

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

**EKŞİ HAMUR KAYNAKLI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Fatma Nur DEMİRBAŞ**

**Mayıs - 2016**

**BAYBURT**

**EKŞİ HAMUR KAYNAKLI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatma Nur DEMİRBAŞ**

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

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

**EKŞİ HAMUR KAYNAKLI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN**  
**TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Fatma Nur DEMİRBAŞ**

**2016**  
**BAYBURT**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAY SAYFASI

### Ekşi Hamur Kaynaklı Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Teknofonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ ve Dr. Azime Yılmaz danışmanlığında, Fatma Nur DEMİRBAŞ tarafından hazırlanan bu tez çalışması 12/05/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Nihat AKIN

İmza: 

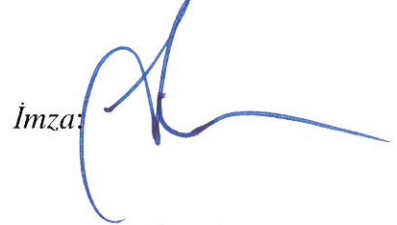
Üye: Doç. Dr. Hüseyin SERENCAM

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHİN

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Özlem ÇAKIR

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

  
Prof. Dr. Rabil AYAZOĞLU

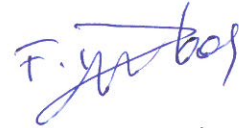
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma 1140695 nolu TUBİTAK projesi 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.



Fatma Nur DEMİRBAŞ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### EKŞİ HAMUR KAYNAKLI BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma Nur DEMİRBAŞ

Bayburt Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Birinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ  
İkinci Danışman: Dr. Azime YILMAZ

Bu çalışmada ülkemizin en önemli fermente ürünlerinden biri olan geleneksel yollarla üretilen ekşi hamur örneklerinden izole edilip tanımlanmış LAB türlerinin teknofonksiyonel ve probiyotik özellikleri çerçevesinde çeşitli nitelikleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu türlerin EPS üretimi noktasında gerçekleştirilen testler, bütün türlerin sükrozun C kaynağı olduğu koşullar altında glukozdan oluşan homopolimerik glukoz üretebildiklerini göstermiştir. LAB türleri ile yapılan glukozsükras aktivite testleri türlerin glukozsükras aktivitesinin önemli ölçüde farklılık arz ettiğini ve bu aktivitenin hücrenin farklı kısımlarında önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Bu türlerin kontrollü şartlarda küflendirilmiş ekmekten izole edilmiş küflere karşı gösterdikleri antifungal aktivite türler arasında farklılık arz etse de bu türlerin önemli oranda antifungal aktivite gösterebildikleri ortaya konmuştur. Bu türlerin çeşitli gıda kaynaklı patojenlere gösterdikleri antimikrobiyal aktivite test edilmiş ve türlerin farklı oranlarda antimikrobiyal aktivitede olabilecekleri gösterilmiştir. Bu türlerin probiyotik potansiyellerinin belirlenmesi noktasında ise antibiyotik hassasiyetlerinin belirlenmesi, farklı çözümlere hidrofobisite yetenekleri, düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları test edilen LAB türlerinin önemli bir kısmının düşük pH ve safra tuzu içeren MRS ortamında canlılığını koruduğunu göstermiştir. Öte yandan antibiyotik dirençlerinde kültürler arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Benzer olarak bu türlerin farklı seviyelerde hidrofobisite yeteneklerinin olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak bu çalışma ile ekşi hamur bazlı LAB türlerinin teknofonksiyonel özellikleri ve probiyotik potansiyelleri ortaya konmuştur.

**2016, 68 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Ekşi hamur, LAB, Ekzopolisakkarit, Fonksiyonel özellikleri

## **ABSTRACT**

MS Thesis

### **DETERMINATION OF TECHNOFUNCTIONAL PROPERTIES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA SPECIES ISOLATED FROM SOURDOUGH**

Fatma Nur DEMIRBAS

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Enes DERTLI  
Second Supervisor: Dr. Azime YILMAZ

In this study, the technofunctional and probiotic properties of Lactic Acid Bacteria isolated previously from sourdough as an important fermented product of our country were determined. Determination of the EPS production of these strains revealed that all strains produced homopolymeric glucan type EPS formed by only glucose from sucrose as the C source. The glucanase activity tests showed that all strains had the glucanase activity and this activity was shown to be altered depending on the location within the cell environment. These LAB strains exhibited important levels of antifungal activity against the Fungi species isolated from moulded bread samples under controlled conditions and this activity was found to be strain dependant. The antibacterial effects of these strains were also tested against food-borne pathogens and these effects were found to be strain dependant. In terms of determining the probiotic potentials of these strains, the antibiotic sensitivity, resistance to low pH and bile salt conditions and hydrophobicity of these strains were tested. Results revealed that an important number of LAB strains survived under low pH and bile salt conditions and the antibiotic sensitivity of these strains were altered depending on strain specific conditions. Similarly different levels of hydrophobicity were observed amongst the tested strains. Consequently, this study revealed the technofunctional properties and probiotic potentials of the sourdough based LAB strains.

**2016, 68 pages**

**Keywords:** Sourdough, LAB, Exopolysaccharide, Functional properties

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmasını; planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında her türlü maddi, manevi yardım ve kolaylığı esirgemeyen fikir ve düşünceleriyle yol gösteren değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye,

İkinci danışmanım Dr. Azime YILMAZ'a

Çalışma süresince her zaman büyük destek ve teşviklerini gördüğüm saygıdeğer arkadaşım Hümevra İSPİRLİ'ye,

Manevi ve maddi destekleriyle hayatım boyunca yanımda olan aileme,

1140695 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TUBİTAK'a sonsuz teşekkürler.

Fatma Nur DEMİRBAŞ

Mayıs /2016



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>5</b>
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	5
2.2. Ekşi Hamur ve Laktik Asit Bakterileri .....	6
2.3. Ekşi Hamur Türleri Açısından Teknofonksiyonel Etki Mekanizmaları .....	7
2.3.1. Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve biyosentez mekanizması .....	8
2.3.2. Ekşi hamur açısından EPS üretiminin önemi.....	11
2.3.3. Antifungal bileşenler üretimi .....	12
2.4. LAB Türlerinin Probiyotik Fonksiyonları Açısından Çeşitli Nitelikleri .....	13
2.4.1. Sindirim sistemi .....	13
2.4.2. LAB türleri açısından EPS üretiminin önemi ve EPS'in fonksiyonel etkileri .....	14
2.4.3. Düşük pH ve safra tuzlarına direnç.....	16
2.4.4. Hidrofobisite nitelikleri.....	17
2.4.5. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi .....	18
2.4.6. Antimikrobiyal üretimi .....	18
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>20</b>
3.1. Materyal .....	20
3.1.1. Bakteriyel kültürler ve gelişme şartları.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Ekşi hamur kaynaklı LAB'den EPS izolasyonu .....	20
3.2.2. EPS kimyasal yapısının tespiti amacıyla modifiye BHI besiyerinin oluşturulması .....	21

3.2.3.	EPS kimyasal yapısının aydınlatılması .....	22
3.2.4.	Ekşi hamur izolatlarında glukansükraz aktivitesinin test edilmesi ve hücresel yerlerinin tespiti .....	22
3.2.5.	Ekmeğin kontrollü küflendirilmemesi ve küflerin tanımlanması .....	23
3.2.6.	Küflerin RAPD-PCR ile genotipik karakterizasyonu .....	24
3.2.7.	26S rRNA geni ile küfleri tanımlama .....	24
3.2.8.	LAB türlerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi .....	25
3.2.9.	Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin belirlenmesi .....	25
3.2.10.	LAB türlerinin hidrofobisite niteliklerinin belirlenmesi .....	26
3.2.11.	LAB türlerinin antibiyotik hassasiyet niteliklerinin belirlenmesi .....	26
3.2.12.	LAB türlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi .....	27
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....</b>	<b>28</b>
4.1.	Ekşi Hamur İzolatları Tarafından Üretilen EPS'in Karakterizasyonu .....	28
4.2.	Ekşi Hamur İzolatlarının Glukansükraz Aktivitesi .....	30
4.3.	Düşük pH ve Safra Tuzlarına Karşı Direncin Belirlenmesi .....	33
4.4.	LAB Türlerinin Hidrofobisite Niteliklerinin Belirlenmesi .....	36
4.5.	LAB Türlerinin Antibiyotik Hassasiyetlerinin Belirlenmesi .....	41
4.6.	LAB Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi .....	45
4.7.	LAB Türlerinin Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	48
<b>5.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>53</b>
	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>69</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

°C	Santigrat derece
g	gram
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
pH	Asitlik Bazlık Birimi
V	Volt
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ mol	Mikromol

### Kisaltmalar

AML	Amoxicillin
AMP	Ampicilin
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pairs
C	Karbon
C	Chloramphenicol
CAR	Carbenicilin
CN	Gentamicin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit

dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
DSS	3,5 Dinitrosalicylic Acid
E	Erithtromycin
EPS	Ekzopolisakkaritler
FAO	Food and Agriculture Organization
FTF	Fruktoziltransferaz
GTF	Glikoziltransferaz
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Hemopolisakkarit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	Kanamycin
kob	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe
OD	Optik Dansite
OX	Oxacillin
PCR	Polymerase Chain Reaction
pgm	Fosfoglikomutaz
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RD	Rifampicin
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozamal RNA
S	Streptomycin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Tri-Chloroacetic Acid
TSB	Tryptic Soy Broth
TE	Tetracycline
UV	Ultraviyole
VA	Vancomycin
WHO	World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> Gastrointestinal sistemin değişik kısımlarında yer alan mikroorganizmalar .....	14
<b>Şekil 4.2</b> <i>L. plantarum</i> ED10 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı .....	28
<b>Şekil 4.3</b> <i>L. rossiae</i> ED1'in antibiyotik disklerle gösterdiği direnç.....	42
<b>Şekil 4.4</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923'e karşı sırasıyla <i>L. curvatus</i> N19 ve <i>L. pseudomesenteroides</i> N13'ün antimikrobiyal etkileri.....	46
<b>Şekil 4.5</b> Küf izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....	48
<b>Şekil 4.6</b> 26S geninin ampilifikasyonunu gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....	48
<b>Şekil 4.7</b> <i>L. paraplantarum</i> N15'in sırasıyla <i>Aspergillus niger</i> ve <i>Penicillium chrysogenum</i> 'e karşı antifungal etkisi.....	50
<b>Şekil 4.8</b> <i>L. paralimentarius</i> E106'nın <i>Penicillium chrysogenum</i> 'e karşı antifungal etkisi .....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1</b> Çalışmada kullanılan bakteriler ve suş kodları.....	20
<b>Çizelge 3.2</b> Çalışmada kullanılan patojen bakteriler ve suş kodları .....	27
<b>Çizelge 4.1</b> LAB'nin çözünür ve hücre duvarına bitişik fraksiyonlarının glukansükraz aktivitesi .....	31
<b>Çizelge 4.2</b> Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direnç deneyinden elde edilen sonuçlar .....	35
<b>Çizelge 4.3</b> LAB'nin farklı hidrokarbonlara % tutunma sonuçları.....	40
<b>Çizelge 4.4</b> Antibiyotik disklerde ölçülen zon çapları.....	44
<b>Çizelge 4.5</b> Antimikrobiyal aktivite gösteren LAB'nin inhibisyon zon çapları .....	47
<b>Çizelge 4.6</b> LAB'nin antifungal aktivite test sonuçları .....	51

## 1. GİRİŞ

Geleneksel fermente ürünlerin üretiminden sorumlu Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) izolasyonu, tanımlanması ve bu türlerin fonksiyonel ve teknolojik yönlerinin ortaya çıkarılması hem bu türlerin endüstriyel anlamda kullanım potansiyellerinin hem de probiyotik hadiseler çerçevesinde insan sağlığı ile alakalı rollerinin tanımlanması açısından son derece önemli bir konudur. Probiyotikler; “yeterli miktarda tüketildiklerinde konağın sağlığına olumlu etkileri bulunan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO ve WHO, 2002). Probiyotik özellik taşıyan mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerine yönelik çalışmalar ilk defa 1908 yılında, Nobel ödüllü Rus araştırmacı Elie Metchnikoff çalışmalarında uzun ve sağlıklı yaşam ile alakalandırılan yoğurt ile başlamıştır. Geçtiğimiz yüzyıl yoğurda ilaveten farklı fermente ürünlerden izole edilen LAB türlerinin fonksiyonel etkilerinin ve probiyotik potansiyellerinin geliştirilmesine yönelik onlarca çalışma yürütülmüştür. Aynı şekilde LAB türlerinin fermantasyon kabiliyetleri neticesinde oluşan bir diğer önemli fermente ürün de ekşi hamurdur. Temel olarak ekşi hamur; un ve su kullanılarak elde edilen hamurun LAB türleri tarafından fermente edilmesiyle elde edilmektedir. Ekşi hamur geleneksel bir ürün olarak endüstriyel açıdan çok büyük bir potansiyele sahiptir. Türkiye dâhil olmak üzere Avrupa'nın birçok bölgesinde farklı tipte ekşi hamurlar üretilmekte ve bu ekşi hamurlar ekmek, kek ve pizza gibi birçok ürünün üretilmesinde kullanılmaktadır. Ekşi hamurun oluşumu sırasında LAB türlerinin meydana getirdiği biyokimyasal faaliyetler neticesinde hamurun özellikleri, fizikokimyasal nitelikleri gelişerek ekmeğin hacmi ve tekstürü, besinsel ve tat özellikleri iyileşmekte ve aynı zamanda ekmekte istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenebilmektedir. Bu açıdan ekşi hamur kompleks mikroflorası ve benzersiz teknolojik yönleri ile son dönemde üzerinde en fazla durulan fermente ürünlerin başında gelmektedir.

LAB türleri ekşi hamurun fizikokimyasal nitelikleri üzerindeki temel rolleri bu türlerin ekzopolisakkaritler (EPS) olarak adlandırılan biyopolimerleri üretme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır. EPS farklı veya aynı şeker monomerlerinin farklı glikozidik

bağlar ile bağlanması ile oluşan bakteri hücrelerinin hücre dışında oluşturduğu bakteri hücrelerine ya tamamen bağlı kapsüler formda ya da bakteri hücrelerinin çevrelendikleri ortama salgılayabildikleri ekstra hücrenel formda bileşenlerdir. Her iki formda da LAB türleri tarafından üretilebildikleri gösterilmiş olup EPS hem bakteri hücrelerini dış ortamdan koruyup probiyotik fonksiyonlarında rol oynar hem de *in situ* olarak üretilerek karmaşık gıda matriksindeki reolojik ve teknofonksiyonel etkilerinden dolayı gıdaların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde geliştirir. EPS'ler kimyasal olarak homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılır ve homopolisakkaritler (HoPS) sadece tek tip şeker biriminden oluşurken, heteropolisakkaritler (HePS) birden fazla şeker monomeri içerebilir. Glikozidik bağlardaki farklılıklar çok farklı tipte EPS'lerin üretilebilmesine imkân sağlamaktadır. Genetik çalışmalar homopolisakkaritlerin üretiminden tek bir genin, heteropolisakkarit üretiminden ise bakteri genomunda veya plazmitlerde kodlanan *eps* gen kümelerinin sorumlu olduğunu göstermiştir. LAB türlerinde homopolimerik EPS üniteleri ya glikozdan ya da fruktozdan oluşmakta olup glukoz ünitelerinin EPS'in tekrarlanan ünitesinde yer aldığı HoPS'lerin üretiminden *gtf* genleri sorumlu olup bu genin kodladığı proteinler glikoziltransferaz (GTF), glukansükraz, dekstransükraz vs. şeklinde adlandırılmaktadır. GTF bu proteinlerin çatı adı olup glükansükrazlar spesifik olarak sükrozun varlığında HoPS'leri üretmekte iken, glikoziltransferazlar ise farklı C kaynaklarını ve özellikle glukozu HoPS'lerin üretiminde kullanırlar. GTF proteinleri yüksek oranlarda korunmuş bölgeleri içermekte olup bu proteinlerdeki konformasyonel farklılıklar farklı tipte HoPS'lerin üretimini sağlamaktadır. Hamur ürünleri gibi sükrozun bulunup oluşabildiği fermentasyon koşullarında glükansükrazların aktiviteleri çok daha fazla önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmalar ekşi hamur izolatlarının büyük oranda homopolimerik EPS üretebildiklerini göstermiştir.

Heteropolimerik EPS ise genel olarak glukoz, galaktoz ve ramnoz olmak üzere farklı şeker gruplarının EPS'in tekrarlanan ünitesini oluşturması ile meydana gelmektedir. Heteropolimerik EPS üretimi için yaklaşık 14-20 genin bir arada bulunduğu bir gen kümesine ihtiyaç bulunup bu genlerden en önemlisi *p-gtf* olarak adlandırılan başlatıcı glikoziltransferazı kodlayan genidir. Bu genin kodladığı protein ilk şeker ünitesini izoprenoid lipid taşıyıcıya ekleyerek EPS üretimini başlatır ve diğer genlerinde



fonksiyonları ile EPS üretimi gerçekleşmiş olur. Aynı şekilde bu gen kümesi transkripsiyon düzenleyici ve zincir uzunluğunun belirlenmesini kodlayan genleri de içermektedir. LAB türlerinde bu genlerin tespiti ve aydınlatılması üretim potansiyellerinin ve biyosentez mekanizmalarının anlaşılabilmesi açısından son derece önemlidir.

Ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin diğer teknolojik fonksiyonları da antifungal etkileridir. Küfler; ekmek üretiminde özellikle hijyenik olmayan üretim koşullarından kaynaklanan bozulmaya neden olan mikroorganizma grubudur ve ekmek üretiminde çeşitli antifungal katkı maddeleri kullanılabilir. Bununla birlikte ekşi hamurun üretimi sırasında rol oynayan LAB türleri ürettikleri organik asitler dahil olmak üzere farklı metabolitlerle küflerin gelişimini sınırlamaktadırlar. Bu açıdan ekşi hamur bazlı LAB türlerinde antifungal aktivitenin belirlenmesi teknolojik açıdan son derece önemlidir.

LAB türlerinin kaynağı ne olursa olsun çeşitli probiyotik fonksiyonları olabilmektedir. Dolayısıyla bu türlerin teknolojik fonksiyonlarının yanı sıra probiyotik fonksiyonlarının da incelenmesi gerekmektedir. LAB türlerinin probiyotik fonksiyon göstermesi patojen türlerin uzaklaştırılması noktasında konakta zorlu koşullara direnç göstermeleri, konakta tutunmaları ve ürettikleri çeşitli bileşenler vasıtasıyla konakta patojen türlerin gelişimini engellemeleri yoluyla meydana gelebilmektedir. Benzer olarak vücuda alınan probiyotik bakterilerin etkilerini gösterebilmeleri için canlı olarak ve istenilen sayıda gastrointestinal sisteme ulaşmaları gerektiği bilinmektedir. Bu sebeple fonksiyonel özellikleri incelenen probiyotik olacak suşların mide asiditesine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaları, patojenlerle mücadele edebilmeleri, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyal maddeleri üretmeleri ve probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin konakçı sağlığına zarar vermemesi gerekmektedir (Salminen ve vonWright 1998). Bunlara ilaveten gastrointestinal sistem duvarına tutunarak kolonize olmaları ve konak üzerindeki olumlu etkilerinin çok kısa sürede başlaması gerekmektedir (Young ve Huffman 2003). LAB türlerinin probiyotik potansiyellerinin belirlenmesi noktasında bu özelliklerinin ortaya konması elzemdir.

