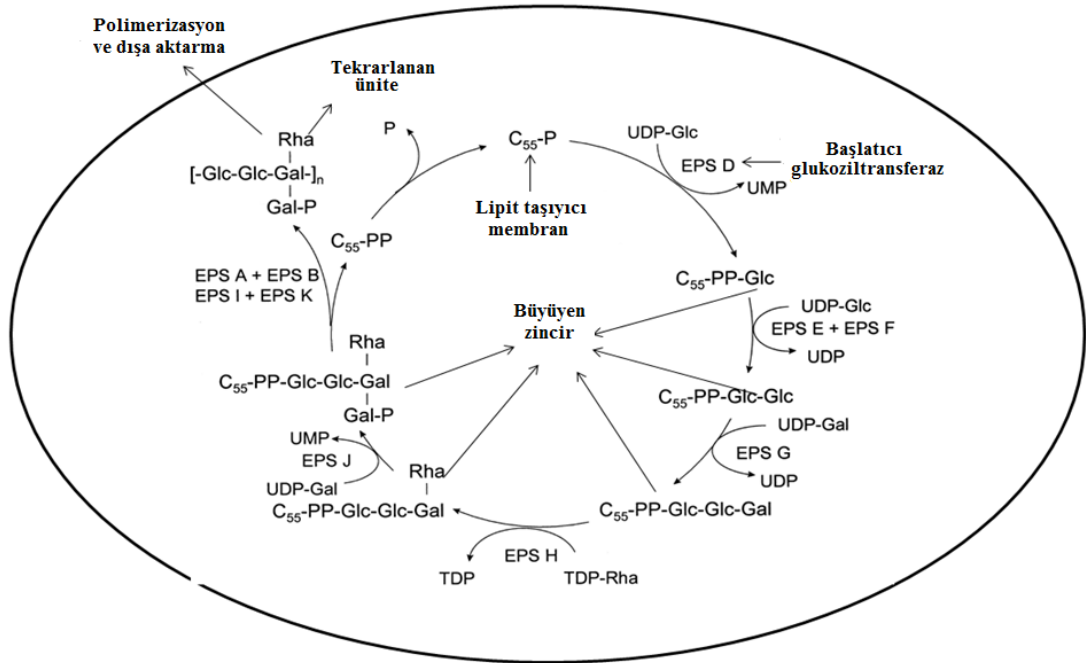
Ekspresyonu değişmeyen temel genler ve *eps* kümelerine yerleşen özel genler tarafından şeker nükleotidlerinin üretimi yapıldıktan sonra, tekrarlayan birimli monosakkarit toplulukları şeker nükleotidlere aktive olur ve EPS üretiminin sonraki adımları sırasıyla spesifik glukoziltransferaz ve spesifik enzimler tarafından gerçekleştirilir (De Vuyst ve Degeest, 1999). LAB'de *eps* gen kümeleri tarafından kodlanan bu özel enzimler, birkaç LAB türü için belirlenmiştir (Jolly vd, 2002; Nierop Groot ve Kleerebezem, 2007; Stingele vd, 1996; Van Kranenburg vd, 1997). Glukoziltransferaza ek olarak bu *eps* kümeleri, zincir uzunluğunun belirlenmesi ve şeker biyosentezinin düzenlenmesiyle bağlantılı olan birkaç önemli gen kodlayıcı enzimleri bünyesinde bulundurur. Bu genlerin ürünleri zincir uzunluğunun belirlenmesi; polimerizasyon, dışa verme (export) ve tekrarlayan birimlerin biyosentezi için gereklidir (Badel vd, 2011).

Glukoziltransferazlar, EPS içeren polisakkaritler, oligosakkaritler ve disakkaritlerin biyosentezini içeren prokaryotik ve ökaryotik enzimlerdir. Bu enzimler, genellikle nükleotid şekerleri aktive olan donör moleküllere transfer ederler. Bu donör moleküller, bir şeker fosfat ya da bir disakkarit olabilir. Spesifik akseptör molekülleri, glukoziltransferaz enziminin yapısına bağlı olarak yeni glukozidik bağların oluşumuyla meydana gelen şeker monomerleri ya da lipit taşıyıcı molekülleri ya da büyüyen bir karbonhidrat zinciri olabilir (Saxena vd, 1995).

Eğer glukoziltransferaz bir α -glukoziltransferazsa, donör şeker kalıntılarının anomerik konfigürasyonu α bağlantıları ile bir arada tutulacaktır. Eğer glukoziltransferaz bir β -glukoziltransferazsa, donör şeker bileşenleri anomerik konfigürasyonuna

dönüşecektir. (Lairson vd, 2008; María Laura Werning, 2012). Glukoziltransferazlar etki mekanizmasına bağlı olarak ilerleyen (prosesif) ve ilerlemeyen enzimler (non-prosesif) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. İlerleyen enzimler, akseptörlere şeker artıklarını transfer edebilen enzimlerdir. İlerlemeyen enzimler ise akseptör moleküllere tek bir şeker kalıntısının transferini katalizleyebilen enzimlerdir (Saxena vd, 1995). İlerleyen ve ilerlemeyen glukoziltransferazlar, LAB'ın homopolimerik ve heteropolimerik EPS için tekrarlayan birim yapılarının biyosentezinde gereklidir.

Heteropolimerik EPS üretiminin ilk adımında glukoziltransferaz, izoprenoid lipid taşıyıcısına ilk şeker nükleotidlerini bağlar. Bu olayı glukoziltransferazla ilişkilendirilen şeker nükleotidlerin eklenmesi takip eder. Glukoziltransferazlar, LAB'da EPS'nin tekrarlayan birimlerine şekil vermek için *eps* gen kümelerinde kodlanırlar (De Vuyst ve Degeest, 1999).



Şekil 2.5 *L. lactis* NIZO'nun EPS biyosentez modeli (Van Kranenburg vd, 1997). De Vuyst ve arkadaşlarından uyarlanmıştır (De Vuyst ve Degeest, 1999).

EPS'nin tekrarlayan birim yapıları için spesifik şeker nükleotidleri, enzimler tarafından bir araya getirilirler. Bu enzimler, LAB'ın ekspresyonu değişmeyen temel genlerinde veya spesifik *eps* gen kümelerinde kodlanabilirler. LAB'ın ekspresyonu değişmeyen temel genleri ve *eps* gen kümeleri, sitoplazmanın şeker havuzunda şeker

nükleotidleri oluşumu için ara çevrimde gereklidir (Broadbent vd, 2003). Bir UDP-glukoz 4-epimeraz olan enzim örneklerinden birisi de GaIE'dir. UDP-glukoz 4-epimeraz, UDP-glukoz and UDP-galaktozun ara çevrimini katalize eder. UDP-glukoz ve UDP-galaktozun her ikisi de *Streptococcus thermophilus*'da EPS'nin tekrarlayan birim yapılarının oluşumu için gereklidir (Delcour vd, 1999; Stingele vd, 1999).

Hücre zarının iç kısmından zarın iç kısmına doğru tekrarlayan birimlerin dışa verilmesi ve polimerizasyonu diğer bir adımdır. Temelde, *eps* gen kümelerinde kodlanan üç farklı protein vardır ve bu proteinler dışa verme ve polimerizasyon prosesini gerçekleştirirler. İlk olarak, flippaz ya da transkolaz, membranın sitoplazmik yüzeyinden membranın periplazmik yüzeyine lipit taşıyıcı tekrarlayan birim komplekslerini taşır. İkinci olarak, polimeraz bu tekrarlayan birimlerin bileşimini katalizler. Son olarak zincir uzunluğu saptama proteini, son EPS'nin zincir uzunluğunu da belirleyen dışa verme ve polimerizasyon prosesini durdurmak için lipit taşıyıcı-tekrarlayan birim kompleksleri koparır (Laws vd, 2001).

Tirozin kinaz gibi bazı gen ürünleri de son EPS'nin zincir uzunluğunun belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Cieslewicz vd, 2001; Morona vd, 2003; Morona vd, 2000). Daha sonra bu EPS polimerleri ya hücre dışı EPS olarak direk olarak çevreye salgılanır ya da kapsüler EPS olarak hücre yüzeyine tutunmuş olarak kalır (De Vuyst ve Degeest, 1999). Gram pozitif bakterilerde bazı polimerler hücre yüzeyinden açığa çıkmasına rağmen, kapsüler EPS'nin çoğunluğu kovalent bağlarla membran komponentlerine ya da peptidoglukana bağlanmış olarak kalır (Yother, 2011). Hücre yüzeyine EPS'nin bağlanma mekanizması ve çevreye direk olarak salgısı henüz bilinmemesine rağmen, Gram negatif *E. coli*'de dış membran proteini Wzi'nın kapsüler EPS'nin birleşme yüzeyini içerdiği gözlemlenmiştir. Bu proteinin yokluğunda dış çevreye salgılanan polimer miktarında artış gözlemlenmiştir (Rahn vd, 2003). LAB'da son EPS'nin lokasyonunun belirlenme mekanizması ileriki tanımlamalar için gereklidir.

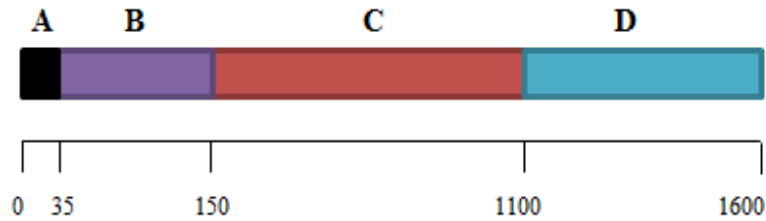
Homopolimerik EPS üretimi daha az komplekstir. LAB dekstran, levan ve reuteran gibi homopolimerik EPS'nin farklı çeşitlerini üretme yeteneğine sahiptirler (Badel vd., 2011; Donot vd, 2012; Kralj vd, 2004a). Dekstranlar, mikrobiyal aktiviteyle ilişkili olan şeker kamışı şuruplarının pelteleşme prosesinde ilk defa Pastör tarafından

keşfedilmiştir ve pelteleşme prosesine sebep olan ürünlerin pozitif dönel gücünün bir sonucu olarak ürün “dekstran” terimiyle ifade edilmiştir (Van Hijum vd, 2006). LAB’lerinde homopolisakkaritlerin yapısı farklı glikozidik bağlı ya glukoz birimleri ya da fruktoz birimlerinden oluşur. Lineer olması, dallanma noktalarındaki çeşitlilik ve sayısı, monosakkarit zincirlerinin farklı uzunlukları, molekül kütlesi ve glukoziltransferazın rolüne dayanan konformasyonuna göre değişiklik gösterebilir (Van Hijum vd, 2006). Homopolisakkaritlerin biyosentezi ya sitoplazmada ya da hücre dışında gerçekleşir (Donot vd, 2012). İçerde, ilgili glukoziltransferazlar aktive olmuş monosakkarit moleküllerini bir glikozidik bağ oluşturarak akseptör molekülüne transfer eder (Badel vd, 2011; Broadbent vd, 2003). Hücre dışı glukoziltransferazlar, kültür ortamında sükrozun degradesyonunu katalize ederler. Polisakkarit oluşturmak amacıyla akseptör moleküllerine glukozil kalıntılarını transfer etmek için degradesyon prosesinde ortaya çıkan enerjiyi kullanırlar (Badel vd, 2011). Homopolisakkaritlerin hücre içi biyosentezi, üretimlerini limitleyebilen bazı ekspresyonu değişmeyen temel enzimlerin fonksiyonu için gereklidir (Broadbent vd, 2003). Genellikle *Lactobacillus* türünün suşları homopolisakkarit tip inülin veya levan gibi fruktanları ya da glukanlar gibi dekstranları üretirler. Tek glukoziltransferazlar ve fruktoziltransferazlar *gtf* ve *ftf* genleri tarafından kodlanırlar. *Gtf* ve *ftf* genleri, sırasıyla glukan ve fruktan üretiminden sorumludurlar ve her enzimin konformasyonuna bağlı olarak farklı bağlantılarla bağlanmışlardır (Badel vd, 2011; Cote vd, 2012; Kralj vd, 2004a; Kralj vd, 2002; Van Hijum vd, 2002; Walter vd, 2008). Mikrobiyal glukanlar, glukoz birimleri arasındaki glikozidik bağlara bağlı olarak iki gruba ayrılırlar. α -glukanlar, β -glukanlar ve farklı birkaç glukan LAB için tarif edilmiştir. Tersine, LAB için β -(2→6) bağlantılı levan ve β -(2→1) bağlantılı inülin tip olmak üzere sadece iki farklı fruktan karakterize edilmiştir (Korakli ve Vogel, 2006). GTF (Glycosyltransferase) ve FTF (Fructosyltransferase) enzimleri monosakkaritleri transfer eder ve farklı bağlantılarla onları polimerize eder ve sonuç olarak gıda endüstrisinde önemli bir rolü olan LAB tarafından farklı homopolisakkaritler üretilir.

2.7 Laktik Asit Bakterilerinde Ekzopolisakkarit Üretiminin Genetiği

Heteropolimerik EPS üretiminden özel bir *eps* gen kümesi sorumlu iken homopolimerik EPS üretiminden tek bir gen sorumludur. Homopolimerik glukanların

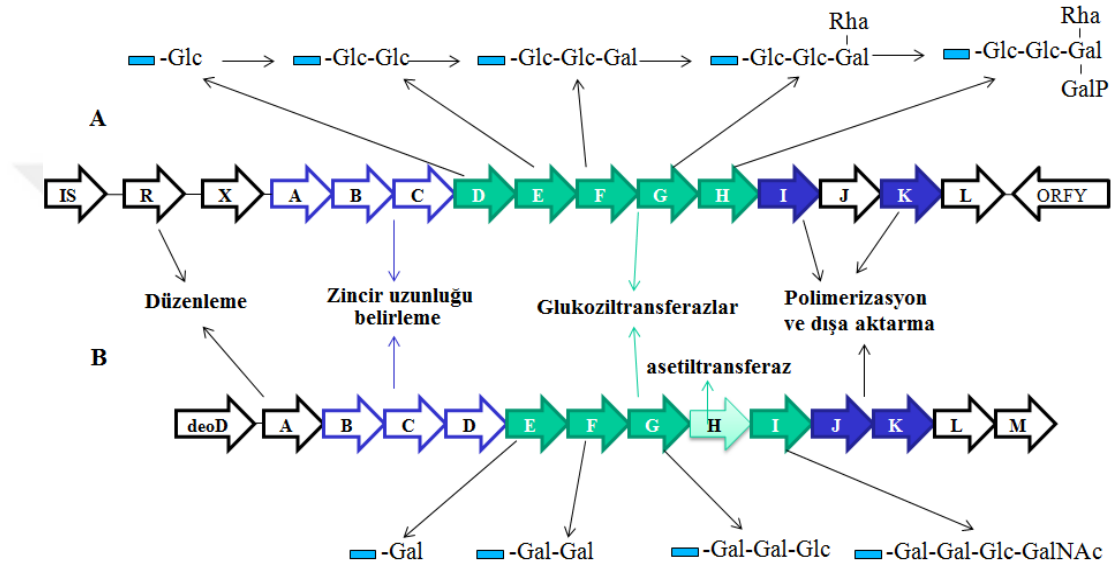
ve fruktanların üretimi için *gtf* ve *ftf* genlerini birkaç LAB'in kodladığı gösterilmiştir (Kralj vd, 2004a; Kralj vd, 2002; Schwab ve Ganzle, 2006; Van der Meulen vd, 2007; Van Leeuwen vd, 2008). Bazı LAB'leri genomlarında birden fazla *gtf* geni de bulundurabilir (Korakli ve Vogel, 2006). GTF ve FTF'lerin amino asit dizilimlerinin kümelenme analizlerine dayanarak GTF'ler arasındaki benzerlik düşük iken FTF'ler yüksek oranda benzerlik göstermektedirler (Korakli ve Vogel, 2006). Bu nedenle LAB türleri sınırlı farklılıkta fruktan üretebilmektedir. GTF genleri ve enzimleri altı farklı *Lactobacillus* suşunda araştırılmıştır ve kromozom içerisinde *gtf* genlerinin lokasyonunun bu altı suş için oldukça değişken olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu *gtf* genlerinin komşu transpoz homologlarının oldukça sık olduğu rapor edilmiştir (Kralj vd, 2004a). Aynı araştırmacılar genel yapısı aşağıdaki gibi olan altı farklı GTF aminoasit dizilimi bulmuşlardır. GTF'lerin yapısı a) Tipik bir gram pozitif sinyal peptidi; b) değişken bölge (Kralj vd, 2004a); c) enzimatik aktivite için gerekli katalitik bölge; d) varsayılan bir glukan bağlanma alanı (Kralj vd, 2004b) (Şekil 2.6). LAB'da GTF enzimlerinin bu genel yapısı farklı LAB'ların otuzdan fazla GTF için daha önceden rapor edilmiş ve genel yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 GTF'lerin genel yapısının şematik gösterimi; A) N-ucu sinyal bölümü, B) değişken bölge, C) katalitik alan, D) glukan bağlayıcı alan (Monsan vd, 2001)

Homopolimerik EPS üretiminin tersine, heteropolimerik EPS üretimi için *eps* gen kümelerinde kodlanan birkaç genin birlikte çalışması gereklidir ve oldukça karmaşık bir mekanizması vardır. Şimdiye kadar, LAB için birkaç *eps* kümesi belirlenmiştir (Jolly vd, 2002; Lebeer vd, 2009; Nierop Groot ve Kleerebezem, 2007; Stingle vd, 1996; Van Kranenburg vd, 1997). Bu *eps* kümeleri dört fonksiyonel bölgede organize olmuş LAB arasındaki korunumlu genleri kapsar: İlk olarak merkezi bölge, tekrarlayan EPS birimlerinin biyosentezi için gerekli spesifik glukoziltransferazlardan

oluşur; ikinci bölge, merkezi bölgenin genelde yukarı bölgesine yerleştirilmiş son EPS'nin zincir uzunluğunu belirlediği düşünülen proteinler için genlere sahip olan bölge; üçüncü bölge, merkezi bölgenin aşağı yönüne yerleştirilmiş dışa aktarım ve polimerizasyon genleri tarafından oluşturulmuş bölge ve son olarak dördüncü bölge, *eps* bölgelerinin başlangıcında yer alan EPS biyosentezinin transkripsiyonel düzenlemesinden sorumlu bölgedir (Şekil 2.7) (De Vuyst ve Degeest, 1999).



Şekil 2.7 (A) *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 (Van Kranenburg vd, 1997) ve (B) *S. thermophilus* Sfi6 (Stingele vd, 1996)'ların *eps* gen kümelerinin organizasyonu ve varsayılan fonksiyonel mekanizmaları.

Bu *eps* kümeleri *Streptococcus* ve *Lactobacillus* suşlarında kromozoma bağlı olarak yerleştirilmişken *Lactococcus* suşlarında ise bu *eps* kümeleri genellikle plazmite yerleştirilmişlerdir. Bu kümeler ekzopolisakkaritler ve kapsüler ekzopolisakkaritleri yansıtan, *eps* ya da *cps* kümeleri olarak adlandırılırlar. Bu kümelerdeki bireysel genler için isimler, terimleri oldukça karmaşık hale getiren farklı suşlar için, farklı olarak belirlenmiştir. Genlerin farzedilen fonksiyonları aynıdır ve onların homolojisine dayanır fakat terimleme yapıldığı zaman araştırmacılar tarafından farklı bir isimlendirme yapılır. LAB için ilk *eps* kümesi 1996'da *S. thermophilus* Sfi6 için tarif edilmiştir. *S. thermophilus* Sfi6 13 genli (*epsM*'ye *epsA*) ve 14.5 kb büyüklüğündedir ve kapsüler polisakkarit oluşumuyla ilgili olan farklı organizmalardan genlerle yüksek homoloji göstermiştir (Şekil 2.7) (Stingele vd, 1996). Daha sonra 12 kb gen

kümesinde, 40 kb plazmide yerleşmiş *L. lactis* NIZO B40 belirlenmiştir (Şekil 2.7) (Van Kranenburg vd, 1997). Bu *eps* kümelerinde genlerin oryantasyonu aynı yöndedir ve tek bir polisistronik mRNA olarak meydana gelmiş *eps* gen kümelerinin transkripsiyonu, *L. lactis* NIZO B40 suşu için gösterilmiştir (Van Kranenburg vd, 1997). Fakat daha önceki çalışmalarda Stingle ve arkadaşları GC içeriğine dayanarak *eps* gen kümelerinde farklı gen gruplarının olabileceğini göstermişlerdir. Farklı gen gruplarında düşük GC içerikli bölgelerin varlığının farklı transkripsiyonel bölgelerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Stingle vd, 1996). Yakın bir zamanda *Bifidobacterium breve* UCC2003'nin *eps* yeri belirlenmiştir. İki farklı transkripsiyonel bölge *eps1* ve *eps2* olarak numaralandırılmış ve daha da önemlisi farzedilen başlatıcı glukoziltransferaz geni gösterilmiştir. Ayrıca farz edilen EPS zincir uzunluğu düzenleme geni monosistronik mRNA olarak tarif edilmiştir (Fanning vd, 2012). Diğer bir çalışmada 18 *eps* geni içeren dört *L. rhamnosus* suşunun *eps* kümeleri karşılaştırılmıştır. Farz edilen transkripsiyonel düzenleyici ve farz edilen transpozları kodlayan iki gen haricinde 18 *eps* geni aynı oryantasyon göstermiştir. Bu genlerin on beş tanesi daha önceki çalışmalarla uyum göstererek polisistronik olarak üretilmektedirler (Fanning vd, 2012). Fakat araştırmacılar, *eps* gen ifadelerinin düzenlenmesindeki karışıklığı göstererek *L. rhamnosus* suşlarının *eps* kümelerinde beş farklı destekleyici belirlemiştir (Peant vd, 2005). Kendi transkripsiyon başlatıcısından *B. breve* UCC2003'ün farz edilen başlatıcı glukoziltransferaz geninin kopya etmesinin bir benzeri olarak, *L. rhamnosus* suşlarının farzedilen başlatıcı glukoziltransferaz genlerini kendi transkripsiyon başlatıcılarından kopya ettiği belirlenmiştir. İşlemeye hazırlayıcı glukoziltransferaz geninin bağımsız ifadesinin EPS biyosentezinin başlamasını hızlandırabileceği ifade edilmiştir (Peant vd, 2005). Bu sonuçlar özellikle laktobasillerin *eps* kümelerindeki gen oryantasyonunun aynı yönde olduğunu göstermektedir. *Eps* gen kümelerinin transkripsiyonu ya tek polisistronik mRNA ya da *eps* kümelerindeki genlerin genetik yapısına bağlı ayrı bir monosistronik mRNA olabilir. EPS'nin öneminden dolayı, araştırmacılar farklı LAB'nde EPS biyosentez mekanizmalarına odaklanmışlardır. Farklı LAB'da aynı genetik organizasyona sahip birkaç gen kümesi belirlenmiştir. EPS biyosentezi: EPS biyosentezi için düzenleyici genlerle başlayan, zincir uzunluğunu belirleme için görevli genler ve tekrarlayan birim biyosentezi için glukoziltransferazla dolu merkezi bölge ile devam eden ve son olarak dışa verme ve polimerizasyonla ilişkili olan

genlerle biten bir süreçtir (Almiron-Roig vd, 2000; Germond vd, 2001; Jolly vd, 2002; Lamothe vd, 2002). Son zamanlarda, iyi bilinen bir probiyotik suş olan *L. rhamnosus* GG’de hücre yüzeyi EPS ile bağlantılı olan bir gen kümesi belirlenmiştir. Bu gen kümeleri dTDP-rhamnoz prekürsör biyosentezi ile ilgili spesifik genleri bünyesinde bulundurduğu için LAB ve laktobasillerin gen kümelerinden önemli farklılıklar gösterebilirler (Lebeer vd, 2009). Aslında önceleri *L. rhamnosus* suşlarının *eps* gen kümesi organizasyonunun laktobasillerden önemli bir biçimde değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Fakat *L. rhamnosus* GG’nin *eps* kümesiyle uyum gösteren *L. rhamnosus* suşları arasında, *eps* kümeleri oldukça benzerdir (Peant vd, 2005). LAB’in *eps* kümelerinin organizasyonel yapısında bazı farklılıklar tespit edilmesine rağmen, laktobasil suşlarının *eps* kümeleri son derece benzer genetik organizasyon gösterir (Jolly ve Stinglele, 2001).

