

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTOBİYONİK ASİT
ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Selma YAKUT

**Danışman
Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2022**



© 2022 [Selma YAKUT]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	İ
ÖZET	İİ
ABSTRACT	İV
TEŞEKKÜR.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	İX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1.AAB Özellikleri ve Sınıflandırılması	3
2.2.Laktobiyonik Asidin Yapısı ve Özellikleri	6
2.3.LBA'nın Probiyotik Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri	7
2.4.LBA'nın Gıda Endüstrisinde Kullanımı	8
2.5. LBA'nın Diğer Alanlarda Kullanımı	11
2.6. LBA'nın Üretim Yöntemleri	12
2.6.1. Elektrokimyasal Oksidasyon	12
2.6.2. Heterojen Katalitik Oksidasyon	12
2.6.3. Biyokatalitik Oksidasyon.....	13
2.7. GDH ve AAB tarafından LBA üretim mekanizması.....	15
2.8. LBA'nın Tespitinde Kullanılan Yöntemler	16
2.8.1. Moleküler Yöntemler	17
2.8.2. Kromatografik Yöntemler	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2.Yöntem	22
3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması	22
3.2.2. Sayım ve izolasyon yöntemi	22
3.2.3. İzolasyonda kullanılan besiyerleri.....	23
3.2.4. DNA izolasyonu	24
3.2.5. Primer dizaynı	25
3.2.6. Gerçek zamanlı PZR.....	26
3.2.7. Suşların LBA üretiminin TLC ile belirlenmesi.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1 İzolasyon Sonuçları.....	30
4.2. LBA belirleme yöntemleri	35
4.2.1.Gerçek Zamanlı PZR Bulguları.....	35
4.2.1 TLC ile LBA üretimini belirleme	39
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	46
EKLER.....	52
EK A. Grafikler.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN LAKTOBİYONİK ASİT ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Selma YAKUT

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI

Laktobiyonik asit (LBA) gıda, kozmetik, eczacılık ve kimya endüstrisinde birçok uygulama alanı bulunan katma değeri yüksek bir laktoz türevidir. Toksik madde olmaması, peynir altı suyunun kullanılarak üretilmesi nedeniyle çevre dostu bir ürün olması ve maliyetinin nispeten düşük olmasından dolayı katkı maddesi olarak kullanımı artmaktadır. LBA, kimyasal, enzimatik ve mikrobiyel yöntemler ile üretilmektedir. Gıda sanayisinde kullanılacak LBA'nın maliyetinin uygunluğu ve güvenli olması nedeniyle mikrobiyel olarak üretilmesi tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, asetik asit bakterileri (AAB) ile laktozdan doğal ve toksik özellik taşımayan LBA üretimi yapılmıştır. AAB'nin izolasyonu için çeşitli bölgelerden temin edilen 31 adet sirke ve meyve örneğinden yararlanılmıştır. İzolasyon çalışmasında GYC agar ve HS sıvı besiyeri kullanılmıştır. İzolasyon sonucunda 91 adet AAB suşu elde edilmiştir. İzole edilen suşların LBA üreten, glikoz dehidrogenaz (GDH) enzimine ait genin bir bölgesi qPZR ile çoğaltılarak suşlarda genin varlığı belirlenmiştir. GDH genine sahip olan suşların LBA üretimleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda ise AÜ11, DÜ12, GÜ1, İK43, İÜ65, MG2, MÜ13, MÜ21, MÜ24 ve MÜ3 olmak üzere 10 adedinin bu yöntem ile belirlenebilir düzeyde LBA ürettiği tespit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde GDH enzimine ait gen bölgesine sahip olan suşların tümünün LBA üretimi yapmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle suşların gen ekspresyon düzeylerinin farklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

LBA'nın ülkemiz koşullarında üretimi ve özelliklerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa yüksek teknoloji ile üretilen biyoteknolojik ürünler dünyada önemli bir pazar payına sahiptir ve ülkemiz döviz ödeyerek bu ürünleri ithal etmektedir. Laktobiyonik asidin ülkemiz koşullarında üretilmesi bu açıdan önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra aynı amaca yönelik olarak kullanılan gıda katkı maddelerine doğal bir alternatif oluşturulması tüketici sağlığının korunmasına katkı sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Laktobiyonik asit, asetik asit bakterileri, ince tabaka kromatografisi (TLC), qPZR

2022, 59 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF LACTOBIONIC ACID PRODUCTION BY ACETIC ACID BACTERIA WITH MOLECULAR AND CHROMATOGRAPHIC METHODS

Selma YAKUT

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI

Lactobionic acid (LBA) is a lactose derivative with high added value that has many applications in the food, cosmetics, pharmaceutical and chemical industries. Its use as an additive is increasing due to non-toxicity, being an environmentally friendly product since it can be produced using whey, and relatively low cost. LBA is produced by chemical, enzymatic and microbial methods. Due to cost effectiveness and safety microbial LBAs are preferred in the food industry.

In this study, natural and non-toxic LBA was produced from lactose with acetic acid bacteria (AAB). For the isolation of AABs, 31 vinegar and fruit samples obtained from various regions were used. GYC agar and HS broth were used in the isolation study. As a result of the isolation, 91 AAB strains were obtained. The presence of the gene in the strains was determined by amplifying a region of the LBA-producing glucose dehydrogenase (GDH) gene of the isolated strains by qPCR. Strains with GDH gene were included in thin layer chromatography (TLC) analysis. As a result of the analysis, it was determined that 10 of them, AU11, DU12, GÜ1, IK43, IÜ65, MG2, MU13, MU21, MU24 and MU3, produced a detectable level of LBA with this method. When the results were evaluated, it was observed that not all strains with GDH enzyme produced LBA. It was concluded that the reason for this was that the gene expression levels of the strains were different.

No study has been found to determine the production and properties of LBA under the conditions of our country. However, biotechnological products produced with high technology have a significant market share in the world and our country imports these products by paying foreign currency. It is important in this respect that lactobionic acid can be produced under the conditions of our country. In addition, the creation of a natural alternative to food additives used for the same purpose will contribute to the protection of consumer health.

Keywords: Lactobionic acid, acetic acid bacteria, thin layer chromatography (TLC), qPCR

2022, 59 pages



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile hayatıma yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI'ya, fikirlerini ve tecrübelerini her zaman bizlerle paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında her zaman yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN'a, Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e, Ar. Gör. Talip ZENGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan MCC Kozmetik A.Ş. ailesine teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Gıda Yük. Müh. Emel SAYIN YATIK'a ve Gıda Müh. Oğuzhan GEDİK'e, her daim bana destek olan sevgili ev arkadaşım Gıda Müh. Beste FIRINCIOĞULLARI'na, canım arkadaşlarım Gıda Müh. Pınar ÜNSAL ve Müyesser GÜLCÜ'ye teşekkür ederim.

FYL-2020-7484 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda hissettiğim, maddi manevi hep destek olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Selma YAKUT
ISPARTA, 2022

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Laktozun laktobiyonik aside oksidasyon	6
Şekil 2.2. Biyokatalitik oksidasyon yolu ile laktozun laktobiyonik aside dönüşümü.....	13
Şekil 4.1. GÜ1 ve MÜ3 suşlarının GYC agardaki koloni görüntüleri.....	32
Şekil 4.2. AÜ11 ve DÜ12 suşun mikroskoptaki görüntüsü.....	35
Şekil 4.3. HS sıvı besiyerinde geliştirilen MÜ1 suşun görüntüsü.....	35
Şekil 4.4. Bazı örneklerin glikoz dehidrogenaz genine ait çoğalma eğrileri.....	38
Şekil 4.5. Bazı örneklerin erime eğrileri.....	38
Şekil 4.6. YPGL sıvı besiyerinde geliştirilen suşların görünümü.....	40
Şekil 4.7. Plakaların tanka yerleştirilme görüntüsü ve yürütücü fazın ilerlemesi.....	41
Şekil 4.8. Kurutma yapılmayan plakanın dağılma görüntüsü.....	41
Şekil 4.9. Laktobiyonik asit üreten suşların ince tabaka kromotografideki görünümü.....	42
Şekil A.1. Laktobiyonik asit üreten GÜ1 suşunun glikoz dehidrogenaz gen bölgesi çoğalma eğrisi.....	56
Şekil A.2. Laktobiyonik asit üreten GÜ1 suşunun glikoz dehidrogenaz gen bölgesi erime eğrisi.....	56
Şekil A.3. Laktobiyonik asit üreten MÜ3 suşunun glikoz dehidrogenaz gen bölgesi çoğalma eğrisi.....	56
Şekil A.4. Laktobiyonik asit üreten MÜ3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erim eğrisi.....	57
Şekil A.5. Laktobiyonik asit üreten IK3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	57
Şekil A.6. Laktobiyonik asit üreten IK3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	57
Şekil A.7. Laktobiyonik asit üreten MÜ21 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	57
Şekil A.8. Laktobiyonik asit üreten MÜ21 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	58
Şekil A.9. Laktobiyonik asit üreten DÜ12 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	58
Şekil A.10. Laktobiyonik asit üreten DÜ12 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	58
Şekil A.11. Laktobiyonik asit üreten İÜ65 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	58
Şekil A.12. Laktobiyonik asit üreten İÜ65 suşunun glikozdehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	59
Şekil A.13. Laktobiyonik asit üreten MG2 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	59
Şekil A.14. Laktobiyonik asit üreten MG2 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	59
Şekil A.15. Laktobiyonik asit üreten AÜ11 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	59