Bu çalışmada bu hususlardan yola çıkılarak ülkemizin önemli fermente ürünlerinden olan geleneksel yollarla üretilen ekşi hamur örneklerinden daha önceki bir proje çerçevesinde izole edilip tanımlanmış LAB türlerinin teknofonksiyonel ve probiyotik özellikleri çerçevesinde çeşitli nitelikleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu türlerin EPS üretimi noktasında gerçekleştirilen testler bütün türlerin sükrozun C kaynağı olduğu koşullar altında glukozdan oluşan homopolimerik glukoz üretebildiklerini gösterilmiştir. LAB türleri ile yapılan glukansükraz aktivite testleri türlerin glukansükraz aktivitesinin önemli ölçüde farklılık arz ettiğini ve hücrenin farklı kısımlarında önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Bu türlerin bu tez çalışması çerçevesinde kontrollü şartlarda küflendirilmiş ekmekten izole edilmiş küflere karşı gösterdikleri antifungal aktivite belirlenmiş ve türler arasında farklılık arz etse de bu türlerin antifungal aktivite gösterebildikleri ortaya konmuştur. Bu türler ile *Escherichia coli* BC 1402, *Bacillus cereus* BC 6830, *Salmonella typhimurium* RSSK 95091, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Staphylococcus aureus* ATC 25923'e karşı yapılan antimikrobiyal aktivite testleri farklı oranlarda olsa da ilgili türlerin antimikrobiyal etkileri olabileceği gösterilmiştir. Bu türlerin probiyotik potansiyellerinin tespiti noktasında ise antibiyotik hassasiyetleri, farklı çözümlere hidrofobisite yetenekleri, düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençleri belirlenmiştir. Sonuç olarak ilgili türlerin teknofonksiyonel ve probiyotik fonksiyonları olabileceği ortaya konmuştur.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) endüstriyel açıdan son derece önemli ve son yıllarda sağlık üzerindeki olumlu fonksiyonları nedeniyle giderek önem kazanan mikroorganizma grubudur. LAB grubuna dahil cinsler arasında *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer almaktadır (Holzapfel vd, 2001). LAB türleri insan ve hayvan gastrointestinal sistemi dahil olmak üzere çok çeşitli ortamlarda bulunabilmekte olup endüstriyel açıdan fermente ürünlerin oluşumunda rol almaları nedeniyle starter kültür olarak, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle de probiyotik türler olarak fonksiyon icra etmektedirler.

LAB, Gram (+), spor oluşturmeyen, katalaz (-), asidi tolere edebilen ve karbohidrat fermantasyonu sırasında başlıca son ürünü laktik asit olan bakterilerdir (Bulut, 2003). LAB türleri C kaynaklarının fermantasyonu sonucunda oluşan son ürüne göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. Homofermentatif türler son ürün olarak sadece laktik asit üretirken heterofermentatif türler son ürün olarak laktik asitin yanı sıra asetik asit, etanol ve CO<sub>2</sub> üretmektedirler (Wood ve Holzapfel, 1995).

Geleneksel olarak LAB türleri, gıda fermantasyonlarında ve gıda maddelerinin korunmasında rol alırlar ve süt ürünleri, turşu, fermente et ürünleri ve ekşi hamurdan yapılan fırın ürünlerinin kendilerine özgü tat ve tekstür özelliklerinin gelişiminden sorumludurlar (Tannock, 2004).

*Lactobacillus* cinsleri çubuk şeklinde hücrelere sahip mikroorganizmalardır. Hücreler düzgün veya hafif kıvrık, bazı türlerde T, Y ve V şeklindedir (Şahin, 2003). *Lactobacillus* cinslerinin gelişme sıcaklıkları 2-53°C, optimum gelişme sıcaklıkları ise 30-40°C arasında olduğu bilinmektedir. Optimum pH'ları 5,5-6,2 arasındadır. Bakterilerin gelişmesi 5,0 veya altındaki pH'larda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Alkali pH'larda gelişme kabiliyetleri düşüktür (Şen vd, 2004).

*Leuconostoc* türleri ovoid kok ve yaygın olarak zincir şeklinde mikroorganizmalardır. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasındadır. Heterofermantasyon ile glikozu fermente ederek, başlıca D-laktat, etanol ve gaz üretmektedirler. Bu bakteri grubu, fermente gıda ürünlerinin (örneğin süt, tereyağı, peynir ve et) tekstür ve organoleptik kalitesindeki değişimlerde önemli rol oynamaktadır (Dellaglio vd, 1985).

*Weissella* cinsi bakteriler ise hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz (-), fermentatif, kısa çubuk veya kokoid şeklinde türlerdir (Shin vd, 2009). Bu türler 15°C'de gelişebilir fakat 45°C'de gelişemezler (Tangüler ve Erten, 2006). Bazı heterofermentatif *Lactobacillus* ve çeşitli *Leuconostoc* türlerini içeren yeni bir cins olarak kabul edilmiştir (Axelsson, 1998).

Yukarıda belirtilen türler özellikle ekşi hamur üretimi noktasında son derece önemli olan LAB türleridir.

## 2.2 Ekşi Hamur ve Laktik Asit Bakterileri

Ekşi hamur 5000 yıldır kullanılmakta ve yıllık 3 milyon tondan fazla miktarda ürünün üretilmesinde endüstriyel önemini korumaya devam etmektedir (Vogel vd, 2011). Ekşi hamur buğday ya da çavdar unu ve su karışımının LAB ve mayalarla fermente edilmesi sonucu elde edilen bir üründür (Randazzo vd, 2005).

Ekmek Türk ve Avrupa diyetlerinin vazgeçilmez bir unsurudur, ekşi hamurdan üretilen ekmek ekmeğe kültürel ve coğrafi yön katmaktadır. Örneğin İtalya'da üretilen hamur ürünlerinin yaklaşık %30'u ekşi hamur kullanılarak elde edilmektedir (Ottogalii vd, 1996).

LAB ve mayalar ekşi hamurun mikrobiyal florasının temel unsurları olmakla birlikte ekşi hamurda LAB/maya oranı 100:1 şeklindedir (Ottogalii vd, 1996). Diğer fermente ürünlerin aksine genel olarak heterofermentatif LAB türleri ekşi hamuru domine etmektedirler ancak homofermentatif türlerde ekşi hamurda önemli miktarda bulunabilmektedirler (De vuyst vd, 2002; Erginkaya ve Kabak, 2010). Aslında ekşi hamurun kendine has tadının oluşmasında heterofermentatif türlerin ürettiği asetik asidin son derece önemli bir payı bulunduğu söylenebilir (De vuyst ve Neysens, 2005).

Ekşi hamur fermente edilebilir karbonhidratlar açısından oldukça zengindir ve genel olarak pH'sı 3-5 arasında değişmektedir. Bu nedenle bu düşük pH, LAB türlerinin tipik karakteristik gelişimlerine yol açarak ekşi hamurun elde edilmesine imkan sağlamaktadır. Ekşi hamur fermentasyonu sırasında *Lactobacillus plantarum* türünde içinde bulunduğu homofermentatif ve *L. sanfranciscensis* gibi heterofermentatif türler ortamı domine ederek istenmeyen Gram (-) türlerin gelişmesini engellemektedirler. Genel anlamda ekşi hamurda bulunan türler arasında *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. paralimentarius*, *L. frumenti*, *L. brevis* ve *L. plantarum* bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar yaklaşık olarak 50 LAB türünün ekşi hamurlarda bulunduğunu göstermiştir (De vuyst ve Neysens, 2005). Bununla birlikte bazı araştırmacılar tanımlanamayan LAB türlerinin de ekşi hamurlarda bulunabileceğini vurgulamaktadırlar (Rosenquist ve Hansen, 2000).

LAB türlerinin ekşi hamurları domine etmelerinin en önemli nedenlerinden bir tanesi de ekşi hamurda maltoz ve fruktoz gibi şekerlere adapte olmuş karbonhidrat metabolizmalarıdır. Aynı zamanda ekşi hamur pH'sı ve gelişim sıcaklığı LAB türlerinin ortamı domine etmelerine neden olmaktadır. Ek olarak LAB türlerinin biyokimyasal faaliyetleri neticesinde organik asitler, bakteriyosin gibi antimikrobiyal bileşenlerin üretimi bu türlerin rekabet etme şanslarını büyük ölçüde artırmaktadır.

### **2.3 Ekşi Hamur Türleri Açısından Teknofonksiyonel Etki Mekanizmaları**

LAB türlerinin fermantasyon sırasında *in situ* olarak ekzopolisakkaritleri (EPS) üretmeleri hem ürünün fizikokimyasal niteliklerinde önemli gelişmelere neden olur hem de üreten türün çevresiyle etkileşimi çerçevesinde fonksiyonel sonuçlar oluşturabilir. Ekşi hamur ölçeğinde düşünüldüğünde ise EPS üretimi hamurun fizikokimyasal özelliklerini geliştirerek hamurun teknolojik özelliklerini iyileştirir ve aynı zamanda üretilen ekmeğin tekstürel niteliklerini önemli ölçüde geliştirir. Benzer olarak LAB türlerinin ekşi hamur ortamında antifungal etkileri ürünün raf ömrünün uzaması ve ekonomik yönlerden son derece önem arz etmektedir.

#### **2.3.1 Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve biyosentez mekanizması**

LAB türleri açısından EPS üretimi hem bu türlerin probiyotik fonksiyonları hem de endüstriyel anlamda tekstür ve kıvam geliştirici bileşenler olmaları nedeniyle son derece önemlidir. Ekzopolisakkaritler hücreye sıkı bir şekilde bağlanmış kapsül formunda olan kapsüller EPS veya hücreye gevşekçe bağlı veya tamamen hücre dışına salgılanan ekstra-hücresele EPS olarak iki formda olabilir. Her iki grupta EPS olarak adlandırılabilir. Kimyasal yapıları açısından mikrobiyal EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılırlar. Homopolisakkaritler glukoz veya fruktoz olmak üzere sadece tek tip şeker monomerinden oluşurken, 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 ve Mody, 2007). Bu yapıların özgünlüğü ve aynı zamanda gıda, kimya, tıp ve farmasötik gibi alanlardaki doğal bileşenlere olan ihtiyaç EPS'lere olan ilginin artmasına neden olmuştur (Kanmani vd, 2011). Gıda endüstrisi açısından EPS'ler vizkoziteyi artırıcı, stabilize ve emulsifiye edici özelliklerinden ötürü son derece önem arz etmektedirler (Kanmani vd, 2011). Hücre dışına salgılanan EPS'lerin gıda sanayisinde temel kullanım amacı bu tür özelliklerin sağlanmasıdır. Bu amaca yönelik olarak kullanılan EPS'lere dekstranlar, ksantan, jellan, pullulan, maya glukozları ve bakteriyel aljinatlar örnek olarak gösterilebilir (Wang vd, 2008). Benzer olarak bakteriyel EPS'ler bakteri hücrelerinin antibiyotiklerden, kurumadan, faj ataklarından ve dış ortamlardan korunması ve biyofilm oluşumunda da 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).

LAB grubu da hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS üretme kabiliyetindedir. LAB tarafından üretilen homopolisakkaritler glukoz ünitelerinden oluşmuş glukoz veya dekstranlar olarak adlandırılan polimerleri veya fruktoz ünitelerinden oluşmuş fruktan veya levan olarak tanımlanmış polimerleri içermektedirler (De Vuyst ve Degeest, 1999). LAB tarafından üretilen heteropolisakkaritler temel olarak glukoz, galaktoz ve ramnoz olmak üzere farklı şeker

monomerlerinden veya organik veya inorganik diğer gruplardan oluşabilirler. Her iki kimyasal grup açısından monomerlerin bağlı oldukları glikozidik bağların yapısı çok çeşitli polimerlerin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Badel vd, 2011). LAB hem hücre dışına tamamen salgılanan hem de hücre çeperlerine bağlı kalıp kapsül oluşturan EPS üretme yeteneğindedirler. Ancak bu iki grup arasındaki ayrım net olarak yapılamamıştır ve üretilen EPS'in hücre çeperlerine bağlı kalmasını veya ortama salgılanmasını belirleyen faktörler net değildir. Bununla birlikte her iki grubun üretilmesinden sorumlu genetik mekanizma ortaktır ve EPS biyosentez mekanizması LAB grubunun üyeleri için oldukça benzerdir (Jolly ve Stingle, 2001).

Fermente ürünlerin üretimi açısından *in situ* olarak üretilen EPS'in gıdanın organoleptik özellikleri üzerindeki fonksiyonu son derece önemli olsada fermantasyon ortamında üretilen EPS'in hücre düzeyindeki etkisi de önem arz etmektedir. Heteropolimerik EPS biyosentezi *eps* gen kümelerinde kodlanan gen ürünlerinin fonksiyonu ile icra edilen kompleks bir işlemdir. Ayrıca bu işlemin temel basamaklarında temel hücresel fonksiyonlar için gerekli gen ürünleri görev alır (Laws vd, 2001). Aynı şekilde temel hücresel fonksiyonlar için gerekli gen ürünleri homopolimerik EPS üretiminde de önemlidirler ancak homopolimerik EPS üretiminden gen kümesi değil de sadece tek bir gen ürünü sorumludur ve heteropolimerik EPS üretime göre daha basit bir işlemdir. EPS üretimdeki ilk anahtar element hücrede şekerlerin parçalanmasındaki son ürün olan glikoz-6-fosfattır (Welman ve Maddox, 2003). Daha sonra bir temel hücresel fonksiyon gen ürünü olan enzim fosfoglikomutaz (pgm) glikoz-6-fosfatı glikoz-1-fosfata indirger (Laws vd, 2001). Bu bileşenler EPS yapısını oluşturan şeker monomerlerinin oluşumu için gerekli şeker nükleotitlerinin üretiminde görev alır. Aynı şekilde heteropolimerik EPS üretimi için elzem olan lipit taşıyıcının üretimi de temel hücresel fonksiyon gen ürünlerinin EPS üretimdeki rolünü gösteren bir diğer örnektir.

Homopolimerik EPS üretiminden bir tek gen, heteropolimerik EPS üretiminden ise özel *eps* gen kümesi sorumludur. Birçok LAB türünün homopolimerik glukoz ve fruktan üretiminden sorumlu *gtf* ve *ftf* genlerini taşıdığı gösterilmiştir (Walter vd, 2008; Kralj vd, 2004; Kralj vd, 2002; Van Der Meulen vd, 2007; Van Leeuwen vd, 2008). Bazı LAB türleri birden fazla *gtf* geni de içerebilirler. GTF ve FTF'lerin aminoasitlerinin kümelenme analizlerine göre FTF'ler yüksek oranda benzerlik

gösterirken, GTF'lerin benzerlik oranı daha düşüktür (Koraklı ve Vogel, 2006). Aslında bu LAB'lerinin neden glukun üretimlerinin yüksek oranda farklılık gösterdiğini fruktan yapılarının ise büyük ölçüde benzerlik gösterdiğini açıklayabilir. GTF en temel manada glikoziltransferaz enziminin kısaltılmış gösterimidir. Bu genin kodladığı proteinler sadece glikoziltransferazlar ki bunlar farklı C kaynaklarını kullanıp EPS üretebilirler ve daha da önemlisi sücrozu kullanıp açığa çıkan enerji ve glukoz ünitelerini birbirine bağlayabilen glukansükrazlar olarak ikiye ayrılrsa da bu ürünler arasındaki ayırmda net olarak ortaya konmamıştır. Bununla birlikte gıda sanayi açısından glukansükrazların aktivitesi daha fazla öne çıkmaktadır. Bu enzimlerin marifeti ile LAB dekstran, levan, pullulan ve reuteran gibi farklı yapılarda homopolimerik EPS üretebilirler (Badel vd, 2011; Kralj vd, 2004; Donot vd, 2012). Homopolimerik EPS üretimi bakteri sitoplazmasında veya hücre dışında gerçekleşebilir ve bu özellikle heteropolimerik EPS üretimi ve glukansükraz aktivitesi dışındaki homopolimerik EPS üretimi için söz konusudur (Donot vd, 2012). Hücre içerisinde gerçekleşme şekli hem glikoziltransfer aktivitesi hem de taşıma özelliği bulunan GTF enzimlerinin şeker nükleotitleri birbirlerine belli bağlarla bağlanması ve hücre dışına taşınması ile gerçekleşir (Kumar ve Mody, 2007). Hücre dışında ise ortamda bulunan sücrozun GTF tarafından monomerlerine parçalanması ve açığa çıkan enerji ile glikozil ünitelerinin birbirlerine bağlanması ile gerçekleşir (glukansükraz). Bu açıdan fermente ürünlerdeki homopolimerik EPS üretimi çoğunlukla hücre dışı aktivitesi gösterebilen GTF ve FTF enzimleri vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Bu sayede fermente ürünler açısından son derece önemli olan glukun ve fruktanlar üretilmektedir.

LAB türlerinin hangi tip EPS üretimini gerçekleştireceği hem ilgili gen veya gen kümelerinin varlığı hem de ortamda bulunan C kaynağına bağlı olarak aktive olabilecek gen ve enzimlere bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin özellikle ekşi hamur ortamında maltoz ve sücrozun bulunduğu şartlar altında genel olarak LAB türleri homopolimerik EPS üretme kabiliyetinde olabilmektedir. Bununla birlikte C kaynağı glukoz olduğu şartlarda da LAB türleri glukun üretimi gerçekleştirebilmektedir (Dertli vd, 2013).

### **2.3.2 Ekşi hamur açısından EPS üretiminin önemi**



Ekşi hamur karbonhidratlarca zengin ortamı nedeniyle EPS üretiminin genel olarak LAB türleri tarafından gerçekleştirilebildiği bir ortamdır. Nitekim ekşi hamur bazı LAB türlerinin genel olarak glukoz ve fruktan formunda EPS üretebildikleri gösterilmiştir (Bounaix vd, 2009). Mikrobiyal glukozlar glikoz ünitelerini birbirlerine bağlayan bağın şekline bağlı olarak kimyasal yapılarına göre  $\alpha$  ve  $\beta$  glukozlar olarak ikiye ayrılmaktadırlar ve GTF enzimlerinin yapısına bağlı olarak birçok farklı yapıda üretilmektedirler. Aksine şimdiye kadar  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) bağı ile oluşmuş inülin ve  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) bağı ile oluşmuş levan olmak üzere iki farklı yapıda fruktanın LAB tarafından üretildiği gösterilmiştir (Koraklı ve Vogel, 2006). Bu homopolimerik EPS'ler gıda sanayi ve probiyotik özellikler açısından son derece önem arz etmektedirler. Pepe vd, (2013) yaptıkları çalışmada ekşi hamurdan izole ettikleri LAB türlerinin dekstran ürettiğini ve dekstran üretiminin hamur formülasyonundaki prebiyotik katkıların arttığını ve hem ekmeğin fizikokimyasal özelliklerinin hem de besleyici değerinin arttığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ekşi hamur örneklerinden 177 adet LAB izole edilmiş ve bu bakterilerde homopolimerik EPS üretimi için gtf ve ftf, heteropolimerik EPS üretimi için ise epsA, epsB, epsD/E, epsGTF genleri PCR teknikleri ile saptanmıştır. Bu genlerin farklı türlerde genel bir dağılım gösterdiği ve bazı türlerin hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS üretiminden sorumlu genleri içerdiği gösterilmiştir. Bu çalışma ayrıca EPS üretiminin hamur ve ekmeğin genel karakteristikleri açısından son derece önemli olduğunun gösterilmesi açısından dikkate değerdir (Palomba vd, 2012). Minervini vd, (2010) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus curvatus* DPPMA10'nun EPS üretiminin ve GTF aktivitesinin ortam şartlarına bağlı olarak optimize edilebileceğini göstermişlerdir. Tieking vd, (2003) 111 LAB türünde ftf ve gtf genlerinin varlığını araştırmış ve EPS üretebilen türlerde bu genlerin varlığını tespit etmiş ve bu genlerin yapısını şimdiye kadar tespit edilen nükleotit sekansları ile karşılaştırmış ve bu genlerin az ya da çok benzerlik gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışma *in situ* EPS üretiminin ekşi hamur fermantasyonu sırasında ne denli önemli olduğunun gösterilmesi açısından son derece önemlidir. Fırın ürünlerinde yapılan çalışmaların genel olarak homopolimerik EPS üretimi etrafında toplanması ortamda sükrözün bol miktarda bulunması ve dolayısıyla GTF aktivitesinin buna paralel gerçekleşme ihtimalinin yüksek olması beklentisi ile açıklanabilir.

### 2.3.3 Antifungal bileşenler üretimi

Ekşi hamurun ekmek ve fırın ürünleri açısından diğer bir önemli fonksiyonu da ekşi hamurda bulunan LAB türlerinin antifungal etkileri sayesinde ekmek küf oluşumunun engellenmesi ve sonuçta ekmeğin raf ömrünün uzamasıdır (Spicher, 1983). Zira hem ürünlerin kısa sürede tüketilemeyecek duruma gelip ekonomik kayıpların oluşmaması hem de insan sağlığı açısından zararlı olan mikotoksinlerin meydana gelmemesi için birçok fırıncı, fungal etkiyi durdurucu maddeler kullanmaktadır (Legan, 1993).