Genellikle, LAB’ın *eps* kümeleri transkripsiyonel düzenleyici “*epsA*” olarak tanımlanan tek bir genle başlar. EPS biyosentezinde transkripsiyonel düzenleyicinin rolü *Streptococcus* suşu için gösterilmiştir. *Streptococcus* suşunda bu genin kopması, kapsül oluşumunun azalmasıyla sonuçlanmıştır (Bender vd, 2003; Cieslewicz vd, 2001; Morona vd, 2000). Bir *Lactococcus* suşunda plazmide yerleşen *eps* kümesinden transkripsiyonel düzenleyicinin kopması sonucunda, bu suшта EPS biyosentezinin tamamen kaybı gerçekleşmiştir (Nierop Groot ve Kleerebezem, 2007). Birçok çalışmada *Lactobacillus* türlerinin EPS’si rapor edilmiştir. Fakat *eps* kümesinin transkripsiyonel düzenlemedeki rolüne ilişkin veriler eksiktir. LAB’da transkripsiyonel düzenleyici genler arasındaki homoloji yüksektir. Fakat transkripsiyon düzenlemesinin asıl mekanizmasına henüz karar verilmemiştir.

LAB’in *eps* kümelerinde *epsA* genini, kompleks bir yapı gösteren üç gen takip eder. Bu üç gen *epsB*, *epsC* ve *epsD* olarak tanımlanmıştır ve son EPS’nin zincir uzunluğunu belirlemeden sorumludurlar (Broadbent vd, 2003). *Lactobacillus*’da son ürünün zincir uzunluğunu belirlemek için kompleks *epsB-C-D*’nin birlikte nasıl çalıştıklarına dair veriler eksiktir. Fakat bu üç gen farklı türler arasında yüksek benzerlik gösterir ve *epsB*, *epsC* ve *epsD* genleri sırasıyla varsayılan polimerizasyon ve zincir uzunluğu saptama proteinini, varsayılan protein tirozin kinazı ve fosfotirozin-protein fosfatazı kodlar (Jolly ve Stinglele, 2001). Bu genler fosfo düzenleyici kompleks olarak davranmasına rağmen, *eps* ya da *cps* kümelerinde bu üç gen diziliminin türler arasında

farklı olabileceği unutulmamalıdır. EPS biyosentezinde hücrel metabolizmada önemli rol oynayan bir takım organizmaların (ökaryotlar, prokaryotlar) fosfotirozin-protein ve protein-tirozin kinaza sahip olduğu gösterilmiştir (Vincent vd, 1999). Önceden Gram negatif *E.coli*'nin iki proteini, protein-tirozin kinaz (Wzc) ve fosfotirozin-protein fosfotaz (Wzb) olarak tanımlanmıştır. Bu iki protein birbirleriyle zıt aktivite sergiler. Wzc protein, tirozin kalıntıları üzerine kendi fosforlanır. Oysa Wzb proteini Wzc'yi fosforilden arındırır. Bu gözlem, bakteriyel metabolik proseslerin tirozin kalıntılarında, geri dönüşümlü protein fosforilasyonunun düzenleyici rolünü destekler. Araştırmacılar birkaç bakteriyel türde bu gen kompleksinin varlığından dolayı, EPS'lerin üretim mekanizmalarıyla bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. EPS üretimi için kritik bir hareket olan geri dönüşümlü fosforilasyon prosesinde, bu proteinlerin fonksiyonu mümkün olabilir (Vincent vd, 1999). Benzer gözlemler Gram pozitif bakteriyel türler için de tespit edilmiştir. *Streptococcus pneumoniae*'nin kapsül polisakkarit kümesinde yer alan bir oto-fosforilasyonlaştırıcı protein tirozin kinaz olan cpsD'nin rolünün önemli olduğu gösterilmiştir. Çünkü bu genin ATP bağlayıcı alanlarında, gen kopması ya da gen mutasyonu sonucunda kapsül oluşumu gerçekleşmez (Morona vd, 2000). Streptococcal cpsC ve cpsD (*Lactobacillus eps* kümeleri için sırasıyla, *epsB* ve *epsC*) birbirleriyle etkileşime girer, ATP bu kompleksi bağlar ve cpsB (*epsD*) ve tirozin-fosforilasyonla sonuçlanan cpsD (*epsC*) fosforilize olur. Ardından EPS üretimini düzenleyen bu kompleks defosforilize olur ve son ürünün zincir uzunluğu belirlenir (Morona vd, 2002; Morona vd, 2000). EPS'nin zincir uzunluğunu belirlemek için kompleks bir şekil oluşturarak ortaklaşa çalışan bu genler, diğer Streptococcal suşlar içinde öngörülmüştür (Cieslewicz vd, 2001; Cozzone vd, 2004). CpsD'nin defosforilasyonunun, Streptococcal suşlarda kapsül oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *S. pneumoniae*'nin kapsül oluşturması ile ilgili bir diğer araştırmada, cpsD'nin fosforilize olmuş formunun daha fazla kapsül oluşturduğu gösterilmiştir (Bender vd, 2003). CpsD'nin fosforilize ve defosforilize olmuş formunun yanı sıra, *Streptococcus agalactiae*'de cpsC ve cpsD'nin inaktivasyonunun EPS zincir uzunluğunun azalmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Cieslewicz vd, 2001). Diğer bir kapsamlı çalışmada *S. pneumoniae*'de kapsül oluşumunun zincir uzunluğu belirleme mekanizması gösterilmiştir. Araştırmacılar, kapsül oluşumunu düzenlemek için cpsB, cpsC, cpsD ve ATP 'nin stabil bir kompleks oluşturduğunu

göstermiştir (Bender ve Yother, 2001). Ayrıca, varsayılan polimerizasyon ve zincir uzunluğunu belirleme proteini ve protein-tirozin kinaz kodlayıcı *epsC* ve *epsD*'den yoksun mutantlar, *S. thermophilus*'da EPS biyosentezi göstermemiştir. Fakat *epsB* (*epsD*, *Lactobacillus eps* kümeleri için), fosfotirozin-protein fosfataz'ın kopması EPS üretimini sonlandırmaz (Minic vd, 2007). *EpsD*'nin fosforilasyonu *epsC* gen aktivitesi için gereklidir ve başlatıcı fosfogalaktoziltransferaz geni *epsE*'nin aktivitesi *epsC* ya da *epsD* kopma mutasyonlarında bulunmamıştır. *epsE* geninin bu suşta fosforilasyon kompleksi için hedef olabileceği belirtilmiştir (Minic vd, 2007). Bu gözlemler, *epsB*, *epsC* ve *epsD*'den oluşan *eps* kümelerinin düzenleyici bölgedeki rolünü açıkça göstermiştir.

Eps kümelerindeki merkezi bölgeler, tekrarlayan EPS birimlerinin biyosentezi için gerekli olan spesifik glukoziltransferazlardan oluşmuştur (De Vuyst ve Degeest, 1999). Bu bölge genelde *epsE* geniyle başlar ve *epsE* geni glukoziltransferazların tümünün sistem girişine yerleştirilmiştir. Glukoziltransferazların tümü, LAB'de başlatıcı glukoziltransferazları kodlar ve aktive olmuş şekerler nükleotidlerden, fosforilize olmuş lipit taşıyıcısına ilk şeker monomerinin ilavesinden sorumludur (Almiron-Roig vd, 2000; Broadbent vd, 2003; De Vuyst ve Degeest, 1999; Jolly vd, 2002; Jolly ve Stingle, 2001; Lamothe vd, 2002; Lebeer vd, 2009; Van Kranenburg vd, 1997). Ayrıca, *L. rhamnosus* suşunda varsayılan başlatıcı glukoziltransferaz geninin yer aldığı da rapor edilmiştir (Lebeer vd, 2009; Peant vd, 2005). Başlatıcı glukoziltransferaz geni olan *epsE* geninin kopması, birkaç bakteriyel türde EPS üretimi kaybıyla sonuçlanmıştır (Bentley vd, 2006; Cieslewicz vd., 2001; Dabour ve LaPointe, 2005; Minic vd, 2007; Van Kranenburg vd, 1997). *L. rhamnosus* GG'de *epsE* geninin kopması galaktozca zengin EPS'nin kaybıyla sonuçlanmıştır. Fakat glukozca zengin EPS'in hala hücre yüzeyinde mevcut olduğu bildirilmiştir. *L. rhamnosus* GG'nin iki tip EPS üretebileceği ve *epsE* geninin galaktozca zengin EPS için (glukozca zengin olan için değil) başlatıcı glukoziltransferaz olabileceği belirtilmiştir (Lebeer vd, 2009). Birkaç LAB'de *epsE* genlerinin fonksiyonel analizleri, bir başlatıcı glukoziltransferaz olan *epsE*'nin biyokimyasal rolünü de sağlamlaştırmıştır. Başlatıcı glukoziltransferazlar, sitoplazmik zarın iç yüzeyinde fosforilize olmuş lipit taşıyıcısına glukozil-1-fosfat ya da galaktozil-1-fosfat ekleyerek EPS üretimini başlatırlar (Almiron-Roig vd, 2000; Jolly vd, 2002; Stingle vd, 1996;

Stingele vd, 1999). Lipit taşıyıcı membrana ilk şeker ilavesinden sonra *eps* kümesinin her bir glukoziltransferazı, tekrarlayan EPS birimlerine şekil vermek için sırayla lipit taşıyıcı-şeker komplekse şeker monomerlerinin ilave eder (Broadbent vd, 2003).

Merkezi bölgenin aşağı yönünde fonksiyonları bilinen bazı enzimler, mutazlar, dışa verme ve polimerizasyon için gerekli olduğu tahmin edilen gen kodlayıcı proteinler yer alır (Broadbent vd, 2003; Delcour vd, 1999; Lebeer vd, 2009; Stingele vd, 1999). LAB'ın *eps* kümelerinin, polimerizasyon bölgesinde ve dışa açılan yerinde kodlanan flippaz, membranın iç yüzeyinden periplazmik yüzüne tekrarlayan lipit taşıyıcı bağlantı birimlerinin yerini değiştirir (Jolly ve Stingele, 2001; Laws vd, 2001). Bu bölge, membran boyunca EPS'nin tekrarlayan birimlerinin polimerizasyonundan sorumlu olan diğer önemli genleri bünyesinde bulundurur. Polimeraz, polisakkarit zincirlerine şekil vermek için tekrarlayan birimleri birbirine bağlar (Jolly ve Stingele, 2001). Bu genler LAB'ın *eps* kümeleriyle yüksek türdeşlik göstermesine rağmen, bu proteinlerin fonksiyonu LAB için hala belirlenmemiştir. LAB'nin *eps* kümelerinde varsayılarak belirlenmiş son gen *glf* dir. *Glf* nin, mutazı kodladığı tahmin edilmiştir. Mutaz, bakterinin şeker havuzundan EPS'nin tekrarlayan birim yapısıyla bağlantılı şeker nükleotidlerin ara çevrimini katalizler (Lebeer vd, 2009; Remus vd, 2012). Benzer şekilde *L. rhamnosus* suşlarının *eps* kümelerinin, son EPS yapısıyla ilişkili olan dTDP-rhamnoz prekürsör biyosentezi genlerini içerdiği gösterilmiştir (Lebeer vd, 2009; Peant vd, 2005). Son olarak, LAB'ının *eps* kümeleri bilinmeyen fonksiyonlu birkaç geni bünyesinde barındırır (Broadbent vd, 2003).

2.8 Ekzopolisakkarit Biyosentezini Etkileyen Faktörler

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS, gıda endüstrisinin doğal stabilizör olarak rol alır. Bununla birlikte, bu biyopolimerlerin üretim düzeyleri diğerlerine nazaran düşük ya da çok değişkendir. Ortamın bileşimi, fizikokimyasal ve kinetik parametreler içeren birkaç koşul LAB tarafından üretilen EPS miktarını etkileyebilir (Boels vd, 2003; Dupont vd, 2000). Örneğin, EPS biyosentezi için *L. rhamnosus* suşları benzer genetik organizasyona sahip olmasına rağmen, dört *L. rhamnosus* suşunda EPS üretiminin son verimi 61-1611 ml/l arasında önemli bir değişkenlik göstermektedir (Peant vd, 2005). Fermentasyon süresi, sıcaklık ve karbon kaynağına bağlı olarak farklı EPS üretim seviyeleri gösteren iki *L. rhamnosus* suşunun birincil

EPS yapısında bir değişme olmadığı rapor edilmiştir (Van Calsteren vd, 2002). Tersine, sadece verim değil, aynı zamanda *L. casei* CG11 tarafından üretilen EPS'nin kompozisyonu kültür ortamında sunulan karbon kaynağına bağlı olarak değişmiştir (Cerning vd, 1994). Besiyeri, üreme şartları (sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon-nitrojen oranı, pH, mineral tuzlar, vitaminler) (Broadbent vd, 2003; De Vuyst ve Degeest, 1999), bazal hücre metabolizmada şeker nükleotidlerin kullanılabilir olması (Boels vd, 2001; Levander vd, 2002; Looijesteijn vd, 1999), şeker yıkım yolunda gen ifade düzeyi (Levander vd, 2002; Svensson vd, 2005) ve EPS üretimi için gerekli genlerin transkripsiyonel düzeyinin yanı sıra bakteriler tarafından kullanılan karbon kaynağı (Audy vd, 2010) gibi iç ve dış faktörler üretim düzeyini etkileyebilmektedir. EPS metabolizmasını düzenlemek, EPS üretim düzeyini arttırmak ve LAB'ın EPS yapılarını modifiye etmek için EPS üretimini etkileyen faktörlerin anlaşılması çok önemlidir. Daha önceden, 3 *Lactobacillus* suşunun EPS üretimi farklı koşullar altında test edilmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz ya da laktoz kullanımı ya da fermentasyon sıcaklığının 32°C ya da 37°C olması EPS üretim düzeyi miktarında önemli bir değişikliğe yol açmamıştır. Fakat EPS üretimi bu laktobasil suşları arasında değişkenlik gösterir (Audy vd, 2010). Diğer bir çalışmada ise yoğurt starter kültürlerinin EPS üretiminin pH, sıcaklık ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiiği gösterilmiştir (Aslim vd, 2005). Dahası birkaç bakteriyel EPS için inkübasyon süresi boyunca EPS'nin degradasyonu gerçekleşmiştir (Cerning vd, 1988; Cerning vd, 1992). Pham ve arkadaşları, uzayan fermentasyon süresince *L. rhamnosus* tarafından üretilen EPS'nin azalma nedeninin bu bakteri tarafından üretilen farklı glukohidrolazların fonksiyonundan dolayı gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Pham vd, 2000).

L. lactis NIZO B40'da plazmitte kodlanan eps gen kümesindeki ekspresyon artışı son EPS'nin üretim düzeyinde dört kat artışa neden olmuştur. Fakat bu suşlarda gelişim hızı doğal suşlardan daha düşüktür (Boels vd, 2003). Aslında değiştirilmiş mutantlardaki düşük gelişim hızı, şeker nükleotidlerin EPS üretiminde kullanıldığını göstermesi bakımından önemlidir. Bu şeker nükleotidleri bakterinin şeker havuzunda bulunur ve bakteri şeker havuzu hücre duvarı biyosentezini içeren bakteriyel metabolik aktiviteler için de bir kaynak oluşturur (Boels vd, 2003; Looijesteijn vd, 1999; Ramos vd, 2001). Buna ek olarak, *L. casei* CG11'in gelişimi değişmeksizin EPS üretiminin arttığı rapor edilmiş ve EPS biyosentezi için izoprenoid fosfat lipid

taşıyıcısının kullanılabilir olmasından dolayı bunun gerçekleştirilebileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Cerning vd, 1994). Dahası, son EPS veriminde merkezi şeker metabolizmasının önemi ve rolü, UDP-pirofosforilaz (GalU)'ı kodlayan aşırı eksprese edilmiş *galU* geninde *S. thermophilus* LY03 için rapor edilmiştir. Fosfoglukomutazı kodlayan *pgmA* geniyle birlikte, son EPS veriminde neredeyse iki kat artış sağlanmıştır (Levander vd, 2002). Daha önce yapılan bir çalışmada, aynı suşta başlatıcı glukoziltransferazın aşırı ifadesi, EPS üretim düzeyinde %15 artışla sonuçlanmıştır (Van Kranenburg vd, 1999). Benzer şekilde, başlatıcı glukoziltransferazın daha yüksek transkripsiyon düzeyi *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* suş CRC 002'de EPS üretimini arttırmıştır (Audy vd, 2010). Araştırmacılar, yeni reolojik özellikleri gözlemek için son EPS yapısını modifiye ederek genetik mühendisliğini de kullanmışlardır (Badel vd, 2011).

Yukarıda da bahsedildiği gibi LAB'ın son EPS verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri karbon kaynağıdır. Ayrıca, Bazı LAB'lar kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak farklı EPS yapıları üretebilirler (Cerning vd, 1994) fakat bazıları üretmezler (Degeest vd, 2001). Bu durum, LAB'ın *eps* kümelerinde kodlanan glukoziltransferazın önemli rolünden dolayı kaynaklanmış olabilir.

2.9 Tezin Amacı

Erzincan Tulum peyniri ülkemiz açısından en önemli peynir çeşitlerinin başında gelmekte ve üretiminde rol alan LAB türlerinin ortaya konması son derece önem arz etmektedir. Bu bağlamda bu tez çalışmasının temel amacı geleneksel yollarla üretilen Tulum peynirlerinden LAB türlerini izole etmek ve bu türleri tanımlamaktır. LAB türlerinin fonksiyonel özelliklerinin başında EPS üretim kabiliyetleri gelmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışması ile starter potansiyeli olabilecek Tulum peyniri izolatlarında EPS üretiminin genotipik ve fenotipik olarak ortaya konması bu tez çalışmasının ikincil hedefi olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak Tulum peynirine özgü EPS üretim kabiliyetinde olan türlerin izolasyonu hem bilimsel hem de endüstriyel anlamda oldukça önemli bir husustur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Erzincan tulum peyniri örnekleri

Araştırmada, Erzincan’da tüketime sunulan ve köylerindeki üreticilerden toplanan 12 tanesi plastik bidonlarda 4 tanesi deride olmak üzere farklı olgunlaşma evrelerindeki toplam 16 adet Erzincan tulum peyniri örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler steril numune torbalarına alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiş ve analiz sürecinde buzdolabı şartlarında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Bu çalışma kapsamında toplanan keçi derisinde olgunlaştırılmış tulum peyniri örneği.

3.1.2 Besiyerleri

Tez çalışması boyunca kullanılan besiyerleri: de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve agar, Brain Heart Infusion (BHI) broth ve agar, M17 broth ve agar, Potato Dextrose Agar (PDA), Plate Count Agar (PCA). Kullanılan besiyerleri Merck-Türkiye'den sağlanmıştır.

3.1.3 Primerler

Tulum peynirinden farklı türlerin izolasyonu, genotipik karakterizasyonu, tanımlanmaları ve bu türlerde *eps* genlerinin tespiti amacıyla kullanılan primerler, ampilifiye edilmek istenen hedef gen boyutu ve PCR şartları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Bu primerlerin kullanım amaçları ileriki bölümlerde açıklanmıştır.



Çizelge 3.1 Tez çalışması boyunca kullanılan primerler.

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Hedef gen boyutu(bp)	PCR şartları	Referans
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	-	-	94°C 2dk 94°C 1dk 42°C 20s 72°C 2dk 40 defa 72°C 10dk	(Dertli vd, 2016)
AMP_F	GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG	16S	1.500	95°C 2dk 95°C 30s 55°C 20s 72°C 30s 25 defa 72°C 5dk	(Baker vd, 2003)
AMP_R	AAGGAGGTGATCCARCCGCA				
<i>epsEFG</i> F	GAYGARYTNCCNCARYTNWKAAYGT	p-gtf	1.600	94°C 30s 94°C 30s 49°C 45s 72°C 1dk 30 defa	(Palomba vd, 2012)
<i>epsEFG</i> R	TGCAGCYTCWGCCACATG				(Mozzi et vd, 2006)
<i>epsA</i> F	TAGTGACAACGGTTGTACTG	Transkripsiyon düzenleyici	800	94°C 15s 43°C 30s 72°C 1dk 35 defa	(Low vd, 1998)
epSA R	GATCATTATGGACTGTCAC				
<i>gtf</i> F	GAYAAYWSIAAYCCIRYIGTIC	<i>gtf</i>	660	95°C 30s 42°C 45s 72°C 1dk 35 defa	(Palomba vd, 2012)
<i>gtf</i> R	ADRTCICCRTARTAVIYKIG				
<i>LevVfw</i>	GAYGTNTGGGAYWSNTGGC	<i>ftf</i>	800	95°C 30s 42°C 45s 72°C 1 dk 35 defa	(Tieking vd, 2003)
<i>LevVrev</i>	TCNTYYTCRTCNSWNRMCAT				
G-*-Bact-a-F-36	TCATTTTATTCGTAAAACCTCAATTGAYGARYTNCC	p-gtf	189	95°C 30s 42°C 45s 72°C 1dk 35 defa	(Provencher vd, 2003)
G-*-Bact-a-R-27	AATATTATTACGACCTSWNAYYTGC CA				
G-Lr-Bact-a-F-26	ATGAGTTTGGTTGGACCAAGACCTCC	p-gtf	276	95°C 30s 42°C 45s 72°C 1dk 35 defa	(Provencher vd, 2003)
G-Lr-Bact-b-R-20	TTTAATAGGCTCCAGTTGGA				
DexreuV	GTGAAGGTA ACTATGTTG	<i>gtf</i>	600	95°C 30s 43°C 45s 72°C 1dk 35 defa	(Tieking vd, 2005)
DexreuR	ATCCGCATTAAGAATGG				
<i>epsB</i> F	CGTACGATTCGTACGACCAT	Zincir uzunluğu	1150	94°C 30s 94°C 45s 46°C 1dk 72°C 1dk 35 defa	Dertli vd, 2016)
<i>epsB</i> R	TGACCAGTGACACTTGAAGC				

Y = C or T; R = A or G; W = A or T; K = G or T; S = C or G; M = A or C; V = A, C, or G; N = A, C, G, or T; I = inosine

3.2 Yöntem

3.2.1 Tulum peyniri örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için peynir örneklerinden 10 g alınarak 90 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde stomacherde homojenize edilmiş ve 1/10'luk dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra homojenize hale getirilen örneklerden 1 ml alınarak içinde 9 ml FTS bulunan tüpe aktarılmış ve bu şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir mikroorganizmanın sayımı için uygun dilüsyonlardan uygun besiyerlerine uygun metod ile ekim yapılmıştır (Harrigan, 1998).

3.2.1.1 Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

Bu grup mikroorganizmaların sayımında Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463) besiyeri kullanılmıştır. Dökme metodu ile seçilen uygun dilüsyonlardan paralelli olarak ekim yapılmış ve ekilen petri plakları 30°C'de 48±2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen, uygun sayım aralığında ki (10-300) bütün koloniler "toplam bakteri" olarak sayılmış ve koloniler ilgili dilüsyon faktörü ile çarpılarak TAMB sayısı log kob/g olarak tespit edilmiştir (Harrigan, 1998).

3.2.1.2 Maya ve küf sayımı

Maya ve küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130) besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine %10 luk tartarik asit katılmış ve dökme yöntemi ile seçilen uygun dilüsyonlardan paralelli olarak ekim yapılmıştır. Petri plakaları 21±2°C 'de 5-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda uygun sayım aralığında ki (10-300) üremeler sayılıp seyreltme faktörü ile çarpılarak sonuç log kob/g bulunmuştur (Kurt vd, 1996).

3.2.1.3 Laktokokların sayımı

Laktokokların sayımı için M-17 Agar (Merck 1.15108) kullanılmıştır. Besiyerine yayma yöntemiyle uygun dilüsyonlardan ekim yapıldıktan sonra Anaerocult A (Merck 1.13829) ile birlikte Anaerobik jarlara konularak oluşturulan anaerobik şartlarda 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonda üçten fazla petri istiflemesi yapılmamış ve petri hareket ettirilmemiştir. İnkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılıp seyreltme faktörü ile çarpılarak veya ilgili dilüsyon faktörü hesaplanarak sonuç log kob/g olarak bulunmuştur (Speck, 1984).

3.2.1.4 Laktobasillerin sayımı

Laktobasillerin sayımı amacıyla de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) (Merck 1.10660) kullanılmıştır. Yayma yöntemiyle uygun dilüsyonlardan petri plaklarına ekim yapıldıktan sonra petri plakları Anaerocult A (Merck 1.13829) ile birlikte Anaerobik jarlara konularak oluşturulan anaerobik şartlarda 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda yukarıda ifade edildiği şekilde sonuçlar log kob/g olarak bulunmuştur (Speck, 1984).

3.2.2 Tulum peyniri örneklerinde yapılan fiziksel ve kimyasal analizler

Tulum peyniri örneklerinde kurumadde miktarı gravimetrik yöntemle, yağ miktarı Van-Gulik yöntemiyle, tuz miktarı Mohr yöntemiyle, toplam protein oranı mikro Kjeldahl yöntemiyle, titrasyon asitliği (% laktik asit cinsinden) ve peynir örneklerinde pH, dijital pH metre ile tespit edilmiştir.

3.2.2.1 Kurumadde tayini

Desikatörde muhafaza edilen kurutma kapları içerisine yaklaşık 5 g kadar peynir örneği tartılmış ve 102-105°C sıcaklıktaki etüve konulmuştur. 3-4 saat kadar etüvde tutulmuş ve desikatörde yarım saat soğutulduktan sonra örnekler tartılmıştır. Örnekler tekrar 1 saat etüvde tutulup, desikatörde soğutulup tartılarak, ağırlığın sabit hale gelip gelmediği kontrol edilmiştir. Sabit hale geldiğinde elde edilen değerlerden % kurumadde miktarı hesaplanmıştır (Kurt vd, 1996).