Şekil A.16. Laktobiyonik asit üreten AÜ11 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	60
Şekil A.17. Laktobiyonik asit üreten MÜ24 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	60
Şekil A.18. Laktobiyonik asit üreten MÜ24 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	60
Şekil A.19. Laktobiyonik asit üreten MÜ13 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi.....	60
Şekil A.20. Laktobiyonik asit üreten MÜ13 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi.....	61



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Asetik asit bakterilerinin sayımı ve izolasyonu için kullanılan bazı besiyerleri ve içerikleri.....	4
Çizelge 2.2. Bazı mikroorganizmalar ve laktobiyonik asit üretimi için enzimleri.....	15
Çizelge 2.3. Asetik asit bakterilerinde glikoz dehidrogenaz varlığı.....	16
Çizelge 2.4. Uygulama biçimine göre kromatografi çeşitleri.....	19
Çizelge 3.1. İzolasyon materyali olarak kullanılan örnekler ve alındığı şehirler.....	21
Çizelge 3.2. GYC agar besiyeri.....	23
Çizelge 3.3. HS sıvı besiyeri.....	23
Çizelge 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan oligoların baz dizisi.....	26
Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.....	26
Çizelge 3.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan sıcaklık, süre ve döngü sayıları.....	27
Çizelge 3.7. YPGL besiyeri bileşenleri.....	27
Çizelge 4.1. Sirke örneklerinin pH değerleri.....	30
Çizelge 4.2. Meyve örneklerin pH değerleri	31
Çizelge 4.3. İzolasyon kaynaklarının toplam bakteri sayımı ve izolatlar	33
Çizelge 4.4. qPZR sonuçlarına göre Cq ve Tm değerleri.....	36
Çizelge 4.5. Pelet sayımı sonuçları.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAB	Asetik asit bakterileri
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
g/L	Gram/litre
GDH	Glikoz dehidrogenaz
kob/g	Koloni oluşturan birim/gram
kob/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
LBA	Laktobiyonik asit
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/Litre
mg/ML	Miligram/mililitre
NaCl	Sodyum klorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
µg/g	Mikrogram/gram

1. GİRİŞ

Laktobiyonik asit (LBA), endüstriyel açıdan birçok uygulamada kullanılması nedeniyle ticari pazara giren bir laktoz türevidir. Kimyasal yapısından dolayı stabilizatör, antimikrobiyel, antioksidan, şelat oluşturucu, asitlendirici ve nem tutucu gibi önemli özelliklere sahiptir (Cardoso vd., 2019). Bu nedenle kozmetik, ilaç, kimya ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca LBA, süt endüstrisinde ortaya çıkan peyniraltı suyunun artık olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle çevre dostu bir bileşen olmasının yanısıra kullanıldığı ürünlerin yapı ve tekstürünü de olumlu yönde etkilemektedir. Taşıdığı bu teknik özelliklere ilaveten prebiyotik özelliğe olması LBA'nın ticari değerini arttırmaktadır (Miyamoto vd., 2000; Goderska, 2019).

Kozmetik sektöründe nemlendirici, jelleştirici, çözündürücü etken, peeling maddesi, keratinizasyon etkeni; biyomedikal ve eczacılıkta biyomalzemeler, nanopartiküller, antikoagülan, organ koruyucu, ilaç taşıyıcı, kontrast maddesi, gen taşıyıcı; kimya endüstrisinde şelatlandırıcı, antioksidan, nanopartiküler, yüzey aktif madde; gıda endüstrisinde antioksidan, şelatlandırıcı, gıda katkı maddesi ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Alonso vd., 2013).

LBA kimyasal ve biyolojik yöntemler ile üretilmektedir. Kimyasal üretim yöntemleri heterojen katalitik oksidasyon (laktozun brom ile oksidasyonu) ve elektrokimyasal oksidasyon (alkali ortamda platin elektrotlarla laktozun oksidasyonu) olarak ikiye ayrılır. Biyolojik olarak mikrobiyel ve enzimatik yöntem ile üretilmektedir. Enzimatik üretimde mikroorganizmalardan elde edilen laktoz oksidaz, GDH, sellebiyoz dehidrogenaz gibi enzimlerle laktozun oksidasyonu sağlanmaktadır. Mikrobiyel üretimde ise *Pseudomonas taetrolen* başta olmak üzere *Halobacterium sacharovorom*, *Penicillium chrysogenum*, *Lactococcus lactis*, *Gluconobacter* spp., *Gluconoacetobacter* spp. ve *Acetobacter* spp laktozu okside edererek LBA üretmektedir. Gıda sektöründe LBA üretiminde biyolojik oksidasyon yöntemleri tercih edilmektedir. Bunun nedeni diğer yöntemlerde kullanılan materyallerin istenmeyen yan reaksiyon ürünlerinin oluşturmasıdır.

Bu tez çalışmasında, biyolojik yöntem ile LBA üretimini sağlamak hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle çeşitli sirke ve meyve örneklerinden asetik asit bakterileri (AAB) izole edilmiştir. İzole edilen şuşlarda GDH geni varlığı qPZR ile incelenmiştir. Daha sonra GDH genine sahip olan şuşların LBA üretimi sağlanmış ve LBA üretimi TLC ile nitel olarak belirlenmiştir.



2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.AAB Özellikleri ve Sınıflandırılması

Asetik asit bakterileri (AAB), *Acetobacteraceae* familyasına ait, gram negatif veya gram değişken bakterilerdir. Spor oluşturmeyen, polimorf yapıda, elipsoidal veya çubuk şeklindeki, flagella (peritik veya polar) bulundurma durumlarına göre hareketli veya hareketsiz hücrelerdir. Boyutları 0.4-1 µm genişlik ve 0.8-4.5 µm uzunluk arasında değişmektedir. Tek, çift veya zincirler halinde gözlenebilir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-30 °C'de 2-8 gün arasında değişmektedir. Optimum pH 5.0-6.5'tur fakat daha asidik ortamlarda da (pH 3.0-4.0) gelişirler. *Acetobacteraceae* türleri zorunlu aerob bakterilerdir. Metabolizmalarında son elektron alıcısı oksijendir (Kerstens vd., 2006). Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir (Raspor ve Goranovic, 2008; Sengun ve Karabiyikli, 2011; Gomes vd., 2018).

Polifazik sınıflandırma teniklerinin geliştirilmesi ile 19 cins ve 45 AAB türü tespit edilmiştir (Qiu vd., 2021). *Asaia* spp. hariç diğer AAB'nin ortak özelliği aerobik koşullarda oksijen kullanarak etanolü asetik aside dönüştürmektir (Kerstens vd., 2006). Şeker içeriği yüksek ortamlarda *Gluconabacter* türleri, alkol içeriği yüksek ortamlarda *Acetobacter* türleri yaygın olarak bulunurlar (Raspor ve Goranovic, 2008). Sahip oldukları çeşitli mekanizmalar ile asitliği tolere ederler ve ortamlarında bulunan diğer mikroorganizmaların gelişmesini engellerler. Ayrıca ürettikleri organik asitleri gelişmelerini arttırmak için kullanabilirler (De Roos ve De Vuyst, 2018). *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* ve *Acidomonas* suşları etanolün oksidasyonundan sonra asetik asidi CO₂ ve H₂O'ya dönüştürür. *Asaia* ve *Kozakia* zayıf olarak asetik asidi okside ederken *Gluconobacter* asetik asidi okside etmez (Kerstens vd., 2006; Tanasupawat vd., 2011).

AAB'nin besin elementi gereksinimleri fazladır. Laboratuvar koşullarında fermente içeceklerden izole edilmesi ve geliştirilmesi zordur. Bu nedenle AAB'nin loaboratuvar koşullarında üretilmesi için birçok farklı besiyeri mevcuttur, fakat bir besiyeri bir suş için seçici olurken diğer suşun gelişimini desteklemeyebilir

(Gomes vd., 2018). Bu nedenle AAB'nin izolasyonu için birçok besiyeri bulunmaktadır. Kullanılan besiyerlerin bazıları aşağıda bulunan Çizelge 2.1'de verilmiştir. Genellikle besiyeri içeriğinde maya ve küf gelişimini engellemek için pimarisin ve sikloheksimid; laktik asit bakterilerinin gelişimini engellemek için nisin ve penisilin gibi antibiyotikler kullanılır (Raspor ve Goranovič, 2008).