Yapılan çalışmalar *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, ve *Rhizopus* gibi türlerinin ekmek içinde doğal olarak bulunabileceğini göstermektedir (Legan, 1993). Dolayısıyla bu küf türlerinden kaynaklanabilecek sorunların ortadan kaldırılması gerekmektedir. LAB türleri tarafından antifungal bileşiklerin üretildiğini pek çok araştırmada ortaya konmuştur. Bu bileşenler laktik ve asetik asit, CO<sub>2</sub>, diasetil, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koproik asit, 3-hidroksi yağ asitleri, fenil laktik asit, siklin dipeptitler, reuterin ve fungusinlerdir. LAB türlerinden *L. casei*, *L. pentosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* tarafından fungusitlerin üretildiği bildirilmiştir (Gourama, 1997; Magnusson ve Schnurer, 2001; Okkers vd, 1999). Başka bir çalışmada ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus plantarum* 21B'nin ürettiği fenillaktik ve 4-hidroksi-fenillaktik asit gibi bileşenler vasıtasıyla *Eurotium repens* IBT18000, *Eurotium rubrum* FTDC3228, *Penicillium corylophilum* IBT6978, *Penicillium roqueforti* IBT18687, *Penicillium expansum* IDM/FS2, *Endomyces fibuliger* IBT605 ve IDM3812, *Aspergillus niger* FTDC3227 ve IDM1, *Aspergillus flavus* FTDC3226, *Monilia sitophila* IDM/FS5 ve *Fusarium graminearum* IDM623'e karşı kuvvetli antifungal etki göstermiş ve ekmek üretiminde sodyum benzoat gibi antifungal bileşenlerin kullanımını azaltmıştır (Lavermicocca vd, 2000). Sonuç olarak ekşi hamur bazlı LAB türlerinin antifungal etkileri ekşi hamurun fonksiyonel etkilerinin ortaya çıkarılması açısından son derece önemlidir.

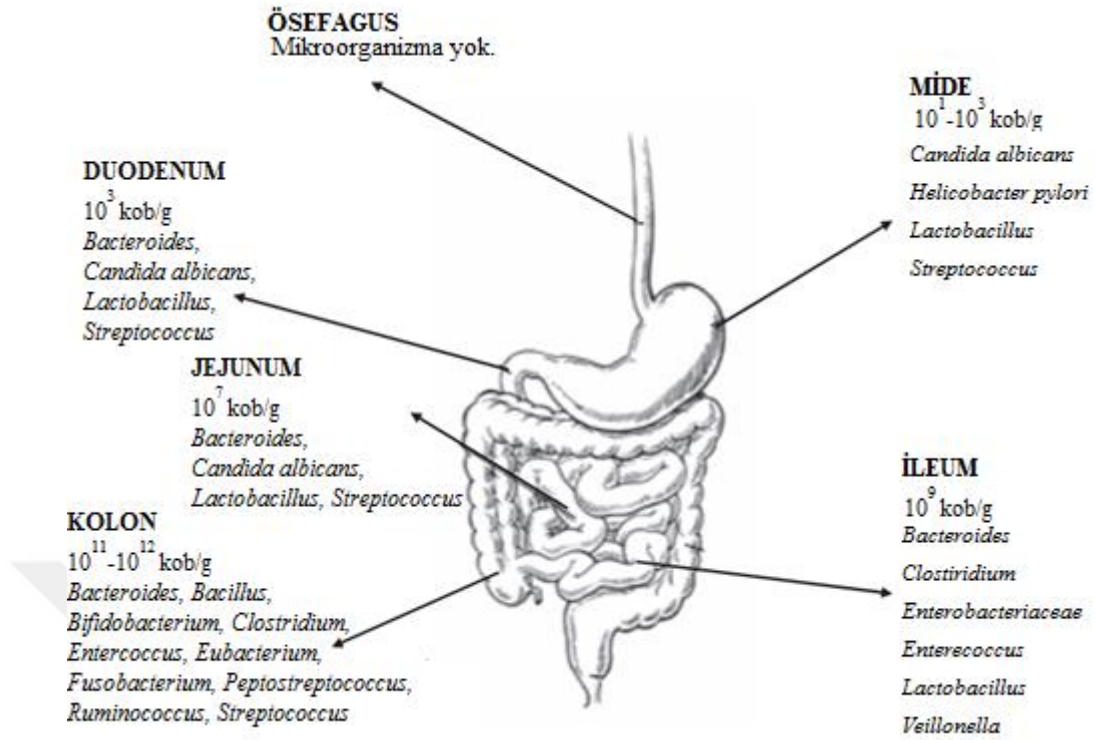
### 2.4 LAB Türlerinin Probiyotik Fonksiyonları Açısından Çeşitli Nitelikleri

Ekşi hamur gibi fermente ürünler kaynaklı LAB türlerinin fonksiyonel etkilerinin yanı sıra probiyotik fonksiyonlarının da belirlenmesi gerekmektedir. Potansiyel probiyotik

değeri olan bir mikroorganizmanın taranmasındaki en önemli parametrelerden birisi kullanılan mikroorganizmanın gastrointestinal bölgelerden geçerken metabolik aktivitesini ve tanımlanmış hedef mikroorganizmaya karşı biyolojik aktivitesini yitirmemesidir. Ayrıca son üründe ve ticarî üretim esnasında suşun canlılığını ve istenen özelliklerini koruyabilmesi de çok önemli bir husustur (Salminen vd, 1998; Gomes ve Malcata 1999; Ouwehand vd, 1999a) LAB türleri tarafından üretilebildikleri gösterilen EPS bakteri hücrelerini dış ortamdan koruyup probiyotik fonksiyonlarında önemli rol oynar. Bu açıdan LAB türlerinin zorlu sindirim şartlarını geçmesi ve daha sonra kolonize olması probiyotik fonksiyonlar açısından elzem bir husustur.

#### **2.4.1 Sindirim sistemi**

İnsan gastrointestinal sistemi mikrobiyal açıdan oldukça dinamik bir sistem olup günümüzde yeni bir organ olarak adlandırılmaktadır. Mikrobiyal yoğunluk yemek borusunda beslenmeye bağlı olarak değişiklik gösterirken midede  $10^1$ - $10^3$  kob/g, jejunumda  $10^7$  kob/g, ileumda  $10^9$  kob/g değerlerinde olurken kalın bağırsakta  $10^{11}$  -  $10^{12}$  kob/g yoğunluğa ulaşmaktadır (Şekil 2.1) (Isolauri vd, 2004). Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük ve çeşitlilik beslenme şekli, bağışıklık, pH, redoks potansiyeli, yaş ve antimikrobiyal bileşenler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Fooks vd, 1999).



**Şekil 2.1** Gastrointestinal sistemin değişik kısımlarında yer alan mikroorganizmalar (Özden, 2005)

Ürünlerdeki mikrobiyal yoğunluklarının yanı sıra probiyotiklerin tüketimi ile ilgili bir diğer önemli husus, sindirim sisteminde tutunarak aktive göstermelerine rağmen probiyotik bakterilerin sindirim sisteminde uzun süre kolonize olamamasıdır. Ayrıca sindirim sisteminde çoğalmaları yavaş gerçekleşmektedir bununla birlikte türler sindirim sisteminde oldukça aktif olabilmektedirler (Marco vd, 2006). Gıda kaynaklı LAB türlerinin bu sistemde kendine yer bulup özellikle bağırsak bölgelerine lokalize olup probiyotik fonksiyonlarını icra etmesi gerekmektedir. Bu bağlamda LAB türlerinin tutunması vs. gibi hususlar açısından LAB türlerinin ürettikleri başta EPS olmak üzere çeşitli moleküller rol oynamaktadırlar.

#### 2.4.2 LAB türleri açısından EPS üretiminin önemi ve EPS'in fonksiyonel etkileri

Son yıllarda yapılan çalışmalar LAB ve diğer türler tarafından üretilen EPS'lerin sadece ortama salgılanmaları dolayısıyla ekşi hamurun fizikokimyasal özellikleri açısından değil aynı zamanda fizyolojik ve fonksiyonel açıdan da bu bakteriler ve onların konakları veya gıda maddesi ise besleyicilik değeri açısından son derece

önemli olduklarını göstermiştir. Bu açıdan EPS, LAB hücre kılıfının en önemli öğelerindedir. EPS bakteri hücrelerini kuruma, antibiyotikler, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi antimikrobikler, ozmotik stres, fagositoz, makrofajlara karşı korur ve bakterilerin katı yüzeylere olan tutunma kabiliyetlerini artırır (De Vuyst ve Degeest, 1999; Looijesteijn vd, 2001) ve aynı zamanda biyofilm oluşturma açısından son derece önemli roller üstlenir (Walter vd, 2008). EPS insan sağlığı açısından da son derece önemli olabilmektedir, nitekim fermente süt ürünlerinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin LAB tarafından üretilen EPS nedeniyle olabileceği vurgulanmıştır (Kıtazawa vd, 1998). Örneğin EPS'lerin prebiyotik olarak fonksiyon icra edebileceği ve bağırsak mikrobiyotasını modifiye ederek sağlığı olumlu yönde etkileyeceği vurgulanmıştır (Lebeer vd, 2007). Koraklı vd, (2002) *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen fruktan tip EPS'in prebiyotik etki gösterebileceğini göstermişlerdir. Bunun yanı sıra EPS üreten türlerin kendi ürettikleri EPS'leri katabolize edemedikleri gösterilmiştir (Cerning, 1990). Aynı zamanda LAB tarafından üretilen EPS'lerin antiülser veya kolesterol azaltıcı fonksiyonlarının da olabileceği ifade edilmiştir (Ruas-Madiedo vd, 2002). Aslında EPS'in muhtemel sağlık üzerindeki etkileri genel olarak konakçı-bakteri ilişkileri ile alakalıdır ve EPS'in bu ilişkideki anahtar rolü yapı ve karakteristiğine bağlı olarak EPS'in bağışıklık sistemi üzerindeki etkisidir (Hidalgo-Cantabrana vd, 2012). Örneğin yapılan bir çalışmada yüksek moleküler ağırlığa sahip EPS üreten orijinal tür probiyotik *L. casei* shirota ile daha az EPS üreten *eps* mutantlar fare makrofaj hücrelerindeki sitokin üretimleri açısından karşılaştırılmış ve orijinal türdeki sitokin oluşumu daha az bulunmuştur. Bu EPS'in bağışıklık baskılayıcı özellikte olduğunu göstermiştir (Yasuda vd, 2008). Benzer olarak bu etki EPS üreten ve üretmeyen *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* RW-9595M suşlarında da tespit edilmiştir (Remus vd, 2012; Bleau vd, 2010). EPS'in bağışıklık sistemini baskılaması dolayısıyla konakçısı tarafından hemen uzaklaştırılmaması EPS'in probiyotik fonksiyon açısından son derece önemli olduğunu önermektedir. Nitekim yakın zamanda *Bifidobacterium breve* UCC2003'ün *in vivo* kolonize olması ve bağışıklık sistemini baskılaması EPS üretme kabiliyeti ile alakalandırılmıştır (Fanning vd, 2012). EPS'in baskılayıcı özelliğinin yanı sıra bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Vinderola vd, 2006). EPS'in bir diğer önemli rolü de hem gıda matriksinde hem de konakçıda önemli olabilecek biyofilm oluşumuna olan etkisidir. Biyofilm oluşumu genel olarak patojenik türlerde onların

uzaklaştırılabilmesi açısından önem arz etmektedir ancak son yıllarda yapılan çalışmalar LAB'nin de biyofilm oluşturabildiklerini ve EPS'in bu biyofilmlerin oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir ve probiyotik fonksiyonlar açısından biyofilm oluşturma kabiliyeti oldukça önemlidir (Lebeer vd, 2007). Örneğin *L. rhamnosus* GG ve *L. reuteri*'nin biyofilm oluşturduğu ve EPS'in biyofilm oluşumunda ve kümeleşmede (otoaggregasyon) rol aldığı gösterilmiştir (Lebeer vd, 2007; Walter vd, 2008). Bu amaçla yürütülen bir *in vivo* çalışmada *L. reuteri*'nin *gtf* geninin silinmesi ve glukan üretmemeye kolonizasyon yeteneğini azaltırken *ftf* geninin silinmesi kolonizasyonda herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Walter vd, 2008). Benzer olarak *L. reuteri* 100-21 suşunda *ftf* genin silinmesi ön mide epitelyum yüzeyinde biyofilm oluşturma açısından hiçbir değişikliğe neden olmamıştır (Sims vd, 2011). *L. rhamnosus* GG ile yapılan bir çalışmada biyofilm oluşumu üzerine sadece EPS üretim miktarının değil aynı zamanda EPS'in düzen sel ve yapısal özelliklerinin de etki edebileceği gösterilmiştir (Lebeer vd, 2007).

### 2.4.3 Düşük pH ve safra tuzlarına direnç

Probiyotiklerin mideden ince bağırsağa ulaşana kadar kolonize olabilmeleri için hayatta kalmaları gerekmektedir. İnce bağırsak sistemik dolaşımın gerçekleşeceği önemli bir bölgedir (Geboes vd, 2001; Reed ve Wickham, 2009). Probiyotik bakterilerin ince bağırsakta faaliyet gösterebilmesi için, midenin asitli ortamını (pH 1,5-3,0) geçerken canlı kalması gerekmektedir (Stanton vd, 2001; Gbassi vd, 2011). Dolayısıyla probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriterlerden biri suşların asit dirençleridir (Dunne vd, 1999). Probiyotik olarak kullanılan suşların asit dirençliliklerinin yüksek olması, midenin asidik ortamında canlılıklarını yitirmeden bağırsak sistemine ulaşmaları ve ince bağırsakta kolonize olmaları noktasında gereklidir (Vasiljevic ve Shah, 2008).

Probiyotik seçiminde kullanılan diğer bir kriter ise suşların safra tuzlarına direnç özellikleridir (Lee ve Salminen, 1995). Probiyotiklerin gastrointestinal sistemde canlılıklarını korumaları ince bağırsakta safra tuzuna dayanımları ile ilişkilidir. İntestinal sistemdeki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu %0,3-0,5 arasındadır (Begley vd, 2005a). Laktik asit bakterilerinin ince bağırsak koşullarında *in vitro* direnç düzeylerinin belirlendiği %0,3'lük safra tuzu ilavesi, mikroorganizmaların probiyotik

özelliklerinin belirlenmesinde kritik önem taşımaktadır. (Charteris vd, 1998; Maragkoudakis vd, 2006). Safra, yağların ayrılmasında ve emiliminde rol oynayan kompleks bir sindirim salgısı olarak bilinmektedir (Russel ve Setchell 1992). Safra asitleri antimikrobiyal aktivite içeren amfipatik moleküller olarak açıklanmıştır. Gram (+) bakteriler çevrelerinde bulunan toksik ajanlara karşı Gram (-) bakterilerden daha duyarlıdır (Thanassi vd, 1997). Gram (-) ve Gram (+) bakteriler safranın toksik etkisine direnç gösterebilmek ve sindirim sistemi gibi safra bakımından zengin ortamlarda canlı kalabilmek için özgül mekanizmalar geliştirmişlerdir (Gunn, 2000).

Yapılan bir çalışmada *L. plantarum* türünün sağlıklı bir insanın gastrointestinal sistemi boyunca kolonize olan en belirgin bakteri olduğu ortaya atılmıştır. (De Vries vd, 2006). Aynı şekilde diğer bir çalışmada ise farklı pH konsantrasyonlarına dirençliliği ile ilgili *L. fermentum* suşu üzerinde denemeler gerçekleştirilmiş, pH 3 ortamında inkübe edilmiş ve gelişmesi izlenmiştir. Bu suşun hayatta kalmak için asitli ortamlara dayanıklı olduğu ortaya konulmuştur. Yine *L. fermentum* suşları farklı safra konsantrasyonlarında da test edilmiş ve 3 g.L<sup>-1</sup> safra tuzu ile inkübasyonu sonucunda safraya dirençli olduğu belirlenmiştir. *L. fermentum* suşunun pH ve safraya dirençli olduğu belirlenmiş ve bu nedenle probiyotik bakteri olarak potansiyeli olduğu kabul edilmiştir (Pan vd, 2011).

Bu bağlamda ekşi hamurdan izole edilen LAB'nin düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençleri belirlenerek probiyotik potansiyelleri açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.

#### **2.4.4 Hidrofobisite nitelikleri**

Bağırsak mukozasına tutunma kolonizasyon için önemlidir ve probiyotik mikroorganizmaların seçiminde gerekli olan önemli kriterlerden biridir (Ouwehand vd, 2001). Probiyotik bakterilerin tutunması onların bağırsak sisteminde uzun süre kalabilmesi ve taşıdıkları yararlı özellikleri gösterebilmeleri için önemlidir (Coconnier vd, 1992). Probiyotik mikroorganizmaların tutunması ile patojenlerin kolonizasyonunun azaltıldığı, immün sistemin modüle edildiği ve zarar gören mukozanın iyileşmesinde artış görüldüğü belirlenmiştir (Green ve Klaenhammer, 1994; Ouwehand vd, 1999b). Probiyotik kültürlerin bağırsağa ulaşması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten

mukus tabakasına ve epitel hücrelere kolonize olması gerekmektedir. Bu olay, enteropatojenlere karşı antogonistik etki göstermesi için önemlidir (Bernet vd, 1993; Ouwehand vd, 2001). Probiyotik türlerin bağırsak dokularına tutunması ile alakalı *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* çeşitli metotlar geliştirilmiştir, bu metotlara ilaveten LAB/probiyotik türlerin spesifik çözenlere tutunması bu türlerin bağırsak dokularına tutunma kabiliyeti hakkında bilgi veren basit, kolay uygulanabilir ve önemli bir metottur. Dolayısıyla bu çalışmada tutunma testleri hidrofobisite nitelikleri belirlenmiştir.

#### **2.4.5 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi**

Probiyotik bakterilerin bağırsak sisteminde var olan patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkileri önemli bir yere sahiptir. Probiyotik bakterilerin bağırsak sisteminde canlı olmaları önemlidir. Bu bakterilerin pH, safra tuzlarına karşı tolerans ve dayanıklılıkları ile birlikte çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilikleri de seçimde önemlidir (İşleroğlu vd, 2008). Probiyotik tedavisinin, antibiyotik tedavisi yerine alternatif olacağı düşünülmektedir (Dhanani vd, 2011). Probiyotik kültürler farklı gıda ürünlerine kullanılabileceği için antibiyotik direnç genlerinin yayılması noktasında önemli bir potansiyel kaynak olma ihtimalleri vardır (D'Aimmo vd, 2007). Dolayısıyla probiyotik olabilecek türlerin antibiyotik direncinin mümkünse mevcut olmaması gereklidir. *Lactobacillus*'ların genel olarak cefoxitin, ciprofloxacın, kanamycin, gentamicin, streptomycin, teikoplanin, kotrimoksazol ve vancomycine yüksek derecede dirençli oldukları tespit edilmiştir (Danielsen ve Wind, 2003). Bu bağlamda ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi elzemdir.

#### **2.4.6 Antimikrobiyal üretimi**

Probiyotik mikroorganizma seçim kriterlerinden birisi de patojenlere ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasıdır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitler, CO<sub>2</sub>, diasetil, biyosüfaktan maddeler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve protein yapısındaki bileşikler (bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler) gibi metabolitlerin birçoğunun antimikrobiyal etkisi vardır (Mishra ve Lambert, 1996; Rolfe, 2000; Reid vd, 2001).



Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretiminden kaynaklanan antagonistik aktiviteleri Sanni vd, (1999) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada fermente tahıl ürününden (Ogi, Nijerya) *L. plantarum* (3 suş), *L. delbrueckii* (1 suş), *L. brevis* (2 suş), *L. reuteri* (2 suş), *L. casei* (1 suş), *L. fermentum* (1 suş) ve *L. acidophilus* (1 suş) olmak üzere 11 adet mikroorganizma izole edilmiştir. Araştırma sonunda izole edilen 11 bakteriden 8 tanesinin, denemede kullanılan 29 adet indikatör mikroorganizmadan aralarında *Yersinia enterocolitica*, *Esherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. reuteri*'nin de bulunduğu 13 suşa karşı bakteriyosin kaynaklı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar LAB türleri tarafından nisine ilaveten onlarca farklı bakteriyosinin üretilebileceğini göstermiş ve son dönemde bu çalışmalara farklı kaynaklardan izole edilen türlerin bakteriyosin üretme kabiliyetlerinin yanı sıra üretilen bu bakteriyosinlerin genetik manipülasyon ile daha etkin bileşenlere dönüştürülmesi bağlamında yürütülmektedir (O'Shea vd 2013). Bu bağlamda öncelikle yapılması gereken bakteriyosin üreten LAB türlerinin ortaya konmasıdır. Antimikrobiyal aktivite probiyotik seçim kriterleri bakımından önem arz etmektedir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Bu çalışmada 114O695 nolu TUBİTAK projesi çerçevesinde ekşi hamurdan izole edilip tanımlanmış LAB türleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan bakteriler ve suş kodları

Suş kodu	Tür
<b>N6</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<b>N7</b>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<b>N9</b>	<i>Weissella cibaria</i>
<b>N13</b>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<b>N15</b>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<b>N19</b>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<b>ED1</b>	<i>Lactobacillus rossiae</i>
<b>ED5</b>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<b>ED10</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>E25</b>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<b>E106</b>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>

#### 3.1.1 Bakteriyel kültürler ve gelişme şartları

Bu çalışmada kullanılan LAB türleri aksi belirtilmedikçe MRS besiyerinde 30 veya 37 °C’de aerobik olarak geliştirilmiştir.