3.2.2.2 Yağ tayini

Van Gulik bütirometresi beherciğine peynir örneğinden 0.005 g duyarlıkta 3 g tartılmış ve bütirometreye yerleştirilmiştir. Üstteki tıpa açılarak 10 ml 1.50 özgül ağırlıklı sülfürik asitten konulmuştur. Bütirometre yaklaşık 65-70°C'lik su banyosuna konulup ara sıra çalkalanmak suretiyle peynirin tamamen erimesi sağlanmıştır. Sonra 1 ml amil alkol konulup hafifçe çalkalanmıştır. Daha sonra bütirometrenin taksimatlı kısmına kadar sülfürik asit ilave edilerek, ağzı kapatılıp, alt üst edilerek iyice çalkalanmıştır. Bütirometre yaklaşık 5 dakika 65-70°C'lik su banyosunda bekletilmiş ve ardından 10 dakika 1000-1200 devir/dakikada santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bütirometreler 4-5 dakika 65°C'lik su banyosunda taksimatlı kısım berrak hale

gelinceye kadar tutulmuş ve sonra bütirometre skalasından direkt olarak % yağ oranı okunmuştur (Metin, 2010).

3.2.2.3 Tuz tayini

Porselen bir havan içine 5 g peynir tartılmış, sıcak saf su yardımıyla havanda iyice ezildikten sonra yalnız sulu kısım 500 ml'lik ölçü balonuna aktarılmıştır. Aynı işlem, tüm tuzun suya geçmesini sağlamak amacıyla 5-6 kez tekrarlanmıştır. Balon, bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra çizgisine kadar normal sıcaklıktaki saf su ile tamamlanmış ve süzümüştür. Süzüntüden 25 ml alınıp 1-2 damla potasyum kromat indikatörü katılmış ve 0,1 N AgNO₃ ile kırmızı kiremit rengi oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan AgNO₃ çözeltisi miktarından, peynirin tuz miktarı aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplanmıştır (Kurt vd, 1996).

$$\% \text{ Tuz} = (G \times 0,585) / P$$

G: Titrasyonda kullanılan 0,1 N AgNO₃ çözeltisi (ml)

P: Titrasyonda kullanılan peynir miktarı, g (5,0 g tartılmışsa bu değer 0,25 g'dır).

3.2.2.4 Titrasyon asitliği tayini

Daha önce havanda ezilerek ufalanmış peynir örneğinden erlen içerisine yaklaşık 10 g tartılmış, ardından 40°C'deki 105 ml damıtık su azar azar ilave edilerek peynir bir baget yardımı ile ezilmiş ve 2 dakika kuvvetlice çalkalanmıştır. Bir filtre kağıdından süzümüş ve süzüntüden 25 ml bir erlen içerisine alınmıştır. 2-3 damla %1'lik fenolftalein indikatörü eklenmiş ve 0,1 N NaOH ile en az 30 saniye kalıcı pembe renk oluşana kadar titre edilmiştir. Peynir örneklerinin titre edilebilir asitlik derecesi % laktik asit cinsinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Metin, 2010).

$$\% \text{ Laktik asit} = (V \times 0,009 \times 100) / m$$

V: Titrasyonda kullanılan 0,1 N NaOH çözeltisi (ml)

m: Titrasyonda kullanılan peynir miktarı (g)

3.2.2.5 pH tayini

Peynir örneklerinin pH'sını belirlemek için 10 gram peynir örneği 15 ml saf su ile homojen hale getirilmiş ve uygun probu olan pH-metre (WTW Inolab 7110) kullanılarak ölçümler yapılmıştır (Savello vd, 1989). pH metre standart tampon çözeltiler ile kalibre edildikten sonra ölçüm işlemi $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.6 Protein tayini

Toplam protein miktarı mikro-Kjeldahl metodu kullanılarak belirlenmiştir (IDF, 1993). 0,1-0,3 g kadar peynir örneği mikro- Kjeldahl tüplerine tartılmış ve kademeli sıcaklık artışı ile karışım berraklaşınca kadar mikro-Kjeldahl ünitesinde yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi takiben 0,1 N H₂SO₄ ile titre edilerek toplam azot, 6,38 faktörü ile çarpılarak protein oranı belirlenmiştir.

3.2.3 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

3.2.3.1 Kültür ortamı

Laktobasillerin izolasyonu için MRS agar, geliştirilmesi için MRS broth, Laktokokların izolasyonu için M17 agar, geliştirilmesi için M 17 broth kullanılmıştır. Çalışmada BHI agar kullanılmış olup, böylece üründe bulunabilecek muhtemel patojen ve Enterokokların da incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece ürünün sağlık açısından irdelenebilmiş ve Enterokoklar gibi laktik asit bakterilerinin de dahil edilmesi sağlanmıştır.

3.2.3.2 Bakteriyel suşlar ve büyüme koşulları

Peynir örneklerinden laktik asit bakterisi izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 ml steril FTS ilave edilerek homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden dilüsyon hazırlanmış ve 10^{-4} ve 10^{-5} dilisyonlardan MRS agar, M17 agar ve BHI agar besiyerlerine yayma yöntemiyle ekim yapıp petri plakaları 37°C de 24 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip ilgili sıvı besiyeri ortamına steril kürdanlar yardımı ile alınıp 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4 Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması

İzole edilen bakterilerin stok solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanıp -80°C de depolanmıştır.

3.2.5 Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması

3.2.5.1 Fenotipik tanımlama

3.2.5.1.1 Koloni morfolojisi

Katı besiyeri ortamında gelişen koloniler birbirleri ile kıyaslanarak morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilmiştir. Özellikle EPS üreten türler koloni formunda yapışkan bir görünüm gösterdiği için şlaym karakterdeki koloniler seçilmiştir.

3.2.5.1.2 Gram boyama

Gram boyama yapılacak kültürler 18-24 saat sıvı kültür ortamında geliştirilmiş daha sonra kültürler santrifüjlenerek sıvı kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakteri pelletinden temiz bir lam üzerine öze yardımıyla aktarılmış ve ince bir film tabakası halinde yayılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra preparat usulüne uygun şekilde 3 kez alevden geçirilerek, bakterilerin lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır. Preparat kristal viyole ile 1 dk boyanmış, boya lam üzerinden akıtılmış ve yerine lügol çözeltisi konularak 1 dakika beklenmiştir. Lügol lam üzerinden akıtılarak, preparat rengi giderilinceye kadar önce etil alkol ile sonra su ile yıkanmıştır. Preparat ikinci zıt boya olan sulu karbol füksin ile 20-30 sn. boyanmıştır ve boyanın uzaklaştırılmasını takiben preparat su ile iyice yıkanmış ve sonrasında kurutma kağıdı ile kurulanmış ve havada kuruması için beklenmiştir. Preparata immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunun x100'lük objektifinde incelenmiştir. Gram pozitif bakteriler kristal viyolenin koyu mavi-mor renginde, Gram negatifler ise füksinin kırmızı renginde görünmüşlerdir (Sert, 2002).

3.2.5.1.3 Katalaz testi

Besiyerindeki ilgili koloninin (1 günlük) üzerine 1 damla %3'lük Bactident Catalase (Merck 1.11351) çözeltisi damlatılmıştır. İşlem ardından gaz çıkışının gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Pichhardt, 2004).

Morfolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda Gram pozitif ve katalaz negatif suşlar genotipik karakterizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.5.2 Genotipik olarak Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması

3.2.5.2.1 Genomik DNA izolasyonu

Sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden ependorf tüpü içerisine 1 ml alınarak 10 dakika 7000xg de santrifüj işlemi ile bakteri hücreleri bir araya toplanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 µl TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde süspanse olması sağlanmıştır. Süspanse edilen hücrelere 50 µl %10 luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µl Proteinaz K ilave edilip iyice vortekslendikten sonra 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.5 ml fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C’de 10 dakika 7000xg de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-isoamil alkol karışımı ile birkez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M’lık sodyum asetatın 50 µl içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. İçeriğe 1 ml izopropanol ilave edilerek çöken DNA’nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000xg de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0,5 ml %70 lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000xg de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C’de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µl distile su ilave edilerek süspanse edilmiştir.

3.2.5.2.2 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon

Elde edilen kolonilerden DNA izole etmeksizin koloni PCR işlemi ile ilgili primer (M13) kullanılarak RAPD (Rastgele Amplifiye edilmiş Polimorfik DNA) PCR uygulanıp kolonilerin farklı olup olmadığı tespit edilmiştir. RAPD-PCR analizi için daha önce tanımlanmış primer M13 (5’- GAG GGT GGC GGT TCT) kullanılmıştır.

Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı Çizelge 3.2 ve RAPD-PCR şartları Çizelge 3.3'de verildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.2 RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı

H ₂ O	50 µl için
DNA	1 µl
5X Phusion Buffer	10 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP miks	0,4 µl
Primer (M13)	0,75 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

Çizelge 3.3 RAPD-PCR analizi için oluşturulan PCR şartları

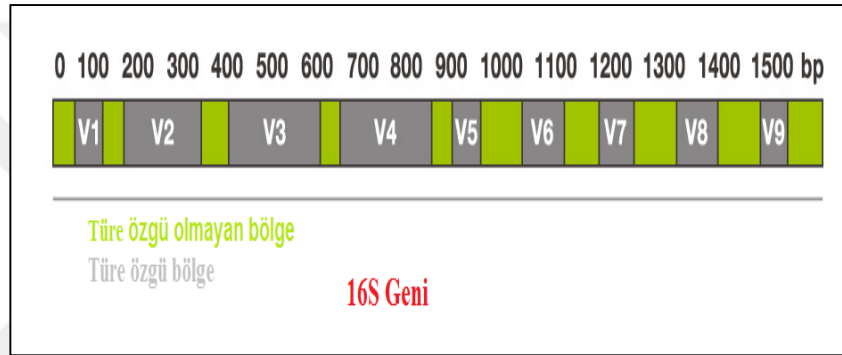
Denatürasyon	94°C 2 dk	1 döngü
Denatürasyon	94°C 1 dk	40 döngü
Bağlanma	42°C 20 s	
Uzama	72°C 2 dk	
Son uzama	72°C 10 dk	
Bekleme	20°C	

3.2.5.2.3 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

RAPD-PCR işlemini takiben farklı kolonilerde 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S geni bakterilerin çoğalması için elzem olan ribozomal RNA'lerden sedimentasyonuna bağlı olarak 16S olarak adlandırılan rRNA geninin kodlandığı genlerdir ve temel özelliği bakterilerin jenerasyonu için gereklidir ve en önemli özelliği ise bu gen bölgesinin her bir bakteri türüne özgü olmasıdır dolayısıyla taksonomik açıdan bakterilerin sınıflandırılmasını sağlar ve özellikle son yıllarda bakterilerin tanımlanması 16S gen bölgelerine göre yapılmaktadır. Yani bu bölge parmak izi bölgesi olarak da adlandırılmaktadır. Bakteriyel tanımlamada bu genin kullanımının bir diğer avantajı da

bu genin 1500 bp uzunluğunda olması dolayısıyla sekanslama işlemi açısından kolay ve ucuz olmasıdır.

Bu gen Şekil 3.2’de görülebildiği gibi 9 farklı bölgeden oluşmakta ve bu bölgeler türler arası değişken bölgeler ve her türde aynı olan bölgeleri içermektedir ve primer geliştirilme işlemlerinde her tür için aynı olan bölgeler kullanılmaktadır. Bu genin kullanılması son zamanlarda oldukça gelişen topluluk mikrobiyota analizlerinin de gelişimine katkı sağlamıştır.



Şekil 3.2 16S geni

16S geninin tespiti amacıyla PCR işlemi için; koloniler steril kürdan ile alınıp 10 µl steril H₂O da çözündürülmüş ve bu süspansiyonun 1 µl'si Gotaq (Promega) ile yürütülen koloni PCR da DNA şablonu olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda bakteriden izole edilmiş olan DNA'dan 1 µl şablon olarak kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımı Çizelge 3.4’de ve PCR şartları Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR karışımı

H ₂ O	50 µl için
DNA	1µl
5X Phusion Buffer	10µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP miks	0,4 µl
Primer 1(AMP-F)	1,0 µl
Primer 2(AMP-R)	1,0 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

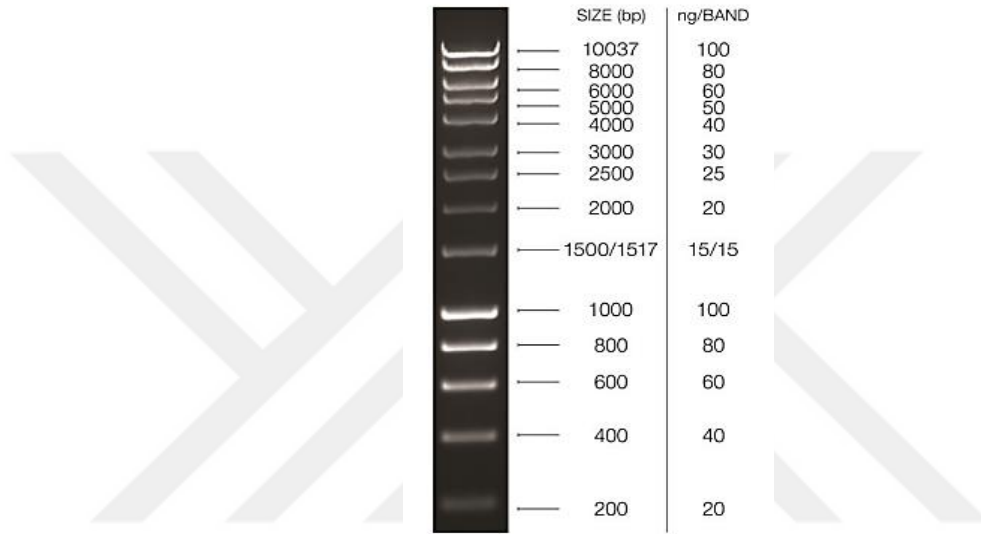
Çizelge 3.5 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR şartları

Denatürasyon	95°C 2 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s	
Bağlanma	55°C 20 s	25 döngü
Uzama	72°C 30 s	
Son uzama	72°C 5 dk	
Bekleme	20°C	

3.2.5.2.4 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü

PCR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0,5X Tris borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PCR ürününden 10 µl alınarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu kullanılarak elektroforez işlemine bırakılmıştır. Örnekleri bir yükleme boyası ile boyamak gerektiğinde örnekleri agaroz jele yüklemeye önce örnekler loading buffer (0,015% bromethyl blue (Sigma), 10% glycerol (Sigma) in 0,5 x TBE buffer) ile renklendirilmiştir. Bu işlem için ilk olarak parafilm üzerine 1 µl loading buffer dan konulup üzerine 10 µl örnek aktararak otomatik pipet aracılığı ile örnek ve buffer birbirine karıştırılmıştır ve renklendirilen örnekler agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez işleminin ardından jeller 1 mg.L⁻¹ lik etidyum bromid çözeltisi içerisinde

30 dk bekletilerek jelde yüklü olan DNA parçacıklarının boyanması için beklenmiştir. Bu işlemin ardından jeller deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV Transilluminatör (Clever) kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. Hyperladder I (Bioline, UK) her elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır. Jele yüklenen 5 µl ladder'ın fragmentlerinin boyutları ve miktarları Şekil 3.3 de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.

3.2.5.2.5 PCR ürünlerinin saflaştırılması

Gerekli görülen hallerde PCR ürünleri tamponlar, dNTP, kısa DNA parçaları ve enzimlerden arındırılmak için hızlı bir DNA temizleme aracı olan Sure-Clean (Bioline) kullanılarak arıtılmıştır. PCR ürününe eşit miktarda Sure-Clean tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra santrifüjlenmiştir (30 dk, 14.000×g, 24°C). Daha sonra 150 µl %70'lik etanol ilave edilip tekrar santrifüjlenmiştir (30 dk, 14000×g, 24°C). Bu adımda etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellet havada kurutulmuş ve 20 µl TE tamponu ilave edilerek yeniden süspansiyon edilmiştir. PCR ürünleri dizi analizi için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5.2.6 Dizi analizi

DNA sıralaması bir DNA molekülünün nükleotit bileşiminin belirlenmesidir. Bu bağlamda saflaştırdığımız PCR ürünlerinin 16S rRNA geninin sekans analizi ülkemizde İzo-Ser Rezidans, Şeker Mahallesi 1419. Cadde 1417. Sokak No:5 Daire:70 adresinde hizmet veren GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine yaptırılmıştır.

3.2.6 İzole edilen bakterilerin filogenetik analizi

DNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla yapılan moleküler filogenetik analizler, türlerin evrimsel ilişkilerini, canlılar arasındaki genom benzerliklerini veya farklılıkları hakkında bilgi vermektedir. Bu bilgiler ışığında filogenetik ağaçlar üretilir. Bu tez kapsamında izole ettiğimiz bakterilerin filogenetik analizi MEGA 7.0 paket programında yapıp filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu bağlamda filogenetik ağaçlar 1000 tekrarlı özyükleme ile neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987).

3.2.7 Homopolimerik ve heteropolimerik eps üretimi için gerekli *gtf / ftf* ve *p-gtf* genlerinin tespiti

Tulum peynirinden izole edilerek tanımlanmış olan LAB türlerinde EPS üretiminin araştırılması amacıyla bu türlerde mevcut olabilecek *gtf/ftf* ve *p-gtf* genleri PCR ile tespit edilmiştir. Genel olarak LAB türlerinden bu genlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılmış primerler ve PCR şartları Çizelge 3.1 de verilmiştir. Kullanılan PCR şartları gerekli görüldüğünde değiştirilmiştir.

3.2.8 EPS genleri tespit edilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması

3.2.8.1 Süt ortamında geliştirilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması

EPS üretim genlerine sahip olduğu tespit edilen suşlar %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanan -80°C 'de muhafaza edilen kültür stoklarından canlandırma amacı ile %3 laktoz içeren 10 ml MRS besiyerine %1 oranında ekilmiş ve 37°C de 24 saat ön geliştirme yapılmıştır. Gelişen kültürler 250 ml pastörize süt içerisine %1 oranında ekilerek 37°C de 2 gün geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürün geliştiği ortam içerisine %80'lik TCA çözeltisinden son hacmi %10 olacak şekilde ilave edilip iyice çalkalanmıştır. Elde edilen kültür ve TCA karışımı, hücreleri ve proteinleri

uzaklaştırmak için 4°C'de 30 dakika boyunca 4000×g de santrifüjlenmiştir. Elde edilen ham EPS içeren süpernata X2 kat soğuk etanol ilave edilerek ham EPS'nin çökmesi için +4°C'de 2 gün bekletilmiştir. Çöken ham EPS 4000×g de 15 dk santrifüj işlemi ile elde edilmiştir ve süpernatant uzaklaştırılarak ham EPS 20 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. Tamamen çözündürülen EPS -80°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. Elde edilen EPS kurutulduktan sonra monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi için sonraki analizlerde kullanılmıştır.

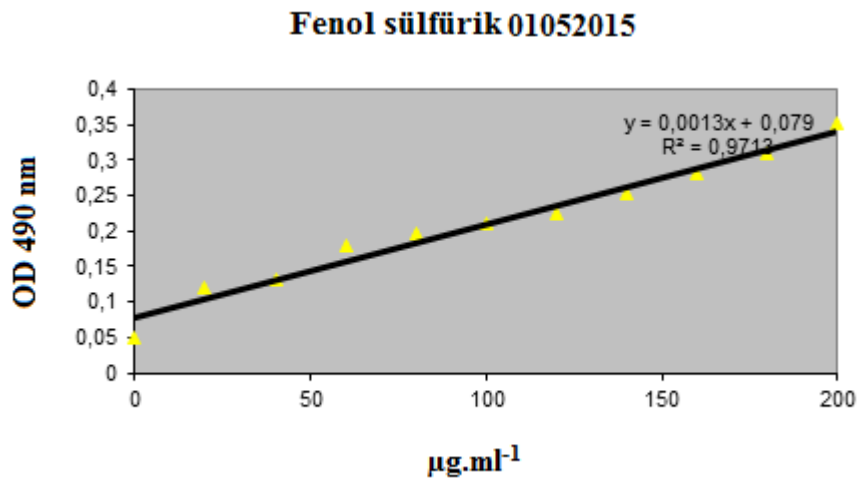
3.2.8.2 %3 Laktozlu MRS ortamında geliştirilen türlerden EPS izolasyonu ve saflaştırılması

EPS üretim genlerine sahip olduğu tespit edilen suşlar %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanan -80°C'de muhafaza edilen kültür stoklarından canlandırma amacı ile 10 ml MRS broth'a %1 oranında ekilmiş ve 37°C de 24 saat ön geliştirme yapılmıştır. Gelişen kültürler %3 laktoz içeren 250 ml MRS brotha %1 oranında ekilerek 37°C de 2 gün geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürün geliştiği ortam içerisine %100 lük TCA çözeltisinden son hacmi %10 olacak şekilde ilave edilip 4-5 saat rocker yardımı ile çalkalanmıştır. İşlemi takiben bakteri ve TCA solüsyonu 4000×g de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin sonunda süpernatant kısmı alınarak temiz bir kaba aktarılmıştır. Santrifüj sonunda elde edilen bakteri pelleti saf suda çözündürülüp 20 dk sonikasyon işlemine tabi tutulup ardından 4000×g de 10 dk santrifüjlenmiştir ve süpernatant kısmı alınarak ilk süpernatanta katılmıştır. Toplamda elde edilen süpernatanta X2 kat soğuk etanol ilave edilip 4°C de 1 gece bekletilmiştir. Oluşan çökelti santrifüj aracılığı ile 4000×g de 10 dk santrifüjlenerek bir araya toplanmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak elde edilen pellet saf suda çözündürülüp X2 kat soğuk etanol ilave edilerek 4°C de 1 gece bekletilmiştir. Oluşan çökelti 4000×g de 10 dk santrifüjlenerek bir araya toplanmıştır ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak saf eps elde edilmiştir (Dertli vd, 2016).

Elde edilen saf eps distile suda çözündürülüp kurutulmadan önce feneol_sülfirik asit testinde, -80°C'de dondurulup ardından liyofilizatörde kurutulduktan sonra monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi için sonraki analizlerde kullanılmıştır.