Çizelge 2.1. AAB'nin sayımı ve izolasyonu için kullanılan bazı besiyerleri

Besiyeri Adı	İçeriği	Kaynak
HS	%2 Glikoz, %0.5 pepton, %0.5 Maya ekstraktı, %0.27 Na ₂ HPO ₄ , %0.15 Sitrik asit	(Hestrin ve Schramm, 1954)
GYC	%5 glikoz, %1 maya ekstraktı, %3 CaCO ₃ , %2 agar	(Gillis vd., 1989)
AE (Asetik asit- Etanol)	%0.5 Glikoz, %0.3 maya ekstraktı, %0.4 pepton, %3 asetik asit, %0.9 agar	(Gullo vd., 2006)
YPM	%2,5 D-Mannitol %0.5 Maya ekstraktı %0,3 Pepton %1.2 Agar	(Gullo ve Giudici, 2008)
Malt ekstrakt agar (MYA)	%1.5 arpa ekstraktı, %0.5 maya ekstraktı, % 1.5 agar, 60 ml etanol	(Gullo ve Giudici, 2008)
Bromcresol Purple Agar	%1 glukoz, %1 maya ekstraktı, %5 (%0.04'lük) bromkresol moru, %4 etanol, %2 agar	(Şengün ve Kılıç, 2016)
YPE (Yeast extract, peptone, etanol)	%1 maya ekstraktı, %0.5 pepton, %2 etanol, %1.5 agar	(Gomes vd., 2018)
MAB	%0.5 Maya ekstraktı, %2 Glikoz, %2 Etil alkol, %0.025 MgSO ₄ .7H ₂ O, %0.1 KH ₂ PO ₄ , %0.33 (NH ₄) ₂ SO ₄	(Bilginer, 2018)
BME (basal medium plus ethanol)	Yeast extract %0.5 maya ekstraktı, %0.3 vitamin (kumarin asitsiz), %0.3 etanol, %1.5 agar	(Gomes vd., 2018)

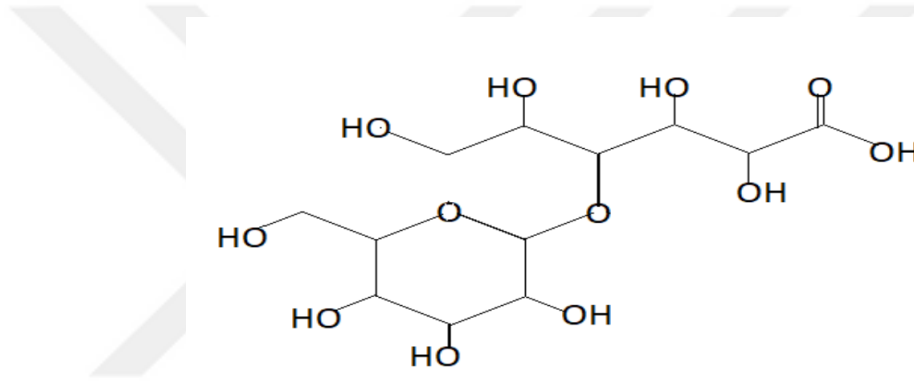
Meyveler, çiçekler, palmye özsuyu, bahçe toprağı AAB'nin doğal habitatıdır. Sıcak ve nemli iklimlerde böcekler ile simbiyotik ilişki içinde bulunurlar ve böcekler tarafından çevreye yayılırlar (Sengun ve Karabiyikli, 2011). Enerji ihtiyaçları için karbonhidratları, alkollerini ve şeker alkollerini (polihidrik alkoller veya polioller) oksidatif fermentasyon ile organik asitlere, aldehitlere veya ketonlara dönüştürmeleriyle karakterize edilirler (Cassoni ve Cereda, 2013; Lynch vd., 2019). Çeşitli gıdalar üzerinde olumlu veya olumsuz etkilere sahiptir. Bazı AAB türleri ananasta pembe hastalığa, elma ve armutta kök hastalığına neden olmaktadır. Bitkilerin köklerinde ve gövdelerinde yaşayan birkaç türü ise azot fiksasyonu yapabilmektedir. Benzer şekilde şarap, bira, bazı alkolsüz içecekler ve meyvelerin bozulmasına yol açarken sirke, kefir, kambu çayı (kambucha çayı), lambik bira ve kakao gibi birçok fermente ürünün üretiminden sorumludur (Raspor ve Goranovic, 2008).

Endüstride kullanılan birçok kimyasal ve biyopolimerlerin üretiminde de AAB'den yararlanılmaktadır. D-glukonik asit, L-sorboz, dihidroksiaseton, laktobiyonik asit, selüloz, asetan, Tip II diyabet tedavisinde kullanılan miglitolün biyosentezinde, askorbik asit (C vitamini), gliserolden dihidroksi aseton (kimyasal güneş yanığı ajanı) üretiminde kullanılırlar (Papalexandratou vd., 2009; Lynch vd., 2019). Yaygın olarak sirke, askorbik asit (C vitamini) ve selüloz üretiminde kullanılırlar (De Roos ve De Vuyst, 2018; Matsutani ve Yakushi, 2018).

AAB organik asitleri, aldehitleri veya ketonları sitoplazmik zarın dış yüzeyinde bulunan dehidrogenazlar tarafından okside ederek üretir (Gomes vd., 2018). Bu oksidatif aktivite ile glukonik asit, tartarik asit, gliserik asit ve laktobiyonik asit gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretimini yapmaktadır. AAB, laktozu membrana bağlı GDH enzimi ile okside ederek LBA'yı oluşturur (Kiryu vd., 2019; 2020).

2.2.Laktobiyonik Asidin Yapısı ve Özellikleri

Laktobiyonik asit (LBA), laktozun oksidasyonu ile elde edilir. LBA, aldonik asit grubunda yer alan bir organik asittir. LBA'nın sistematik adı 4-O-β-D-galaktopiranosil-D-glukonik asitir. LBA kimyasal yapısında, glukonik asit molekülüne bağlı galaktoz molekülünü içermektedir. Laktozun yapısında bulunan glikozun oksidasyonu sonucunda glukonik asit oluşur. Yapısındaki glukonik asitten dolayı 8 hidroksil grubu içermektedir (Gutiérrez vd., 2012; Alonso vd., 2013; Yılmaz vd., 2016). LBA'nın molekül formülü Şekil 1.'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Laktobiyonik asit molekülünün kimyasal

LBA, 2 kcal/g enerji sağlayan düşük kalorili bir tatlandırıcıdır. Bu karboksilik asitin, moleküler ağırlığı 358.3 g/mol ve pKa değeri 3.6'dır (Alonso vd., 2013). pH değeri %10'luk çözeltide 2.7'dir ve erime noktası 113-118°C'dir (Cardoso vd., 2019). Çok sayıda hidroksil grubu içerdiği için higroskopiktir ve %14 nemde jel yapı oluşturur (Gutiérrez vd., 2012). Toksik madde olmaması, antioksidan özellikte olması, şelatlama ve biyouyumluluk özelliklerinden dolayı katkı maddesi olarak kullanımı artan bir üründür (Sarenkova vd., 2019). LBA'nın amfifil özellikte olmasından dolayı doğal emülgatör ve yüzey aktif madde olarak kullanılmaktadır (Alonso vd., 2013; Sarenkova ve Ciprovica, 2018).

LBA, minerallerin bağırsak emilimini destekleyerek kemik metabolik dengesini iyileştirir (Nakano vd., 2010). Bağı dokusunu oluşturan yapıların üzerinde uyarıcı

bir etkiye sahiptir ve üretimini destekler (Goderska, 2019). LBA'nın birçok teknik özelliklerinin yanı sıra prebiyotik özellik taşımasından dolayı probiyotik bakterilerin gelişmesini de teşvik etmektedir. Çok yönlü kullanım alanına sahip, yüksek katma değerli ve düşük maliyetli bir ürün olmasından dolayı son yıllarda LBA'nın ticari önemi artmıştır (Alonso vd., 2013). Ayrıca üretiminde peynir altı suyu kullanılmasıyla çevre dostu bir ürün olma özelliği de vardır. LBA, serbest asit veya LBA tuzları halinde kullanılabilir (Per Munk Nielsen, 2012). Aşağıda LBA'nın kullanım alanlarından bazılarına değinilmiştir.

2.3.LBA'nın Probiyotik Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

LBA sindirime dirençli olması, minerallerin emilimini sağlaması ve probiyotik mikroorganizmaların gelişmesini teşvik etmesinden dolayı, prebiyotik potansiyeli olan bir laktoz türevidir. Bağırsaktaki beta-galaktosidaz enzimi tarafından metabolize edilir. Bu nedenle bağırsakta LBA ve laktoz beta-galaktosidaz enzimi için rekabetçi konumdadır (Schaafsma, 2008).