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Ekşi hamur kaynaklı LAB’den EPS izolasyonu

Ekşi hamur izolatlarından EPS izole edilmiştir. Bu amaçla ekşi hamur izolatları 15 ml’lik tüplerde anaerobik olarak bir gece geliştirilmiş ve takiben %1 oranında 100 ml

ek olarak %1 sükröz içeren MRS besiyerine inoküle edilmişlerdir. İnkübasyon işlemi 30 ve 37°C'de ve aerobik-anaerobik olarak 24-48 saat gerçekleştirilmiş ve takiben EPS izole edilmiştir. Daha sonra ekşi hamur örneklerinden EPS izolasyonu için ilk olarak hücreler  $6000 \times g$  (4°C, 30 dakika)'de elde edilmiş, bakteriyel çökelti ve supernatant ayrılmıştır. Elde edilen supernatanta eşit miktarda soğuk etanol ilave edilerek EPS çökeltiştir. Bir gece 4°C'de bekletilen örnekler  $10000 \times g$ 'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra çökelen EPS toparlanmıştır. EPS çökeltisi daha sonra suda hafif bir ısıtma işlemi ile (50°C'de) çözülmüş ve 2 katı kadar soğuk etanol ilave edildikten sonra bir gece daha 4°C'de bekletilmiştir. EPS tekrar santrifüj ile elde edilmiş ve H<sub>2</sub>O'da çözülerek EPS dışında bulunabilecek şeker bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için çökelti 3 gün boyunca diyaliz işlemine (12000-14000 Da) tabi tutulmuştur. Daha sonra EPS'e karışmış olabilecek protein bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için diyaliz işlemine tabi tutulmuş EPS çözeltileri %10'luk TCA ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında 3-4 saat hafif çalkalamalı şartlarda inkübasyonun ardından çökelen proteinler  $10000 \times g$ 'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek EPS'den ayrılmıştır. Bu işlemin ardından EPS süspansiyonunun pH'sı 7,0'ye ayarlanmış ve süspansiyona 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek 4°C'de bir gece çökeltme işlemi uygulandıktan sonra çökelen EPS elde edilip H<sub>2</sub>O'da çözülmüştür.

### **3.2.2 EPS kimyasal yapısının tespiti amacıyla modifiye BHI besiyerinin oluşturulması**

MRS besiyerinde bulunan maya ekstraktı bünyesinde gluklan içerebilmekte ve dolayısıyla EPS'lerin kimyasal yapılarının belirlenmesinde sorun oluşturabilmektedir. Bu sorunun önüne geçmek adına ilk defa bu çalışma kapsamında oluşturulmak üzere modifiye BHI besiyeri hazırlanmıştır. BHI kimyasal formülasyonu mümkün olduğu kadar MRS'e yakın bir hale getirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca ekşi hamur izolatlarının glukansükraz aktivitesine bağlı olarak EPS üretebilecekleri öngörülmüştür. Glukansükraz aktivitesi içinde karbon (C) kaynağı olarak sükröze ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla modifiye BHI besiyeri glukozu ilaveten sükröz C kaynağı olacak şekilde hazırlanmıştır. Modifiye BHI besiyerinin formülasyonu: beef heart 5 g.L<sup>-1</sup>, calf brains 12,5 g.L<sup>-1</sup>, disodium hydrogen phosphate 2,5 g.L<sup>-1</sup>, peptone 10 g.L<sup>-1</sup>, sodium chloride 5 g.L<sup>-1</sup>, glucose 10 g.L<sup>-1</sup>, sucrose 20 g.L<sup>-1</sup>, tween 20 1 g.L<sup>-1</sup>, sodium acetate 5 g.L<sup>-1</sup>, peptone casein 5 g.L<sup>-1</sup>, peptone meat 5 g.L<sup>-1</sup> ve magnesium sulfate 0,2

g.L<sup>-1</sup>. Aynı şekilde sükröz ilaveli olarak MRS besiyerinden de kimyasal yapının test edilmesi amacıyla EPS izole edilmiştir.

### 3.2.3 EPS kimyasal yapısının aydınlatılması

Ekşi hamur izolatlarından izole edilen LAB'lerin 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 nötralize edildikten sonra hacimleri 30 ml'ye tamamlanmıştır. İşlem sonunda tüpler 1600 × g'de 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.

### 3.2.4 Ekşi hamur izolatlarında glukansükraz aktivitesinin test edilmesi ve hücresel yerlerinin tespiti

Ekşi hamur izolatlarında EPS üretiminin tespit edilmesini takiben bu türlerde glukansükraz aktivitesi tespit edilmiştir. Ekşi hamurdan izole edilen LAB: *Lactobacillus paralimentarius* E106, *L. rossiae* ED1, *L. mesenteroides* N6, *L. pseudomesenteroides* N13, *L. curvatus* N19, *Weissella cibaria* N9, *L. brevis* E25, *L. paraplantarum* N15 ve *Leuconostoc pseudomesenteroides* N13'tür. Bu amaçla her bir tür C kaynağı olarak sükröz içeren modifiye BHI besiyerinde son hacimleri 100 ml olacak şekilde 30°C'de son pH'ları 5,0 oluncaya kadar geliştirilmiştir. Takiben bütün kültürlerin pH'ları 5 M steril NaOH kullanılarak 5,4'e ayarlanmıştır. Kültürlerde sonrasında 4°C'de 8000 × g'de 20 dk santrifüj işlemini takiben kültür supernatantı ve

pelet kısımları her iki kısımda da glukansükraz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ayrılmıştır. Hücre peletleri iki defa 20 mM Sodyum asetat pH 5,4 tamponu ile yıkanmış ve bu tamponun 100 ml’de toplanmıştır. Supernatant ve peletlerde ivedilikle glukansükraz aktivitesi belirlenmiş ve kullanılmayan örnekler sonraki kullanımlar amacıyla -25°C’de saklanmıştır. Glukansükraz aktivitesi 3,5-dinitrosalicilyic acid (DSS) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla kültür peletleri ve süpernatantlarından alınan 3 ml’lik örnekler 3 ml 292 mM sükroz ile 30°C’de inkübe edilmiş ve takiben oluşan glukozun seviyesi DSS metodu ile tespit edilmiştir (Sumner ve Howell, 1935). Bir glukansükraz ünitesi ilgili enzimin 292 mM sükrozu 20 mM sodyum asetat (pH 5,4) tamponunda her bir 30 dk’da 1 µmol glukoz oluşumunu katalizlemesi olarak tanımlanmıştır.

### 3.2.5 Ekmeğin kontrollü küflendirilmesi ve küflerin tanımlanması

Küf türlerin tespiti amacıyla genotipik karakterizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada kontrollü şartlar altında küflendirilen ekmekten morfolojik özelliklerine bakılarak birbirinden farklı olduğu düşünülen küfler seçilmiş seçilen küfler saflaştırılmak amacıyla PDA’ya (Potato Dextrose Agar, Merck) çizilmiştir. Fenol-kloroform metodu ile küf ekstrakte edilmiştir. Daha sonra PCR işlemine geçilmiştir. Aynı şekilde PCR işlemi için gerekli şablon DNA, 450 µl lizis buffere steril kürdan ile alınmıştır ve daha sonra denatüre edilmesi neticesinde elde edilen süspansiyondan temin edilmiştir. Fenol-kloroform metodunun uygulanışı ise şu şekildedir: PDA’ya çizilen küf örnekleri 450 µl lizis buffere steril kürdan ile alınmıştır. 4°C’de 10 dakika 5000 × g boyunca santrifüj edilerek pelet halinde toplanmıştır. Takiben süspansiyona %10’luk SDS’den 50 µl ve Proteinaz K’dan 2 µl ilave edilmiş 1 saat boyunca 37°C’de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımından 0,5 ml içeriğe ilave edilmiş, baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C’de 10 dakika boyunca 5000 × g’de santrifüjlenmiş ve vizkozitesi yüksek süpernatant toplanarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Proses fenol-kloroform karışımı ile bir kez daha tekrarlanmış ve süpernatant tekrar yeni bir tüpde toplanmıştır. Takiben 5 M sodyum asetatdan 50 µl içeriğe ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Sonrasında ise izopropanol’dan 1 ml ilave edilir ve çöken DNA’nın iplikleri oluşana kadar ters çevrilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 10 dakika boyunca 4000 × g’de

santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl %70'lik etanol ilave edilir. Son olarak DNA'nın etanol ile yıkanması amacıyla 4000 × g'de 10 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanmış ve pelet 37°C'de 5-10 dakika kurutulduktan sonra distile sudan 100 µl ilave edilerek ekstrakte edilen DNA çözülmüştür. Sonuç olarak DNA ekstrakte edilmiş ve sonraki PCR işlemlerinde kullanılmıştır.

### 3.2.6 Küflerin RAPD-PCR ile genotipik karakterizasyonu

Küf izolatlarının genotipik olarak farklı olup olmadıklarının tespiti için M13 primeri (5'- GAGGGTGGCGGTTCT-3') kullanılarak RAPD-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla hazırlanan PCR reaksiyonu 1 µl şablon DNA, 10 µl 5 × PCR buffer (Promega), 0,4 µl dNTP (Bioline), 2 µl 20 mM primer M13, 0,25 µl Taq polimerase (Promega) ve 50 µl'ye kadar steril H<sub>2</sub>O içermektedir. PCR işlemi içinde ilgili program kullanılmıştır: 35 döngü olmak üzere 94°C'de 1 dk, 40°C'de 20 s ve 72°C'de 2 dk. (Oguntoyinbo vd, 2010).

PCR (Benchmark, TC9639) işlemi sonunda elde edilen ürünlerden 10 µl %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve ürünler 90 V'da 1,5 saat boyunca yürütülmüş takiben jeller etidium bromid solüsyonunda boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenip fotoğraflanmıştır.

### 3.2.7 26S rRNA geni ile küfleri tanımlama

DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilen küflerin tanımlama işlemi 26S rRNA geninin D1/D2 bölgesinin ampilifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla PCR miksi hazırlanırken NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3') ve NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu primer çifti 600 bp olan genin tamamının ampilifikasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Bu amaçla reaksiyon miksi; Şablon (DNA) 1 µl, 5x tampon 10 µl, dNTP 0,4 µl, Primer F (20 µM) 1 µl, Primer R (20 µM) 1 µl, GoTaq 0,25 µl ve H<sub>2</sub>O 36,35 µl olmak üzere 50 µl olarak hazırlanmış ve PCR işlemi içinde; 95°C 10 dk, 40 döngü; 94°C 1 dk, 54°C 2 dk, 70°C 3 dk ve 72°C 7 dk şartları uygulanmıştır (Vilela vd, 2005). PCR işlemi bittikten sonra PCR işleminin sonucunu görmek için PCR karışımından 10 µl ve DNA ladder ile birlikte agaroz jelde elektroforez işlemi uygulanmış ve etidium bromide ile

boyandıktan sonra jel görüntülenmiştir. Pozitif sonucu takiben PCR ürünleri saflaştırılmış (Sure Clean, Bioline) ve DNA konsantrasyonu tekrar agaroz jelde görüntüledikten sonra belirlenmiş ve sekanslama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Big Dye sistemi kullanılmıştır. Aynı şekilde sadece 26S PCR işleminin ürünleri hiçbir saflaştırma ve sekanslama işlemine tabi tutulmadan da sekanslama için uygun yerlere gönderilmiştir. Sekanslama işlemi için örnekler ülkemizde bu işlemi gerçekleştiren firmalara yollanmıştır. Sekanslama sonucuna göre 400-1200 bp nükleotit BLAST ve ribosomal database sistemlerine yüklenmiş ve şimdiye kadar tanımlanmış mevcut 26S sekansları ile karşılaştırıldıktan sonra ve BLAST sisteminde %97-99 arasında, ribosomal database'de ise 0,97-1 oranında benzerlik gösteren izolatların o türe ait olduğu belirlenmiştir. Küf izolatlarının 26S sekans bilgileri NCBI Genbank databankasına yüklenmiş ve erişim numaraları alınmıştır.

### **3.2.8 LAB türlerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi**

Ekşi hamur izolatları %1 inokulasyon olacak şekilde MRS broth içerisinde 37°C'de bir gece geliştirilmiştir. *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum*'e karşı antifungal özelliği tespit edilmiştir. Cabo, Braber ve Koenraad'ın (2002) belirlemiş olduğu metotta bir takım değişiklikler yapılarak analiz yürütülmüştür. MRS agar dökülen petriyerler 37°C'de 3 saat kurutulmuştur. Üç kopya halinde spot yöntemiyle 10 µl ekim yapılmıştır. 37°C'de petriyerler ters konumda bir gece inkübe edilmiştir. 10 ml yumuşak PDA (%0,8 agar) içine küf ilave edilerek gelişen laktik asit bakterilerin üzerine ekilerek 25°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. LAB etrafında oluşan inhibisyon zonları kaydedilmiştir.

### **3.2.9 Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin belirlenmesi**

Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin değerlendirilmesi için, türler MRS ortamı içinde bir gece boyunca, aerobik olarak geliştirildikten sonra %1 kontrol olarak MRS ortamında kültür tekrar geliştirilmiştir ve MRS ortamında %0,3 (w/v) konsantrasyonda safra tuzları ihtiva eden (Bovine bile, Sigma) ve 1 M HCl kullanılarak pH 4'e ayarlanmıştır, OD<sub>600</sub>'de 1'e ayarlanmıştır. Bütün türler 10 ml deney tüplerinde 37°C'de sarsılmadan inkübe edilmiştir ve gelişmeleri her dört saate

bir 24 saat boyunca spektrofotometre (PG Instruments, T60) kullanılarak OD<sub>600</sub> ölçülmüştür (İspirli vd, 2015).

### 3.2.10 LAB türlerinin hidrofobisite niteliklerinin belirlenmesi

Hidrofobisite testi Sağdıç vd, (2014) belirlediği metoda göre uygulanmıştır. Hidrofobisite LAB türlerinin N-hekzadekan, ksilen, di etil eter ve N-hekzana tutunma testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gece geliştirilen türler santrifüj (6000 × g, 4°C'de; 10 dk) edildikten sonra iki defa 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözeltisi ile yıkanmıştır ve aynı çözeltide OD<sub>600</sub>'de 0,8 olacak şekilde süspanse edilmiştir. Süspanسیونun pH'sı 3 olarak 1M HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Ardından 2 ml bakteriyel süspanسیون ve eşit miktarda N-hekzadekan 10 ml deney tüpüne konularak ve yaklaşık 1 dk boyunca vortekslendikten sonra 20 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra üstteki akıcı faz ayrılıp süspanسیونun birleşik kısmından 1 ml alınarak OD<sub>560</sub>'da ölçülmüştür.

Böylece;

$$\% \text{ Tutunma} = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (3.1)$$

formülü ile belirlenmiştir. A<sub>0</sub> ilk OD, A<sub>1</sub> ise 20 dakikalık inkübasyonun sonundaki OD'dir. Belirtilen işlemler diğer çözenlerle de yürütülmüştür.

### 3.2.11 LAB türlerinin antibiyotik hassasiyet niteliklerinin belirlenmesi

Seçilen LAB türleri için antibiyogram testi antibiyotik difüzyon diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İspirli vd, (2015) belirlediği metoda göre geliştirilen bakteriler 10<sup>7</sup> kob/ml olacak şekilde ayarlanmış ve 100 µl MRS agara yayılmıştır. Ardından antibiyotik diskler petri kutusuna uygulanmıştır. Antibiyotiklerin test konsantrasyonu ise ampicillin (Amp, 10 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), kanamycin (K, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), vancomycin (VA, 30 µg), gentamicin (Cn, 10 µg), rifampicin (Rd, 5 µg), carbenicillin (CAR, 100 µg), amoxicillin (Aml, 25 µg), oxacillin (Ox, 1 µg) ve streptomycin (S, 10 µg), (Oxoid, İngiltere) şeklindedir. Antibiyotik uygulanan petriler 37°C'de 24 saat geliştirilmiş ve oluşan inhibisyon



zonları kaydedilmiştir. Böylece LAB türlerinin antibiyotik hassasiyetleri belirlenmiştir.

### 3.2.12 LAB türlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Ekşi hamur izolatlarının antimikrobiyal etkileri 5 patojene karşı belirlenmiştir.

**Çizelge 3.2** Çalışmada kullanılan patojen bakteriler ve suş kodları

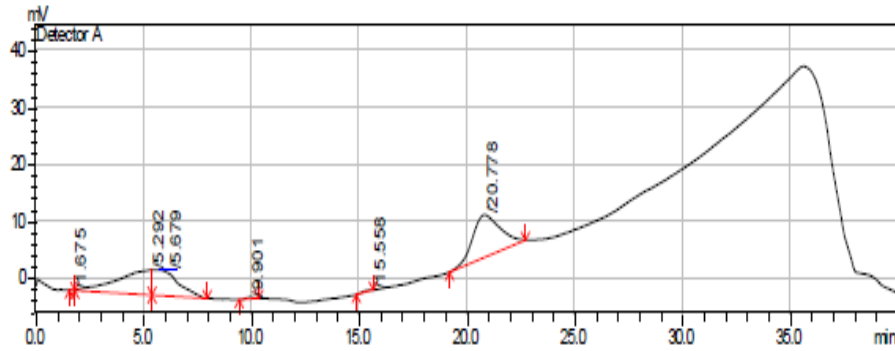
Suş kodu	Tür
<b>P12</b>	<i>Escherichia coli</i> BC 1402
<b>P60</b>	<i>Bacillus cereus</i> BC 6830
<b>P78</b>	<i>Salmonella typhimurium</i> RSSK 95091
<b>P91</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729
<b>P94</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

Bütün patojenler TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) besiyerinde aerobik koşullarda 37°C'de geliştirilmiştir. Bakteri izolatları %1 inokülasyon olacak şekilde geliştirilmiştir ve antimikrobiyal aktivite testi İspirli vd, (2015) belirlediği metoda göre yürütülmüştür. Bakterilerin antimikrobiyal etkinliğinin saptanması için, kültürler 10 ml MRS broth içinde %1 inokülasyon ile bir gece boyunca 37°C'de geliştirilmiştir. Hücreler, 5 dakika boyunca 20000 × g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatanttan tüm bakteri hücreleri uzaklaştırmak için süpernatant steril bir 0,22 µm şırınga filtreden filtre edilmiştir. Filtre edilen süpernatantın pH'sı NaOH ile pH 6,0'ya ayarlanmıştır. Muhtemel engellerin ortadan kaldırılması için 30 dakika boyunca 25°C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz (Merck) ile uygulama inhibisyonu, takip eden organik asitler ilave edilmiştir. 20 µl süpernatantları her bir suş için nihai bir filtrelenme aşaması uygulanmıştır ve inhibisyon bölgeleri ölçülmesi için hedef patojen suşları TSA'ya dökme yöntemiyle ekilmiştir 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası antimikrobiyal aktivite inhibisyon bölgesinin zon çapları mm cinsinden kaydedilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1 Ekşi Hamur İzolatları Tarafından Üretilen EPS'in Karakterizasyonu

Ekşi hamur izolatlarından *L. plantarum* ED10, *L. paralimentarius* E106, *L. rossiae* ED1, *Leuc. mesenteroides* N6, *L. pseudomesenteroides* N13, *L. curvatus* N19, *W. cibaria* N9, *L. brevis* E25 ve *L. paraplantarum* N15 sükröz içeren modifiye BHI besiyerinde geliştirilmiş ve izolatların ürettiği EPS'in içerebileceği şeker gruplarının tespiti amacıyla HPLC işlemi uygulanmıştır. Bütün türlerden EPS başarılı bir şekilde izole edilmiştir. HPLC analizi neticesinde bütün türlerin kromotogramında farklı oranlarda tespit edilmek kaydıyla sadece glukoz tespit edilmiştir (Şekil 4.2). HPLC işlemi ile sükröz ve glukozun tutma süreleri sırasıyla 17,396 dk ve 20,593 dk olarak bulunmuştur. Şekil 4.2'de *L. plantarum* ED10'a ait HPLC kromotogramlarını göstermektedir. Kromatogramdan da görüleceği üzere ED10'da tespit edilen tek şeker ünitesi glukoz olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra modifiye BHI'dan kaynaklanan sükrözde kromotogramda tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 *L. plantarum* ED10 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı

(HPLC kromatogramından elde edilen glukozun pik alanı ile hesaplanmış glukoz seviyesini göstermektedir. 20,593 dk'dan sonra glukoz tespit edilmiştir).