3.2.9 Fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim miktarı analizi

EPS izolasyonunu takiben üretilen EPS miktarını belirlemek amacıyla fenol-sülfirik asit testi uygulanmıştır (Dubois vd, 1956). Bu amaçla glikoz kullanılarak standart seyreltiler ile (0'dan 0,2 mg.ml⁻¹'ye kadar) kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Daha sonra 200 µl örnek spektro küvetine konmuş ve üzerine 600 µl %98'lik sülfirik asitten ilave edildikten sonra 120 µl %5'lik fenol ilave edilmiş ve renk gelişimi için 5 dakika beklenmiştir. Ardından ilgili küvetlerdeki OD₄₉₀ nm ölçülmüş ve glikoz eğrisi kullanılarak örneklerin EPS miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Fenol sülfirik asit testinde kullanılan standart eğri

3.2.10 Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi

Tulum peynirinden izole edilen LAB'leri tarafından üretilen EPS'te yer alan şeker gruplarının tespiti amacıyla HPLC analizi uygulanmıştır. Bu kapsamda ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 1 g EPS örneği tartılmış ve örnekler 0,5 M 25 ml sülfirik asit ilavesiyle 95°C sıcaklıkta tam 12 saat süreyle hidrolizasyona uğratılmıştır. İşlem sonunda örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve daha sonra 4 M NaOH ile nötraleedildikten sonra hacimleri 30 ml'ye tamamlanmıştır. İşlem sonunda tüpler 1600×g hızında 10 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve süpernatantlar 0,45 µm şırınga filtrelerden geçirilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekler refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiş ve

kolon olarak CARBOsep CHO-682 Pb Column kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C’de sabit tutulmuş ve hareketli faz olarak su kullanılmıştır. Örneklerin glukoz ve galaktoz içerikleri, aynı sistem ve çözücü kullanılarak her bir şeker için daha önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu kapsamda glukoz ve galaktoz için farklı konsantrasyonlar hazırlanmış ve her bir konsantrasyona karşılık HPLC kromatogramından elde edilen alan belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Tulum Peyniri Örneklerine Ait Bazı Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.1.1 Peynir örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı

Tulum peyniri örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayıları Çizelge 4.1 de verilmiştir. Çizelgenin incelenmesiyle de anlaşılacağı gibi TAMB sayısı en düşük 7,12 log kob/g ve en yüksek 9,23 log kob/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlardan peynir örneklerindeki TAMB sayısının oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonucun peynirlerin üretiminde kullanılan sütün ısıl işlem görmemiş olması, peynirin üretim süresinin uzun olması, bu nedenden ötürü üretim süresince süttten gelen ve üretim sırasında bulaşan mikroorganizmaların hızla çoğalması, olgunlaşma süresi ve koşullarından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Çizelge 4.1 Peynir örneklerinin bazı mikrobiyolojik analiz sonuçları

Örnek Kodu	TAMB Sayısı (log kob/g)	Maya-Küf Sayısı (log kob/g)	Laktobasil Sayısı (log kob/g)	Laktokok Sayısı (log kob/g)
1	9,00±0,29*	7,00±0,02	8,69±0,10	9,27±0,20
2	7,73±0,03	7,60±0,02	8,03±0,20	7,81±0,20
3	7,54±0,47	3,02±0,09	6,00±0,20	7,04±0,20
4	7,12±0,09	5,34±0,01	6,78±0,10	7,26±0,20
5	8,33±0,12	3,85±0,09	7,89±0,20	8,10±0,10
6	8,89±0,01	5,70±0,23	8,82±0,20	8,94±0,20
7	7,87±0,08	2,15±0,21	7,32±0,10	7,89±0,10
8	9,23±0,11	5,56±0,01	8,83±0,20	9,25±0,20
9	9,00±0,12	6,12±0,15	8,33±0,20	8,79±0,10
10	8,78±0,03	4,21±0,08	7,86±0,10	8,56±0,22
11	7,23±0,18	5,53±0,07	6,60±0,20	7,71±0,20
12	8,25±0,03	6,10±0,28	7,81±0,10	7,87±0,12
13	7,18±0,14	5,54±0,34	7,30±0,20	7,79±0,20
14	8,13±0,05	5,00±0,00	8,01±0,10	7,74±0,20
15	7,89±0,25	5,45±0,21	7,40±0,20	7,79±0,20
16	7,78±0,03	5,30±0,00	7,54±0,20	7,77±0,10

Çakır (2011), tulum peyniri örneklerinde TAMB sayısını en düşük 7,44 log kob/g ve en yüksek 8,38 log kob/g olarak tespit etmiştir. Bu sonuçlar bulmuş olduğumuz değerler ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca tulum peyniri örneklerinde tespit edilen TAMB sayısı, Kurt vd (1991a), Bostan (1991) ve Çağlar (2001) tarafından bildirilen değerlerle de paraleldir. Araştırma bulguları arasındaki bu farklılıklar peynir örneklerinin, üretim teknolojileri, olgunlaşma düzeyi ve olgunlaşma şartları arasındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

4.1.2 Peynir örneklerinin maya ve küf sayısı

Tulum peyniri örneklerinde belirlenen maya-küf sayısı Çizelge 4.1 de verilmiştir. Çizelgenin incelenmesi ile de anlaşılacağı gibi maya-küf sayısı en düşük 2,15 log kob/g ve en yüksek 7,60 log kob/g olarak belirlenmiştir.

Tulum peyniri örneklerinde maya ve küf sayısı Çakır (2011) tarafından en düşük 2,53 log kob/g ve en yüksek 7,11 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Bu değerler bulmuş olduğumuz değerler ile benzerlik göstermektedir.

Bu araştırma sonucunda tulum peyniri örneklerinde belirlenen maya ve küf sayılarının büyük varyasyon göstermesi peynirlerin yapım ve muhafaza şartlarının farklı olmasından, farklı ambalajlar içerisinde ve farklı sürelerde olgunlaştırılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.1.3 Peynir örneklerinde Laktokokların sayısı

Tulum peyniri örneklerinde belirlenen Laktokok sayısı en düşük 7,04 log kob/g ve en yüksek 9,27 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bu çalışmada Tulum peyniri örneklerinde tespit edilen değerler Ceylan (1998), Öner vd (2003), Tarakçı vd (2005) tarafından Tulum peynirlerinde belirlenen değerlerden yüksek, Çağlar (2001), Çetin vd (2006) ve Çakır (2012) tarafından belirtilen değerlere ise benzer bulunmuştur.

Araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların Tulum peynirinin ambalaj materyalinin özelliğine bağlı olarak olgunlaşma süresince meydana gelen nem kaybı ve nispi tuz

oranı artışı ile hammadde olarak kullanılan sütün bileşiminden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.1.4 Peynir örneklerinde Laktobasillerin sayısı

Tulum peyniri örneklerinde belirlenen laktobasil sayısı en düşük 6,00 log kob/g, en yüksek 8,83 log kob/g, ortalama 7,70 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Sonuçlar incelendiğinde örneklerde bulunan laktobasil sayılarının birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada Tulum peyniri örneklerinde tespit edilen değerler Çağlar (2001), Çetin vd (2006) ve Çakır (2012) tarafından belirtilen değerlerle benzerlik gösterirken Ceylan (1998), Öner vd (2003) ve Tarakçı vd (2005) tarafından belirlenen değerlerden yüksek bulunmuştur.

Araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların Tulum peynirinin ambalaj materyalinin özelliğine bağlı olarak olgunlaşma süresince meydana gelen nem kaybı ve nispi tuz oranı artışı ile hammadde olarak kullanılan sütün bileşiminden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.2 Tulum Peyniri Örneklerinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

Erzincan Tulum peyniri örneklerine ait bazı kimyasal analiz sonuçları ve kurumadde oranları Çizelge 4.2’de belirtilmektedir.

Çizelge 4.2 Peynir örneklerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait bazı istatistiksel analiz sonuçları.

Özellik	En düşük	En yüksek	Ortalama	Standart sapma
Kurumadde (%)	61,43	73,52	68,61	5,24
Protein (%)	19,80	25,11	22,73	2,20
Tuz (%)	2,81	4,56	3,67	0,73
Yağ (%)	35,00	40,00	38,80	2,17
Asitlik (%)	1,10	1,76	1,52	0,25
pH	5,10	5,50	5,32	0,15

İncelenen tulum peyniri örneklerinde kurumadde miktarı en düşük %61,43 ve en yüksek %73,52 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerler Akyüz (1981)'ün tulum peynirlerinde bulmuş olduğu değerler ile benzerlik gösterirken, Arıcı ve Şimşek (1991) tarafından belirlenen değerlerden yüksektir. Sonuçlar arasındaki farklılıkların üretimde kullanılan hammadde sütün, işleme metodlarının, tuz oranının, ambalaj materyalinin çeşidi, büyüklüğü ve geçirgenliği ile olgunlaşma süre ve sıcaklığının farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Türk Standartlarında (TS 3001) tulum peynirinin kurumadde oranının %60'dan az olamayacağı hükmü yer almaktadır (Anonim, 2006). Bu durumda kurumadde yönünden analizi yapılan örnekler Tulum Peyniri Standardına (TS 3001) göre uygun bulunmuştur.

Toplanan Tulum peyniri örneklerinin yağ oranı en düşük %35,00 ve en yüksek %40,00 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Çakır (2011), incelediği 20 tulum peyniri örneğinde yağ oranını en düşük %26,00 ve en yüksek %33,00 olarak tespit etmiştir. Bu değerler, elde ettiğimiz araştırma bulgularından düşüktür.

Bu durum peynir yapımında kullanılan sütün bileşiminden ve tulum peyniri örneklerinin farklı kurumadde oranlarından kaynaklanabilir. Aynı zamanda Erzincan Tulum peyniri yapımında genellikle koyun sütü kullanılmaktadır ve koyun sütünün yağ oranı inek sütünün yağ oranından daha yüksektir. Bu nedenle sadece inek sütü ile yapılan veya inek ve koyun sütü karıştırılarak yapılan tulum peynirlerinin yağ oranlarının daha düşük olabileceği düşünülmektedir.

Peynirlerin yapısal özellikleri ve kendine özgü lezzeti ile olgunlaşma süresince mikrobiyal stabilitenin sağlanmasında önemli olan tuz miktarı (Kınık vd, 1999) en az %2,81, en çok %4,56 ve ortalama %3,67 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Akyüz (1981), Tulum peynirlerinin tuz oranlarını en az %3,44 ve en çok %7,37 olarak tespit etmiştir. Tuz oranları arasında görülen farklılıkların üretimde kullanılan tuz miktarı, peynir üretim metodu, olgunlaşma süresince ambalaj materyali ve olgunlaşma şartlarına bağlı olarak peynir örneklerinde meydana gelen nem kaybına bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Ayrıca peynire katılan tuz miktarının üreticinin

alışkanlığından ve tulum peynirinin standart bir üretiminin olmayışından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

İncelenen tulum peyniri örneklerinin titrasyon asitliği değerine (% laktik asit cinsinden) ait istatistiksel veriler Çizelge 4.2’de verilmiştir. Örneklerin titrasyon asitliği değeri en düşük %1,10 ve en yüksek %1,76 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, Akyüz (1981)’ün en az %0,90 ve en çok %3,10 olarak bulduğu değerlerden düşüktür. Sonuçlar arındaki farklılıkların peynirin üretimini sırasında peynir bünyesinde kalan laktoz miktarı, mikroorganizma faaliyeti ve ürünün olgunlaşma süresi ve şartlarına bağlı olarak farklılık göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

İncelenen tulum peyniri örneklerinin pH değerleri en düşük 5,10 ve en yüksek 5,50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Çakır (2011), Tulum peynirlerinin pH değerlerini en düşük 4,39 ve en yüksek 5,28 olarak tespit etmiştir. Bu değerler elde ettiğimiz değerler ile paralellik göstermektedir.

İncelenen peynir örneklerinin protein oranları Çizelge 4.2’nin incelenmesi ile de anlaşılacağı gibi en düşük %19,80 ve en yüksek %25,11 ve olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, Kurt vd (1991b)’nin bulduğu değerlerden (en az %12,75, en çok %24,67) yüksek bulunmuştur. Protein oranının yüksek olması incelenen tulum peynirlerinde kurumadde oranının yüksek olmasına bağlanabilir. Ayrıca incelenen tulum peyniri örneklerinin yapımında inek sütünden (% protein 3,4) ziyade koyun sütünün (% protein 5,5) kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. Araştırma bulguları arasındaki farklılıkların peynirin üretiminde kullanılan sütün, olgunlaştırma süre ve sıcaklıklarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3 Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Toplanan 16 tulum peyniri örneğinden MRS, M17 ve BHI besiyerlerine ekim yapılarak toplamda farklı olabileceği düşünülen 272 koloni izole edilmiştir.

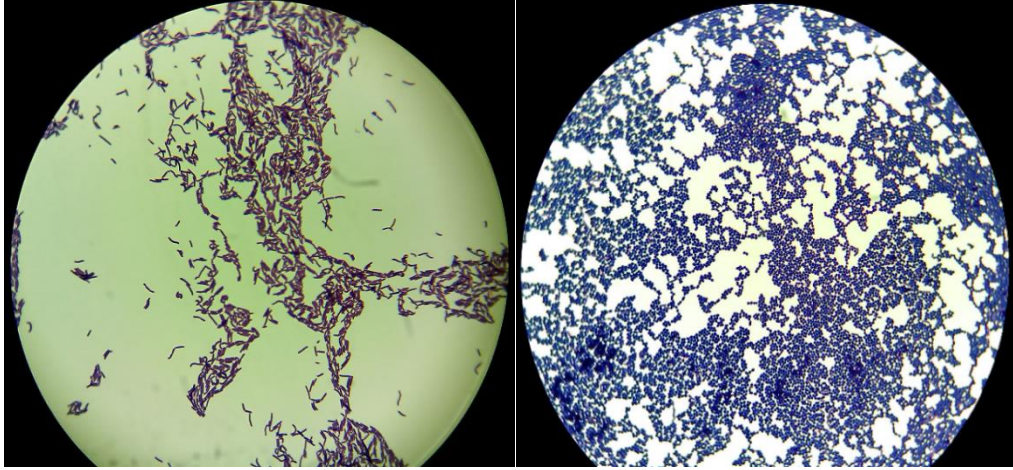
Çizelge 4.3 Tulum peynirinden elde edilen izolat sayıları

Örnek No	İzolat Sayısı		
	MRS agar	M17 agar	BHI agar
1	2	7	6
2	6	10	10
3	1	6	4
4	2	3	3
5	2	7	3
6	4	6	7
7	1	6	7
8	3	4	4
9	7	4	4
10	2	4	5
11	3	3	6
12	7	4	6
13	5	6	8
14	8	7	8
15	6	8	8
16	16	9	12

4.4 İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

4.4.1 Laktik Asit Bakterilerinin fenotipik tanımlanması

İzole edilen bakterilerde fenotipik tanımlama amacı ile yapılan morfolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda Gram pozitif ve katalaz negatif suşlar seçilerek genotipik karakterizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Şekil 4.1'de gram boyama esnasında ışık mikroskobu ile görüntülenen Gram pozitif ve Gram negatif suşlara ait görüntü yer almaktadır.

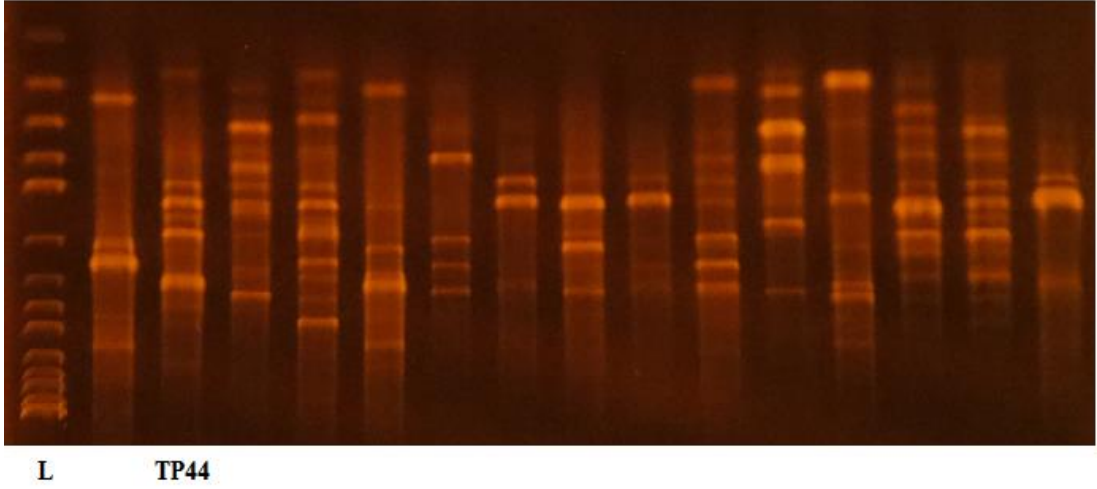


Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin gram boyama görüntüsü

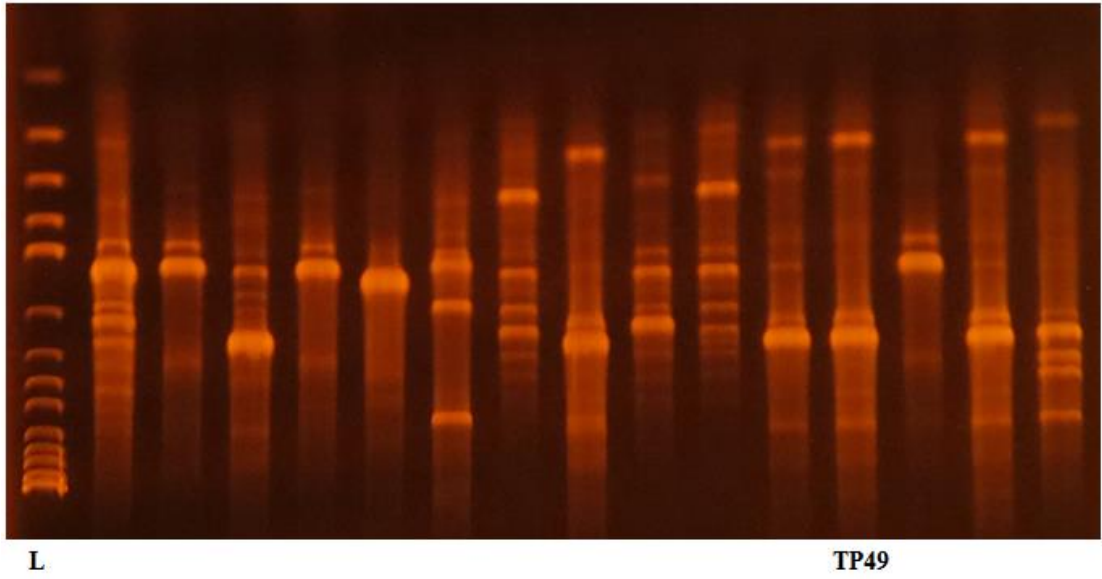
Gram boyama yapılan izolatların önemli bir kısmının Gram negatif çıkmasından dolayı örneklerde bulunan gram negatif bakterilerden de seçilerek genotipik karakterizasyon yapılmıştır.

4.4.2 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon

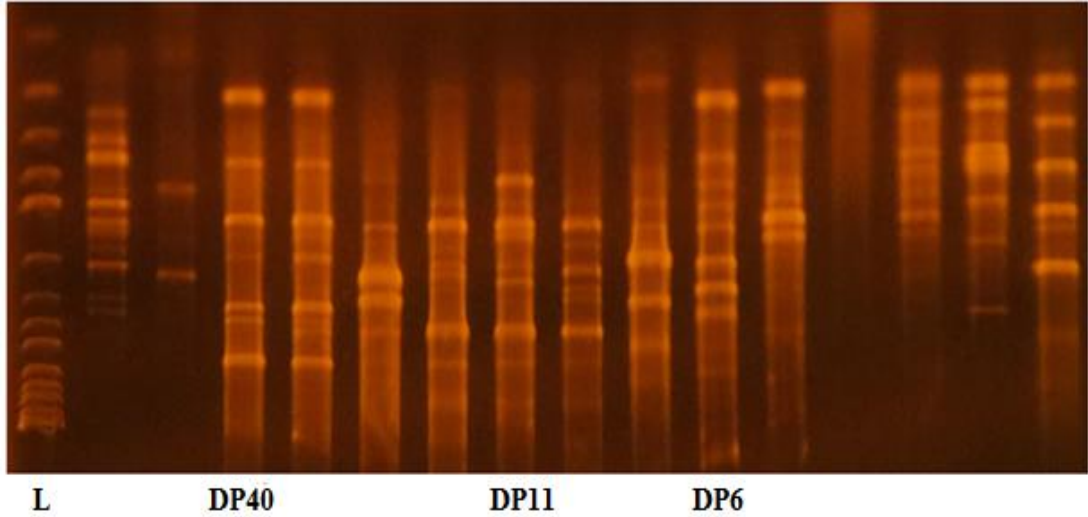
Tulum peyniri örneklerinden izole edilen LAB türlerinin genotipik ayrımının gerçekleştirilmesi amacıyla RAPD-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Genotipik karakterizasyon metodu olarak seçilen bu işlemde M13 primeri kullanılmıştır. Şekil 4.2-4.4 tulum peyniri izolatlarının RAPD-PCR işleminin ardından elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilmiş bazı görüntüleri göstermektedir. Literatüre bakıldığında genel olarak elektroforez işleminin 4°C'lerde 1 gece kadar düşük voltajda gerçekleştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Ancak bu çalışmada jeller genel olarak 50 V'da 3-4 saat kadar yürütülmüş ve gerekli ayrımın rahatlıkla gerçekleştirilebileceği jel görüntüleri elde edilmiştir ve ayrıca jellerde herhangi bir erime de meydana gelmemiştir. Bazı örneklerde 90 V'da yürütme işlemi de uygulanmış ve yine benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu işlemler neticesinde seçilen izolatlardan genotipik profili aynı/çok benzer olanlar ve farklı olanlar belirlenmiştir. Sonuç olarak biyokimyasal ve genotipik karakterizasyon işlemleri neticesinde 272 adet tulum peyniri izolatından yaklaşık olarak 80 tanesi 16S rRNA genin çoğaltılması için seçilmiştir.



Şekil 4.2 Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü



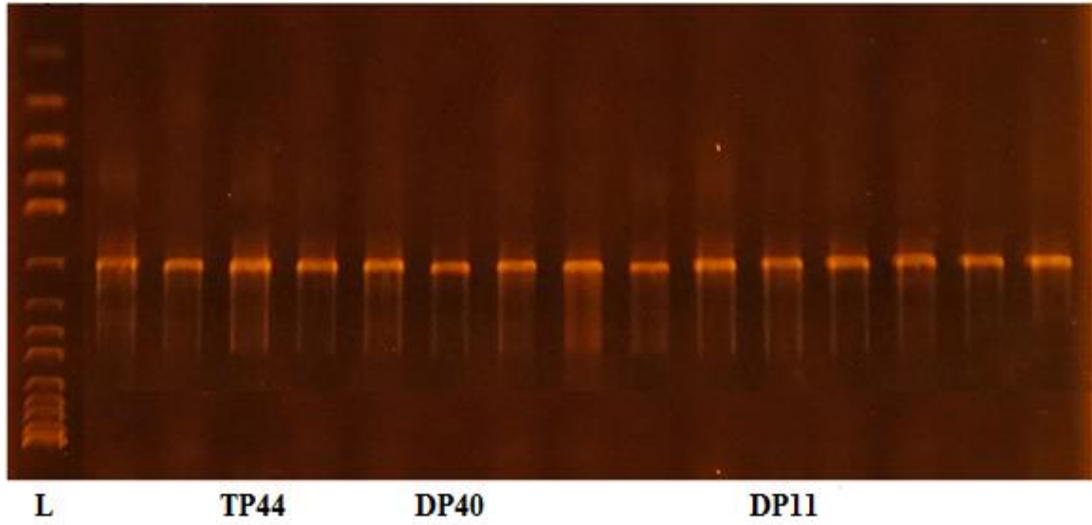
Şekil 4.3 Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü



Şekil 4.4 Tulum peyniri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü

4.4.3 LAB türlerinin 16S rRNA genlerinin tanımlanması

RAPD-PCR sonucu farklı olduğu düşünülerek seçilen yaklaşık 80 kolonide 16S geni ampilifiye edilmiş (Şekil 4.5) ve saflaştırıldıktan sonra (Sure Clean ile) sekans reaksiyonu kurulmuş ve sekanslama işlemi için ülkemizdeki firmalara gönderilmiştir. Bazı örneklerde ise herhangi bir saflaştırma işlemi olmaksızın ampilifiye edilen ürün sekans için gönderilmiştir (Ülkemizdeki ve artık Dünyadaki çoğu firma sekans reaksiyonunu kendisi kurmaktadır). Şekil 4.5 16S geninin PCR ampilifikasyonunun ardından jelde yürütülmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsünü göstermektedir. Sekans işleminin ardından sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veya Ribosomal database project (<http://goo.gl/8OILPU>) veritabanlarında mevcut türler ile karşılaştırılarak ilgili izolatların hangi türe ait olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.5 16S geninin ampifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü

4.5 Tulum Peynirinden İzole Edilen LAB ve Diğer Türler

Genotipik karakterizasyon ve takiben tanımlama işlemlerinin ardından 2 farklı dönemde toplanan tulum peyniri örneklerinde starter potansiyeli olabilecek 7 farklı LAB türünün bulunduğu saptanmıştır. Toplanan tulum peynirlerinden izole edilen bu türler; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus crustorum*, *Lactobacillus paracasei*, *Weissella paramesenteroides* olarak ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.4 tanımlanan türleri, bu türlerin hangi örneklerde bulunduğunu ve bu türlerin fermentasyon kabiliyetlerini göstermektedir. Genotipik ayrıma bağlı olarak seçilen ve sekanslama işlemi gerçekleştirilen izolatların 23 farklı türe ve 70 farklı suşa ait olduğu gözlenmiştir.

Tulum peyniri örneklerinden izole edilen homofermantatif türler *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus crustorum* olarak bulunurken heterofermantatif türler ise *Lactobacillus paracasei*, *L. brevis*, *W. paramesenteroides*, olarak ortaya çıkartılmıştır (Çizelge 4.4). Bunun yanı sıra *Lactobacilli* dışında *Enterococci*'de tulum peyniri örneklerinde bulunmuştur. Çizelge 4.4'den de görülebileceği gibi LAB türleri dışındaki türler tulum peyniri örneklerini domine etmektedir.