İnsanlardan izole edilen *Lactobacillus* türlerinin probiyotik suşları laktoz türevlerini kullanabilmeleri açısından değerlendirilmiştir. Laktoz türevleri olarak LBA, laktitol, pentozan ve laktuloz kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak laktoz türevleri ve glikoz karşılaştırıldığında, lag fazında aynı konsantrasyona ulaşmalarına rağmen suşların daha yavaş gelişmelerine neden olmuştur. %2 LBA ve %2 glikoz konsantrasyonlarında *Lactobacillus paracasei* E-97949 suşunun gelişmesi karşılaştırıldığında gelişme hızı ve yoğunluğunun benzer sonuçlar olduğu görülmüştür. Fakat aynı koşullar altında *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 için sadece gelişme yoğunluğunda benzer bir sonuç gözlenmiştir. *Lactobacillus salivarius* E-981006 suşu ise substrat olarak LBA kullanıldığında çok düşük oranda gelişmiştir (Saarela vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada LBA'da probiyotik *Lactobacillus casei* CECT 475 suşunun gelişmesi incelenmiştir. LBA, glikoz içermeyen MRS sıvı besiyerine (pH 6.2) ilave edilerek karbon kaynağı değiştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak MRS sıvı besiyeri (pH 6.2), negatif kontrol olarak herhangi bir karbon kaynağı içermeyen MRS (pH

6.2) hazırlanarak suşun tüm bu durumlardaki gelişimi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda *Lactobacillus casei* CECT 475 suşunun %0.5 LBA'da, başka karbon kaynağı olmadığında, LBA'yı kullandığı kanıtlanmıştır (García vd., 2017).

Kneifel vd. (2000), probiyotik mikroorganizmaların, prebiyotik karbonhidratlarda in vitro gelişme davranışlarını incelemişlerdir. Çalışmada GOS (galaktooligosakkarit); FOS (fruktooligosakkarit), MOS (mannooligosakkarit), laktuloz ve LBA gibi prebiyotik kaynaklar kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *Bifidobacterium* türlerinin LBA'da diğer karbon kaynaklarına göre gelişme oranının %50'den fazla olduğu gözlemlenmiştir. LBA *Bifidobacterium* türleri ve *Lactobacillus* türleri tarafından değişen oranlarda kullanılmaktadır. LBA'nın, biyo-kütle verimini önemli ölçüde etkilediği, ancak gelişme kinetiğinin mikroorganizmanın türüne bağlı olarak değiştiği saptanmıştır (Goderska, 2019).

Wojciechowska vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada ise, hidroksi asitlerin probiyotik bakteriler üzerinde etkisini incelemek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada hidroksi asit olarak laktobiyonik asit, glukonik asit ve glukohptonik asit kullanılmıştır. Hidroksi asitler en yüksek 0,05 M'lik konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu konsantrasyonda kullanılan hidroksi asitlerden glukonik asit ve glukohptonik asit probiyotik suşların gelişimini LBA'ya göre daha olumlu etkilemiştir.

Teknolojik gelişmelerin ve küreselleşmenin artmasıyla probiyotik mikroorganizmaların önemi de artmıştır. Bu durumda probiyotik mikroorganizmaların ihtiyacı olan besin kaynaklarının sağlanması gerekmektedir. Bu mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli olan besin ihtiyacı olarak, birçok olumlu etkisinin yanında prebiyotik etkisi de bilinen LBA kullanılabilir.

2.4.LBA'nın Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Gıda endüstrisinin amacı sadece üretilen gıdanın yapısını korumak değildir. Gıdanın yapısını korurken aynı zamanda tüketicilere fayda sağlayabilen ürün üretmektir. Bu nedenle fonksiyonel ürünlere giderek ilgi artmaktadır. Değerli bir

ürün olan LBA'nın önemli kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı potansiyel bir gıda bileşenidir. Gıda endüstrisinde yoğurt, peynir üretimi sırasında bu ürünlerin üretim süresini azaltır, sabit bir jel yapısının oluşumunu teşvik etmede, tat ve aromanın zenginleştirilmesinde, tat iyileştirmede, taze aromanın korunmasında, laktozsuz süt ürünlerinin üretiminde, bitkisel yağların kısmi hidrojenizasyonun ve oksidasyonun engellenmesinde kullanılmaktadır (Saarela vd., 2003).

LBA ilk olarak Japonya'da Kafkas Denizi yoğurdunda tespit edilmiş ve yoğurdun üst katmanında bulunmuştur. Özellikle fermente süt ürününün yüzeyinden 10 mm içerisine kadar önemli miktarda tespit edilmiştir. Laktoz oksidasyonu aerobik koşullarda oluştuğu için yüzeyden itibaren her 10 mm de bir katmandaki LBA konsantrasyonu ölçülmüştür. En yüksek LBA miktarı 0-10 mm de tespit edilmiştir (Kiryu vd., 2008).

Ribeiro vd. (2016), tuz ve aroma maddeleri eklenmiş sütü LBA ve Glukono-d-lakton (GDL) ile asitlendirerek elde ettikleri pıhtının reolojik özelliklerini, sodyum iyonu ve aroma maddeleri miktarını incelemiştir. LBA ve GDL gibi polihidroksi bileşikler, hidrojen bağlarıyla proteinlere bağlanarak sistemdeki serbest suyu ve protein çözünürlüğünü değiştirir. Sonuçlar incelendiğinde uçucu organik aroma bileşiklerinin miktarında ve reolojik özelliklerinde küçük farklılıklar gözlemlenirken, sodyum iyonu miktarında ise önemli bir fark gözlenmemiştir. LBA ile elde edilen pıhtının sıklığının ve uçucu aroma bileşiklerinin salınmasının GDL ile elde edilene kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında LBA'nın GDL (E 575)'ye alternatif olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

LBA antioksidan özellik taşıdığından yağların oksidasyonunu engelleyebilmektedir. Goderska (2019), kolza yağına farklı konsantrasyonlarda LBA ilavesi ile peroksit değerlerini kontrol etmiştir. Çalışma sonucunda LBA'nın konsantrasyonu arttıkça oksidasyon hızında azalma olduğu belirlenmiştir.

LBA mineral emilimini arttırdığından mineral eksikliğinin giderilmesi amacıyla gıda takviyesi olarak kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada, diyetlerine LBA ilave edilmiş fareler ile kontrol grubu farelerin Ca^{+2} emilimi karşılaştırılmıştır. Diyetine LBA ilavesi yapılan farelerde Ca^{+2} emiliminin arttığı belirlenmiştir (Alonso vd., 2013). Kalsiyum tuzlarının suda çözünürlüğü LBA tuzlarına göre daha düşüktür. LBA tuzlarının suda yüksek çözünürlüğünün olması diğer tuzlara göre teknolojik avantajdır (Cardoso vd., 2019). Ayrıca kalsiyum laktobiyonat diğer kalsiyum tuzları kadar acı bir tada sahip değildir (Nakano vd., 2010).

Et ürünlerinde donma, çözündürme ve pişirme gibi işlemlerden sonra su kaybı meydana gelmektedir. Bunu engellemek için et, dondurulmadan veya pişirilmeden önce marine edilir. LBA ile muamele edilen et ürünlerinin LBA içermeyenlere kıyasla daha az su kaybettiği görülmüştür (Nielsen, 2012). LBA içeren yemlerin tüketilmesi ile yumurta kabuğunun güçlendirilmesi de sağlanabilmektedir. Kalsiyum laktobiyonat ile takviye edilmiş kanatlı yemleri ile beslemenin yumurta kabuğunu güçlendirerek çatlama oranını azalttığı belirlenmiştir (Nakano vd., 2010).

LBA proteinleri pıhtılaştırma özelliğinden dolayı kıvam arttırıcı özelliğe sahiptir (Nakano vd., 2010). Bu nedenle FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi), gıda katkı maddesi olarak kalsiyum laktobiyonatin puding karışımlarında kıvam arttırıcı madde olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (Food and Drug Administration (FDA), 2021).

García vd. (2019) tarafından LBA içeren ve *Lactobacillus casei* ile fermente edilmiş bir süt ürünü üretilmiştir. Süt ilk aşamada, *Pseudomonas taetrolens* tarafından fermente edilerek LBA üretimi sağlanmıştır. Daha sonra LBA ve süt karışımı hazırlanarak sterilize edilmiştir. Bu karışıma *Lactobacillus casei* aşılansarak laktik asit fermantasyonu gerçekleştirilmiş ve LBA içeren fermente süt ürünü elde edilmiştir. Sonuç olarak 30 g/L LBA, 10^9 kob/mL aktif *L. casei* popülasyonuna sahip ve <%1 laktoz içerikli bir sinbiyotik fermente süt elde edilmiştir.