Sonuç olarak *L. plantarum* ED10 dahil olmak üzere bütün türlerde sadece glukozun monomer olarak bulunuşu, ekşi hamur izolatlarının sükrözün C kaynağı olarak varlığında sadece glukoz içeren glukan yapısında homopolimerik EPS ürettiklerini göstermektedir. Aynı şekilde sükröz bulunan ortamda glukoz üretimi bütün türlerin

homopolimerik *gtf* genlerinin glukansükraz aktivitesinde olduğunu öne sürmektedir. Sonuç olarak ekşi hamur izolatlarının HPLC analizi, bütün izolatların modifiye BHI'daki sükrozu kullanarak sadece glukozdan oluşan homopolimerik EPS ürettiklerini göstermiştir.

Son dönemde yapılan çalışmalar *in situ* EPS üretiminin ekşi hamur ve ekmeğinin teknolojik ve fizikokimyasal özellikleri üzerine olan olumlu etkilerinden dolayı ekşi hamur izolatu LAB türlerinin EPS üretiminin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Galle ve Arendt, 2014; Galle vd, 2011; Palomba vd, 2012; Tiekıng vd, 2003; Wolter vd, 2014). LAB türlerinde EPS biyosentezinin mekanizması iyi bir şekilde tanımlanmıştır (Horn vd, 2013) ve LAB türleri heteropolimerik (Lebeer vd, 2009) veya homopolimerik (Kralj vd, 2002) ya da her iki tür EPS'i üretme kabiliyetindedirler (Dertli vd, 2013; Van Der Meulen vd, 2007). Heteropolimerik EPS üretiminden farklı genleri (*epsA*, *epsB*, *epsD-epsE*) bir arada bulunduran bir *eps* gen kümesi sorumlu iken (Horn vd, 2013) homopolimerik EPS üretiminden (*gtf* veya *ftf*) ise sadece tek bir gen sorumludur (Palomba vd, 2012).

Tanımlanan ekşi hamur izolatlarının tümü sükroz içeren modifiye BHI ortamında geliştirilmesi ile sükrozun varlığında homopolimerik EPS ürettikleri gösterilmiştir. Burada dikkat çeken bir husus toplanan ekşi hamur örneklerinin hepsinde EPS üretiminin gerçekleşmesi olmuştur. Aslında bu husus daha önce Tiekıng vd, (2003) tarafından da dile getirilmiş ve kendiliğinden fermentasyon ile oluşan herhangi bir ekşi hamurun EPS üreticisi LAB türlerini içermeye ihtimalinin çok yüksek olacağı şeklinde ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi Fransız ekşi hamurlarından izole edilen bütün türlerin EPS ürettiği gösterilmiştir (Bounaix vd, 2009).

HPLC sonuçları izole edilen tüm türlerin sadece glukozdan oluşan glukon yapısından olabilecek EPS'lerin sükrozdan ürettiğini ortaya koymuştur. Ekşi hamur izolatlarının hepsi daha önce farklı yapıda EPS üreticisi olarak gösterilmiştir. *L. paraplantarum* daha önce plasmid orijinli bir *eps* gen kümesi vasıtasıyla glukoz, ramnoz, galaktoz ve mannoz içeren heteropolimerik EPS üreticisi bir tür olarak gösterilmiş olup (Zivkovic vd, 2015) homopolimerik EPS üretiminin bu türde gösterilmiş olması oldukça önemlidir. Diğer yandan ekşi hamur izolatları *L. brevis* ve *L. plantarum* hem homopolimerik (Martensson vd, 2003) hem de heteropolimerik EPS (Suzuki vd, 2013)

üretme kabiliyetinde olup *W. cibaria*, *L. pseudomesenteroides* ve *L. mesenteroides*'in ise şimdiye kadar sadece homopolimerik EPS ürettikleri gösterilmiştir (Bounaix vd, 2009; Paulo vd, 2012).

Genel olarak elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi (Palomba vd, 2012; Tiekıng vd, 2003) ekşi hamur bazlı LAB türlerinde EPS üretiminin çok yaygın olduğunu doğrulamaktadır. LAB türlerinin EPS üretim nedenleri ile alakalı hücrelerin dış etkilerden korunması, biyofilm oluşturma ve özellikle insan ve hayvan bazlı türlerde tutunmanın sağlanması gibi (Dertli vd, 2015) yaklaşımlar söz konusu olmakla birlikte LAB türlerinin neden EPS ürettikleri ile alakalı temel sebep hala belirsizliğini korumaktadır. Bunun yanı sıra LAB türlerinin kendi ürettikleri EPS'i enerji kaynağı olarak kullanabildiklerini gösteren henüz bir çalışma mevcut değildir. Ekşi hamur gibi fermantasyonun cereyan ettiği ve gelişen türlerin son derece önemli olduğu kompleks ortamlarda LAB türleri tarafından üretilen EPS'in prebiyotik etkisi olduğu düşünülmektedir.

#### **4.2 Ekşi Hamur İzolatlarının Glukansükraz Aktivitesi**

*Leuc. mesenteroides* N6, *W. cibaria* N9, *L. plantarum* ED10, *L. pseudomesenteroides* N13, *L. curvatus* N19, *L. paraplantarum* N15, *L. brevis* E25, *L. rossiae* ED1 ve *L. paralimentarius* E106'da hücre dışı glukansükraz aktivitesinin kültür supernatantı veya hücre peletlerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı ve türler arasındaki aktivite farklılıklarının tespiti amacıyla türlerin glukansükraz aktiviteleri tespit edilmiştir. Çizelge 4.1 ilgili tür hücrelerinin peletlerinden elde edilmiş hücre duvarı bazlı ve kültür supernatantlarından elde edilmiş çözünebilir fraksiyonlarının glukansükraz aktivitelerini ( $U \cdot ml^{-1}$ ) göstermektedir. Ekşi hamur izolatlarının glukansükraz aktivitesi hem hücresel kısımda hem de kültür supernatantında gözlenmekle birlikte belli türlerin hücre ile alakalı kısımlarının glukansükraz aktivitesi diğer kısma göre oldukça yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1** LAB'nin çözünür ve hücre duvarına bitişik fraksiyonlarının glukansükraz aktivitesi

Suş	Hücre duvarı bazlı aktivite (U.ml <sup>-1</sup> )	Çözünebilir aktivite (U.ml <sup>-1</sup> )
N6	0,205 ± 0,01	0,252 ± 0,01
N9	0,179 ± 0,043	0,218 ± 0,02
N13	0,26 ± 0,03	0,195 ± 0,025
N19	0,279 ± 0,008	0,101 ± 0,025
N15	1,661 ± 0,44	0,220 ± 0,024
ED1	1,756 ± 0,31	0,191 ± 0,017
ED10	1,781 ± 0,32	0,183 ± 0,03
E25	1,631 ± 0,28	0,208 ± 0,05
E106	0,638 ± 0,05	0,19 ± 0,06

Her bir değer iki bağımsız glukansükraz aktivitesi ölçümünün ortalaması ± standart sapma değerini göstermektedir.

*Leuc. mesenteroides* N6, *W. cibaria* N9, *L. pseudomesenteroides* N13 ve *L. curvatus* N19'un glukansükraz aktiviteleri lokalizasyona bağlı olarak pek değişmemekle birlikte hücre ile ilgili kısım ve çözünebilir fraksiyonlarda sırasıyla 0,2 – 0,25; 0,18 – 0,25; 0,26 – 0,19 ve 0,28 – 0,1 U.ml<sup>-1</sup> düzeyinde glukansükraz aktiviteleri ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte *L. paraplantarum* N15, *L. rossiae* ED1, *L. plantarum* ED10, *L. brevis* E25'te hücresel kısmın çözünebilir kısma göre glukansükraz aktivitesi yaklaşık olarak 8 kat daha yüksek gözlenmiş ve bu türlerde hücre ile ilgili kısım ve çözünebilir fraksiyonlarda sırasıyla 1,66 – 0,22; 1,75 – 0,19; 1,78 – 0,18 ve 1,63 – 0,208 U.ml<sup>-1</sup> düzeyinde glukansükraz aktivitesi tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *L. paralimentarius* E106'nın hücre ile ilgili ve çözünebilir fraksiyonları arasında yaklaşık olarak 3 katı kadar farklılık olmak koşulu ile glukansükraz aktivitesi her iki kısım için 0,63 ve 0,19 U.ml<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere glukansükraz aktivitesi türler arasında ve türlerin farklı fraksiyonlarında farklılık arz etmektedir. Genel itibariyle hücrelerin çözünebilir fraksiyonlarının glukansükraz aktiviteleri birbirlerine oldukça benzerlik gösterirken türler arasındaki farklılığı belirleyen hücre peleti ile alakalı glukansükraz aktivitesi olmuş ve özellikle *L.*

*paraplantarum* N15, *L. rossiae* ED1, *L. plantarum* ED10, *L. brevis* E25 bu aktiviteleri yönünden öne çıkmıştır. Sonuç olarak elde edilen sonuçlar türlerin glukansükraz aktivitesini ve türler arasında ve türlerin farklı lokalizasyonlarında glukansükraz aktivitelerinin farklılık arz ettiğini ortaya koymuştur.

Bu çerçevede *L. curvatus*, *L. paraplantarum*, *L. brevis*, *W. cibaria*, *L. plantarum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. mesenteroides*, *L. rossiae* ve *L. paralimentarius* türlerinin hepsi glukansükraz aktivitesi göstermiştir.

Genel olarak ekşi hamur, farklı fermente ürünler, insan ve hayvan gastrointestinal sistemleri gibi farklı orijinli LAB türlerinin glukansükraz aktivitesi göstererek sükrozdan farklı glikozidik bağlar içeren glukun üretmeleri genel bir karakteristiktir (Bounaix vd, 2009; Van Hijum vd, 2006).

Ekşi hamur izolatlarına yapılan glukansükraz aktivite testleri aktivitesinin lokalizasyona bağlı olarak türler arasında farklılık arz ettiğini göstermiştir. Bu türlerden *Leuc. mesenteroides* N6, *W. cibaria* N9, *L. pseudomesenteroides* N13 ve *L. curvatus* N19'un glukansükraz aktiviteleri lokalizasyona bağlı olarak pek değişmemiş ve diğer türlere kıyasla daha düşük glukansükraz aktivitesi bu türlerde gözlenmiştir. Bununla birlikte *L. paraplantarum* N15, *L. rossiae* ED1, *L. plantarum* ED10 ve *L. brevis* E25'te hücresel kısmın çözünebilir kısma göre glukansükraz aktivitesi yaklaşık olarak 8 kat daha yüksek olarak ortaya çıkmış ve özellikle hücresel kısımdaki aktivite diğer türlere kıyasla da oldukça yüksek düzeyde meydana gelmiştir. Son olarak *L. paralimentarius* E106'nın hücre ile ilgili ve çözünebilir fraksiyonları arasında yaklaşık olarak 3 katı kadar aktivite farkı oluşsa da çözünür formun aktivitesi düşük aktivitelilere benzer hücresel formun aktivitesi ise yüksek aktivitelilerin yaklaşık yarısı kadar ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak çalışma çerçevesinde ekşi hamurdan izole edilen farklı türlerdeki glukansükraz aktivitesinin lokalizasyona bağlı olarak değişebildiği ve türler arasında farklılık arz edebildiği ortaya konmuştur.

### 4.3 Düşük pH ve Safra Tuzlarına Karşı Direncin Belirlenmesi

Ekşi hamurdan izole edilen LAB türleri MRS besiyerinde geliştirilmiş, düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin belirlenmesi amacıyla her dört saatte bir spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Probiyotik özelliklerinin belirlenmesinde elzem testlerden biri olan düşük pH ve safra tuzlarına karşı direnç testinden sonra bu çalışmada kullanılan tüm türlerin düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Sindirim sırasında mideden salgılanan sıvının pH değeri 0,9 olmasına rağmen gıda maddesi içerisindeki bileşenler nedeniyle midede sıvının pH değeri 3'e kadar çıktığı bilinmektedir (Erkkila ve Petaja, 2000). Laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmının pH 2,5 değerinde canlılıklarını koruyabildiği tespit edilmiştir (Maragkoudakis vd, 2006; Mathara vd, 2008). Daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi pH 2,5'da canlılıkları incelenmiştir. Safra suyu karaciğerde kolesterol kullanılarak sentezlenenir ve safra kesesinde depolanarak gerek duyulduğunda ince bağırsağa salgılanırlar (Mathara vd, 2008; Begley vd, 2006). Salgılanmasının temel nedeni biyolojik bir deterjan görevi görerek yağları emülsifiye etmesi ve çözündürmesidir. Yağlara olan etkisinden dolayı mikroorganizmaların hücre zarına zarar vererek antimikrobiyal etki de sağlamaktadır. Hücre zarına etkisi dışında DNA'ya zarar vermesi, bazı proteinlerin denatürasyonuna yol açması ve serbest radikal oluşumuna neden olması gibi diğer antimikrobiyal etkileri de bulunmaktadır (Begley vd, 2005b). Yapılan bazı çalışmalar sonucunda safra tuzuna dirençli kültürlerin tespiti için %0,3 safra tuzu konsantrasyonunun kritik değer olduğu belirtilmektedir (Erkkila ve Petaja, 2000; Gilliland vd, 1985). Dolayısıyla midedeki düşük pH değerinde canlı kalan bakterilerin safra tuzu dirençlerinde artış olmayacaktır. Bu çalışmada da mevcut bilgiler ışığında LAB düşük pH ve safra tuzuna karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Düşük pH ve safra tuzuna direncin kültürler üzerine etkisi spektrofotometrik metoda göre belirlenen sonuçlar (OD<sub>600</sub>) Çizelge 4.2'de verilmiştir. Analize tabi tutulan LAB düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençleri türlere özgü olduğu görülmektedir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde test edilen kültürlerin; pH 2,5 ve %0,3 (w/v) safra tuzu içeren MRS broth besiyerinde canlılıklarını koruduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara genel olarak bakıldığında benzer çalışmalarda da belirtildiği üzere laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmının pH 2,5 değerinde canlılıklarını koruyabildiği gözlenmektedir (Maragkoudakis vd, 2006; Mathara vd, 2008). Bazı

çalışmalarda da *Lactobacillus* türlerinin %0,3 konsantrasyonda gelişimlerinin yavaşladığı tespit edilmiştir (Pennacchia vd, 2004; Maragkoudakis vd, 2006). Yapılan bir çalışmada *L. plantarum* türünün sağlıklı bir insanın gastrointestinal sistemi boyunca kolonize olan en belirgin bakteri olduğu ortaya atılmıştır. (De Vries vd, 2006).

Bununla birlikte bu konsantrasyonda kültürlerin gelişimlerinin yavaşladığı görülmektedir. Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre bakterilerin mide asitliğine direnci oldukça yüksek bulunmuştur. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin yoğunluğunda çok azda olsa bir düşme meydana gelmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde ekşi hamurdan izole edilen LAB'lerin pH ve safra tuzlarına dirençlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.



**Çizelge 4.2** Düşük pH ve Safra Tuzlarına Karşı Direnç Deneyinden Elde Edilen Sonuçlar ( $\pm$  standart sapmadır, n=2.)

	Kontrol							Safra							pH						
	0	4	8	12	16	20	24	0	4	8	12	16	20	24	0	4	8	12	16	20	24
<b>ED1</b>	0,012 $\pm 0,1$	0,213 $\pm 0,1$	0,426 $\pm 0,1$	0,475 $\pm 0,1$	0,496 $\pm 0,1$	0,426 $\pm 0,1$	0,485 $\pm 0,1$	0,047 $\pm 0,1$	0,147 $\pm 0,1$	0,226 $\pm 0,1$	0,336 $\pm 0,1$	0,402 $\pm 0,1$	0,420 $\pm 0,1$	0,427 $\pm 0,1$	0,042 $\pm 0,1$	0,105 $\pm 0,1$	0,250 $\pm 0,1$	0,285 $\pm 0,1$	0,328 $\pm 0,1$	0,316 $\pm 0,1$	0,384 $\pm 0,1$
<b>ED5</b>	0,019 $\pm 0,1$	0,236 $\pm 0,1$	0,575 $\pm 0,1$	0,606 $\pm 0,1$	0,520 $\pm 0,1$	0,521 $\pm 0,1$	0,564 $\pm 0,1$	0,030 $\pm 0,1$	0,130 $\pm 0,1$	0,248 $\pm 0,1$	0,260 $\pm 0,1$	0,306 $\pm 0,1$	0,262 $\pm 0,1$	0,306 $\pm 0,1$	0,017 $\pm 0,1$	0,150 $\pm 0,1$	0,291 $\pm 0,1$	0,312 $\pm 0,1$	0,383 $\pm 0,1$	0,302 $\pm 0,1$	0,338 $\pm 0,1$
<b>ED1 0</b>	0,013 $\pm 0,1$	0,289 $\pm 0,1$	0,646 $\pm 0,1$	0,469 $\pm 0,1$	0,499 $\pm 0,1$	0,440 $\pm 0,1$	0,513 $\pm 0,1$	0,037 $\pm 0,1$	0,169 $\pm 0,1$	0,191 $\pm 0,1$	0,187 $\pm 0,1$	0,240 $\pm 0,1$	0,132 $\pm 0,1$	0,157 $\pm 0,1$	0,026 $\pm 0,1$	0,161 $\pm 0,1$	0,304 $\pm 0,1$	0,437 $\pm 0,1$	0,417 $\pm 0,1$	0,362 $\pm 0,1$	0,402 $\pm 0,1$
<b>E25</b>	0,003 $\pm 0,1$	0,211 $\pm 0,1$	0,404 $\pm 0,1$	0,532 $\pm 0,1$	0,428 $\pm 0,1$	0,342 $\pm 0,1$	0,463 $\pm 0,1$	0,027 $\pm 0,1$	0,930 $\pm 0,1$	0,218 $\pm 0,1$	0,249 $\pm 0,1$	0,282 $\pm 0,1$	0,301 $\pm 0,1$	0,271 $\pm 0,1$	0,026 $\pm 0,1$	0,147 $\pm 0,1$	0,285 $\pm 0,1$	0,539 $\pm 0,1$	0,388 $\pm 0,1$	0,370 $\pm 0,1$	0,409 $\pm 0,1$
<b>E106</b>	0,039 $\pm 0,1$	0,198 $\pm 0,1$	0,467 $\pm 0,1$	0,490 $\pm 0,1$	0,514 $\pm 0,1$	0,622 $\pm 0,1$	0,522 $\pm 0,1$	0,030 $\pm 0,1$	0,115 $\pm 0,1$	0,230 $\pm 0,1$	0,263 $\pm 0,1$	0,242 $\pm 0,1$	0,229 $\pm 0,1$	0,269 $\pm 0,1$	0,036 $\pm 0,1$	0,090 $\pm 0,1$	0,280 $\pm 0,1$	0,325 $\pm 0,1$	0,382 $\pm 0,1$	0,312 $\pm 0,1$	0,412 $\pm 0,1$
<b>N6</b>	0,026 $\pm 0,1$	0,246 $\pm 0,1$	0,444 $\pm 0,1$	0,662 $\pm 0,1$	0,537 $\pm 0,1$	0,495 $\pm 0,1$	0,558 $\pm 0,1$	0,052 $\pm 0,1$	0,157 $\pm 0,1$	0,214 $\pm 0,1$	0,238 $\pm 0,1$	0,207 $\pm 0,1$	0,193 $\pm 0,1$	0,154 $\pm 0,1$	0,047 $\pm 0,1$	0,157 $\pm 0,1$	0,287 $\pm 0,1$	0,311 $\pm 0,1$	0,420 $\pm 0,1$	0,383 $\pm 0,1$	0,468 $\pm 0,1$
<b>N7</b>	0,046 $\pm 0,1$	0,252 $\pm 0,1$	0,541 $\pm 0,1$	0,654 $\pm 0,1$	0,562 $\pm 0,1$	0,560 $\pm 0,1$	0,665 $\pm 0,1$	0,047 $\pm 0,1$	0,131 $\pm 0,1$	0,208 $\pm 0,1$	0,207 $\pm 0,1$	0,226 $\pm 0,1$	0,171 $\pm 0,1$	0,176 $\pm 0,1$	0,030 $\pm 0,1$	0,105 $\pm 0,1$	0,218 $\pm 0,1$	0,316 $\pm 0,1$	0,337 $\pm 0,1$	0,370 $\pm 0,1$	0,406 $\pm 0,1$
<b>N9</b>	0,022 $\pm 0,1$	0,197 $\pm 0,1$	0,607 $\pm 0,1$	0,614 $\pm 0,1$	0,679 $\pm 0,1$	0,539 $\pm 0,1$	0,565 $\pm 0,1$	0,042 $\pm 0,1$	0,128 $\pm 0,1$	0,207 $\pm 0,1$	0,221 $\pm 0,1$	0,242 $\pm 0,1$	0,194 $\pm 0,1$	0,240 $\pm 0,1$	0,032 $\pm 0,1$	0,120 $\pm 0,1$	0,234 $\pm 0,1$	0,258 $\pm 0,1$	0,319 $\pm 0,1$	0,352 $\pm 0,1$	0,391 $\pm 0,1$
<b>N13</b>	0,015 $\pm 0,1$	0,002 $\pm 0,1$	0,062 $\pm 0,1$	0,130 $\pm 0,1$	0,186 $\pm 0,1$	0,391 $\pm 0,1$	0,440 $\pm 0,1$	0,030 $\pm 0,1$	0,036 $\pm 0,1$	0,052 $\pm 0,1$	0,084 $\pm 0,1$	0,107 $\pm 0,1$	0,094 $\pm 0,1$	0,139 $\pm 0,1$	0,018 $\pm 0,1$	0,033 $\pm 0,1$	0,016 $\pm 0,1$	0,024 $\pm 0,1$	0,041 $\pm 0,1$	0,055 $\pm 0,1$	0,107 $\pm 0,1$
<b>N15</b>	0,037 $\pm 0,1$	0,197 $\pm 0,1$	0,559 $\pm 0,1$	0,733 $\pm 0,1$	0,585 $\pm 0,1$	0,594 $\pm 0,1$	0,660 $\pm 0,1$	0,032 $\pm 0,1$	0,084 $\pm 0,1$	0,180 $\pm 0,1$	0,172 $\pm 0,1$	0,207 $\pm 0,1$	0,188 $\pm 0,1$	0,238 $\pm 0,1$	0,045 $\pm 0,1$	0,158 $\pm 0,1$	0,234 $\pm 0,1$	0,312 $\pm 0,1$	0,389 $\pm 0,1$	0,401 $\pm 0,1$	0,491 $\pm 0,1$
<b>N19</b>	0,018 $\pm 0,1$	0,028 $\pm 0,1$	0,075 $\pm 0,1$	0,089 $\pm 0,1$	0,178 $\pm 0,1$	0,301 $\pm 0,1$	0,570 $\pm 0,1$	0,017 $\pm 0,1$	0,030 $\pm 0,1$	0,064 $\pm 0,1$	0,067 $\pm 0,1$	0,093 $\pm 0,1$	0,113 $\pm 0,1$	0,145 $\pm 0,1$	0,002 $\pm 0,1$	0,016 $\pm 0,1$	0,033 $\pm 0,1$	0,006 $\pm 0,1$	0,029 $\pm 0,1$	0,082 $\pm 0,1$	0,141 $\pm 0,1$