Çizelge 4.4 Tulum peyniri izolatlarının örneklerdeki dağılımı

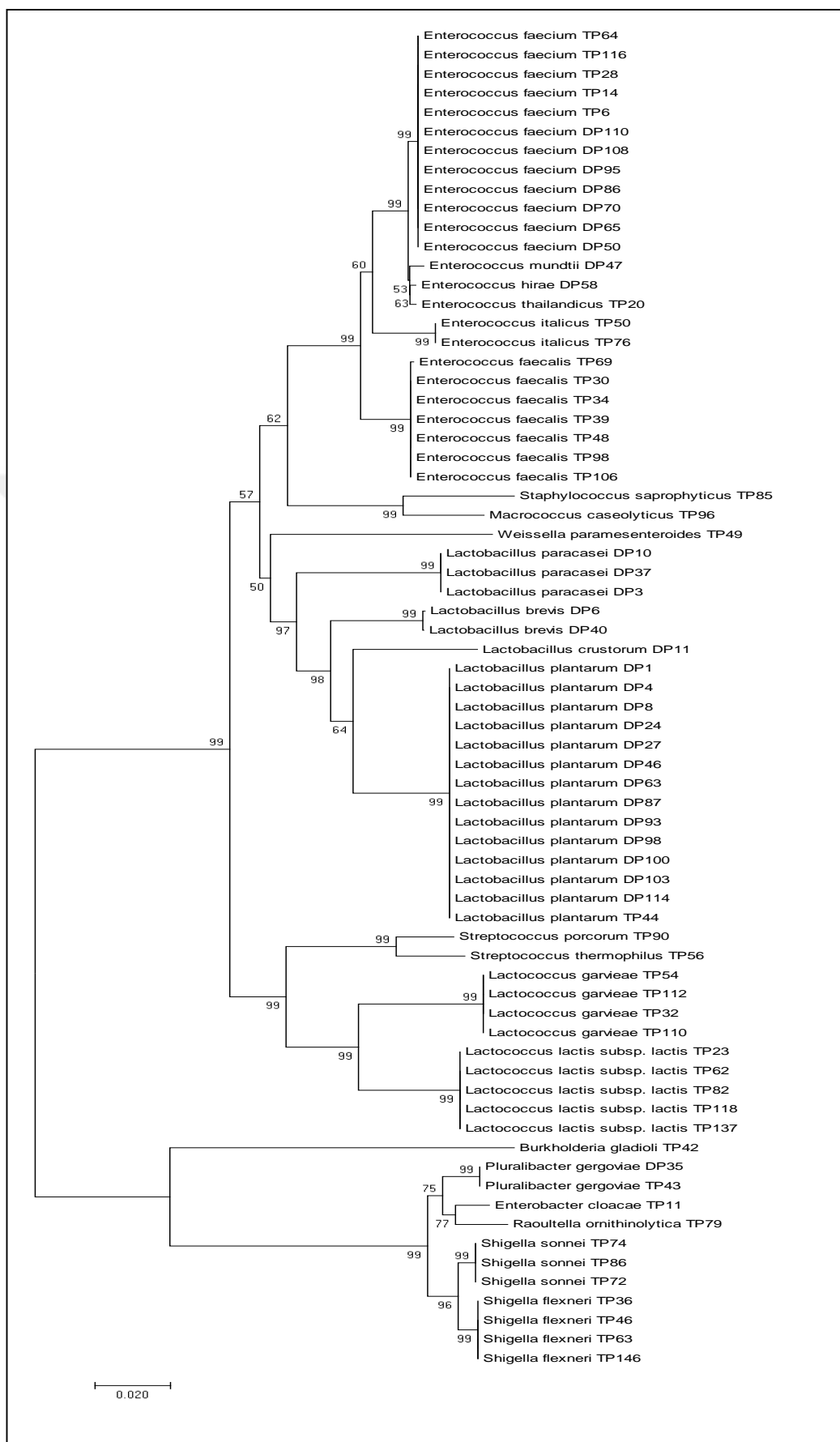
İzole edilen LAB türleri	İzole edildiği örnek kodları	Suş sayısı	% oran
Homofermantatif LAB türleri			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2-11-12-13-14-15-16	50	18.38
<i>Lactococcus lactis</i>	5-6-8	21	7.72
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3	1	0.37
<i>Lactobacillus crustorum</i>	13	5	1.84
Heterofermantatif LAB türleri			
<i>Lactobacillus paracasei</i>	12-13-16	6	2.20
<i>Lactobacillus brevis</i>	12-16	4	1.47
<i>Weisella paramesenteroides</i>	2-3	4	1.47
Diğer LAB türleri			
<i>Lactococcus garvieae</i>	3-10	10	3.68
<i>Enterococcus mundtii</i>	12	2	0.74
<i>Enterococcus faecium</i>	1-3-4-5-7-9-12-13-14-15-16	69	25.37
<i>Enterococcus hirae</i>	14	4	1.47
<i>Enterobacter cloacae</i>	2-4	5	1.84
<i>Enterococcus thailandicus</i>	6	6	2.20
<i>Enterococcus faecalis</i>	1-2-4-6-9	22	8.10
<i>Enterococcus italicus</i>	2-7	9	3.31
İzole edilen diğer türler			
<i>Shigella flexneri</i>	1-2-5-10	16	5.88
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	2-16	11	4.04
<i>Shigella sonnei</i>	6-7-9	14	5.15
<i>Burkholderia gladioli</i>	2	4	1.47
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8	3	1.10
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	9	2	0.74
<i>Streptococcus porcorum</i>	10	2	0.74
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	1	2	0.74

4.6 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi

Şekil 4.6 Tulum peyniri izolatlarının 16S rRNA genlerinin filogenetik ilişkisini farklı alt grupların oluşması ile gösteren Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuş dendrogram göstermektedir. MEGA7 ile gerçekleştirilen kümesel gruplandırma analizi tulum peyniri izolatlarının 16S rRNA genlerinin tür ve suş seviyesinde farklı gruplara

ayrıldığını göstermektedir. Dendograma bakıldığında Laktobasil, Laktokok, Enterokok, Weisella türlerinin bir arada gruplandığı diğer türlerinde kendi grupları arasında bir araya geldikleri görülmektedir. Farklı suş ve türlerin 16S genine bağlı olarak bir araya gelişi kaynakları itibariyle benzerlik gösterebilecekleri anlamına gelmekte ve bu açıdan filogenetik açıdan benzerlik dolayısıyla önem taşımaktadır. Gelecek çalışmalarda elde ettiğimiz türler ile farklı kaynaklardan izole edilecek aynı tür ve suşlara ait türler ile benzerlik ve farklılık test edilecektir.



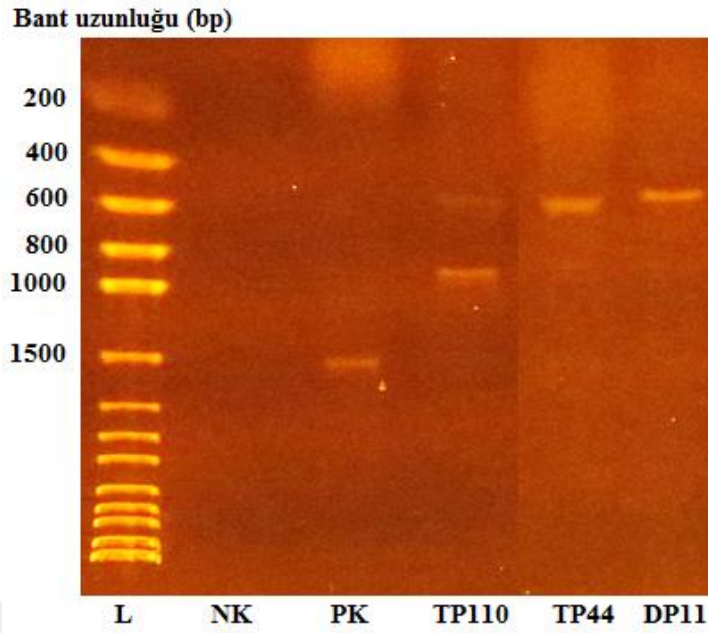


Şekil 4.6 Tulum peyniri izolatlarının 16S rRNA sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuş Dendrogram. Filogenetik analiz Mega7 ile gerçekleştirilmiştir.

4.7 Tulum Peyniri İzolatlarında Homopolimerik ve Heteropolimerik *eps* Genlerinin Taranması

Tulum peyniri izolatlarında EPS üretim potansiyelinin ve *eps* genlerinin tespiti amacıyla bütün izolatlardan çizme yöntemi ile ekim yapılmış ve sünme potansiyeli ve yapışkan görünüm baz alınarak suşlar daha sonraki işlemler için seçilmiştir. Sünme ve yapışkanlık özelliğine bağlı olarak *Lactobacillus plantarum* DP1/TP44, *Lactobacillus paracasei* DP3, *Lactobacillus brevis* DP6/DP40, *Lactobacillus crustorum* DP11, *Weissella paramesenteroides* TP49, *Lactococcus garvieae* TP110 EPS üretiminin ve *eps* genlerinin tespit amacıyla seçilmiştir. Şekil 4.7-4.12 Çizelge 3.1’de verilen primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR ampilifikasyon işlemlerini gösteren agaroz jel elektroforez işlemini göstermektedir.

LAB türleri genel olarak hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS üretme kabiliyetlerindedirler. Homopolimerik EPS çoğunlukla glukan ve fruktan tip EPS olarak karşımıza çıkmakta ve bu polimerlerin üretiminden sırasıyla *gtf* ve *ftf* olarak literatüre geçen glikoziltransferaz/fruktoziltransferaz kodlayıcı genler sorumlu olmaktadır. Bu bağlamda seçilen türlerde homopolimerik EPS üretiminden sorumlu genlerin varlığı glikoziltransferaz/glukansükraz genlerinin ve proteinlerinin farklı türlerde korunan bölgeleri seçilerek dizayn edilmiş primerler kullanılarak PCR işlemi ile taranmıştır. Bu amaçla daha önce literatürde tanımlanmış Dexreu (*gtf*) ve Lev primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

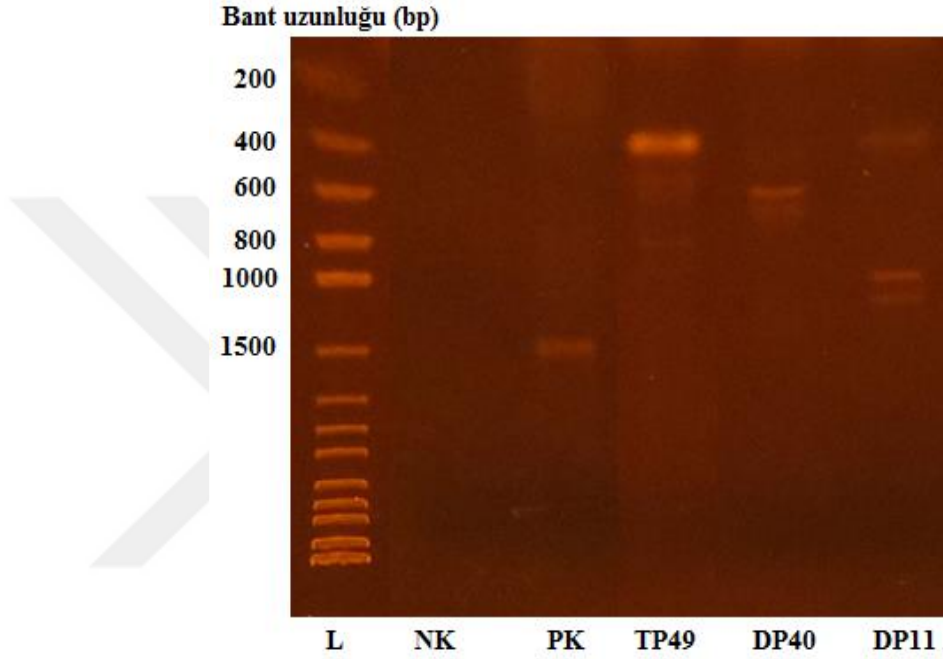


Şekil 4.7 Seçilen izolatlarda Dextran genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L:** Ladder, **NK:** Negatif Kontrol, **PK:** Pozitif Kontrol, **TP110:** *Lactococcus garvieae*, **TP44:** *Lactobacillus plantarum*, **DP11:** *Lactobacillus crustorum*).

Şekil 4.7'den de görüleceği üzere tulum peyniri izolatlarından *Lactococcus garvieae* TP110, *Lactobacillus plantarum* TP44, *Lactobacillus crustorum* DP11'in test ettiğimiz primler ile *gtf* genini taşıdıkları gösterilmiştir (Çizelge 4.5). Şekilden de görüleceği üzere bu primerler ile ampilifiye edilmesi beklenen yaklaşık 600 bazlık kısım *gtf* geninden ampilifiye edilmiştir. Bununla birlikte her ne kadar bu primler ile tespit edilmemiş olsa tulum peyniri izolatlarında homopolimerik eps üretimini kodlayan *gtf* geninin varlığı çok büyük bir ihtimaldir. Zira ekşi hamur LAB suşlarında *eps* genlerinin varlığı üzerine yapılan bir araştırmada ekşi hamur izolatlarının homopolimerik EPS üretimi için gerekli *gtf* ve heteropolimerik EPS üretimi için gerekli *p-gtf* genlerine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır ve genel olarak tahıl-bazlı LAB türleri homopolimerik EPS üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Tieking ve Ganzle, 2005). Ancak son çalışmalar ekşi hamur izolatlarının heteropolimerik EPS ürettiğini de ortaya koymuştur (Galle vd, 2011).

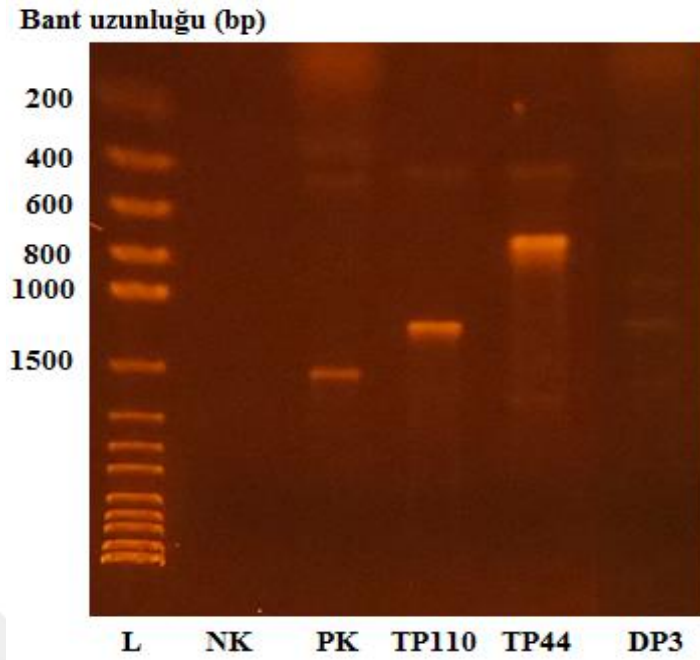
Heteropolimerik EPS üretimi homopolimerik EPS üretime göre daha kompleks bir işlemdir ve yaklaşık olarak 14-20 genin bir arada fonksiyon icra ettiği bir gen kümesi (*eps* cluster) heteropolimerik EPS üretiminden sorumludur. Literatür kısmında fonksiyonları tartışılmış olan ve heteropolimerik *eps* gen kümelerinde yer alan *epsA*

(transcriptional regulator), *epsB* (chain length determination protein) ve *p-gtf*'in (priming glycosyltransferase) tulum peyniri izolatlarının genomlarında varlıkları ilgili primerler (Çizelge 3.1) kullanılarak PCR ile taranmıştır. Şekil 4.8 - 4.12 sırasıyla tulum peyniri izolatlarında *epsA*, *epsB*, *epsEFG*, G*-Bact-a- ve G-Lr-Bact-a- genlerinin bulunup bulunmadığını gösteren agaroz jel görüntülerini göstermektedir.



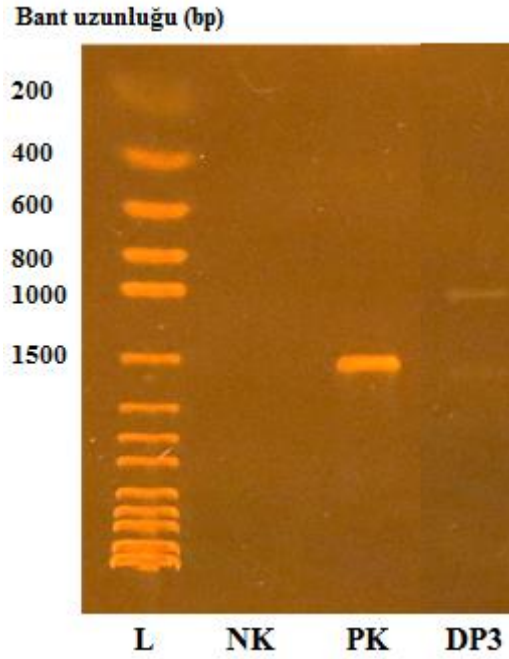
Şekil 4.8 Seçilen izolatlarda *epsA* genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L**: Ladder, **NK**: Negatif Kontrol, **PK**: Pozitif Kontrol, **TP49**: *Weissella paramesenteroides*, **DP40**: *Lactobacillus brevis*, **DP11**: *Lactobacillus crustorum*).

Daha önce *epsA* genine yönelik dizayn edilen ve yaklaşık 800 bazlık bir kısmı ampilifiye etmesi beklenen primer seti ile (Low vd, 1998) *epsA* geninin varlığı peynir izolatlarında test edilmiş ve şekilden de görüleceği üzere *Weissella paramesenteroides* TP49, *Lactobacillus brevis* DP40 ve *Lactobacillus crustorum* DP11'in bu gen açısından pozitif oldukları gözlenmiştir. Farklı türlerde ampilifiye edilen kısmın boyutunda farklılık olduğu gözlenmiş bu durumda herbir türdeki genin yapısındaki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte ilgili primerler ile beklenen bölgede tek bir bandın ortaya çıkışı bu ampilifikasyonunun *epsA* geninden kaynaklandığını düşündürmektedir.

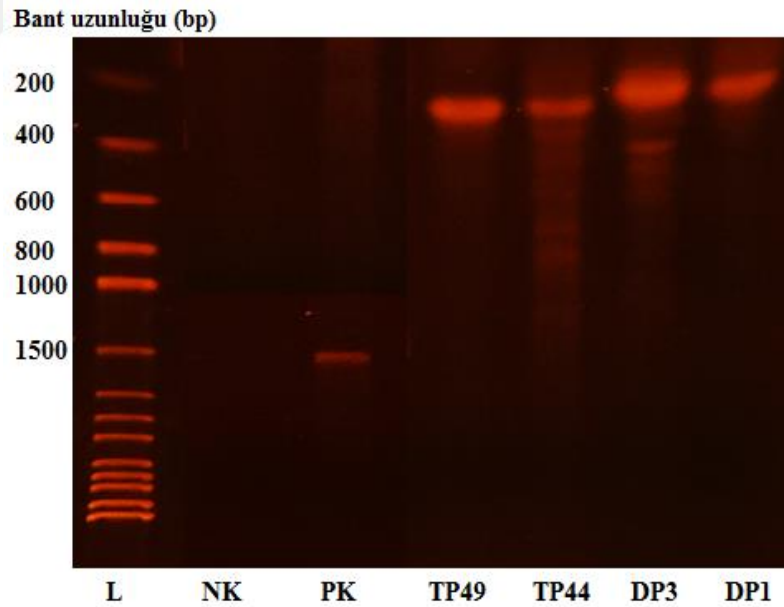


Şekil 4.9 Seçilen izolatlarda *epsB* genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L:** Ladder, **NK:** Negatif Kontrol, **PK:** Pozitif Kontrol, **TP110:** *Lactococcus garvieae*, **TP44:** *Lactobacillus plantarum*, **DP3:** *Lactobacillus paracasei*).

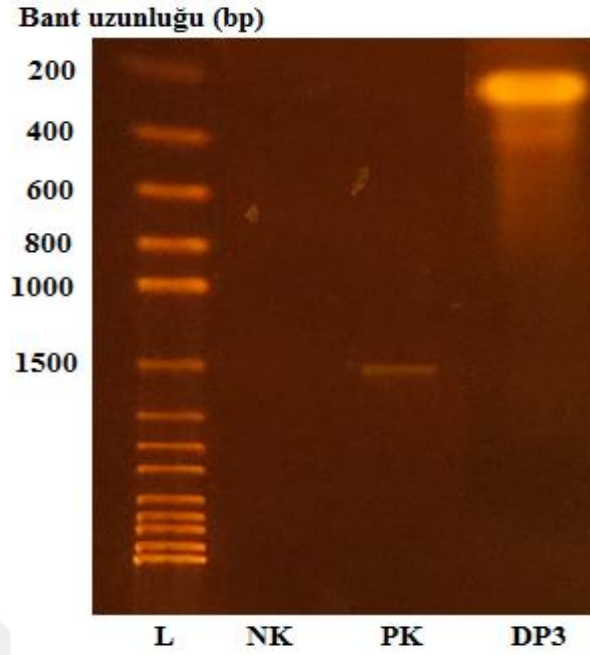
Benzer olarak 1150-bp'lik bir ürün elde edilmesi beklenen PCR işlemi ile *epsB* geninin varlığı (De Vuyst vd, 1998) peynir izolatlarında taranmıştır ve Şekil 4.9'dan da görüleceği üzere 3 türün *Lactococcus garvieae* TP110, *Lactobacillus plantarum* TP44 ve *Lactobacillus paracasei* DP3'ün, bu gen açısından pozitif olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada da ekşi hamurdan izole edilen 11 türün 3'ünün *epsB* geni açısından pozitif olduğu gözlenmiştir (Dertli vd, 2016). Bu sonuçları türler bazında karşılaştırmak temel husus olmakla birlikte biyoinformatik açıdan bu tip karşılaştırmalar ile benzer sonuçlar görmek anlam kazanmaktadır. Bu türlerde *epsA*, *epsB* ve diğer genlerin varlığı heteropolimerik eps kümesinin varlığına ışık tutmaktadır.



Şekil 4.10 Seçilen izolatlarda *epsEFG* genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L**: Ladder, **NK**: Negatif Kontrol, **PK**: Pozitif Kontrol, **DP3**: *Lactobacillus paracasei*)



Şekil 4.11 Seçilen izolatlarda G*-Bact-a-F-36/ G*-Bact-a-R-27 genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L**: Ladder, **NK**: Negatif Kontrol, **PK**: Pozitif Kontrol, **TP49**: *Weissella paramesenteroides*, **TP44**: *Lactobacillus plantarum*, **DP3**: *Lactobacillus paracasei*, **DP1**: *Lactobacillus plantarum*).



Şekil 4.12 Seçilen izolatlarda G-Lr-Bact-a-F-26/ G-Lr-Bact-b-R-20 genlerinin taranması sonucu oluşan PCR ürününü gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü (**L:** Ladder, **NK:** Negatif Kontrol, **PK:** Pozitif Kontrol, **DP3:** *Lactobacillus paracasei*).

Benzer olarak peynir izolatlarında *p-gtf* geninin varlığı 3 farklı primer seti kullanılarak PCR taranmıştır. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere *p-gtf* geni *Lactobacillus paracasei* DP3, *Weissella paramesenteroides* TP49, *Lactobacillus plantarum* TP44 ve *Lactobacillus plantarum* DP1 olmak üzere 4 peynir izolatında PCR işlemi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.10-4.12).

Tulum peynirinde izole edilen LAB türlerinde bulunan heteropolimerik *eps* genlerinin PCR taranması ile elde edilmiş sonuçlar Çizelge 4.5'te özetlenmiştir. Hem jel görüntülerinden hem de Çizelge 4.5'den anlaşılacağı üzere türler arasında farklılık etmek kaydıyla *Lb. brevis* DP6 hariç bütün izolatlar homopolimerik veya heteropolimerik *eps* genlerinden birini taşımaktadır. Bu sonuçlar hem homopolimerik hem de heteropolimerik *eps* üretiminin peynir izolatlarında gerçekleşme ihtimalini göstermektedir.

Çizelge 4.5 Tulum peyniri izolatlarında homopolimerik ve heteropolimerik EPS üretiminin *gtf*, *dexreu*, *lev* ve *epsA*, *epsB*, *epsDE* ve *p-gtf* primelleri ile taranması

	<i>gtf</i>	Dexreu	LevV	<i>epsA</i>	<i>epsB</i>	<i>epsEFG</i>	G-* Bact-a	G-Lr- Bact-a
Hedef gen	<i>gtf</i>	<i>gtf</i>	<i>ftf</i>			<i>p-gtf</i>	<i>p-gtf</i>	<i>p-gtf</i>
Hedef gen boyutu (bp)	660	600	800	800	1150	1600	189	276
DP1- <i>Lb. plantarum</i>	- *	-	-	-	-	-	+	-
DP3- <i>Lb. paracasei</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
DP6- <i>Lb. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
DP11-<i>Lb. crustorum</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
DP40-<i>Lb. brevis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
TP44-<i>Lb. plantarum</i>	-	+	-	-	+	-	+	-
TP49-<i>W. Paramesenteroides</i>	-	-	-	+	-	-	+	-
TP110-<i>Lc. garvieae</i>	-	+	-	-	+	-	-	-

* + ilgili genin bulunduğu – ise ilgili genin bulunmadığına işaret etmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda süt ve ürünlerinde EPS üretiminin yüksek oranda gerçekleşebildiğini ortaya koymuştur. Örneğin *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* yağsız sütte geliştirildiği zaman baskın olarak glikoz ve galaktoz içeren heteropolisakkarit ürettiği ortaya konulurken (Cerning vd, 1988), *Lactobacillus bulgaricus*'un yağsız süt ortamında geliştirilmesi yine galaktoz, glukoz ve ramnoz içeren heteropolisakkarit üretimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Cerning vd, 1986). Son zamanlarda yoğurtların (De Vuyst ve Degeest, 1999; De Vuyst vd, 2001), ekşi kremanın (Duboc ve Mollet, 2001), dondurmanın (Christiansen vd, 1999) ve düşük yağlı Mozerallanın (Broadbent vd, 2001; Low vd, 1998) üretimi için LAB tarafından üretilen doğal tekstür geliştirici ekzopolisakkaritleri *in situ* üretimi araştırılmıştır. Fonksiyonel *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* veya *S. thermophilus*'un ekzopolisakkarit üreten starterleri bu konuda umut verici olmuştur. Benzer olarak tulum peyniri izolatlarının da EPS üretme potansiyeli bu açıdan son derece önemlidir.