2.5. LBA'nın Diğer Alanlarda Kullanımı

İlaç endüstrisinde, LBA, transplantasyondan önce, organları stabilize eden solüsyonlarda ana bileşen olarak kullanılır. Şelatlama özelliğinden dolayı dokulardaki oksidatif hasarı azaltır. Organların vücut dışında 2 güne kadar korunmasını sağlar (Kluyver vd., 1950; Ludwig vd., 2004). Eritromisin LBA ile hazırlanan preparatı eritromisin laktobiyonattır. Eritromisin laktobiyonat, serbest halde bulunan eritromisine göre 50-100 kat daha fazla suda çözünür (Nakano vd., 2010). Ayrıca LBA, alerjik deri iltihapları ve akne gibi dermatolojik patolojilere karşı da etkilidir (Alonso vd., 2013). LBA'nın moleküler yapısından dolayı karaciğerde gelişen tümör hücrelerini hedef alan bir ilaç üretiminde kullanılır (Alonso, 2018). En dış katmanı LBA ile kaplı olan mikrokapsüllerin tümörü hedefleme davranışı sergilemiştir. LBA katmanı olmayan kapsüllerde ise tümör hücrelerine az düzeyde bir bağlanma görülmüştür (Zhang vd. 2011).

Kozmetik endüstrisinde, LBA, cildi nemlendirici etkisi, yaşlanma karşıtı ve yenileyici özelliklerinden dolayı cilt bakımı formülasyonlarının temel bir bileşeni olarak kullanılmaktadır. Glikolik asit gibi klasik hidroksiasitlere kıyasla LBA'nın cildi tahriş edici etki göstermediğini klinik olarak kanıtlamıştır (Alonso vd., 2013). Green vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada %8 LBA içeren krem (pH 3.8) hazırlanmıştır. Bu çalışmada LBA'nın, 12 haftlık incelemeden sonra cildin tüm katmanlarına etkili olduğu gözlenmiştir. Kozmetikte yararlanılan en önemli özellikleri şelatlama etkisi ve higroskopik özelliğidir. Şelatlama etkisinden dolayı antioksidan aktiviteye sahiptir. Vücutta bulunan Fe^{+2} iyonları ile ferritin ve hemosiderin olmak üzere iki önemli protein formunda kolayca kompleksler oluşturur. Yaşlanmadan sorumlu hidroksil radikallerini oluşturan H_2O_2 ile rekabet ettiği için reaksiyonda kullanımlarını engeller. Böylelikle LBA, ciltte çoğu reaktif serbest radikallerin oluşumunu engeller. Cildin güneşe maruz kalması sırasında, oksidasyona ve dolayısıyla çoklu doymamış yağ asitlerine ve diğer lipidlere zarar veren hidroksil radikalleri üretilir. Bu reaksiyon UV kaynaklı lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, özellikle doymamış yağ asitleri bakımından zengin hücre zarlarını ve mitokondrileri güneşe maruz kalma hasarından koruyabilir (Algiert-Zielińska, 2019).

Kimya endüstrisi, LBA, kimya endüstrisinde şeker bazlı bir yüzey aktif madde olarak veya biyolojik olarak parçalanabilen deterjanlarda kullanılır. Yüzey aktif madde olmasından dolayı biyobozunur çamaşır deterjanı üretiminde %40'a kadar LBA kullanılır (Ludwig vd., 2004; Goderska, 2019). Gerling vd. (1995) tarafından, iyi köpük dengeleyici, temizleme, emülsiyonlaştırma ve yumuşatma özelliklerine sahip LBA amid bileşimlerini geliştirilmiştir ve deterjanların formülasyonlarında kullanılmıştır. LBA birçok metal işleme operasyonunda korozyon önleyici maddeler olarak kullanımı önerilmektedir (Alonso vd., 2013).

2.6. LBA'nın Üretim Yöntemleri

LBA ilk olarak 1889 yılında Emil Fischer ve Jacob Meyer tarafından, laktoz uygun koşullar altında brom ile oksitlenerek sentezlenmiştir. Sonraki dönemlerde LBA üretimi için çeşitli kimyasal, elektrokatalitik ve mikrobiyal veya enzimatik işlemler ile üretimi yapılmıştır (Ludwig vd., 2004). Aşağıda elektrokimyasal oksidasyon, heterojen katalitik oksidasyon ve biyokatalitik oksidasyon yöntemlerinden bahsedilmiştir.

2.6.1. Elektrokimyasal Oksidasyon

Bu yöntem Magariello ve Islip (1956) tarafından geliştirilip %98 verimle LBA üretimi sağlanmıştır. Elektrolitik oksidasyon işlemleri yapılarak LBA üretiminde Isabell (1934), grafit elektrotlarını kullanarak kalsiyum karbonat ve brom varlığında laktozu okside etmiştir ve sonucunda kalsiyum laktobiyonat üretmiştir (Gutiérrez vd., 2012).

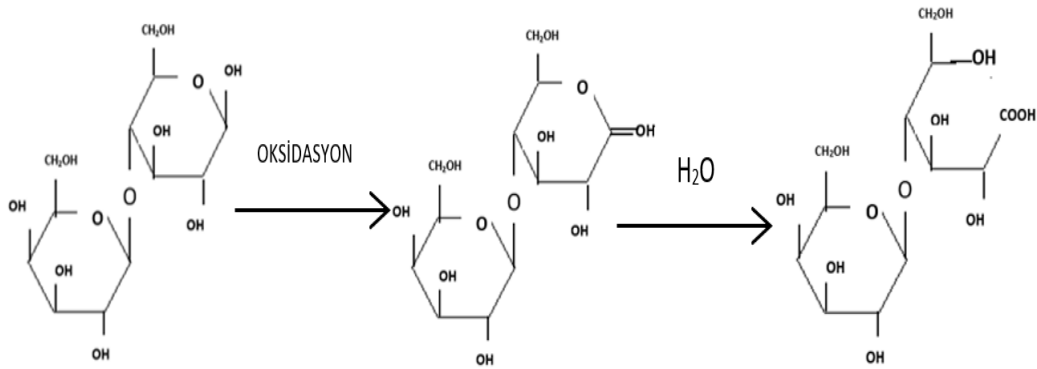
2.6.2. Heterojen Katalitik Oksidasyon

Hendriks, Kuster ve Marin (1990) tarafından paladyum ve bizmut-paladyum destekli katalizörler kullanılarak, laktozun ilk heterojen katalitik oksidasyonu gerçekleştirilmiş ve başarılı bir şekilde LBA üretilmiştir. Bu katalizörlerin, reaksiyon sırasında aşırı oksidasyon yoluyla etkisiz hale gelir. Bu nedenle reaksiyon ortamındaki oksijen konsantrasyonu kontrol edilmelidir. Bizmut

sızmaya eğilimli olduğu için, bizmut içeren katalizör uygulamaları, gıda ve ilaç endüstrisi için kimyasalların üretimi için uygun değildir. Heterojen katalitik oksidasyon için en uygun katalizörler altın destekli katalizörlerdir (Gutiérrez vd., 2012).

2.6.3. Biyokatalitik Oksidasyon

LBA, endüstriyel olarak pahalı, yoğun enerji gerektiren, zararlı oksitleyiciler ile üretimi yapılmıştır. Fakat bu yöntemin gıda endüstrisi için kullanılması tehlikelidir. Bu nedenle LBA üretimi için biyolojik yollar aranmıştır. LBA'nın biyokatalitik üretiminde biyokatalizör olarak mikroorganizma veya spesifik enzimler kullanılır. *P. graveolens*'ten saflaştırılan laktoz dehidrogenaz enzimi ile laktozun oksidasyonu sonucunda reaksiyonun birincil ürünü olan Laktobiono- δ -lakton oluşur. Laktobiono- δ -lakton'un hidrolize uğraması sonucunda da LBA elde edilir (Nakano vd., 2010; Cardoso vd., 2019). Şekil 2.2.'de laktozun LBA'ya biyokatalitik oksidasyonun sistematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyokatalitik oksidasyon yolu ile laktozun laktobiyonik aside dönüşümü

Genel olarak prosesler, biyolojik yapıların zarar görmemesi ve verimli çalışmalarını için düşük sıcaklıklarda (25-50°C), Na, Ca veya K ilaveleri yapılarak pH değeri sabit tutularak çalışır (Okur, 2015). Biyolojik olarak enzimatik üretim ve mikrobiyel üretim olmak üzere 2 farklı üretim yolu vardır.

2.6.3.1. Enzimatik Üretim

Son yıllarda, LBA'nın üretimi üzerine, enzimatik sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemler rafine laktozu, oksidoredüktaz gibi enzimler ile spesifik biyokatalitik basamaklar ile oksitler. Hem enzim üretimi hem de biyokataliz işleminden önceki saflaştırma aşamalarından dolayı pahalı, zaman alıcı ve zahmetli olması dezavantajıdır (Alonso vd., 2013). Enzimatik olarak LBA üretimi için, birçok mikroorganizma ve bitkilerden laktoz okside edici, glukoz-fruktoz dehidrogenaz veya cellediyoz dehidrogenaz gibi, enzimler kullanılmıştır (Gutiérrez vd., 2012). Endüstriyel olarak 2009 yılında Chr. Hansen ve Novozymes şirketleri LactoYIELD adlı enzimatik karışımı üretmiştir. Bu ürün ile peynir altı suyundaki laktozun LBA'ye dönüşmesi sağlanır ve elde edilen reaksiyon ürünü kalsiyum laktobiyonattır.