#### 4.4 LAB Türlerinin Hidrofobisite Niteliklerinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların intestinal epitel hücrelere yapışmasını açıklayan birkaç mekanizma vardır. Mikroorganizmaların en dıştaki yüzeyinin hidrofobik doğası o bakterinin konakçıya tutunması ile alakalıdır. Bu özellik, yapışmada avantaj sağlayabilmesi nedeniyle bakterinin insan gastrointesitinal sisteminde canlılığını devam ettirebilmesi için önem arz etmektedir. Mikroorganizmaların epitel hücrelere adezyonunu değerlendirmede bir araç olan, N-hekzadekana mikrobiyal adezyon geçerli bir yaklaşımdır (Vinderola ve Reinheimer 2003). Bu çalışmada LAB'lerin 4 farklı hidrokarbona mikrobiyal tutunması incelenmiştir.

Bakterilerin farklı maddelere tutunmasını, öncelikle hidrofilik moleküller su ve birbirleri ile etkileşime girerler. Hidrofobik moleküller ise su ile etkileşime girmekten kaçınarak diğer hidrofobik moleküllerle etkileşime girerler. Bakteri hücre yüzeyinin hidrofobisitesi ne kadar yüksek ise konak hücre yüzeyine tutunması o kadar yüksek olur. Aynı tür içindeki bakteriler hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı ve konuk hücrelere tutunma açısından değişiklik gösterebilir (Kos vd, 2003). Daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında tutunma sonuçlarının benzer olduğu söylenebilmektedir.

Polar nitelik taşımayan moleküllerin sıvı ortamda kendiliğinden bir araya toplanma eğilimi, hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin arkasındaki itici güç, hidrofobik grupların etrafını çevreleyen su moleküllerinin yer değiştirmesinden kaynaklanan entropi artışıdır. Hidrofobik etkileşimlerin biyolojik sistemlerdeki en büyük önemi, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını gerçekleştirmesidir (Grover vd, 2012). Probiyotik bakterilerin epitelyum yüzeylere tutunarak kolonize olmaları önemli bir kriterdir. Hidrofobik özelliğe sahip olan probiyotik mikroorganizmaların epitel yüzeylere daha iyi tutundukları bazı araştırmalarda ispatlanmıştır (Salminen vd, 1999; Darılmaz ve Beyatlı, 2012). Ancak bazı araştırmacılar da hidrofobisitenin yapışmaya yardımcı olmasına rağmen, insan bağırsak hücrelerine yapışma için bir ön koşul olmadığını bildirmektedirler (Todorov vd, 2008; Peres vd, 2014). İnsan intesitinal hücrelerindeki suşların adezyonu probiyotiklerdeki faydalı bir özellik olarak düşünüldüğünden, probiyotik suş taramasında belirlenmesi gereken özelliklerden bir tanesi olduğu belirtilmektedir (Rönkä vd, 2003; Rubio vd, 2014). Bu çalışmanın bir

sonraki aşamasında bu türlerin *in vitro* koşullarda insan hücrelerine tutunma potansiyellerinin incelenmesi düşünülmektedir.

Adezyon (tutunma) mekanizması konak hücre yüzeyinin hidrofob oluşu, yüzey yükleri ile bağlantılıdır. Hem bakteri hem de konak hücre yüzeyleri negatif (-) yüklü olabildikleri için bu itici güç özel etkileşimlerle aşılr (Del Re vd, 2000).

Ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin probiyotik özelliklerin belirlenmesi için önemli olan testlerden biri olan hidrofobisite testi LAB türlerinde uygulanmış, hidrokarbonlara tutunmaları (hidrofobikliği) yüzde olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Mikrobiyal hücre yüzeylerinin fiziko-kimyası üzerine yapılan çalışmalar, gliko-protein yapı içeren materyallerin varlığının daha fazla hidrofobisiteye sebep olduğunu, hidrofilik yüzeylerin ise polisakkaritlerin varlığı ile ilişkili olduğunu ortaya çıkartmıştır (Kos vd, 2003). Bu tez çalışmasında ise, *L. pseudomesenteroides* N13 kullanılan her iki hidrokarbon N-hekzan ve ksilene karşı yüksek hidrofobisite göstermiştir. Bu da, *L. pseudomesenteroides* N13 hücre yüzeyinde gliko-protein yapıların fazla olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmalar karşılaştırıldığında, hidrofobisite yeteneğinin türe ve suşa göre değişken olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, genetik olarak yakın türler ve hatta aynı türün farklı suşları arasında bile hidrofobisite yeteneklerinin değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (Schar-Zammaretti ve Ubbink, 2003; Peres vd, 2014).

Konak hücreler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler spesifik değildir. Yine de probiyotik suşlarda, bağırsak mukozasına yapışma yeteneği ve yüzey hidrofobikliği arasında bir ilişki olduğu açıklanmıştır (Peres vd, 2014). Bu tez çalışmasında kullanılan LAB türlerin yüzeyindeki hidrofobik özellikler, ksilen, N-hekzadekan, N-hekzan, di etil eter içeren çözücülere hidrokarbon fazlarına yapışma temeline dayanmaktadır.

Ekşi hamurdan izole edilen laktik asit bakterilerinin hücre süspansiyonunun N-hekzadekan, ksilen, di etil eter, N-hekzan ile muamele edilmeden önceki optik dansitesi (OD) 1,012 ile 1,103 arasında değişim göstermiştir. Genel olarak

hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde, türlerin di etil etere olan ilgisinin diğer çözücülere göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Türlerin ksilene olan ilgisinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Ekşi hamurdan izole edilen laktik asit bakterilerinin hidrofobisite değerleri görüldüğü gibi %31,62 ve %93,75 arasında değişim göstermiştir. N-hekzan çözücüsünde en yüksek hidrofobisite değeri *L. pseudomesenteroides* N13 (%93,75) sahiptir. Bu bakteriyi %93,73 değeri ile *W. cibaria* N9 ile %86,97 değeri ile *L. curvatus* N19 takip etmektedir. Bu çalışmada, bakterilerin farklı maddelere tutunması, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite özelliği ile belirlenmiştir. *L. paralimentarius* E106'nın di etil eter çözücüsüne ilgisinin olmadığı tespit edilirken, ksilen çözücüsüne en yüksek %90,67 ile *L. pseudomesenteroides* N13'ün en düşük %45,24 ile *L. rossiae* ED1'in ilgisi belirlenmiştir. Bu durum, kullanılan bakterilerin yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermiştir. Türler, N-hekzadekan (%83,69-%54,47), ksilen (%90,67-%45,24), di etil eter (%37,24-%12,96), N-hekzan (%93,78-%58,82) çözücülerinde bu değerler arasında hidrofobisite göstermişlerdir. Türlerin hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde LAB her dört çözücüde de hidrofobisite özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türlerin her dört çözücüde hidrofobisite özelliği göstermesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Bu sonuçla birlikte ekşi hamurdan izole edilen LAB di etil eter ve N-hekzadekan kimyasallarına karşı daha az tutunma özelliği gösterdiği, ksilen ve N-hekzan kimyasallarına ise daha fazla tutunma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ksilen ve N-hekzan kimyasallarına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren *L. pseudomesenteroides* N13 (ksilen; %90,67 ve N-hekzan; %93,78) iken en az tutunma özelliği gösteren *L. rossiae* ED1 ksilen; %45,24 ve *L. brevis* E25; N-hekzan; %58,82)'dir. N- hekzadekan kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren *Leuc. mesenteroides* N6 (%83,69) iken, en az tutunma özelliği gösteren ise *L. rossiae* ED1 (%54,47) olarak tespit edilmiştir.

Di etil eter kimyasalına karşı en fazla tutunma özelliği gösteren *L. curvatus* N19 (%37,24) iken, en az tutunma özelliği gösteren ise *L. paralimentarius* E106 (%12,96) olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlarla, ekşi hamurdan elde ettiğimiz tüm türlerin hidrofobisite yönünden probiyotik olarak kullanılmaya uygun olduğu ifade edilebilir. Daha önceki

çalışmalarla paralellik göstererek; türlerin her dört çözücüde de hidrofobisite göstermesi bu türlerin yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında da, türlerin ksilene ilgisinin N-hekzana göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



**Çizelge 4.3** LAB'nin Farklı Hidrokarbonlara % Tutunma Sonuçları

	<b>N-hekzadekan</b>	<b>Ksilen</b>	<b>Di etil eter</b>	<b>N-hekzan</b>
<b>ED1</b>	54,47±0,1	45,24±0,1	31,94±0,1	68,51±0,1
<b>ED5</b>	71,44±0,1	86,12±0,1	20,67±0,1	86,76±0,1
<b>ED10</b>	66,08±0,1	88,46±0,1	33,62±0,1	75,09±0,1
<b>E25</b>	61,02±0,1	82,62±0,1	32,53±0,1	58,82±0,1
<b>E106</b>	77,38±0,1	84,67±0,1	12,96±0,1	78,71±0,1
<b>N6</b>	83,69±0,1	89,92±0,1	35,62±0,1	84,34±0,1
<b>N7</b>	68,08±0,1	86,56±0,1	41,69±0,1	79,94±0,1
<b>N9</b>	61,81±0,1	91,70±0,1	31,62±0,1	93,73±0,1
<b>N13</b>	81,73±0,1	90,67±0,1	31,92±0,1	93,78±0,1
<b>N15</b>	59,20±0,1	83,86±0,1	31,82±0,1	75,24±0,1
<b>N19</b>	74,77±0,1	69,85±0,1	37,24±0,1	86,97±0,1

NOT: Değerler spektrofometrede okutulan % tutunma değerleridir. Veri üç ölçümün ortalaması ± standart sapmasıdır. (n=3)

#### 4.5 LAB Türlerinin Antibiyotik Hassasiyetlerinin Belirlenmesi

Probiyotik bakterilerin gıdalarda kullanımında en büyük risk faktörü olarak antibiyotik direnç genlerini aktarma potansiyelleri görülmektedir. Bu çalışmada Ampicillin (Amp, 10 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), kanamycin (K, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), vancomycin (VA, 30 µg), gentamicin (Cn, 10 µg), rifampicin (Rd, 5 µg), carbenicillin (CAR, 100 µg), amoxicillin (Aml, 25 µg), oxacillin (Ox, 1 µg) ve streptomycin (S, 10 µg) antibiyotiklerine karşı hassasiyet belirlenmiş, oluşan zon çaplarının sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.3'te *L. rossiae* ED1'in antibiyotik disklerle gösterdiği direnç gösterilmiştir.

Analize alınan LAB türlerin tamamı birden fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir. Laktik asit bakterilerinin sıklıkla birden fazla antibiyotiğe doğal olarak (intrinsik direnç) direnç gösterebildiği tespit edilmiştir (Ammor ve Mayo, 2007).

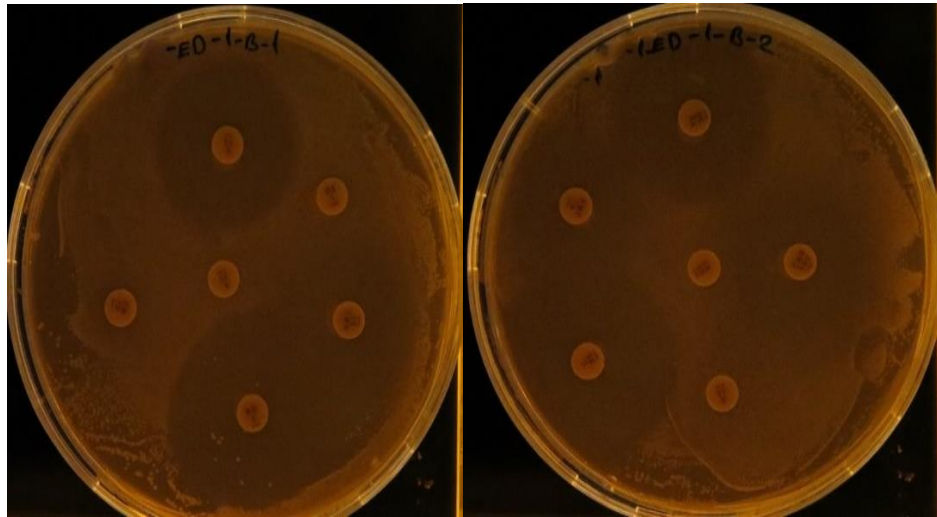
Bazı LAB'leri, vancomycin, kanamycin ve streptomycine yüksek doğal dirençlilik göstermektedirler (Danielsen ve Wind, 2003; Zhou vd, 2005).

Bu çalışmada da disk difüzyon yöntemi kullanılarak LAB türlerinin vancomycin, kanamycin ve streptomycine dirençli olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda, laktik asit bakterilerinin vancomycine karşı dirençli oldukları saptanmıştır (Charteris vd, 1998; Temmerman vd, 2002; Zhou vd, 2005; Kastner vd, 2006; Maragkoudakis vd, 2006). Vancomycine, çoklu ilaç direnci taşıyan patojenlerin neden olduğu klinik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Laktik asit bakterilerinde vancomycine direncinin yatay gen transferi yolu ile aktarılmayan, kromozom kodlu bir özellik olduğu tespit edilmiştir (Zhou vd, 2005; Klare vd, 2007).

Gentamicine karşı direnç konusunda yaygın bir görüş bulunmamakla birlikte direnç gösteren bakterilerin olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Lara-Villoslada, 2007; Zhou vd, 2005).

Bu çalışmada ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin; erythromycin, rifampicin, amoxicillin, tetracycline, carbenicillin, chloramphenicol, ampisiline karşı duyarlı olduğu ispatlanmıştır. Gentamicine karşı; *L. sanfranciscensis* ED5, *L. plantarum* ED10, *L. brevis* E25 ve *L. paralimentarius* E106 dirençli olduğu belirlenmiştir.

Oxacilline karşı; *L. rossiae* ED1, *L. sanfranciscensis* ED5, *Leuc. mesenteroides* N6, *W. paramesenteroides* N7, *W. cibaria* N9, *L. pseudomesenteroides* N13, *L. paraplantarum* N15 ve *L. curvatus* N19 dirençlidir. Erytomycine karşı en yüksek *L. paraplantarum* N15; 12 mm, en düşük *L. paralimentarius* E106; 8 mm etki göstermiştir. Gentamicine karşı en yüksek *L. paraplantarum* N15, *W. paramesenteroides* N7; 3 mm, en düşük *L. rossiae* ED1; 0,5 mm etki göstermiştir. Rıfampicine karşı en yüksek *L. rossiae* ED1, *L. sanfranciscensis* ED5; 13,5 mm, en düşük *Leuc. mesenteroides* N6 ve *W. paramesenteroides* N7; 8,5 mm etki göstermiştir. Amoxicilline karşı en yüksek *L. paraplantarum* N15, *L. plantarum* ED10; 15 mm, en düşük *L. sanfranciscensis* ED5; 8 mm etki göstermiştir. Oxacilline karşı en yüksek *L. brevis* E25; 3 mm, en düşük; *L. plantarum* ED10, *L. paralimentarius* E106; 2 mm etki göstermiştir. Tetracycline karşı en yüksek *L. sanfranciscensis* ED5, *L. paralimentarius* E106; 12 mm, en düşük *W. cibaria* N9; 2 mm etki göstermiştir. Carbeniciline karşı en yüksek *L. brevis* E25, *L. paraplantarum* N15; 17 mm, en düşük *L. rossiae* ED1; 9 mm etki göstermiştir. Chloramphenicole karşı en yüksek *L. brevis* E25; 16 mm, en düşük, *L. plantarum* ED10; 10 mm etki göstermiştir. Ampiciline karşı en yüksek *L. paraplantarum* N15 ve *L. plantarum* ED10; 12 mm, en düşük *L. rossiae* ED1; 7 mm etki göstermiştir.



**Şekil 4.3** *L. rossiae* ED1'in antibiyotik disklerle gösterdiği direnç

Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda probiyotik bakterilerin antibiyotiklere alternatif olacağı düşünülmektedir. Önceki yapılan çalışmalarla elde edilen bulgular çalışmamızı desteklemektedir.