4.8 Fenol-Sülfirik Asit Testi İle Belirlenen EPS Üretim Miktarı

LAB türlerinin EPS üretme kabiliyetleri yanı sıra EPS üretim seviyeleri de bu suşların fonksiyonel etkilerinin ortaya çıkabilmesi açısından önem arz etmektedir. Yapılan değerlendirmeler LAB türlerinde EPS üretiminin çok genel bir işlem olabileceğini ve izolatların daha sonraki işlemler açısından seçimi noktasında üretim miktarlarının son derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda *eps* genlerinin tespit edildiği izolatlar olan *Lactobacillus plantarum* DP1, *Lactobacillus paracasei* DP3, *Lactobacillus crustorum* DP11, *Lactobacillus brevis* DP40, *Lactobacillus plantarum* TP44, *Weissella paramesenteroides* TP49 ve *Lactococcus garvieae* TP110 %3 laktoz içeren MRS ortamında 37°C’de aerobik şartlarda geliştirilmiş ve bu türlerden EPS izolasyonu gerçekleştirilerek EPS üretim miktarları belirlenmiştir. *Lactobacillus brevis* DP6 nın da EPS ürettiği düşünüldüğü için bu türden de EPS izole edilmiştir. Çizelge 4.6 tulum peyniri izolatlarının aerobik şartlarda EPS üretim seviyelerini göstermektedir. Tulum peyniri izolatlarının EPS üretim miktarları birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur.

Ortamın bileşimi, fizikokimyasal ve kinetik parametreler içeren birkaç koşul LAB tarafından üretilen EPS miktarını etkileyebilir (Boels vd, 2003; Dupont vd, 2000). Örneğin, EPS biyosentezi için *L. rhamnosus* suşları benzer genetik organizasyona sahip olmasına rağmen, dört *L. rhamnosus* suşunda EPS üretiminin son verimi 61-1611 ml/l arasında önemli bir değişkenlik göstermektedir (Peant vd, 2005). Fermentasyon süresi, sıcaklık ve karbon kaynağına bağlı olarak farklı EPS üretim seviyeleri gösteren iki *L. rhamnosus* suşunun birincil EPS yapısında bir değişme olmadığı rapor edilmiştir (Van Calsteren vd, 2002). Tersine, sadece verim değil, aynı zamanda *L. casei* CG11 tarafından üretilen EPS’nin kompozisyonu kültür ortamında sunulan karbon kaynağına bağlı olarak değişmiştir (Cerning vd, 1994). Besiyeri, üreme şartları (sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon-nitrojen oranı, pH, mineral tuzlar, vitaminler) (Broadbent vd, 2003; De Vuyst ve Degeest, 1999), bazal hücre metabolizmada şeker nükleotidlerin kullanılabilir olması (Boels vd, 2001; Levander vd, 2002; Looijesteijn vd, 1999), şeker yıkım yolunda gen ifade düzeyi (Levander vd, 2002; Svensson vd, 2005) ve EPS üretimi için gerekli genlerin transkripsiyonel düzeyinin yanı sıra bakteriler tarafından kullanılan karbon kaynağı (Audy vd, 2010) gibi iç ve dış faktörler üretim düzeyini etkileyebilmektedir.

Çizelge 4.6 Aerobik koşullar altında tulum peyniri izolatlarının 37°C’de EPS üretim seviyeleri. EPS %3 laktozlu besiyerinde 1 gece ilgili sıcaklıkta geliştirilen izolatlardan izole edilmiştir. Sonuçlar 3 tekerrürlü 3 bağımsız ölçümün ortalamasıdır. Bu şartlarda geliştirilen bakterilerin total hücre sayısı genel itibariyle 10^7 kob olarak bulunmuş ve sonuçlar $\mu\text{g}/10^7$ kob şeklinde ifade edilmiştir.

Örnek Kodu	EPS Üretim Miktarı ($\mu\text{g}/10^7$ kob)
DP1	1766,154±75,21284
DP3	1858,462±20,82001
DP6	1694,615±44,45138
DP11	1805±34,52
DP40	1740±133,9571
TP44	1713,846±73,03713
TP49	1823,462±38,21
TP110	1763,077±123,0785

4.9 Tulum Peyniri İzotları Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Yapısal Karakterizasyonu

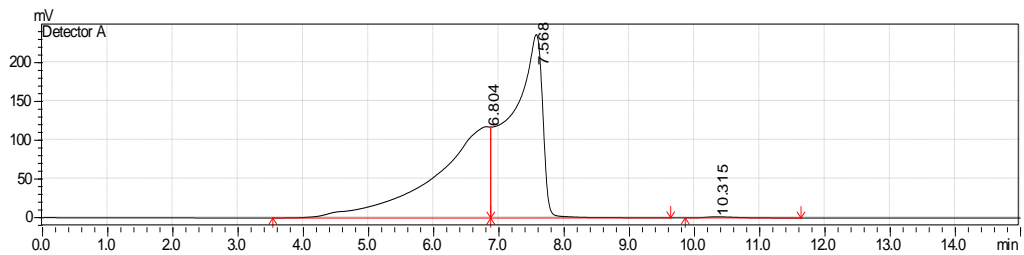
Tulum peyniri izolatlarından *Lactobacillus plantarum* DP1/TP44, *Lactobacillus paracasei* DP3, *Lactobacillus brevis* DP6/DP40, *Lactobacillus crustorum* DP11, *Weissella paramesenteroides* TP49 ve *Lactococcus garvieae* TP110 hem %3 laktoz içeren MRS besiyerinde hem de pastörize sütte geliştirilmiştir. %3 laktoz içeren MRS besiyerinde bütün türlerden EPS başarılı bir şekilde izole edilirken, pastörize sütte sadece DP1, DP3, TP44 VE TP49 türlerinden EPS izole edilebilmiştir. İzolatların ürettiği EPS’in içerebileceği şeker gruplarının tespiti amacıyla HPLC işlemi uygulanmıştır. HPLC analizi neticesinde hem %3 laktozlu MRS ortamında hem de pastörize süt ortamında türlerin ürettiği EPS’in içerebileceği şeker gruplarına ait kromotogramda sadece glukoz tespit edilmiştir (Şekil 4.14 - 4.25). HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 7,429-7,570 dk olarak bulunmuştur. Şekil 4.13 ilgili türlerin süt ortamında gelişimini takiben üretilen EPS’in ekstraksiyon işlemi sonrasındaki görüntüsünü ortaya koymaktadır.



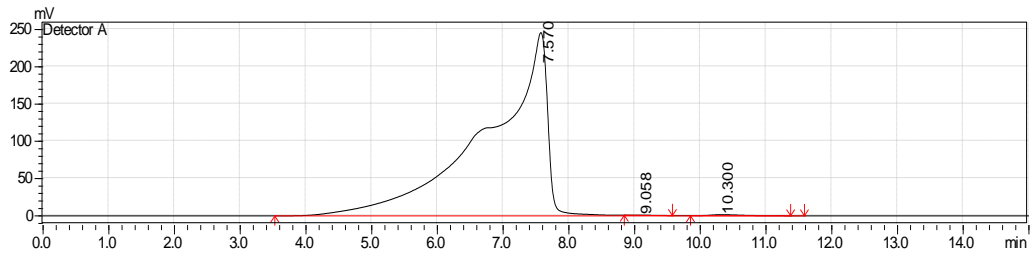
Şekil 4.13 Pastörize süt içerisinde geliştirilen türlerin ürettiği EPS'e ait görüntü.

Şekil 4.14-4.25 sırasıyla hem süt hem de %3 laktozlu MRS ortamında *Lactobacillus plantarum* DP1, *Lactobacillus paracasei* DP3, *Lactobacillus brevis* DP6, *Lactobacillus crustorum* DP11, *Lactobacillus brevis* DP40, *Lactobacillus plantarum* TP44, *Weissella paramesenteroides* TP49, *Lactococcus garvieae* TP110 izolatların ürettiği EPS'in içerebileceği şeker gruplarına ait HPLC kromatogramlarını göstermektedir. Kromatogramlardan da görüleceği üzere bütün türlerde tespit edilen tek şeker ünitesi glukoz olarak bulunmuştur.

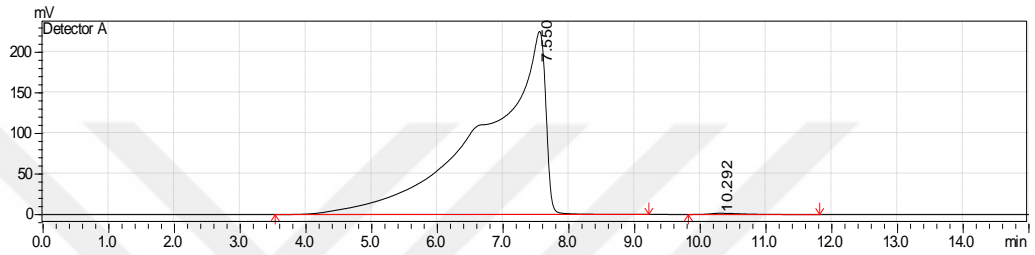
Elde ettiğimiz bu sonuçlar test ettiğimiz ortamlarda bütün türlerin glukozdan oluşan homopolimerik EPS üretme kabiliyetinde olduklarını göstermiştir. LAB türleri tarafından üretilen EPS'in kimyasal yapısı genel olarak stabil olabilsede ortamdaki C kaynağına bağlı olarak değişebilmektedir (Cerning vd., 1994).



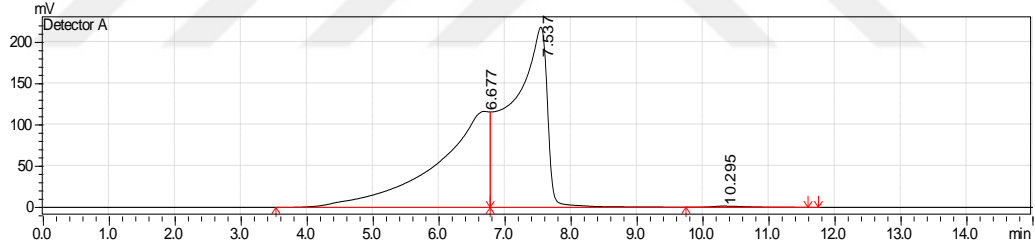
Şekil 4.14 *Lactobacillus plantarum* DP1 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,568 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



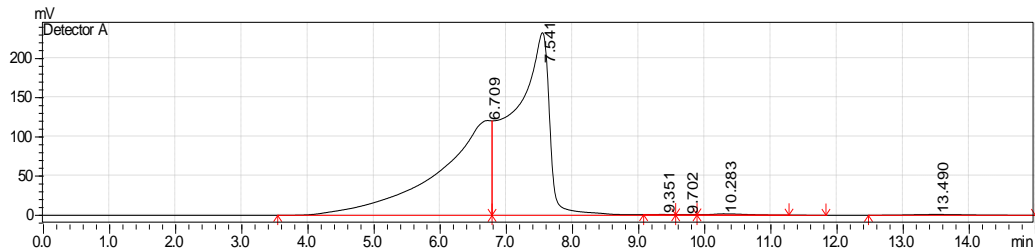
Şekil 4.15 *Lactobacillus paracasei* DP3 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,570 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



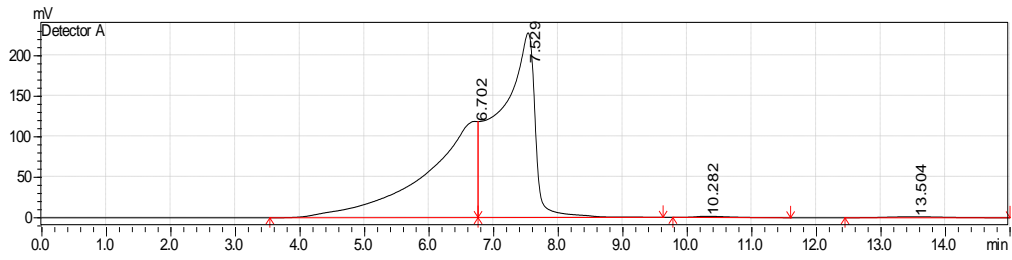
Şekil 4.16 *Lactobacillus plantarum* TP44 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,550 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



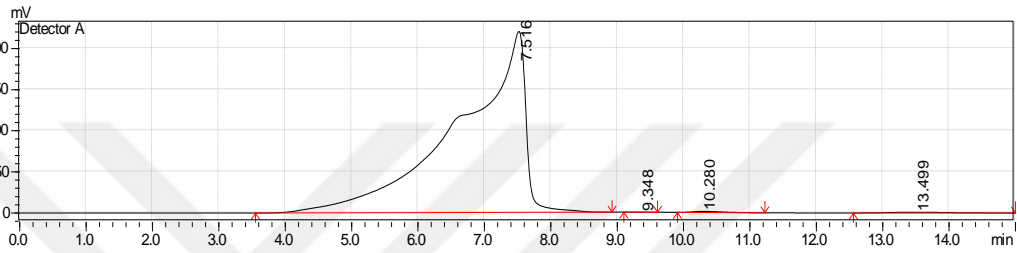
Şekil 4.17 *Weissella paramesenteroides* TP49 tarafından pastörize süt ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,537 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



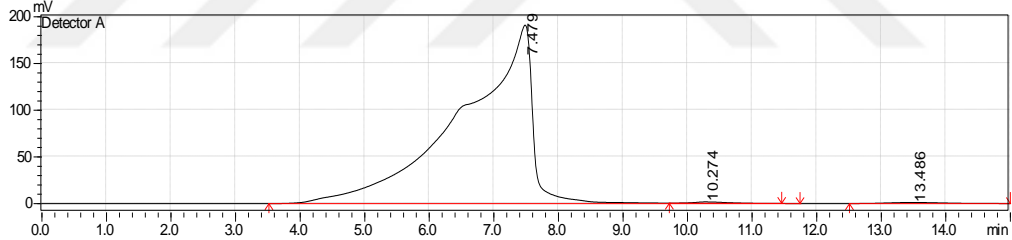
Şekil 4.18 *Lactobacillus plantarum* DP1 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,541 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



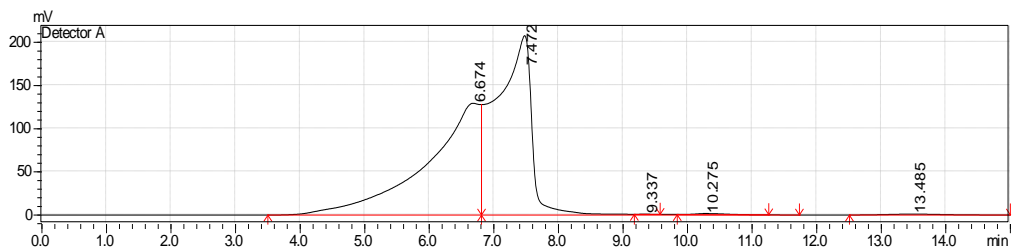
Şekil 4.19 *Lactobacillus paracasei* DPL3 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,529 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



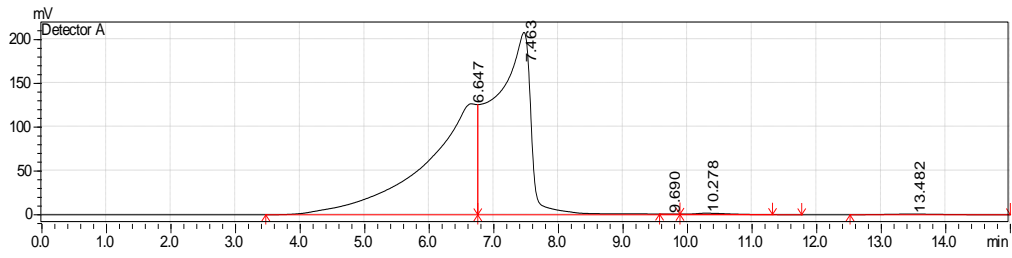
Şekil 4.20 *Lactobacillus brevis* DPL6 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,516 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



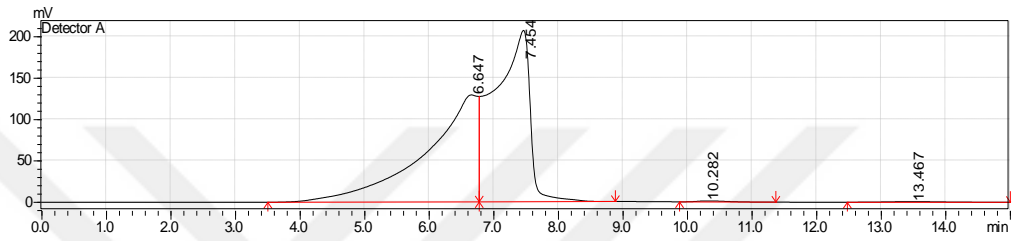
Şekil 4.21 *Lactobacillus crustorum* DPL11 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,479 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



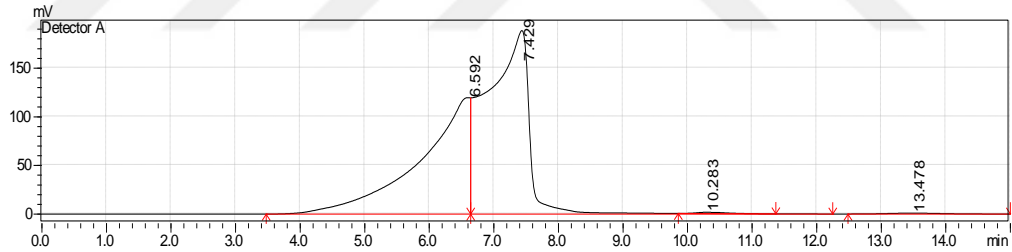
Şekil 4.22 *Lactobacillus brevis* DP40 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,472 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



Şekil 4.23 *Lactobacillus plantarum* TPL44 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,463 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



Şekil 4.24 *Weissella paramesenteroides* TPL49 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,454 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.



Şekil 4.25 *Lactococcus garvieae* TPL110 tarafından %3 Laktozlu MRS ortamında üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 7,429 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir.

LAB türlerinde sadece glukoz birimlerinden oluşan glukoz üretilmesi oldukça yaygın bir işlem olup şimdiye kadar farklı *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus brevis* suşlarının glukoz formunda EPS ürettiği gösterilmiştir (Di Cagno vd, 2006; Bounaix vd, 2009). Süt ürünleri ve insan kaynaklı olabilen *Lactobacillus paracasei* suşlarında da henüz glukoz formunda olmasada EPS üretilmesi gösterilmiştir (Robijn vd, 1996b). Bunun yanı sıra *Lactobacillus crustorum*'un özellikle ekşi hamur bazlı olması glukoz tipinde EPS üretilmesinin olabileceğinin en önemli göstergelerindendir ancak bu konuda literatürde herhangi bir veriye ulaşılamamıştır (Scheirlinck vd, 2007). Son olarak genel itibariyle bir balık patojeni

olması münasebetiyle dikkat çeken *Lactococcus garvieae*'de ise EPS üretiminden sorumlu genler ortaya konarken üretebileceği EPS üzerinde henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır (Suzuki vd, 2013). Bu sonuçlar bu türlerin ürettikleri EPS'in ortaya konması açısından oldukça önemlidir.



5. SONUÇ

Bu tez çerçevesinde Erzincan ili ve köylerinden toplanan tulum peyniri örneklerinden LAB türleri izole edilmiş, genotipik olarak farklı tür ve suşları ayırt edilmiş, seçilen izolatlar tanımlanmış, tanımlanan LAB türlerinde homopolimerik ve heteropolimerik *eps* genleri tespit edilmiş takiben tulum peyniri izolatlarından EPS izole edilerek EPS üretim miktarları tespit edilmiş ve EPS kimyasal yapısı açısından tulum peyniri izolatları incelenmiştir. Bu tez çerçevesinde elde edilen önemli sonuçlar ve bu sonuçların ortaya koyabileceği hususlar ve gelecek beklentileri şu şekilde sıralanabilir:

Geleneksel olarak üretilen tulum peyniri örneklerinden 50 *Lactobacillus plantarum*, 6 *Lactobacillus paracasei*, 4 *Lactobacillus brevis*, 4 *Weissella paramesenteroides*, 21 *Lactococcus lactis subsp. lactis*, 10 *Lactococcus garvieae*, 1 *Streptococcus thermophilus*, 5 *Lactobacillus crustorum* olmak üzere toplam 101 adet LAB suşu izole edilip tanımlanmıştır.

Ayrıca LAB suşlarına ilave olarak tulum peynirlerinden 2 *Enterococcus mundtii*, 69 *Enterococcus faecium*, 4 *Enterococcus hirae*, 5 *Enterobacter cloacae*, 6 *Enterococcus thailandicus*, 22 *Enterococcus faecalis*, 9 *Enterococcus italicus*, 16 *Shigella flexneri*, 14 *Shigella sonnei*, 4 *Burkholderia gladioli*, 3 *Raoultella ornithinolytica*, 2 *Staphylococcus saprophyticus*, 2 *Streptococcus porcorum*, 2 *Macroccoccus caseolyticus*, 11 *Pluralibacter gergoviae* olmak üzere toplam 171 adet NSLAB olabilecek ve aynı zamanda belirli türlerin patojen olabileceği suşlar izole edilip tanımlanmıştır. Geleneksel peynirlerimizde starter potansiyeli olan *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşlarının varlığı ülkemiz gıda endüstrisi açısından son derece önemlidir. Özellikle bu tez çerçevesinde EPS üretimi gerçekleştirebilen suşların tanımlanmış olması bu suşların starter olma potansiyelleri ile direkt olarak ilgili olabilir. Peynir üretimi için starter kültürler halen büyük oranda yurtdışı kaynaklıdır. Dolayısıyla EPS üretimini gerçekleştirebilen *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella paramesenteroides* ile peynir üretimi ve üretilen peynirlerin EPS⁺ ve EPS⁻ starter kültürler ile yapılacak peynirler ile karşılaştırılması gelecek dönemde gerçekleştirmeyi planladığımız işlemlerdir. Özellikle EPS üreten bu türlerin peynirin tekstürü üzerine

etkileri belirlenmeye çalışılacaktır. Aynı şekilde bu suşların histamin ve tiramin gibi biyojenik aminleri üretilip üretilmediği genotipik ve fenotipik olarak belirlenecektir.

Starter olarak faaliyet gösterebilecek türlere ek olarak peynir üretiminde ilave kültür şeklinde kullanılacak *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus thailandicus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus italicus* suşları projemiz çerçevesinde izole edilmiştir. Bu kapsamda bu suşların peynir üretiminde özellikle peynirin tat ve aroması üzerine etkisi ilerleyen dönemlerde belirlenmeye çalışılacaktır. Benzer olarak bu türlerin bakteriyosin üreticisi türler olup antibakteriyel ve ilave olarak antifungal aktiviteleri bu türler ile alakalı test edilecek parametreler arasındadır.

Bu tez çerçevesinde izole edilip tanımlanan *Lactobacillus plantarum* DP1/TP44, *Lactobacillus paracasei* DP3, *Lactobacillus brevis* DP6/DP40, *Lactobacillus crustorum* DP11, *Weissella paramesenteroides* TP49, *Lactococcus garvieae* TP110'da *eps* genleri tespit edilmiş ve ürettikleri EPS'in kimyasal yapısı HPLC ile analiz edilmiştir. Ayrıca bu türlerin EPS üretim seviyeleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Bununla birlikte genetik ve çevresel faktörlerde yapılacak değişiklikler ile bu türlerin daha fazla EPS üretmesi sağlanabilir. Bu türlerin farklı koşullarda ürettikleri EPS miktarları ile alakalı çalışmalar ilerleyen dönemlerde gerçekleştirilebilir.