2.6.3.2. Mikrobiyel Üretim

Diğer organik asitlerin fermentasyon yolu ile üretimi kolayca keşfedilmesine rağmen LBA'nın fermentasyon ile üretiminin keşfedilmesi biraz zaman almıştır. İlk kez Stodola ve Lockwood tarafından, 1940'ların sonunda, LBA'nın bakteriler tarafından üretimi geniş bir tarama sonrasında *Pseudomonas* türlerinde bulunmuştur. 1950'lerden bu yana LBA'nın mikrobiyel üretimi ve tüketimi üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Alonso vd., 2013).

Laktozun LBA'ya biyolojik olarak dönüşümü *Halobacterium sacharovorun* ve *Penicillium chrysogenum* gibi diğer mikroorganizmalarda da gözlenmiştir (Nordkvist vd., 2006). *Pseudomonas* türlerinin yanı sıra bazı laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin de LBA ürettiği çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Gutiérrez vd., 2012). LBA üretiminde, kimyasal veya enzimatik yollarda karşılaşılan olumsuzluklar mikrobiyel üretim ile ortadan kalkmıştır. Çizelge 2.2.'de bazı mikroorganizmaların LBA üretiminde hangi enzimleri kullandıkları ile ilgili bilgi verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı mikroorganizmaların laktobiyonik asit üretimi için enzimleri

Mikroorganizma	Enzim	Kaynak
<i>Acremonium strictum</i>	Gulukooligasakkarit oksidaz	(Lin vd., 1991)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Laktoz oksidaz	(Murakami vd., 2002)
<i>Pseudomonas graveolens</i>	Laktoz dehidrogenaz	(Nakano vd., 2010)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Sellebiyoz dehidrogenaz	(Nakano vd., 2010)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glukoz-fruktoz oksidoredüktaz	(Nakano vd., 2010)
<i>Acremonium strictum</i>	Glukoligosakarit oksidaz	(Gutiérrez vd., 2012)
<i>Gluconobacter oxidase</i>	Glikoz dehidrogenaz	(Oh vd., 2020)
<i>Acetobacter orientalis</i>	Glikoz dehidrogenaz	(Oh vd., 2020)
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Glikoz dehidrogenaz	(Oh vd., 2020)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sellebiyozdehidrogenaz	(Yang vd., 2021)

LBA üretiminde, mikrobiyel fermantasyon ve laktozun enzimatik oksidasyonu yoluyla biyokatalitik olarak gerçekleştirilen proseslerdir. Mikrobiyal fermantasyon ile laktozun enzimatik oksidasyonu karşılaştırıldığında, enzimatik prosesler daha verimlidir. Fakat enzimlerin stabilitesi ve katalitik aktivitesi, biyokataliz işlemleri sırasında çevre koşullarından çabuk etkilenebilirler ve bununla birlikte enzimlerin verimliliğinde bir büyük düşüş olabilir (Yang vd., 2021).

2.7. GDH ve AAB tarafından LBA üretim mekanizması

Membran bağlı GDH (mGDH), D-glikozun piranoz formunun (C1 pozisyonunda) ve diğer monosakkaritlerin laktona oksidasyonunu katalizler. Reaksiyon periplazmada meydana gelir. Elektron alıcısı zardaki ubikinondur (koenzim Q) ve yaklaşık 87 kDa proteindir (Anthony ve Ghosh, 1998).

AAB şekerleri, alkolleri ve şeker alkollerini güçlü bir şekilde okside ederek asit ve ketonlara dönüştürmeleri ile bilinirler. Bu tür oksidasyonlar tamamlanmamış veya oksidatif fermantasyon olarak adlandırılır (Matsutani ve Yakushi, 2018). AAB, *Pseudomonads* gibi aerobik bakteriler, glikoz alımı için, glikoliz veya fosfotransferaz sistemine sahip değildir. Bu nedenle GDH enzimi ile glikozu okside ederler. D-glikozun anomer karbonundaki hidroksil grubu, GDH tarafından oksitlenir ve böylece D-glukono- δ -laktona dönüştürülür, bu da kendiliğinden veya enzimatik reaksiyonla D-glukonik aside hidrolize olur. Bazı bakteriler GDH enzimine sahip olmalarına rağmen PQQ'yu sentezleyemediği için glikozu okside edemez. Örneğin *Klebsiella aerogenes*, glikozu GDH ile okside eder ancak *Escherichia coli* bunu yalnızca gelişme ortamına PQQ temin edildiğinde glikozu okside eder (Anthony, 1992). Çizelge 2.3'te AAB'de GDH enziminin varlığı görülmektedir.

Çizelge 2.3. Asetik asit bakterilerinde glikoz dehidrogenaz varlığı

CİNS	GDH	CİNS	GDH
<i>Acetobacter</i>	+	<i>Neosasaia</i>	+
<i>Komagataeibacter</i>	+	<i>Acidomonas</i>	+
<i>Gluconacetobacter</i>	+	<i>Saccharibacter</i>	+
<i>Asaia</i>	+	<i>Parasaccharibacter</i>	+
<i>Tanticharoenia</i>	+	<i>Acidiphilium</i>	-
<i>Kozakia</i>	+	<i>Granulibacter</i>	-
<i>Gluconobacter</i>	+	<i>Rubritepida</i>	-
<i>Neokomagataea</i>	+	<i>Acidocella</i>	-
<i>Bombella</i>	-	<i>Commensalibacter</i>	-

2.8. LBA'nın Tespitinde Kullanılan Yöntemler

LBA'nın tespitinde moleküler ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Mikroorganizmalardaki laktoz oksidasyonunda rol oynayan genlerin varlığı bir moleküler yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edilir. Mikroorganizmaların ürettiği metabolitin varlığının kontrolü kromatografik yöntemler ile tespit edilir.

2.8.1. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerin kullanım alanları, sürekli olarak değişmekte ve gelişmektedir. Dünya çapında yaygın olarak kullanılmakta olan moleküler yöntemler genetik yapıyı temel alır. Mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar tanımlanması yapılabilir. Başlıca moleküler yöntem teknikleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu – Uçuş süresi (MALDI-TOF), Çoklu Lokus Dizilim Analizi (MLST), 16S rDNA dizilim analizidir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Kısa sürede sonuç vermesi, doğruluk oranlarının yüksek, güçlü ayırım gücüne sahip, tekrarlanabilir ve uygulanmasının kolay olması moleküler yöntemlerin klasik yöntemlere kıyasla olumlu özellikleridir (Çakır ve Çakmakçı, 2005).

2.8.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hücre içerisinde bulunan DNA üzerinde belirlenen hedef bölgenin, o bölgeye özgü primerler ile hücre dışında uygun koşullar sağlanarak çoğaltılması metoduna dayanır. 1984 yılında Mullis ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem iki yüz mikrolitrelik bir tüpte sıcaklık kontrolü yapılarak gerçekleştirilir ve mikrobiyolojik analizlerde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Aran, 2016). Bir PZR döngüsü 3 adımdan oluşur:

1. Basamak: Yüksek sıcaklık ile çift zincirli DNA sarmalının denatürasyonu ile birbirinden ayrılmasıdır.
2. Basamak: Çoğaltılması istenilen hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik iki oligonükleotidin uygun sıcaklık ile hedef DNA'ya bağlanmasıdır.
3. Basamak: DNA polimeraz ile DNA'nın sentezlenmesidir.

PCR tekniğinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak, tanımlanmanın hassasiyetini ve özgüllüğünü arttırmak için ters transkriptaz PZR (Reverse Transcriptase PZR;

RT-PZR), PCR ürününün endonükleaz ile kesilmesi (PZR-RFLP), çoğaltılan PCR fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) ve çoklu PZR (Multipleks PZR) gibi farklı PZR temelli teknikler geliştirilmiştir (Tutar vd., 2016).