Çizelge 4.4 Antibiyotik Disklerde Ölçülen Zon Çapları

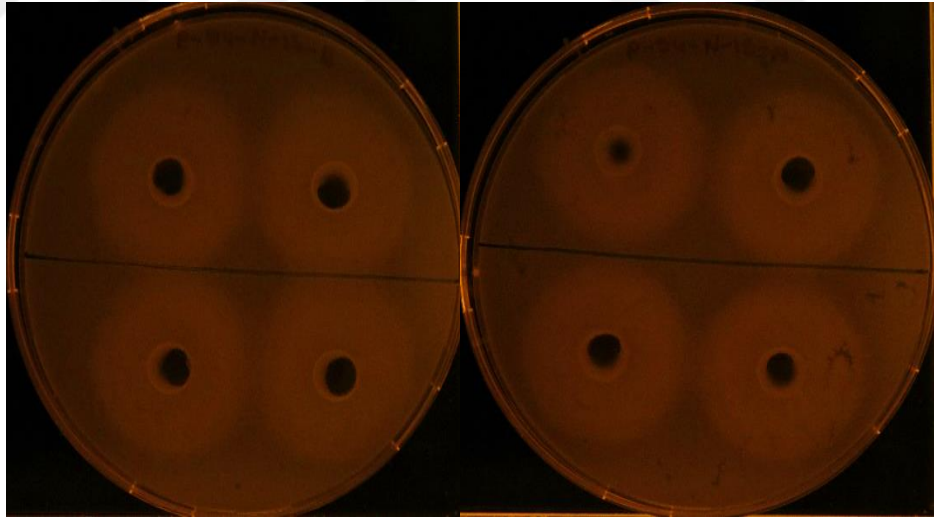
	<b>E</b>	<b>CN</b>	<b>RD</b>	<b>AML</b>	<b>OX</b>	<b>K</b>	<b>TE</b>	<b>CAR</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>AMP</b>	<b>VA</b>
<b>ED1</b>	10,5±0,70	0,5±0,70	13,5±0,70	9±1,41	-	-	11±1,41	9±1,41	-	13,5±0,70	7±1,41	-
<b>ED5</b>	10,5±0,70	-	13,5±0,70	8±0	-	-	12±0	10±0,70	-	13±0	8±0	-
<b>ED10</b>	9±0	-	9±0	15±0	2±2,82	-	6,5±0,70	10±2,82	-	10±0	12±1,41	-
<b>E25</b>	9±0	-	11±0	14±0	3±0	-	11±1,41	17±1,41	-	16±1,41	10±0	-
<b>E106</b>	8±0	-	11±1,41	12,5±0,70	2±0	-	12±1,41	14,5±0,70	-	12±0	9,5±0,70	-
<b>N6</b>	10±0	2±0	8,5±0,70	14±0	-	-	8,5±0,70	14±0	-	13,5±2,12	10,5±0,70	-
<b>N7</b>	10±0	3±1,41	8,5±0,70	14±0	-	-	7,5±0,70	11±0	-	12±0	10±0	-
<b>N9</b>	10±1,41	2±0	9±1,41	12,5±0,70	-	-	6±0	11,5±2,12	-	12±0	11±0	-
<b>N13</b>	10±0	2±0	9±0	13±0	-	-	9±0	13±0	-	13±0	11,5±0,70	-
<b>N15</b>	12±1,41	3±0	10±0	15±1,41	-	-	9,5±0,70	17±0	-	14±0	12±0	-
<b>N19</b>	9±0	2±0	9±0	14±0	-	-	9±0	12,5±0,70	-	12,5±0,70	11,5±0,70	-

**Not:** Değerler mm cinsindedir. Amp, ampicillin; C, chloramphenicol; Va, vancomycin; Cn, gentamicin; Rd; rifampicin; K, kanamycin; E, erythromycin; Te, tetracycline; Car, carbenicillin; Aml, amoxicillin; Ox, oxacillin; S, streptomycin. —, zon yok. Veri üç ölçümün ortalaması ± standart sapmadır (n = 3).

#### 4.6 LAB Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

Probiyotik olarak kullanımı araştırılan mikroorganizmaların sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de patojen mikroorganizmaları inhibe edebilmesidir. Bu nedenle çalışmada izole ettiğimiz izolatlarının önemli bir bağırsak patojeni olarak bilinen *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 (P78), *Escherichia coli* BC 1402 (P12), *Bacillus cereus* BC 6830 (P60), *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 (P91) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (P94) üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. LAB izolatlarının MRS broth kültürlerinden elde edilen süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu yöntemiyle test edilmiş ve test sonunda belirlenen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.5’de verilmiştir. Antimikrobiyal etkinin düşük ortam pH’sından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminden kaynaklanmadığını göstermek amacıyla LAB türlerinden elde edilen süpernatantların pH’sı 6,5’a ayarlanmış ve katalaz enzimi (1 mg.ml<sup>-1</sup>) ile muamele edilmiş ve daha sonra antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak işlem görmüş ve işlem görmemiş süpernatantların aktivitesi arasında fark olmamıştır. Laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitler birçok Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmaya karşı etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde; türlerin inhibisyon etkisi patojene karşı farklı olarak bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite denemeleri, potansiyel probiyotik suşların gerek gıda patojenlerine karşı, gerekse birlikte kullanılmaları durumunda birbirlerine karşı gösterebilecekleri inhibisyonu belirlemek amacıyla yapılmıştır. *L. paraplantarum* N15 hariç tüm türlerin *Escherichia coli* BC 1402’e karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. *Leuc. mesenteroides* N6 ve *L. paraplantarum* N15 hariç tüm türlerin *Bacillus cereus* BC 6830’a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. Tüm türler *Salmonella typhimurium* RSSK 95091’e karşı antimikrobiyal etki göstermezken, sadece antimikrobiyal aktivite *L. paraplantarum* N15’de (2 mm) gözlenmiştir. *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729’e karşı, *L. rossiae* ED1, *L. plantarum* ED10, *W. cibaria* N9, *L. pseudomesenteroides* N13 türlerinin antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’e karşı *L. paraplantarum* N15 hariç diğer tüm türlerin çok yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür, 13 mm değeri ile en yüksek inhibisyon etkisi *L. plantarum* ED10’da gözlenmiştir. *Escherichia coli* BC1402 üzerinde antimikrobiyal aktivitenin en yüksek olduğu tür *Leuc. mesenteroides* N6 (5,5 mm); en düşük olduğu türler ise *W. cibaria* N9 (2 mm)

ve *L. plantarum* ED10 (2,5 mm)'tir. *Bacillus cereus* BC 6830 üzerinde maksimum (5,0 mm) ve minimum (1,0 mm) antimikrobiyal aktivite gösteren türler sırasıyla *L. sanfranciscensis* ED5 ve *L. plantarum* ED10 olarak belirlenmiştir. *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 üzerinde ise 1,5 mm çapı ile en yüksek antimikrobiyal etki *L. plantarum* ED10, *L. pseudomesenteroides* N13'de, en düşük etki ise 1 mm çapı ile *L. rossiae* ED1, *W. cibaria* N9'da görülmüştür. Sadece *L. paraplantarum* N15, *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu (2,0 mm) diğer türlerin ise bu test bakterisi üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretiminden kaynaklanan antagonistik aktiviteleri Sanni vd, (1999) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada fermente tahıl ürününden (Ogi, Nijerya) *L. plantarum*, *L. brevis* izole edilmiştir. Araştırma sonunda izole edilen bakteriler *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *E. faecalis*'e karşı bakteriyosin kaynaklı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında benzerlik göstermekle birlikte; antimikrobiyal aktivite çalışma sonucunda elde edilen verilere göre kültürlerin antimikrobiyal etkinliği türe göre değişkenlik göstermektedir.



**Şekil 4.4** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı sırasıyla *L. curvatus* N19 ve *L. pseudomesenteroides* N13'ün antimikrobiyal etkileri

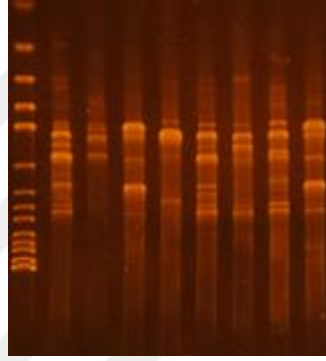
**Çizelge 4.5** Antimikrobiyal Aktivite Gösteren LAB'nin İnhibisyon Zon Çapları

	<b>ED1</b>	<b>ED5</b>	<b>ED10</b>	<b>E25</b>	<b>E106</b>	<b>N6</b>	<b>N7</b>	<b>N9</b>	<b>N13</b>	<b>N15</b>	<b>N19</b>
<b>P12</b>	5±1,41	4,5±0,70	2,5±3,5	3±0	4,5±0,70	5,5±0,70	4±1,41	2±2,82	5±0	-	5±0
<b>P60</b>	2± 2,82	5±7,07	1±1,41	1,5±2,12	3±0	-	2±2,82	2,5±3,53	1,5±2,12	-	2±0
<b>P78</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2±0	-
<b>P91</b>	1±1,41	-	1,5±2,12	-	-	-	-	1±1,41	1,5±2,12	-	-
<b>P94</b>	6±0	7±0	13±0	7±0	11±0	12±0	11,5±0,70	11±0	12,5±0,70	-	12±0

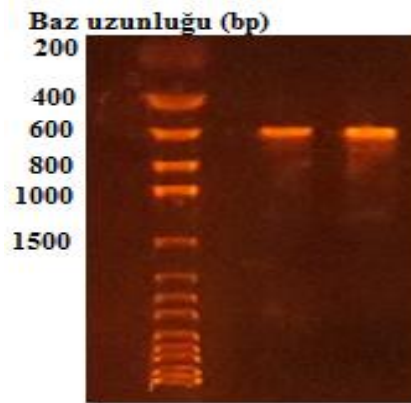
**Not:** Değerler mm cinsindedir. —, zon yok. Veri üç ölçümün ortalaması ± standart sapmadır (n = 3).

#### 4.7 LAB Türlerinin Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kontrollü şartlar altında küflendirilen ekmekten morfolojik ve genotipik özelliklerine bakılarak küfler seçilmiş ve 26S rRNA geni PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Şekil 4.5’de ekmekten izole edilen küflerin RAPD-PCR profillerini göstermektedir. Şekil 4.6’da, 26S rRNA geninin PCR ampilifikasyonunun ardından jelde yürütülmesi sonucu elde edilen tipik bir agaroz jel görüntüsünü göstermektedir.



Şekil 4.5 Küf izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü



Şekil 4.6 26S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz (%1) jel görüntüsü

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.

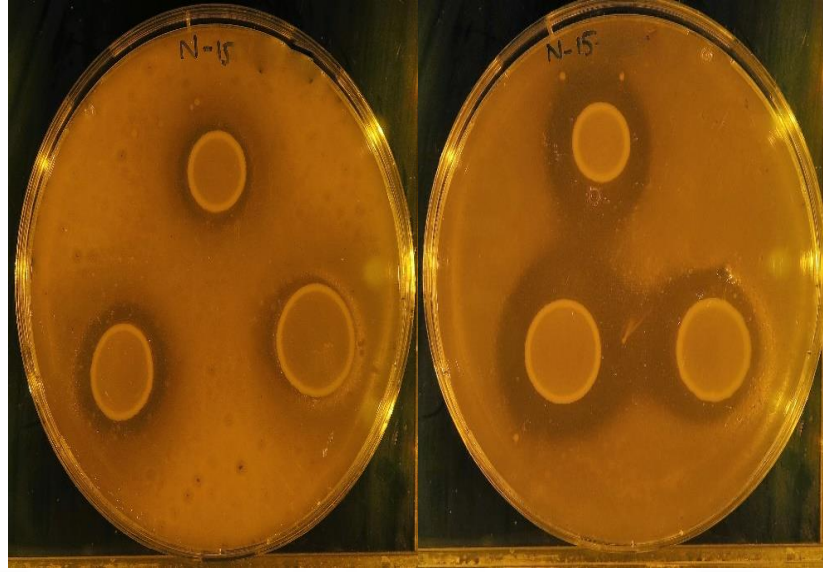
Kontrollü şartlarda küflendirilmiş ekmekten izole edilen küfler *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus niger* olarak tanımlanmış ve ekşi hamur izolatlarının antifungal aktiviteleri bu küflere karşı test edilmiştir (Çizelge 4.6). *Penicillium chrysogenum*'a karşı; *L. paralimentarius* E106, *Leuc. mesenteroides* N6, *L. paraplantarum* N15 suşlarında misel büyümesinin çok iyi engellendiği ve bakteri kolonilerinin etrafında geniş açık bölgeleri ile spor oluşumu yok olduğu gözlemlenmiştir. *L. pseudomesenteroides* N13 suşu antifungal etki gösterememiştir. *Aspergillus niger*'e karşı; *L. paralimentarius* E106, *W. cibaria* N9, *L. paraplantarum* N15 suşları misel büyümesinin çok iyi engellendiği ve bakteri kolonilerinin etrafında geniş açık bölgeleri ile spor oluşumu yok olduğu gözlemlenmiştir. *L. brevis* E25, *L. rossiae* ED1, *L. sanfranciscensis* ED5 antifungal etki gösterememiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada *L. plantarum* ve *L. brevis*'in de aralarında bulunduğu LAB türlerinin antifungal ve antimaya özelliklerinin araştırılmıştır, mayaların küflere göre daha fazla dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. LAB türlerinin %50'si antimaya özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Falguni vd, 2010).

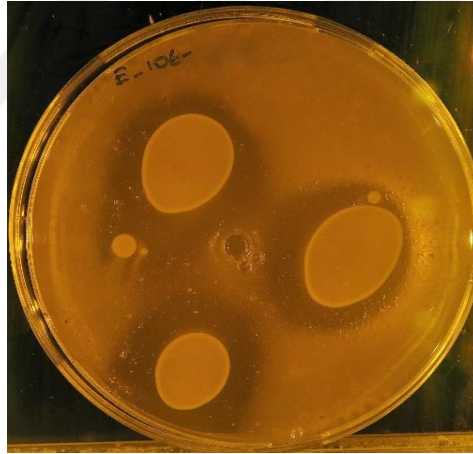
Farklı gıda maddelerinin raf ömrünü uzatmayla ilgili yapılan bir çalışmada, *L. pentosus* izolatu, *A. niger* türünün ekmeğin yüzeyinde konidia gelişimini 30°C'de 12. güne, 4°C'de ise 29. güne ertelerken, *A. oryzae* türünün ekmeğin üzerindeki konidia gelişimi ise 30°C'de 19. güne, 4°C'de 35. güne ertelenmiştir (Muhialdin vd, 2011).

*Fusarium* spp. *Penicillium* spp. *A. niger* türleri üzerine etkili antifungal özellikte fenillaktik asit (PLA) ve 4-hidroksifenillaktik asit (OH-PLA) bileşiklerini üreten *L. plantarum* suşları ekşi hamurdan izole edilmiştir (Magnusson vd, 2003).

LAB'ların supernatantları nötralize edilip, katalaz uygulandığında antifungal aktivitesinde düşüş olmuştur, ancak aktivite tamamıyla yok olmamıştır.



**Şekil 4.7** *L. paraplantarum* N15'in sırasıyla *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum*'e karşı antifungal etkisi



**Şekil 4.8** *L. paralimentarius* E106'nın *Penicillium chrysogenum*'e karşı antifungal etkisi



Çizelge 4.6 LAB'nin Antifungal Aktivite Test Sonuçları

	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>ED1</b>	+	-
<b>ED5</b>	+	-
<b>ED10</b>	++	++
<b>E25</b>	+	-
<b>E106</b>	++++	++++
<b>N6</b>	+++	+
<b>N7</b>	+	+
<b>N9</b>	+	+++
<b>N13</b>	-	+
<b>N15</b>	++++	++++
<b>N19</b>	++	++

Not: (-) İnhibisyon yok,

(+) Spor oluşumu yok,

(++) Bakteri kolonisi etrafındaki inhibisyon küçük şeffaf bölge ile spor oluşumu yok,

(+++) Bakteri kolonisi etrafındaki inhibisyon iyi anlaşılır bölgesi ile spor oluşumu yok,

(++++) Misel büyümesinin çok iyi engellenmesi ve bakteri kolonilerinin etrafında geniş açık bölgeleri ile spor oluşumu yok.

Genel olarak antifungal etki yalnızca laktik asit ve asetik asit üretiminden kaynaklanmadığı düşünülmektedir. LAB suşlarının sentezlediği çok çeşitli maddeler küf ve mayalara karşı sinerjistik bir aktivite gösterdiği düşünülmektedir. De Muynck vd, (2004), *L. brevis* ve *L. plantarum*'un da içlerinde bulunduğu bir grup LAB'den izole edilen supernatantın antifungal özelliklerini incelemiştir. *L. brevis*'in supernatantı (pH 3,5) test edilen çoğu küf türünü inaktive ederken, pH 5,0; 5,5 ve 6,0'ya nötralize edildikten sonra antifungal aktivitesi kaybolmuştur. LAB'ın ürettiği

organik asitlerin ortamdaki pH'ı düşürmesiyle aktive olan antifungal maddeler (peptit gibi) bulunabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışma çerçevesinde antifungal etkinin türlere göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.



## 5. SONUÇ

LAB türlerinde EPS üretimi son derece önemli bir işlemdir. Bu çalışma çerçevesinde ekşi hamur bazlı LAB türlerinin hepsinin homopolimerik glukun tipinde EPS ürettikleri gösterilmiştir. Bu sonuçlar hem bu türlerde EPS üretim miktarının nasıl değiştiği hem de ekşi hamur ortamında EPS üretiminin fizyokimyasal etkilerinin belirlenmesi noktasında yapılacak çalışmaları zorunlu kılmaktadır. İlerleyen dönemlerde bu türler tarafından üretilen EPS'in hamur ve ekmek üzerindeki etkisi test edilecektir. Aynı şekilde LAB türlerinin değişen oranlarda da olsa glukansükraz aktivitesinde olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir. Dolayısıyla ilerleyen dönemlerde bu enzimin süpernatanttan ekstraksiyonu veya ilgili genin farklı bir konakta ekspresyonu ile bu enzim aktivitesi belirlenmeye çalışılacaktır.

Ekşi hamurdan izole edilen LAB türlerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kontrollü şartlar altında küflendirilen ekmekten *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus niger* izole edilmiş, türlere göre antifungal etkinin farklı olduğu tespit edilmiş, bu çalışmanın devamında antifungal etkiye sebep olan metabolitlerin hangi bileşenler olduğu incelenecektir.

Bu çalışma sonucunda, tüm türlerin düşük pH ve safra tuzu toleransının yüksek olması nedeniyle canlılığını koruyarak, bağırsaklara ulaşabileceği düşünülmektedir. Çalışmada fonksiyonel nitelikleri incelenen laktik asit bakterilerinin 24 saat boyunca 4 saatte bir ölçümü yapılan ekşi hamurdan izole edilen türlerin hepsinin yeterli canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite denemeleri, potansiyel probiyotik bakterilerin gerek gıda patojenlerine karşı, gerekse birlikte kullanılmaları durumunda birbirlerine karşı gösterebilecekleri inhibisyonu belirlemek amacıyla yapılmıştır. EPS ve hidrofobisite yetenekleri ile epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkisi sayesinde de epitel yüzeyde *Salmonella typhimurium* RSSK 95091, *Escherichia coli* BC 1402, *Bacillus cereus* BC 6830, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabilecekleri düşünülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; ekşi hamurdan izole edilen LAB'lerin inhibisyon etkisi patojene

karşı farklı olarak bulunmuştur. İzole edilen LAB bakteriyosin üreticisi türler olduğu düşünülmekte bakteriyosin genleri ile alakalı çalışmalar devam ettirilecektir.

Türlerin hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde LAB her dört çözücüde de hidrofobisite özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türlerin her dört çözücüde hidrofobisite özelliği göstermesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Ekşi hamurdan elde ettiğimiz tüm izolatların hidrofobisite yönünden probiyotik olarak kullanılmaya uygun olduğu ifade edilebilir. Gelecek çalışmalar ile bu türlerin *in vitro* koşullarda insan hücrelerine tutunma potansiyelleri belirlenecektir.

Probiyotik bakterilerin gıdalarda kullanımında en büyük risk faktörü olarak antibiyotik direnç genlerini aktarma potansiyelleri görülmektedir. Bu çalışmada da disk difüzyon yöntemi kullanılarak izole edilen LAB vancomycin, kanamycin ve streptomycine dirençli olduğu belirlenirken, erythromycin, rifampicin, amoxycillin, tetracycline, carbenicillin, chloramphenicol ve ampisiline karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu hususların dikkate alınması gerekmektedir.