Geleneksel peynirlerimizden olan tulum peyniri örneklerinden EPS üreticisi starter ve ilave kültür olarak kullanılacak LAB türlerine ilaveten; Şigelloz hastalığına neden olan dört *Shigella* suşundan ikisi olan *Shigella flexneri* ve *Shigella sonnei*, pastörizasyonun gerekli şekilde gerçekleştirilmediği şartlarda süt ve ürünlerinden izole edilebilen *Burkholderia gladioli*, dekarboksilaz enzimini oluşturarak aminoasitlerin dekarboksilasyonunda rol alan *Raoultella ornithinolytica*, Novobiocin'e dirençli bir mikroorganizma olan, dışkı ve üretrada normal flora elemanı olarak bulunan, fırsatçı patojen olarak idrar yolları ve prostat enfeksiyonlarının izole edilen *Staphylococcus saprophyticus*, evcil ve yabani domuzlardan izole edilen *Streptococcus porcorum*, çiğ sütte hakim olan *Macroccoccus caseolyticus*, *Pluralibacter gergoviae* tulum peyniri örneklerinden izole edilmiştir. Bu türlerin izolasyonu üreticilerin eğitimi noktasında daha fazla çabanın sarf edilmesi gerekliliğini ve üreticilere peynir üretiminde hijyen

kurallarına uymaları ile alakalı olarak daha fazla bilinç kazandırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak bu proje ile tulum peyniri kaynaklı orijinal LAB türleri tanımlanmış ve EPS üretimi yönünden bu türler araştırılmıştır. Geleneksel tulum peyniri örneklerinden hem starter hem de ilave kültür olabilecek EPS üreticisi LAB türlerinin izolasyonu ticari açıdan da önemli olup ülkemizde son dönemde gerçekleştirilmeye çalışılan starter kültür geliştirme çalışmalarına da katkı sunacaktır.



KAYNAKLAR

- Akyüz, N. (1981). *Erzincan (Şavak) Tulum Peynirinin Yapılışı ve Bileşimi*. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 12 (1), 85-112.
- Almiron-Roig, E., Mulholland, F., Gasson, M. J. and Griffin, A. M. (2000). *The complete Cps gene cluster from Streptococcus thermophilus NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide*. **Microbiology**, 146 (Pt 11), 2793-2802.
- Al-Zoreky, N. and Sandine, W. E., (1991). *Lactococcus genus: a selective and differential agar medium*. **J. Food Sci.**, 56 (6), 1729-1734.
- Anonim, (2006). TSE 3001 *Tulum Peyniri Standardı*. **Türk Standartları Enstitüsü**, Necati Bey Cad. No:112, Bakanlıklar, Ankara.
- Arıcı, M. ve Şimşek, O. (1991). *Kültür Kullanımının Tulum Peynirinin Duyusal, Fizikselkimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerine Etkisi*. **Gıda**, 16 (1), 53-62.
- Arslaner, A. (2008). *Geleneksel Yöntem ve Farklı Sütlerden Isıl İşlem Uygulanarak Üretilen ve Farklı Ambalaj Materyallerinde Olgunlaştırılan Erzincan Tulum Peynirinde Bazı Kalite Niteliklerinin Tespiti*. **Doktora Tezi**, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z., Beyatlı, Y. and Mercan, N. (2005). *Exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus strains under different growth conditions*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21(5), 673-677.
- Ateş, G. ve Patır, B. (2001). *Starter Kültürlü Tulum Peynirinin Olgunlaşması Sırasında Duyusal Kimyasal ve Mikrobiyolojik Niteliklerinde Meydana Gelen Değişimler Üzerine Araştırmalar*. **FÜ Sağ Bil Derg**, 15, (1), 45-46.
- Audy, J., Labrie, S., Roy, D., and Lapointe, G. (2010). *Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in Bifidobacterium longum subsp. longum CRC 002*. **Microbiology**, 156(Pt 3), 653-664.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. (2011). *New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides*. **Biotechnol Adv**, 29(1), 54-66.
- Baker, G. C., Smith, J. J., and Cowan, D. A. (2003). *Review and Re-analysis of Domain-Specific 16S Primers*. **Journal of Microbiological methods** 55.3: 541-555.
- Bender, M. H., and Yother, J. (2001). *CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in Streptococcus pneumoniae*. **J Biol Chem**, 276(51), 47966-47974.

- Bender, M. H., Cartee, R. T., and Yother, J. (2003). *Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol**, 185(20), 6057-6066.
- Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., Donohone, K., Harris, D., Murphy, L., Quail, M. A., Samuel, G., Skovsted, I. C., Kalltoft, M. S., Barel, B., Reeves, P. R., Parkhill, J. and Spratt, B. G. (2006). *Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 Pneumococcal serotypes*. **PLoS Genet**, 2(3), e31.
- Boels, I. C., Ramos, A., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (2001). *Functional analysis of the Lactococcus lactis galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis*. **Appl Environ Microbiol**, 67(7), 3033-3040.
- Boels, I. C., Van Kranenburg, R., Kanning, M. W., Chong, B. F., De Vos, W. M. and Kleerebezem, M. (2003). *Increased exopolysaccharide production in Lactococcus lactis due to increased levels of expression of the NIZO B40 Eps gene cluster*. **Appl Environ Microbiol**, 69(8), 5029-5031.
- Bostan, K. (1991). *Değişik Ambalajlar İçinde Bulunan Tulum Peynirlerinin Duyusal, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri*. **Her Yönüyle Peynir**, Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi, 125 s, Tekirdağ.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeon, M., Gabriel B. and Fontagne-Faucher, C. (2009). *Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough Lactic Acid Bacteria*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 57(22), 10889-10897.
- Broadbent, J. R., D. J. McMahon, C. J. Oberg, and D.L. Welker. (2001). *Use of exopolysaccharide producing cultures to improve the functionality of low fat cheese*. **Int. Dairy J.** 11:422-439.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., and Moineau, S. (2003). *Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in Streptococcus thermophilus: A Review*. **J Dairy Sci**, 86(2), 407-423.
- Cerning, J., Bouillanne C., Desmazeaud, M. J., and Landon M.. (1986). *Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by Lactobacillus bulgaricus*. **Biotechnol. Lett.**8:625-628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., and Landon, M. (1988). *Exocellular polysaccharide production by Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Letters**, 10(4), 255-260.

- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. (1992). *Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic Lactic Acid Bacteria*. **J Dairy Sci**, 75(3), 692-699.
- Cerning, J., Renard, C. M., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., and Topisirovic, L. (1994). *Carbon source requirements for exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer*. **Appl Environ Microbiol**, 60(11), 3914-3919.
- Ceylan, Z.G. (1998). *Erzincan Tulum Peynirinin Baharatlı Çeşitlerinin Yapılabilirliği Üzerine Araştırmalar*. **Doktora Tezi**, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Christiansen, P. S., Madeira, A. I. M. R., and Edelsten, D. (1999). *The use of ropy milk as stabilizer in the manufacture of ice cream*. **Milchwissenschaft**, 54, 138–140.
- Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., Wang, Y. ve Wessels, M. R. (2001). *Functional analysis in type Ia group B Streptococcus of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of Streptococci*. **J Biol Chem**, 276(1), 139-146.
- Cogan, T. M. and Daly, C. (1987). *Cheese starter cultures, in: cheese: chemistry, physics and microbiology*. **Elsevier App. Sci.**, Vol: 1, Ed. By F. Fox., Publ., London and New York.
- Cote, G. L., Skory, C. D., Unser, S. M., and Rich, J. O. (2012). *The Production of glucans via glucansucrases from Lactobacillus satsumensis isolated from a fermented beverage starter culture*. **Applied Microbiology and Biotechnology**.
- Cozzone, A. J., Grangeasse, C., Doublet, P. and Duclos, B. (2004). *Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria*. **Arch Microbiol**, 181(3), 171-181.
- Çağlar, A. (2001). *Çiğ Sütten Üretilen ve Farklı Ambalajlama Materyallerinde Olgunlaştırılan Erzincan Tulum Peynirlerinin Mikrobiyolojik Özelliklerindeki Değişmeler*. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 32 (3), 285-292.
- Çakır, O. (2011). *Erzincan Tulum Peynirinin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tespiti ile Bu Örneklerde Koagulaz (+) S. aureus ve E. coli O157:H7'nin Aranması*. **Yüksek Lisans Tezi**, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 52.

- Çakır, Y. (2012). *Çörekotu (Nigella Sativa L.) İlavesinin Erzincan Tulum Peynirinin Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 101.
- Çakmakçı, S., Dagdemir E., Hayaloglu A.A., Gurses M. and Gundogdu E. (2008). *influence of ripening container on the Lactic Acid Bacteria population in Tulum cheese. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 293-299.
- Çakmakçı, S., Hayaloglu, A. A. ve Kolçak, M. (2009). *Her Yönüyle "Erzincan Tulum Peyniri". II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, s: 750-753, 27-29 Mayıs 2009, Van.
- Çakmakçı, S. (2010). *Erzincan Tulum Peyniri (Şavak Peyniri)*. (s: 71-73). 1. **Uluslararası "Adriyatikten Kafkaslar'a Geleneksel Gıdalar Sempozyumu**, 15-17 Nisan 2010, Tekirdağ.
- Çakmakçı, S. (2011). *Türkiye Peynirleri* (19. Bölüm: 585-614). In: *Peynir Biliminin Temelleri*. (Editörler: A.A. Hayaloglu ve B. Özer), ISBN: 978-605-87976-1-1, **SİDAS Medya Ltd. Şti.**, İzmir, 643 s.
- Çakmakçı, S. ve Çakır, Y. (2012). *Erzincan Tulum (Şavak) Peyniri ve Benzeri Peynirlerimiz*. **3. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu** (10-12 Mayıs 2012) 218 s, Konya.
- Çetin, B., Gürses, M. ve Sengül, M. (2006). *Nispi Nem Değişikliğinin Tulum Peynirinin Bazı Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi* (24-26 Mayıs), Bolu.
- Dabour, N. and LaPointe, G. (2005). *Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from Lactococcus lactis subsp. cremoris SMQ-461. Appl Environ Microbiol*, 71(11), 7414-7425.
- De Vos, W. M. and Vaughan, E. E. (1994). *Genetics of lactose utilization in Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol Rev*, 15(2-3), 217-237.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. ve 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. and Degeest, B. (1999). *Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol Rev*, 23(2), 153-177.

- De Vuyst, L., De Vin F., Vaningelgem F. and Degeest, B. (2001). *Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*. **International Dairy Journal**, 11:678-707.
- Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L. (2001). *Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields*. **J Appl Microbiol**, 91(3), 470-477.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P. (1999). *The biosynthesis and functionality of the cell-wall of Lactic Acid Bacteria*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 76(1-4), 159-184.
- Denou, E., Pridmore, R. D., Berger, B., Panoff, J. M., Arigoni, F. and Brussow, H. (2008). *Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis*. **J Bacteriol**, 190(9), 3161-3168.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. and 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.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle M, Ciati R. and Gobbetti, M. (2006). *Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(26), 9873-9881.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. and Schorr-Galindo, S. (2012). *Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction*. **Carbohydrate polymers**, 87,(2),951-962.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001). *Applications of exopolysaccharides in the dairy industry*. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. **Analytical Chemistry**, 28 (3). 350-356.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., and Gil-Serrano, A. M. (1998). *Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77*. **Carbohydrate Research**, 307(1-2), 125-133.
- Dupont, I., Roy, D. and Lapointe, G. (2000). *Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei**

grown in chemically defined medium and milk. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 24(4), 251-255.

Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D. and Van Sinderen, D. (2012). *Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109(6), 2108-2113.

Fenelon, M. A., Ryan, M. P., Rea, M. C., Guinee, T. P., Ross, R. P. and Hill, C. (1999). *Elevated temperature ripening of reduced fat cheddar made with or without lactacin 3147-producing starter culture*. **Journal of Dairy Science**, 82, 10–22.

Fox, P.F., Lucey, J.A. and Cogan, T. M. (1990). *Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 29, 237-253.

Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K. and Ganzle, M. G. (2011). *Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by Lactic Acid Bacteria in wheat and sorghum sourdough*. **Food Microbiol**, 28(3), 547-553.

Garcia, E., Llull, D., Munoz, R., Mollerach, M. and Lopez, R. (2000). *Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of Streptococcus pneumoniae*. **Res Microbiol**, 151(6), 429-435.

Gauri, S. S., Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S. and Pati, B. R. (2009). *Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated Azotobacter Sp. SSB81*. **Bioresour Technol**, 100(18), 4240-4243.

Germond, J. E., Delley, M., D'Amico, N. and Vincent, S. J. (2001). *Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharide from Streptococcus thermophilus Sfi39*. **Eur J Biochem**, 268(19), 5149-5156.

Gilliland, S. E. (1988). *Bacteria Starter Cultures for Foods*. **CRC Press, Inc, Boca Roton**, 216.

Gorska, S., Jachymek, W., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. B. and Gamian, A. (2010). *Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by Lactobacillus johnsonii 142*. **Carbohydr Res**, 345(1), 108-114.

Gorska-Fraczek, S., Sandstrom, C., Kenne, L., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. and Gamian, A. (2011). *Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from Lactobacillus rhamnosus KL37B*. **Carbohydr Res**, 346(18), 2926-2932.

- Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J., and de Bont, J. A. M. (1996). *Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 46(3), 279-284.
- Gürses, M. and Erdogan A. (2006). *Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from Cheese during ripening period*. **International Journal of Food Properties**, 9, 551- 557.
- Hammes, W. P. and Tichaczek P. S. (1994). *The potential of Lactic Acid Bacteria for the production of safe and wholesome food*. **Z Lebensm Unters Forsch**, 198, 193-201.
- Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. **Academic Press**, San Diego, USA. 532 s.
- Hayaloğlu, A. A. (2008). *Türkiye'nin Peynirleri-Genel Bir Perspektif*. **Türkiye 10. Gıda Kongresi**, Erzurum, 729-732.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., los Reyes-Gavilán, C., Suárez, A., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P. (2012). *Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and Bifidobacteria*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 4(4), 227-237.
- IDF (International Dairy Federation), (1993). *Standard Method 20B: Milk. Determination of Nitrogen content*. IDF, Brussels, Belgium.
- Jolly, L. and Stingle, F. (2001). *Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria*. **International Dairy Journal**, 11(9), 733-745.
- Jolly, L., Newell, J., Porcelli, I., Vincent, S. J. and Stingle, F. (2002). *Lactobacillus helveticus glycosyltransferases: from genes to carbohydrate synthesis*. **Glycobiology**, 12(5), 319-327.
- Kamaly, K. M. and Marth E. H., (1989). *Enzyme activities of Lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review*. **J. Dairy Sci.**, 72, 1945-1966.
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. and Arul, V. (2011). *Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium Streptococcus phocae PI80 and its functional characteristics activity in vitro*. **Bioresour Technol**, 102(7), 4827-4833.
- Karacabey, A. and Uraz, D. (1974). *Türkiye'de Yapılan Muhtelif Tip Peynirler ve Özellikleri*. **Ankara Çayır-Mera ve Zootekni Araştırma Enstitüsü Yayınları**. 44.

- Karaibrahimoğlu, Y. ve Üçüncü, M. (1988). *Erzincan Tulum Peynirinin İşlem ve Ürün Parametrelerinin Belirlenmesi*. **Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi**, 6 (2), 79-97.
- Kınık, Ö., Ergüllü, E. ve Akbulut, N. (1999). *Sepet Peyniri Üretimi ve Kimi Özellikleri Üzerine Bir Araştırma*. **Gıda**, 24 (3), 151-161.
- Kleerebezem, M., Van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J. and de Vos, W. M. (1999). *Exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis: from genetic engineering to improved rheological properties?* **Antonie Van Leeuwenhoek**, 76(1-4), 357-365.
- Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J. and Topisirovic, L. (1992). *Analysis of exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11, isolated from cheese*. **Appl Environ Microbiol**, 58(12), 4086-4088.
- Korakli, M. and 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.
- Kosikowski, F. (1978). *Cheese and fermented milk foods*. **Michigan Edwards, Brotheds, Inc.**, 711.
- Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Leer, R. J., Faber, E. J., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L. (2002). *Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from Lactobacillus reuteri strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1->4) and alpha-(1->6) glucosidic bonds*. **Appl Environ Microbiol**, 68(9), 4283-4291.
- Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Dondorff, M. M., Kirsanovs, S., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L. (2004a). *Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains*. **Microbiology**, 150(Pt 11), 3681-3690.
- Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L. (2004b). *Biochemical and molecular characterization of Lactobacillus reuteri 121 reuteransucrase*. **Microbiology**, 150(Pt 7), 2099-2112.
- Kumar, A. S., Mody, K., and Jha, B. (2007). *Bacterial Exopolysaccharides--a perception*. **J Basic Microbiol**, 47(2), 103-117.
- Kurt, A., Çağlar, A., Çakmakçı, S. ve Akyüz, N. (1991a). *Erzincan Tulum (Şavak) Peynirinin Mikrobiyolojik Özellikleri*. **Doğa Tr. J. of Veterinary and Animal Science**, 16, 41-50.

- Kurt, A., Çakmakçı, S., Çağlar, A. ve Akyüz, N. (1991b). *Erzincan Tulum (Şavak) Peynirinin Yapılışı, Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma*. **Gıda Dergisi**, 16(5).
- Kurt, A., Çakmakçı S. ve Çağlar A. (1996). *Süt ve Mamülleri Muayene Analiz Metotları Rehberi*. **Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 257**, 398 s, Erzurum.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2008). *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. **Annu Rev Biochem**, 77, 521-555.
- Lamothe, G. T., Jolly, L., Mollet, B., and Stingele, F. (2002). *Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus**. **Arch Microbiol**, 178(3), 218-228.
- Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V. (2001). *Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria*. **Biotechnol Adv**, 19(8), 597-625.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2008). *Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action*. **Microbiol Mol Biol Rev**, 72(4), 728-764, Table of Contents.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrechts, I., Dufrene, Y., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. (2009). *Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase*. **Appl Environ Microbiol**, 75(11), 3554-3563.
- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Favre, N., and Neeser, J. R. (1997). *Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12*. **Appl Environ Microbiol**, 63(9), 3512-3518.
- Levander, F., Svensson, M., and Radstrom, P. (2002). *Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus**. **Appl Environ Microbiol**, 68(2), 784-790.
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., and Xiao, M. (2010). *Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1*. **Bioresour Technol**, 101(14), 5528-5533.
- Looijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (1999). *Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source*. **Appl Environ Microbiol**, 65(11), 5003-5008.

- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J. and Broadbent, J. R. (1998). *Role of Streptococcus thermophilus MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(6), 2147-2151.
- María Laura Werning, S. N., Montserrat Nacher, Pilar Fernández de Palencia, Rosa Aznar and Paloma López (2012). *Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **Food Additive**,
- Merck, (2005). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ed: Prof. Dr. A. Kadir Halkman, 368 s., Ankara.
- Metin, M. (2010). *Süt ve mamülleri analiz yöntemleri*. **Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Yayınları** No: 24. 5.Baskı.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D., and Renault, P. (2007). *Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in Streptococcus thermophilus, by EpsD tyrosine kinase*. **J Bacteriol**, 189(4), 1351-1357.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., and Remaud-Siméon, M. (2001). *Homopolysaccharides from lactic acid bacteria*. **International Dairy Journal**, 11(9), 675-685.
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., and Morona, R. (2000). *Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, 35(6), 1431-1442.
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., and Paton, J. C. (2002). *Streptococcus pneumoniae capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase*. **J Bacteriol**, 184(2), 577-583.
- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., and Paton, J. C. (2003). *Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in Streptococcus pneumoniae*. **J Bacteriol**, 185(10), 3009-3019.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M. R., Font de Valdez, G., and De Vuyst, L. (2006). *Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers*. **Appl Environ Microbiol**, 72(6), 4431-4435.
- Nierop Groot, M. N., and Kleerebezem, M. (2007). *Mutational analysis of the Lactococcus lactis NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS*

- biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB.* **J Appl Microbiol**, 103(6), 2645-2656.
- Olson, N. F. (1990). *The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour.* **FEMS Microbiol Reviews**, 87, 131-138.
- Öksüztepe, G. A., Patir, B., and Çalicioğlu, M. (2005). *Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak tulum cheese.* **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 29(3), 873-879.
- Öner, E. T. (2013). *Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass.* In Z. Fang (Ed.), **Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries** (pp. 35-56): Springer Berlin Heidelberg.
- Öner, Z., Simsek, B. and Sağdıç, O. (2003). *Determination of some properties of Turkish Tulum Cheese.* **Milchwissenschaft**, 3 (4), 152-154
- Öner, Z., Sağdıç, O., and Şimşek, B. (2004). *Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses.* **European Food Research and Technology**, 219(5), 455-459.
- Özalp, E. (1988). *Süt Ürünlerinde Kullanılan Starter Kültürler.* **Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.**, 35 (1), 55-61.
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventorino, V. and Pepe, O. (2012). *Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat Sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture.* **Appl Environ Microbiol**, 78(8), 2737-2747.
- Pan, D., and Mei, X. (2010). *Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12.* **Carbohydrate Polymers**, 80(3), 908-914.
- Peant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., and Roy, D. (2005). *Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*.* **Microbiology**, 151(Pt 6), 1839-1851.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., and Cerning, J. (2000). *Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation.* **Appl Environ Microbiol**, 66(6), 2302-2310.
- Pichhardt, K. (2004). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar.* **Literatür Yayınları**, Manisa, 176-178s.

- Provencher, C., LaPointe, G., Sirois, S., Van Calsteren, M. R., and 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*. **Appl Environ Microbiol**, 69(6), 3299-3307.
- Rahn, A., Beis, K., Naismith, J. H., and Whitfield, C. (2003). *A novel outer membrane protein, Wzi, is involved in surface assembly of the Escherichia coli K30 group 1 capsule*. **J Bacteriol**, 185(19), 5882-5890.
- Ramos, A., Boels, I. C., de Vos, W. M., and Santos, H. (2001). *Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in Lactococcus lactis*. **Appl Environ Microbiol**, 67(1), 33-41.
- Remus, D. M., Van Kranenburg, R., Van Swam, I. I., Taverne, N., Bongers, R. S., Wels, M., Wells, J. M., Bron, P. A. and Kleerebezem, M. (2012). *Impact of 4 Lactobacillus plantarum capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling*. **Microb Cell Fact**, 11, 149.
- Robijn, G. W., Gutiérrez Gallego, R., Van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G. (1996a). *Structural characterization of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus acidophilus LMG9433*. **Carbohydrate Research**, 288(0), 203-218.
- Robijn, G. W., Wienk, H. L., Van den Berg, D. J., Haas, H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. (1996b). *Structural studies of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus paracasei 34-1*. **Carbohydrate research**, 285, 129-139.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406-425.
- Savello, P.A., Ernstrom, C.A. and Kalab, M. (1989). *Microstructure and meltability of model process cheese made with rennet and acid casein*. **Journal of Dairy Science**, 72, 1-11.
- Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr., Fevre, M., Geremia, R. A., and Henrissat, B. (1995). *Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action*. **J Bacteriol**, 177(6), 1419-1424.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Schoor, A. V., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L. and Vancanneyt, M. (2007). *Lactobacillus crustorum sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57(7), 1461-1467.

- Schwab, C., and Ganzle, M. G. (2006). *Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in Lactobacillus reuteri*. **Syst Appl Microbiol**, 29(2), 89-99.
- Scolari, G., Vescovo M. and Rossi G. (1996). *Substrate models for studies on peptidolytic activity Lactobacillus casei*. **Int. Dairy Sci**, (6), 921-935.
- Sert, S. (2002). *Genel mikrobiyoloji laboratuvar notları*. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları** No: 138 (Üçüncü Baskı).Erzurum.
- Speck, M. L. (1984). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. **American Public Health Association**, Washington.
- Spreer, E. (1988). *Technologie der Milchverarbeitung*. **VEB Fachbuchverlag**, Leipzig.
- Stingele, F., Neeser, J. R., and Mollet, B. (1996). *Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from Streptococcus thermophilus Sfi6*. **J Bacteriol**, 178(6), 1680-1690.
- Stingele, F., Newell, J. W., and Neeser, J. R. (1999). *Unraveling the function of glycosyltransferases in Streptococcus thermophilus Sfi6*. **J Bacteriol**, 181(20), 6354-6360.
- Sutherland, I. (2001). *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. **Microbiology**, 147(Pt 1), 3-9.
- Suzuki, C., Kobayashi, M., and Kimoto-Nira, H. (2013). *Novel exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis subsp. lactis, and the diversity of epsE genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 77(10), 2013-2018.
- Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., and Radstrom, P. (2005). *Metabolically improved exopolysaccharide production by Streptococcus thermophilus and its influence on the rheological properties of fermented milk*. **Appl Environ Microbiol**, 71(10), 6398-6400.
- Şengül, M. (2001). *Tulum Peynirinden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakteri Suşlarının Starter Kültür Özellikleri ve Peynirlerin Bazı Özelliklerinin Tespiti*. **Doktora Tezi**, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 123.
- Şengül, M., Çakmakçı, S. (2003). *Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from Erzincan (Şavak) Tulum cheese*. **Milchwissenschaft**, 58 (9/10), 510-513.
- Tannock, G. W. (2004). *A special fondness for lactobacilli*. **Appl Environ Microbiol**, 70(6), 3189-3194.