2.8.1.2. Real Time PZR (RT-PZR)

RT-PZR analizi, floresan syber Green boyası ile her bir amplifikasyon ürününü görüntülemek için oluşturulan bir sistemdir. Bu floresan boyalı PZR ürünlerinin ışık kaynağından gelen ışınlar ile uyarılmasıyla ışımaya yayması ve yayılan ışımının algılanarak izlenebilir hale gelmesi ile oluşan bir sistemdir. Bu teknik ile hedef bölgenin logaritmik olarak artışı eş zamanlı olarak izlenebilir. Floresanın şiddetine göre kalitatif ve kantitatif analiz yapılmaktadır. RT-PZR teknolojisinde kalıp DNA'nın amplifikasyonu 4 farklı fazdan oluşmaktadır. Bunlar doğrusal zemin faz, erken üssel faz, üssel faz ve düz fazdır. PZR'nin başlamadığı yani floresan ışımada artış gözlenmeyen faz doğrusal zemin fazıdır. Temel çizgi (baseline) hesaplaması bu aşamada yapılır. Floresan miktarının eşik değerine (treshold) ulaştığı nokta erken üssel fazdır. Eşik değerine denk gelen döngü sayısı eşik değeri (Ct/Cp) olarak bilinir. Kantitatif analizde Ct değeri önemli bir parametredir, çünkü Ct değeri hedef kopya sayısı ile ters orantılıdır (Tutar vd., 2016).

Erime eğrisi (Melting Curve), PZR sonrası amplifiye edilmiş DNA'nın, üzerinde gerçekleştirilen bir analiz basamağıdır. Analiz, bir dsDNA bağlayıcı boya (SYBR Green I) ile birlikte tipik olarak amplifikasyon basamaklarını takip eder. PCR basamaklarından sonra oluşan amplifiye ürün, 65°C'den 95°C'ye kadar bir sıcaklık artışına tabi tutulur. Sıcaklık artışının sonucunda dsDNA denatüre edilir ve tek iplikli DNA (ssDNA) oluşur. Verilen sıcaklık aralığındaki artış süresince dsDNA'ya bağlanan floresan boyanın ışımaya salınmaya başlar ve bir optik sistem tarafından kaydedilir. Optik sistem bu ışımayı her 0.25-0.5°C'de bir ölçerek kaydeder. Floresan ışımaya, bu işlem boyunca zamanla azalmaya başlar. Ürünün erime sıcaklığı, T_m, dsDNA ürünlerinin yarısının eridiği sıcaklık olarak tanımlanır. Erime sıcaklığı, amplifikasyon için karakteristik bir değerdir. Erime

eğrisi, örneğin PZR ürünlerinin tanımlanması veya karakterizasyonunda DNA ürünlerinin kalitatif analizi olarak kullanılır (Thermo Scientific, 2013).

2.8.2. Kromatografik Yöntemler

Az miktarda ve birbirine yakın özellikteki maddelerin kolayca ayrımının yapılabildiği yöntemlerdir. Kromatografi iki farklı fazdan oluşmaktadır. Bir karışımdaki çeşitli maddelerin, hareketli bir faz ile sabit fazın üzerinden geçirilerek ayrılması prensibine dayanmaktadır. Karışımdaki maddelerin özelliklerine göre farklı hızda hareket ederler ve böylelikle karışımı oluşturan maddelerin ayrımı gerçekleşir. Kromatografi ayırma mekanizmalarına göre, uygulanma biçimine göre ve faz tipine göre üç grupta sınıflandırılmaktadır. Çizelge 2.4'de Uygulama biçimine göre kromatografi çeşitleri verilmektedir.

Çizelge 2.4. Uygulama biçimine göre kromatografi

Düzlemsel Kromatografi	Kâğıt Kromatografi
	İnce Tabaka Kromatografi
Kolon Kromatografi	Gaz Kromatografi
	Sıvı Kromatografi
	Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografi

2.8.2.1. İnce tabaka kromatografi (TLC)

TLC, bir madde bulunan bileşenleri ucuz ve basit olarak ayırmak, belirlemek üzere kullanılır. TLC'nin bir sabit fazın üzerinde bulunan maddenin mobil fazla yürütülerek bileşenlerine ayrılması prensibine dayanır. Sabit faz olarak en yaygın kullanılan adsorban madde silika jel kaplı plakalar kullanılır. TLC'nin uygulanmasında ayrımı yapılacak olan maddeden az bir miktar plakanın ucuna damlatılır ve plaka, içinde mobil faz bulunan ağzı kapalı bir geliştirme tankına

yerleştirilir (İşyapan, 2011). Yürütme işleminden sonra örnek bileşenlerinin yerinin saptanması için çeşitli reaktifler kullanılır. İyot çözeltileri, sülfürik asit çözeltileri ve floresan özellikteki maddeler plaka üzerine püskürtülerek belirlenebilir. Reaktifler ile gözlemlenen maddelerin gecikme faktörü hesaplanır. Gecikme faktörü (retention factor) R_f ile simgelenir ve Denklem 2.1'de verilmiştir.

$$R_f = \frac{dR}{dM} \quad 2.1$$

dR : Çözünen maddenin belli bir sürede gittiđi mesafe

dM : Mobil fazın belli bir sürede gittiđi mesafe

Bir numunedeki maddelerin R_f değeri madde hakkında bilgi verebilir, fakat bunun kesinliğinin bilinmesi için standart ürün ile karşılaştırılması gerekir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden temin edilen ev yapımı sirke, üzüm, şeftali, kiraz, erik, gilaburu meyvesi örnekleri izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Kullanılan izolasyon materyaline ait detaylı bilgi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. İzolasyon kaynaklarına verilen kodlar, temin edildiği şehirlerin baş harfi ve hangi meyveden alınmışsa o meyvenin baş harfi verilerek yapılmıştır.

Çizelge 3.1. İzolasyon materyali olarak kullanılan örnekler

No	Ürün Çeşit	İl	Ürün Kodu
1	Üzüm sirkesi	Manisa	MÜ1
2	Üzüm sirkesi	Gaziantep	GÜ
3	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ1
4	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ2
5	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ3
6	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ4
7	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ5
8	Üzüm sirkesi	Ankara	AÜ1
9	Üzüm sirkesi	Denizli	DÜ
10	Üzüm sirkesi	Manisa	MÜ2
11	Üzüm sirkesi	Manisa	MÜ3
12	Üzüm sirkesi	Isparta	IÜ6
13	Elma sirkesi	Manisa	ME1
14	Elma sirkesi	Manisa	ME2
15	Elma sirkesi	Isparta	IE1
16	Elma sirkesi	Isparta	IE2
17	Kiraz sirkesi	Isparta	İK1
18	Kiraz sirkesi	Isparta	İK2
19	Kiraz sirkesi	Isparta	İK3
20	Pirinç sirkesi	Isparta	IP
21	Erik sirkesi	Isparta	IE3
22	Erik	Isparta	IE4
23	Şeftali	Antalya	AŞ
24	Kiraz	Isparta	İK4
25	Emir üzüm	Ankara	AÜ2
26	Sultani üzüm	Manisa	MÜ4
27	Dimrit üzüm	Isparta	IÜ8
28	Misket üzüm	Isparta	IÜ9
29	Gilaburu meyve	Mersin	MG

Sirke örneklerinden izole edilen suşlardan DNA elde etmek için ticari bakteri genomik DNA test kiti (Hibrigen Biyoteknoloji, Kocaeli, Türkiye) kullanılmıştır. PZR Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için 2x Magic SYBR Mix Kit (Procomcure Biotech GmbH, Thalgau, Avusturya), Nuclease-Free Water (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır. Primer seti (Hibrigen Biyoteknoloji) temin edilmiştir.

İnce tabaka kromatografi analizi için TLC Kiesel gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm (Merck, Darmstadt, Almanya) ve referans standart LBA (EDQM, Strazburg, Fransa) kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması

Örnekler aseptik koşullarda steril kaplar içerisine alınarak SDÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyel Teknoloji Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Tüm örneklerin pH'sı masa üstü pH metre (Mettler Toledo Seven Compact, İsviçre) ile ölçülmüştür. Meyve örneklerinden 10'ar g, sirke örneklerinden 10'ar ml alınarak aseptik koşullarda 90 ml steril Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ile ilk seyreltme yapılmıştır. Daha sonra meyve örnekleri steril homojenizatör kullanılarak aseptik koşullarda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen tüm örnekler, 9'ar ml FTS içeren tüplere 1'er ml alınarak 10⁻¹'lik seyreltiden aseptik şartlarda 10⁶'ya kadar dilüsyon serisi hazırlanmıştır (Karahan vd., 2002).

3.2.2. Sayım ve izolasyon yöntemi

Asetik asit bakterilerinin izolasyonu için yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan dilüsyon serisinden aşağıda bileşimi verilen GYC agara yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Tüm çalışma paralelli bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon plakları 28°C'de 4-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra sayım yapılarak örneklerin g ya da mL'sindeki bakteri

sayısı hesaplanmıştır. Aynı plaklardan izolasyon amacıyla şeffaf zon oluşturan ve farklı morfolojiye sahip koloniler seçilmiştir. Seçilen kolonilerin mikroskop altında hücre morfolojileri ve gram tepkimeleri incelenmiştir. Bu özellikler açısından asetik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatların saflaştırma işlemlerine geçilmiştir. Seçilen izolatlar GYC agara sürme yöntemi ile ekilmiştir (Karahan vd., 2010; Kowser vd., 2016). Bu işleme izolatlar saflaştırılana kadar birkaç kez devam edilmiştir. Saflaştırma işlemi tamamlanan izolatlar HS sıvı besiyerinde 28°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan suşlar %20-25 gliserol içerecek şekilde kriyo tüplere alınmış ve kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Poyrazoğlu Çoban, 2007).