Ekşi hamura fonksiyonel niteliğini kazandıran bu türlerin EPS üretimleri, düşük pH ve safra tuzuna karşı direnci, hidrofobisite nitelikleri, antibiyotik hassasiyeti, antimikrobiyal, antifungal ve glukansükraz aktivitesi üzerinde durulabilmiştir ancak ilerleyen dönemlerde bu türlerin asidifikasyon, proteolitik, amilaz, fitaz, fosfotaz aktiviteleri üzerinde durulacaktır. İzole edilen türlerin çeşitliliğindeki farklılıklar bu türlerin fonksiyonel etkilerinin ortaya konmasını zorunlu kılmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Ammor, M.S. and Mayo, B. (2007). *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update*. **Meat Science**, 76, 138-146.
- Axelsson, L. (1998). *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. *lactic acid bacteria*, **Microbiology and Functional Aspects**, 1-73.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. (2011). *New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides*. **Biotechnology Advances**, 29(1), 54-66.
- Begley, M., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2005a). *The interaction between bacteria and bile*. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 625–651.
- Begley, M., Sleator, R.D., Grahan, C.G.M. and Hill, C. (2005b). *Contribution of three bile-associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, 73 (2); 894-904.
- Begley, M., Hill, C. and Gahan, C.G.M. (2006). *Bile salt hydrolase activity in probiotics*. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(3), 1729-1738.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A. (1993). *Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions*, **Appl. Environ. Microb.**, 59: 4121-4128.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J.P., Lacroix, M., Van Calsteren, M.R., Milette, M., Savard, R. and Lamontagne, L. (2010). *Intermediate chains of exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus RW-9595M increase IL-10 production by macrophages*. **Journal of Applied Microbiology**, 108, 666-75.
- 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., 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 1*. **Journal of Dairy Science**, 86(2), 407-423.
- Bulut, Ç. (2003). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese*, **Yüksek Lisans Tezi**. İzmir Teknoloji Enstitüsü, 102s.

- Cabo, M.L., Braber, A. and Koenraad, M.F.J.P. (2002). *Antifungal activity of several lactic acid bacteria: the role of acetic acid*. **Journal of Food Protection**, 65, 1309–1316.
- Cerning, J. (1990). *Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **FEMS Microbiology Reviews**, 7, 113-30.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. (1998). *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species*. **Journal of Food Protection**, 61(12), 1636-1643.
- Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kernéis, S., Fourniat, S. and Servin, A.L. (1992). *Protein-Mediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture*, **Appl. Environ. Microb.**, 58: 2034-2039.
- D'Aimmo, M.R., Modesta, M.M. and Biavati, B. (2007). *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products*. **International Journal of Food Microbiology**, 15; 35-42.
- Danielsen, M. and Wind A. (2003). *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*. **Internat. J.Food Microbiol.** 82, 1–11.
- Darilmaz, D.O. ve Beyatli, Y. (2012). *Investigating hydrophobicity and the effect of exopolysaccharide on aggregation properties of dairy Propionibacteria isolated from turkish homemade cheeses*, **Journal of Food Protection**, 75 (2), 359-365.
- De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. and Vandamme, E.J. (2004). *Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites*. **Microbiological Research**, 159(4), 339-346.
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., and de Vos, W.M. (2006). *Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. **International Dairy Journal**, 16, 1018-1028.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. **FEMS Microbiology Reviews**, 23(2), 153-177.
- De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and Messens W. (2002). *The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 6059–6069.

- De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). *The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions*. **Trends in Food Science & Technology**, 16(1–3), 43-56.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D. (2000). *Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum*, **Lett. Appl. Microbiol.**, 31; 438-442.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torrani, S. (1985). *The genus Leuconostoc in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria*. **Blackie Academic & Professionals, Glasgow**, Volume 2, edited by Wood BJB and Holzapfel WH. 235-279.
- Dertli, E., Colquhoun, I.J., Gunning, A.P., Bongaerts, R.J., Le Gall, G., Bonev, B.B., Mayer M. and Narbad, A. (2013). *Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by Lactobacillus johnsonii FI9785*. **Journal of Biological Chemistry**, 288(44), 31938-31951.
- Dertli, E., Mayer, M. and Narbad A. (2015). *Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in Lactobacillus johnsonii FI9785*. **BMC Microbiology**, 15 (1), 8.
- Dhanani A.S., Gaudana S.B. and Bagch T. (2011). *The ability of Lactobacillus adhesin EF-Tu to interfere with pathogen adhesion*. **Eur Food Res Technol**, 232, 5:777–785.
- 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, 951-962.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. (1999). *Probiotics: from myth to reality. demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 76; 279-292.
- Erginkaya, Z. ve Kabak, B. (Ed: Osman Erkmén). (2010). Gıda Mikrobiyolojisi, Efil Yayınevi 1. Basım, 22.bölüm, **Fermente Gıdalar**, Ankara. 427-437s.
- Erkkilä, S. and Petaja, E. (2000). *Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use*. **Meat Science**, 55, 297-300.
- Falguni, P., Shilpa, V. and Mann, B. (2010). *Production of proteinaceous antifungal substances from Lactobacillus brevis NCDC 02*, **International Journal of Dairy Technology**, 63(1), 70-76.

- Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. and Van Sinderen D. (2012). *Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, 2108-13.
- FAO and WHO. (2002), Food and Agriculture Organization/World Health Organization. *Guidelines for the evaluation of probiotics in foods*, **Report of a Joint FAO and WHO Working Group**, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 2002.
- Fooks, L.J., Fuller, R. and Gibson, G.R. (1999). *Prebiotics, probiotics and human gut microbiology*. **International Dairy Journal**, 9, 53-61.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E.K. and Gänzle, M.G. (2011). *Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough*. **Food Microbiology**, 28(3), 547-553.
- Galle, S., and Arendt, E.K. (2014). *Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria*. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 54(7), 891-901.
- 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*. **Bioresource Technology**, 100, 4240-3.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Yolou, F.S. and Marchioni, E. (2011). *In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated Lactobacillus plantarum strains in a gastrointestinal tract model*, **International Dairy Journal**, 21: 97-102.
- Geboes, K., Geboes, K.P. and Maleux, G. (2001). *Vascular anatomy of the gastrointestinal tract*. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, 15, 1-14.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. (1985). *Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus*. **Applied And Environmental Microbiology**, 49(2), 377-381.
- Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium ssp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*. **Trends Food Sci. Technol.**, 10; 139-157.
- Gourama, H. (1997). *Inhibition of growth and mycotoxin production of Penicillium by Lactobacillus species*. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, 30, 279-283.



- Green, J.D., and Klaenhammer, R.T. (1994). *Factors involved in adherence of Lactobacilli to human caco-2 cells*, **Appl. Environ. Microb.**, 60: 4487-4494.
- Grover, S., Rashmi, H.M., Srivastava, A.K. and Batish, V.K. (2012). *Probiotics for human health–new innovations and emerging trends*, **Gut Pathogens**, 4 (1), 1-14.
- Gunn, J.S. (2000). *Mechanisms of bacterial resistance and response to bile*. **Microbes and Infection**, 2; 907–913.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Moine, D., Berger, B., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P. (2012). *Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and Bifidobacteria*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 4, 227-237.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001). *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73 (2), 365-373.
- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S.R., Waldron, K.W., Mayer M. and Narbad, A. (2013). *Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on Lactobacillus johnsonii surface characteristics*. **PLoS One**, 8(3), e59957.
- Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. (2004), [Microbial-gut interactions in health and disease. probiotics.](#), **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. Apr;18(2):299-313.
- İspirli, H., Demirbaş, F. ve Dertli, E. (2015), *Characterization of functional properties of Enterococcus faecium strains isolated from human gut*, **Canadian Journal of Microbiology**. 61: 861–870.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. (2008). *Yöresel Peynirden Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı*, **GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 25: 1-6.
- Jolly, L. and Stingle, F. (2001). *Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria*. **International Dairy Journal**, 11, 733-745.
- 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*. **Bioresource Technology**, 102(7), 4827-4833.
- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. and Meile, L. (2006). *Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter*

*cultures and probiotic bacteria used in food. Systematic and Applied Microbiol.*, 29; 145-155.

- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T. and Itoh, T. (1998). *Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. **International Journal of Food Microbiology**, 40, 169-75.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrant, B., Müller-Berling, S., Witte W. and Goossens, H. (2007). *Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use*. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, 59; 900-912.
- Korakli, M., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F. (2002). *Metabolism by Bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by Lactobacillus sanfranciscensis*. **Journal of Applied Microbiology**, 92, 958-65.
- Korakli, M. and Vogel, R.F. (2006). *Structure/Function relationship of homopolysaccharide producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 71, 790-803.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J. and Matošić, S. (2003). *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92*. **Journal of Applied Microbiology**, 94, 981–987.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M., Kirsanovs, S., Van Der Maarel, M.J. and Dijkhuizen L. (2004). *Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains*. **Microbiology**, 150, 3681-90.
- Kralj, S., Van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., Van Der Maarel, M.J.E.C. 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(9), 4283-4291.
- Kumar, A.S. and Mody, K., (2007). *Bacterial exopolysaccharides-A perception*. **Journal of Basic Microbiology**, 47, 103-17.
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Martin, R., Delgado, S., Rodriguez, J.M., Olivares, M. and Xaus, J. (2007). *Safety assessment of two probiotic strains, Lactobacillus coryniformis CECT5711 and Lactobacillus gasseri CECT5714*. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 175-184.

- [Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobetti, M. \(2000\). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough \*Lactobacillus plantarum\* strain 21B. \*Appl Environ Microbiol\*, 66\(9\):4084-90.](#)
- Laws, A., GU, Y. and Marshall, V. (2001). *Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria*. **Biotechnology Advances**, 19, 597-625.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Perea Vélez, M., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C. (2007). *Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG*. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 6768-75.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C. (2008). *Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action*. **Microbiol Mol Biol Rev**, 72, 728-64, Table of Contents.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(11), 3554-3563.
- Lee, Y.K., and Salminen, S. (1995). *The coming of age of probiotics*. **Trends Food Sci. Technol.**, 6; 241-245.
- Legan, J.D. (1993). *Mould spoilage of bread: the problem and some solutions*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 32, 33-53.
- 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*. **Bioresource Technology**, 101, 5528-33.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., and Hugenholtz, J. (2001). *Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis**. **International Journal of Food Microbiology**, 64, 71-80.
- Magnusson, J. and Schnurer, J. (2001). **Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 1-5.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J. (2003). *Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria*, **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 219, pp. 129-135.

- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. (2006). *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products*. **International Dairy Journal**, 16, 189-199.
- Marco, M.L., Pavan, S. and Kleereberzem, M. (2006). *Towards understanding molecular modes of probiotic action*. **Current Opinion in Biotechnology**, 17, 204–210.
- Martensson, O., Dueñas-Chasco, M., Irastorza, A., Öste, R. and Holst, O. (2003). *Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, Pediococcus damnosus 2.6 and Lactobacillus brevis G-77, in an oat-based, nondairy medium*. **LWT - Food Science and Technology**, 36(3), 353-357.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C. and Holzapfel, W.M. (2008). *Functional properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya*. **Curr Microbiology**, 56, 315-321.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C.G. and Gobbetti, M. (2010). *Robustness of Lactobacillus plantarum starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I*. **Food Microbiology**, 27, 897-908.
- Mishra, C. and Lambert, J. (1996). *Production of anti-microbial substances by probiotics*. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, 5; 20-24.
- Muhalidin, B.J., Hassan, Z. and Sadon, S.K. (2011). *Antifungal activity of Lactobacillus fermentum Te007, Pediococcus pentosaceus Te010, Lactobacillus pentosus G004, and L. paracasi D5 on selected foods*, **Journal of Food Science**, Vol. 76(7), pp. 493-499.
- O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2013). *Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria*. **Current Opinion in Biotechnology**, 24(2), 130-134.
- Oguntoyinbo, F., [Huch, M.](#), [Cho, G.S.](#), [Schillinger, U.](#), [Holzapfel, W.H.](#), [Sanni, A.](#) and [Franz, C.](#) (2010). *Diversity of Bacillus species isolated from Okpehe, a Traditional Fermented Soup Condiment from Nigeria*, **J. Food Prot.** 73(5):870-8.
- Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J. and Odendaal, J. (1999). *Characterization of Pentocin TV35b, a bacteriocin-likepeptide isolated from Lactobacillus pentosus with a fungistatic effect on Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, 87, 726–734.

- Ottogalii, G., Galli, A. and Foschino, R. (1996). *Italian bakery products obtained with sourdough: characterization of the typical microflora*. **Adv Food Sci**, 18, 131–144.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M., Isoluari, E. and Salminen, S.J. (1999a). *Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus*. **Int. Dairy J.**, 9: 623-630.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. and Salminen, S. (1999b). *Probiotics: mechanisms and established effects*. **Int. Dairy J.**, 9; 43-52.
- Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S. and Salminen, S. (2001). *Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus*. **Int. J. Food Microbiol.**, 64: 119-126.
- Özden, A. (2005), **Güncel Gastroloji**, , 9/3, 124-133.
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventrino 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, 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, 908-914.
- Pan, D., Zeng, X. and Yan, T. (2011). *Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from Koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*, **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91, 3: 512-518.
- Paulo, E.M., Boffo, E.F., Branco, A., Valente, Â.M.M.P., Melo, I.S., Ferreira, A.G., Roque M.R. and Assis, S.A.D. (2012). *Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 84, 495-508.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. and Villani, F., (2004). *Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics*. **Meat science**, 67, 309-317.
- Pepe, O., Ventrino, V., Cavella, S., Fagnano, M. and Brugno, R. (2013). *Prebiotic content of bread prepared with flour from immature wheat grain and selected dextran-producing lactic acid bacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79, 3779-85.

- Peres, C.M., Hernandez-Mendoza, M.A.A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M.R., Vilas-Boas, L., Peres, C. and Malcata, F.X. (2014). *Novel isolates of Lactobacilli from fermented portuguese olive as potential probiotics*, **LWT - Food Science and Technology**, 59(1), 234-246.
- Randazzo, C.L., Heilig, H., Resestuccia, C., Giudici, P. and Caggia, C. (2005). *Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods*. **Journal of Applied Microbiology**, 99:251-258.
- Reed, K.K. and Wickham, R. (2009). *Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro*, **Seminars in Oncology Nursing**, 25, 314.
- Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J. and Henning, B. (2001). *Oral probiotics can resolve urogenital infections*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 30; 49-52.
- Remus, D.M., Van Kranenburg, R., Van, S., Taverne, N., Bongers, R.S., Wels, M., Wells J.M., Bron P.A. and Kleerebezem, M. (2012). *Impact of Lactobacillus plantarum capsular polysaccharide clusters on surface Glycan composition and host cell signaling*. **Microbial Cell Factories**, 11, 149.
- Rolfe, R.D. (2000). *The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health*. **J. Nutr.**, 130; 396-402.
- Rosenquist, H. and Hansen, Å. (2000). *The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye*. **Food Microbiology**, 17. 241–250.
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J. and Palva, A. (2003). *Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, 83 (1), 63-74.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002). *An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **International Dairy Journal**, 12(2–3), 163-171.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. and Garriga M. (2014). *Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages*, **Food Microbiology**, 38, 303-311.
- Russel, D.W. and Setchell, K.D. (1992). *Bile acid biosynthesis*. **Biochemistry**, 31(20); 4737-4749.
- Sağdıç, O., Ozturk, I., Yapar, N. and Yetim, H. (2014). *Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from Gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberry bush (Viburnum Opulus L.) Fruit Drink*. **Food Res. Int.** 64(0): 537–545.

- Salminen, S., Ouwehand, A.C. and Isolauri. (1998). *Clinical applications of probiotic bacteria*. **International Dairy Journal**, 8, 563-572.
- Salminen, S. and vonWright, A. (1998). *Current probiotics-safety assured*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 10; 68-77.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, K., Y. (1999). *Probiotics: how should they be defined*. **Trends in Food Science and Technology**, 10, 107-110.
- Sanni, A.I., Onilude, A.A., Ogunbanwo, S.T. and Smith, S.I. (1999). *Antagonistic activity of bacteriocin produced by Lactobacillus species from Ogi, an indigenous fermented food*. **J. Basic Microbiol.**, 39 (3); 189-195.
- Schar-Zammaretti, P. and Ubbink, J. (2003). *The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations*. **Biophysical Journal**, 85, 4076– 4092.
- Shin, J.H., Kim, D., Kim, H., Kim D., Kook, J. and Lee, J. (2009). *Severe infective endocarditis of native valves caused by Weissella confusa detected incidentally on echocardiography*, **J. Infec.**, 54, 149-151.
- Sims, I.M., Frese, S.A., Walter, J., Loach, D., Wilson, M., Appleyard, K., Eason, J., Livingston, M., Baird, M., Cook, G. and Tannock G.W. (2011). *Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal Lactobacillus reuteri* 100-23. **ISME J**, 5, 1115-24.
- Spicher, G. (1983). *Bedeutung and biologie der Milchsäurebakterien des sauerfermentierten Brotes*. **Brot Backwaren**, 10, S. 271-273.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch P.B. and Ross, R.P. (2001). *Market potential for probiotics*. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73, 476-483.
- Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1935). *A method for determination of saccharase activity*. **Journal of Biological Chemistry**, 108, 51–54.
- Suzuki, S., Yakabe, T., Suganuma, H., Fukao, M., Saito, T. and Yajima, N. (2013). *Cell-bound exopolysaccharides of Lactobacillus brevis KB290: protective role and monosaccharide composition*. **Canadian Journal of Microbiology**, 59(8), 549-555.
- Şahin, İ. (2003). *Endüstriyel Mikrobiyoloji, Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 64-65.
- Şen, A., Toprak, N., Güneş, E. ve Halkman, K. (2004). *Probiotics*, **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 1-6.

- Tangüler, H. ve Erten H. (2006). *Gıdalarda Bulunan bir Laktik Asit Bakterisi: Weissella*. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü, **Türkiye 9. Gıda Kongresi; Bolu**.
- Tannock, G.W. (2004). *A special fondness for Lactobacilli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 3189-94.
- Temmerman, R., Pot, B. and Huys, G. (2002). *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products*. **Int.J. Food Microbiol.**, 81; 1-10.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H. (1997). *Active efflux of bile salts by Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 179 (8); 2512-2518.
- 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(2), 945-952.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzappel, W.H. and Dicks, L.M.T. (2008). *Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria*. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 465–477.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G. and De Vuyst, L. (2007). *Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved*. **International Journal of Food Microbiology**, 118(3), 250-258.
- Van 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 Leeuwen, S.S., Kralj S., van Geel-Schutten, I.H., 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, 2251-8.
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. (2008). *Probiotics-from metchnikoff to bioactives*, **Int. Dairy J.**, 18: 714-728.
- Vilela, R., Mendoza, L., Rosa P.S., Belone, A.F.F., Madeira, S., Opromolla, D.V.A. and Aparecida, M. (2005). *Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen Lacazia loboi*. **Journal of Clinical Microbiology**, 3657–3661, 3658.



- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. (2003) *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*. **Food Research international**, 36: 895-904.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E. and Matar C. (2006). *Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefirianofaciens on the gut mucosal immunity*. **Cytokine**, 36, 254-260.
- Vogel, R. F., Pavlovic, M., Ehrmann, M. A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S, Angelov A, Böcker G. and Liebl, W. (2011). *Genomic analysis reveals Lactobacillus sanfranciscensis as stable element in traditional sourdoughs*. **Microb Cell Fact**, 10 Suppl 1, S6.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, 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, 72-80.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. (2008). *Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefirianofaciens ZW3 isolated from Tibet kefir*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 43(3), 283-288.
- Welman, A.D. and Maddox, I.S. (2003). *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges*. **Trends in Biotechnology**, 21, 269-274.
- Wolter, A., Hager, A.S., Zannini, E., Galle, S., Gänzle, M.G., Waters, D.M. and Arendt, E.K. (2014). *Evaluation of exopolysaccharide producing Weissella cibaria MG1 strain for the production of sourdough from various flours*. **Food Microbiology**, 37(0), 44-50.
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (1995). *Genetics of lactic acid bacteria*. In: **Blackie Academic and Professional**, 2, 398.
- 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 4746-55.
- Young, R.J. and Huffman, S. (2003). *Probiotic use in children*. **Journal Pediatric Health Care**, 17 (6); 277-283.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J. Gopal, P.K. and Gill, H.S. (2005). *Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains*. **Int. J. Food Microbiol.**, 98; 211-217.
- Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N. and Kojic, M. (2015). *Exopolysaccharide production and ropy phenotype are*

determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BCGG11. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(4), 1387-1396.



## ÖZGEÇMİŞ

**Fatma Nur DEMİRBAŞ**



1991 yılında Ankara’da doğmuştur. 2013 yılında Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nü bitirmiştir. Aynı yıl Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

### **Yayınlar:**

H. İspirli, **F. Demirbaş**, E. Dertli. Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut, Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61 (11), 861-870.