- Tarakçı, Z., Küçüköner E., Sancak H. ve Ekici K. (2005). *İnek sütünden üretilerek cam kavanozlarda olgunlaştırılan Tulum peynirinin bazı özellikleri*. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 16(1), 9-14.
- Tekinşen, C. ve Nizamoğlu, M. (1993). *Selçuklu Tulum Peyniri*. **Türk Veteriner Hekimler Dergisi**, 5, (5), 34.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Ganzle, M. G. and Vogel, R. F. (2003). *In situ production of exopolysaccharides during Sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria*. **Appl Environ Microbiol**, 69(2), 945-952.
- Tieking, M. and Ganzle, M. G. (2005). *Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli*. **Trends in Food Science & Technology**, 16(1-3), 79-84.
- Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R. F. and Ganzle, M. G. (2005). *Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli*. **J Appl Microbiol**, 99(3), 692-702.
- Thomas, L.V. ve Wimpenny J. W. T. (1996). *Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus*. **App Environ Microbiol**, 62: 2006-2012.
- Töral, A. R. (1969). *Elazığ Bölgesi Peynirlerinde Kimyasal Araştırmalar*. **Güven Matbaası**. Ankara.
- Tunail, N. ve Köşker Ö. (1986). *Süt Mikrobiyolojisi*. **Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay. No:966**, Ankara.
- Tzianabos, A. O. (2000). *Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function*. **Clin Microbiol Rev**, 13(4), 523-533.
- Üçüncü, M. (2010). *Süt ve Mamülleri Teknolojisi*. İzmir: **MetaBasım Matbaacılık Hizmetleri**, 202-208.
- Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Begin, A. and Roy, D. (2002). *Structure determination of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus rhamnosus strains RW-9595M and R*. **Biochem J**, 363(Pt 1), 7-17.
- Van Den Berg, D. J. C., Smits A., Pot, B., Ledebor A. M., Kersters K., Verbakel J. M. A. and Verrips T. (1993). *Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections*. **Food Biotechnology**, 7(3), 189-205.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G. F. and De Vuyst, L. (2007). *Screening of lactic acid bacteria*

isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. Int J Food Microbiol, 118(3), 250-258.

- Van Hijum, S. A., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van der Maarel, M. J. and Dijkhuizen, L. (2002). *Characterization of a novel fructosyltransferase from Lactobacillus reuteri that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4390-4398.
- Van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L. and Van Geel-Schutten, I. G. (2006). *Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. Microbiol Mol Biol Rev*, 70(1), 157-176.
- Van Kranenburg, R., Marugg, J. D., Van, S., II, Willem, N. J. and de Vos, W. M. (1997). *Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in Lactococcus lactis. Mol Microbiol*, 24(2), 387-397.
- Van Kranenburg, R., Vos, H. R., Van, S., II, Kleerebezem, M. ve de Vos, W. M. (1999). *Functional analysis of glycosyltransferase genes from Lactococcus lactis and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. J Bacteriol*, 181(20), 6347-6353.
- Van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Gerwig, G. J., Dijkhuizen, L. and Kamerling, J. P. (2008). *Structural analysis of bioengineered alpha-D-glucan produced by a triple mutant of the Glucansucrase GTF180 enzyme from Lactobacillus reuteri strain 180: generation of (alpha1-->4) linkages in a native (1-->3)(1-->6)-alpha-D-glucan. Biomacromolecules*, 9(8), 2251-2258.
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J. and Duclos, B. (1999). *Cells of Escherichia coli contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. J Bacteriol*, 181(11), 3472-3477.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Ganzle, M. G. and Tannock, G. W. (2008). *Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of Lactobacillus reuteri TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. Microbiology*, 154(Pt 1), 72-80.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. (2008). *Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 isolated from Tibet kefir. Int J Biol Macromol*, 43(3), 283-288.
- Wegner, K. (1981). *Milchwirtschaftliche Mikroorganismen in Frage und Antwort. Milchforschung-Milchpraxis*, 5: 118-120.

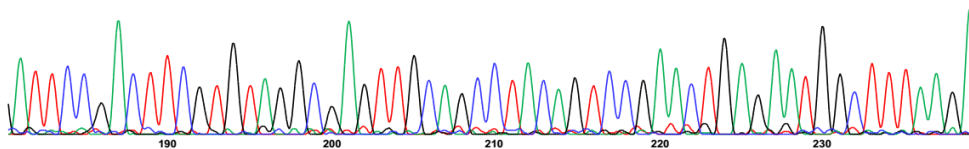
- Welman, A. D. and Maddox, I. S. (2003). *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges*. **Trends in biotechnology**, 21(6), 269-274.
- Yamamoto, Y., Murosaki, S., Yamauchi, R., Kato, K. and Sone, Y. (1994). *Structural study on an exocellular polysaccharide produced by Lactobacillus helveticus TY1-2*. **Carbohydrate Research**, 261(1), 67-78.
- Yasuda, E., Serata, M. and Sako, T. (2008). *Suppressive effect on activation of macrophages by Lactobacillus casei strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides*. **Appl Environ Microbiol**, 74(15), 4746-4755.
- Yother, J. (2011). *Capsules of Streptococcus pneumoniae and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation*. **Annu Rev Microbiol**, 65, 563-581.

EK 2

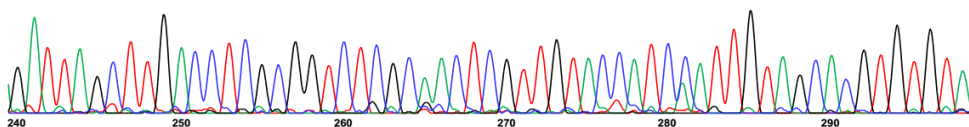
Lactobacillus paracasei DP3'ün 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram

Bioneer DP-3-AMP-R

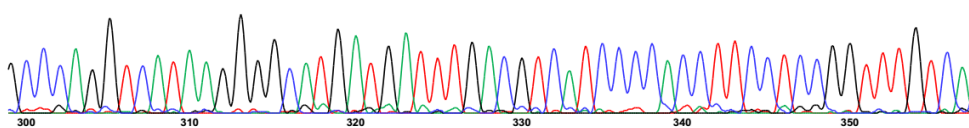
62 62 62 62 51 62 62 62 62 62 62 59 62 51 56 51 54 51 42 62 56 56 56 62 56 56 51 56 62 62 62 56 62 47 62 56 56 56 56 50 56 56 56 51 62 56 47 62 47 47 62 56 62 56 50 62
 A T T C C G A C T T C G T G T A G G C G A G T T G C A G C C T A C A G T C C G A A C T G A G A A T G G C T T T A A G A



56 47 44 56 56 35 51 56 51 62 47 47 62 62 62 56 56 62 62 51 56 56 51 56 42 56 47 56 62 62 56 62 62 51 51 47 51 21 26 27 19 18 24 62 62 56 62 56 62 62 54 62 62 62 56 62 56 56
 G A T T A G C T T G A C C T C G C G G T C T C G C A A C T C G T T G T A C C A T C C A T T G T A G C A C G T G T G T A



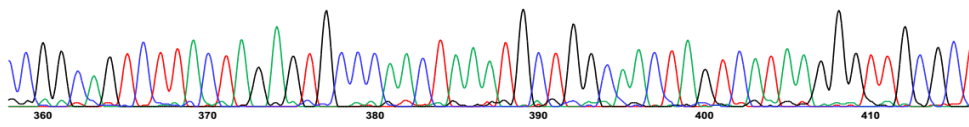
56 56 62 56 62 56 62 56 62 62 62 62 62 62 56 56 56 47 62 54 47 56 54 47 56 62 62 62 62 62 62 62 62 56 54 62 62 62 62 56 56 62 62 62 62 52 54 52
 G C C A G G T C A T A A G G G C A T G A T G A T T T G A C G T C A T C C C A C C T T C C T C G G T T T G T C A



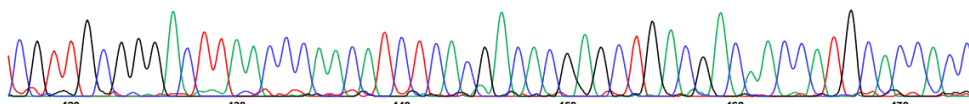
Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 2 of 8

Bioneer DP-3-AMP-R

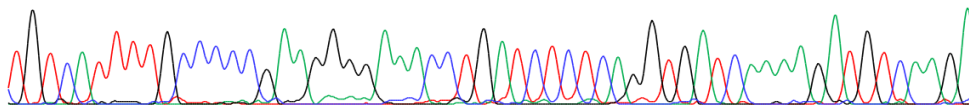
46 52 62 48 52 46 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 62 48 62 62 62 62 62 52 52 54 48 52 47 54 58 58 58 52 52 58 54 54 58 58 54 46 39 54 54 58 54 58 46 48
 C C G G C A G T C T T A C T A G A G T G C C A A C T A A A T G C T G G C A A C T A G T C A T A A G G G T T G C G C T



52 52 47 52 58 54 58 58 54 45 39 54 54 54 53 52 54 54 54 52 54 54 54 58 54 50 50 33 47 52 46 54 54 54 54 54 54 58 54 45 46 52 58 52 27 58 58 54 49 58 58 54 49 45 45 39 51 58
 C G T T G C G G G A C T T A A C C A A C A T C T C A C G A C A C G A G C T G A C G A C A A C A T G C A C C A C C



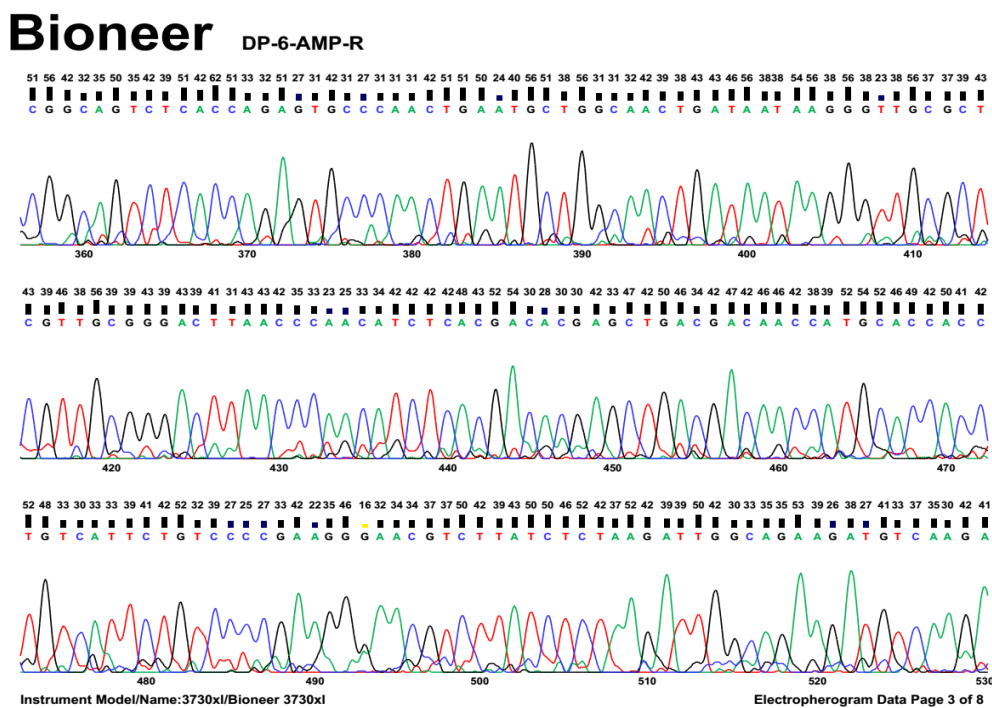
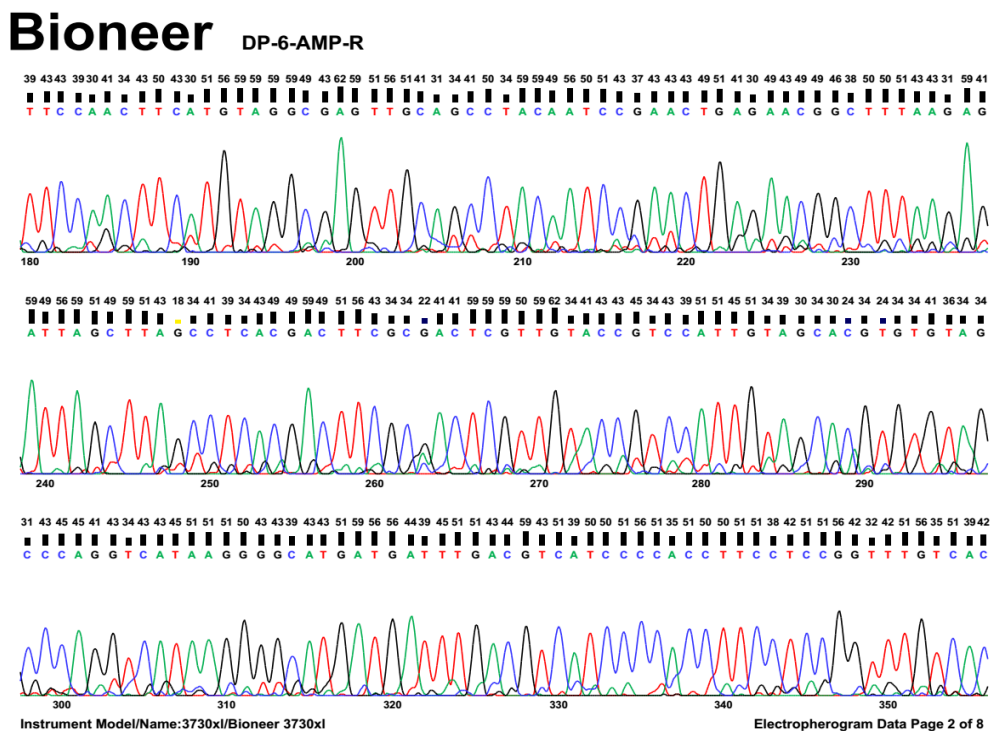
58 58 58 41 54 51 58 49 51 54 53 51 49 48 49 50 51 39 41 51 47 37 44 47 34 37 49 49 58 45 49 58 58 54 58 46 52 28 51 46 51 39 39 51 52 58 58 58 50 58 39 58 54 46 40 51 49 58
 T G T C A T T T T G C C C C G A A G G G G A A A C C T G A T C T C T C A G G T G A T C A A A G A T G T C A A G A



Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 3 of 8

EK 3

Lactobacillus brevis DP6'nin 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram

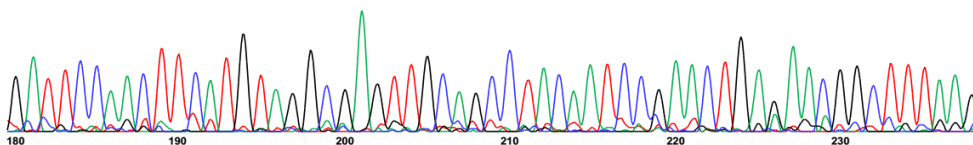


EK 4

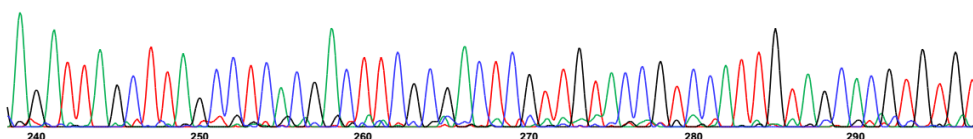
Lactobacillus brevis DP40'nin 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram

Bioneer DP-40-AMP-R

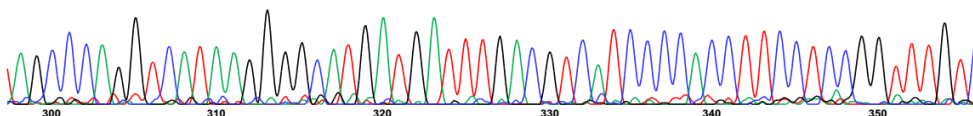
49 49 43 51 51 51 43 39 49 56 62 59 49 59 49 49 62 49 48 56 59 51 39 39 51 59 49 59 56 34 49 51 49 38 31 51 51 51 46 46 43 24 46 43 39 51 51 41 51 51 51 51 43
 G A T T C C A A C T T C A T G T A G G C G A G T T G C A G C C T A C A A T C C G A A C T G A G A A C G G C T T T A A G



62 43 59 59 62 62 56 56 62 59 59 34 50 56 48 56 43 51 49 59 51 59 59 59 49 51 43 46 56 59 59 51 43 44 56 43 43 43 51 56 43 51 51 56 59 62 45 56 43 51 51 44 50 45 59 45 59 45
 A G A T T A G C T T A G C T C A C G A C T T C G C G A C T C G T T G T T A C C G T C C A T T G T A G C A C G T G T G T



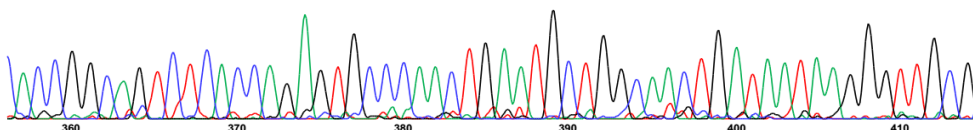
51 45 59 59 51 51 43 59 43 51 51 62 59 59 62 56 56 51 51 44 59 59 51 62 59 59 59 62 56 62 62 51 59 45 59 59 59 59 59 51 59 59 56 47 62 56 51 51 50 56 56 51 56 56 62 56
 A G C C C A G G T C A T A A G G G C A T G A T G A T T T G A C G T C A T C C C A C C T T C C T C G G T T T G T



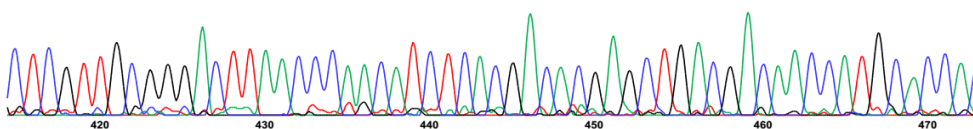
Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 2 of 8

Bioneer DP-40-AMP-R

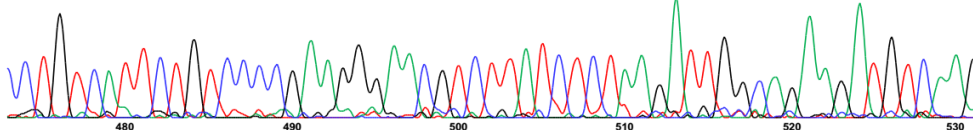
62 56 56 62 62 56 39 35 39 37 51 38 51 42 62 56 56 42 54 56 56 56 51 51 51 51 51 56 51 56 51 51 62 56 56 62 42 32 34 38 38 38 56 56 56 62 62 62 56 56 62 37 51 56 62 51 54
 C A C C G G C A G T C T C A C C A G A G T G C C A A C T G A A T G C T G G C A A C T G A T A T A A G G T T G C G



62 62 62 56 56 62 56 47 56 56 56 47 47 56 56 56 56 43 43 39 38 43 42 56 56 56 56 56 62 39 41 46 35 43 43 62 52 52 54 43 52 62 52 45 62 62 62 62 62 42 54 62 52
 C T C G T T G C G G G A C T T A A C C G A A C A T C T C A C G A C A C G A G C T G A C G A C A A C A T G C A C C A



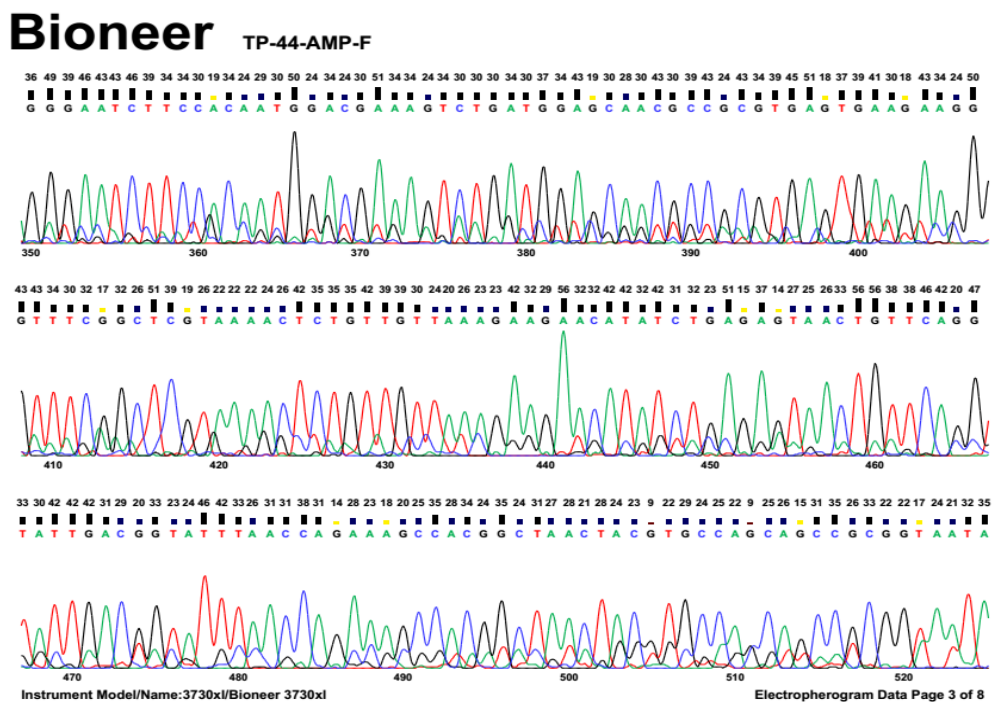
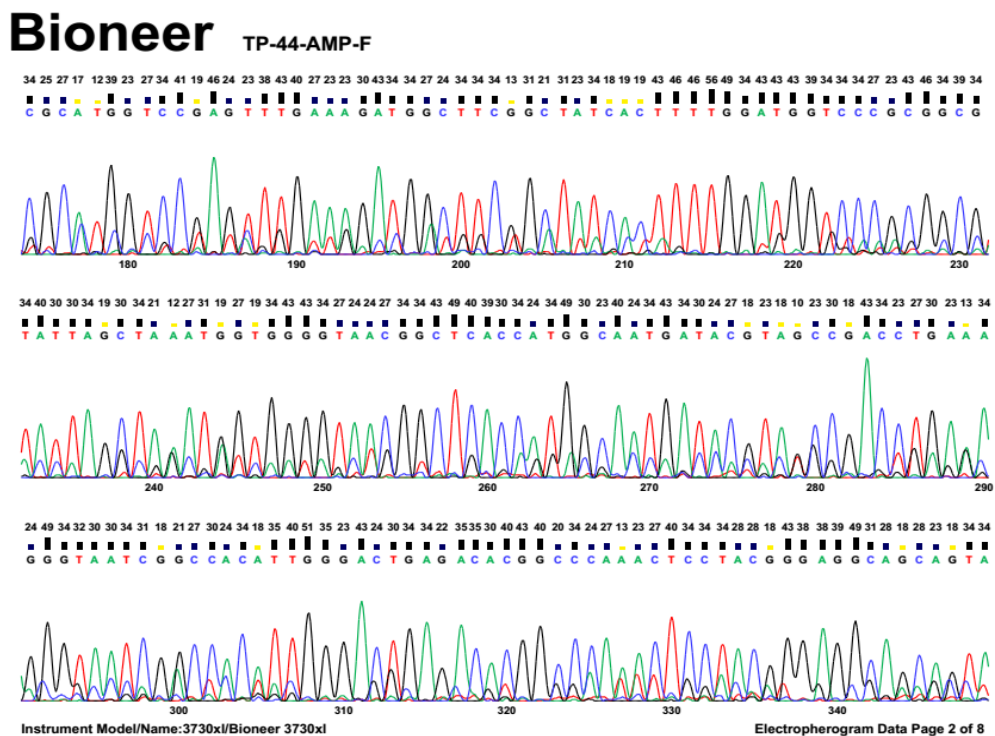
49 52 49 62 47 39 43 52 52 52 52 54 52 52 52 52 52 43 52 38 41 52 34 49 52 39 43 52 52 49 54 54 54 54 45 38 54 32 54 41 52 48 33 37 52 37 58 54 42 42 26 58 54 54 52 54 52
 C C T G T C A T T C T G T C C C G A A G G G A A C G T C T T A T C T C T A A G A T T G G C A G A A G A T G T C A A G



Instrument Model/Name:3730xl/Bioneer 3730xl Electropherogram Data Page 3 of 8

EK 5

Lactobacillus plantarum TP44'ün 16S Geninin Sekans Analizini Gösteren Kromatogram



ÖZGEÇMİŞ

Hümevra İSPİRLİ



4 Nisan 1992 yılında Bayburt’da doğdu. 2009 yılında Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı ve 2013 yılında tamamladı. Aynı yıl Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

Yayınlanan Makaleler

Mercan, E., **İspirli, H.**, Sert, D., Yılmaz, M.T., Dertli, E. 2015. Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some Lactobacillus salivarius strains. Arch Microbiology, 197:1041–1049

İspirli, H ., Demirbaş, F., Dertli, E. 2015. Characterization of functional properties of Enterococcus faecium strains isolated from human gut. Canadian Journal of Microbiology, 61: 861–870

Ödüller

TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu 2014