3.2.3. İzolasyonda kullanılan besiyerleri

Örneklerden AAB izolasyonu ve saflaştırma için GYC Agar, aktifleştirmek için ise Hestrin ve Schramm (HS) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Küf gelişimini önlemek için GYC agara sterilizasyondan önce 100 ppm sikloheksimid (Sigma Aldrich, Missouri, ABD) eklenmiştir (Çakmakçı, 2008; Gomes vd., 2018; Lynch vd., 2019). GYC Agar ve HS sıvı besiyerlerinin içeriği Çizelge 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. GYC agar besiyeri

Glikoz	5.0 g
Maya Ektraktı	1.0 g
CaCO ₃	2.0 g
Agar	2.0 g
Distile su	100 mL

Çizelge 3.3. HS sıvı besiyeri

Glikoz	2.0 g
Pepton	0.5 g
Maya ektraktı	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	0.27 g
Sitrik asit	0.15 g
Distile su	100 mL

GYC agar 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra 45-50°C'ye kadar soğutulan GYC agar, aseptik koşullarda 12-15 ml olacak şekilde steril petri kutularına dökülmüştür. HS sıvı besiyeri ise tüplere bölünerek, 121°C'de 15 dakika süre ile sterilizasyonu sağlanmıştır (Son vd., 2003; Çakmakçı, 2008).

3.2.4. DNA izolasyonu

-20°C'de muhafaza edilen saf bakteri suşları, HS sıvı besiyerinde 28°C'de 4-5 gün inkübe edilerek aktiveleştirilmiş ve steril FTS kullanılarak aseptik koşullarda örneklerin 10⁻⁶'ya kadar dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyon serilerinden paralelli bir şekilde GYC Agara damla kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Gelişme gözlenen plaklarda hem sayım yapılmış hem de DNA izolasyonu için koloni alınmıştır. Daha sonra ticari kit protokolüne göre genomik DNA izolasyonu işlemlerine geçilmiştir. İşlem basamakları aşağıda verilmiştir.

1. Steril eppendorf tüpüne katı besiyerinden hücreler toplandı ve 500 mL LB1 tamponu içerisinde tüp karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür.
2. 2 µl RNaz A (20 mg/mL) eklenmiş ve tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır.
3. 45 µL Proteinaz K (20 mg/mL) eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 175 µL LB2 Tamponu eklenmiştir ve tüp karıştırıcıda birkaç saniye karıştırılmıştır. 50°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Filtreli tüplere 800 µL BE tamponu eklenerek santrifüj ile tamamen boşaltılmıştır. Böylece filtreli tüpler denge haline getirilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanan karışım 10 saniye tüp karıştırıcıda karıştırılarak dengeye getirilmiş olan filtreli tüpün üzerine eklenmiştir.

6. 10 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne süzülen sıvı atılmıştır.
7. 500 µL BDY Tamponu filtreli tüpe eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
8. 7. basamak tekrar edilmiştir.
9. Filtreli tüpün membranının kuruması için hiçbir sıvı eklenmeden 12 000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Toplama tüpü süzülen sıvı ile birlikte atılmıştır.
11. Filtreli tüp temiz 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve doğrudan membran üzerine 40-100 µL BDE Tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte kalan izole edilmiş DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, süspansiyonun µL'sinde bulunan DNA'nın konsantrasyonu ve PZR işlemi için gerekli olan süspansiyonun miktarı tespit edilmiştir. Bunun için NanoDrop (VWR, Radnor, Pennsylvania, ABD) cihazında 260 nm'de okuma yapılmıştır.

3.2.5. Primer dizaynı

National Center for Biotechnology Information (NCBI)'dan AAB'nin GDH enzimine ait gen dizileri taranmıştır. Çıkartılan gen dizilerinden ortak nükleotit dizisini bulmak amacı ile çoklu DNA dizisi hizalama (MSA) yapılmıştır. Çoklu dizi hizalama programı olarak Clustal Omega kullanılmıştır (Higgins vd., 1996). MSA işleminden sonra ortak kısımlar incelenmiştir ve bu bölgelerden Primer-BLAST programı ile primerler tasarlanmıştır (Untergasser vd., 2012). Kullanılan primerlerin baz dizileri ve Tm değerleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. PZR reaksiyonunda kullanılan oligoların baz dizisi

	Baz Dizisi	Tm	bp	NCBI Kaynağı	Erişim No
İleri	5' TCACGCCCGCAAATGTCAGC 3'	61°C	120	<i>G. oxydans</i>	LT900338
Geri	3' CCTCAAGATTGAACTCATGGCCC 5'				

3.2.6. Gerçek zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR bileşenleri ticari qPZR kitine göre hazırlanmıştır. Master mix protokolüne göre bileşenler Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı PZR bileşenleri

BİLEŞEN	MİKTAR
2X Magic SYBR Mix	10 µL
İleri Primer	0.5 µL
Geri Primer	0.5 µL
DNA	50 ng/µL
H ₂ O	20 µL'ye tamamlanır.
TOPLAM	20 µL

Bileşenler karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara (Thermo Fisher 96-Well Plates) pipetlenmiştir. Plakalar, gerçek zamanlı PZR cihazı (PikoReal 96 Real-Time PCR System, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak master mix protokolüne göre analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda oluşan amplifiye ürüne erime eğrisi analizi yapılarak spesifik bölge olup olmadığı belirlenmiştir. Bu işlem sırasında uygulanan sıcaklık süre ve döngü sayıları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-PZR için kullanılan sıcaklık, süre ve döngü sayıları

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Süre (dk)
Başlangıç Denatürasyonu	1	95 °C	5:00
Amplifikasyon	40	95°C	
		55-60°C (oligonükleotide özgü)	00:15
		72°C	00:20
Final uzatma	1	72°C	02:00
Erime Eğrisi Analizi	65°C'den 95°C'ye kadar 0.5°C'lik sıcaklık artışlarını kapsar.		

3.2.7. Suşların LBA üretiminin TLC ile belirlenmesi

qPZR analizinden sonra suşların TLC ile analizi yapılmıştır. TLC analizi basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Durağan hücreler hazırlanmıştır (x10) (Kiryu vd., 2015).

- Suşlar, 5 mL YPGL sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 240 rpm/dakika hızda, 27°C'de 3-4 gün inkübe edilir. YPGL sıvı besiyeri bileşenleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. YPGL besiyeri bileşenleri

Glikoz	0.5 g
Laktoz	0.5 g
Maya eksraktı	0.5 g
Polipepton	0.5 g
MgSO ₄ heptahidrat	0.1 g
Su	100 mL

- Daha sonra kültürlerden 1/100 hacminde YPGL sıvı besiyerine aktarılmıştır ve çalkalamalı inkübatörde 240 rpm/dakika, 27°C'de 3 gün inkübe edilmiştir.

- Hücreler soğutmalı santrifüjde 4°C'de 5.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek sıvı besiyerinden ayrılmıştır.
- Ayrılan hücreler steril FTS ile iki kez yıkanmıştır ve yukarıda belirtilen koşullarda santrifüj edilmiştir.
- Yıkanan hücreler geliştirildikleri besiyeri hacminin 1/20'si düzeyinde steril FTS (20x) ile süspansiyon edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan durağan hücreler kullanılıncaya kadar -20°C'de depolanmıştır.

2. Her suşun durağan hücreleri (2x), %1 laktoz ve 100 mM asetat tamponundan (pH 5.5) oluşan bir reaksiyon karışımı içinde (durağan hücreler 1x seyreltilmiş halde) 27°C'de 3 gün inkübe edilmiştir (Kiryu vd., 2008).
3. Daha sonra hücreler santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve reaksiyon karışımının TLC'de analizi aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır:
 - TLC plakalarının alt kısmından ve yanlarından 1'er cm boşluk bırakılacak şekilde kurşun kalem ile çizgi çekilmiştir.
 - TLC plakalarına çekilen çizgi içinde kalacak şekilde hazırlanan süpernatantlardan 2'şer µL damlatılmıştır. Plakalar 2 saat laboratuvar ortamında, 15 dakika 100°C'de kurutulmuştur.
 - Yürütücü solvent olarak etil asetat : asetik asit : su, 3:1:1 (v/v/v) oranlarında karıştırılarak hazırlanmıştır (Murakami vd., 2002). TLC tankının (25x5x25), solvent ile doygun hale gelmesi için tank yaklaşık bir saat yürütücü solvent konularak bekletilmiştir.
 - Plakalar tanka yerleştirildikten sonra 24 saat boyunca solventin yürüme işlemi devam etmiştir.

- Yürüme tamamlanınca plaklara etil alkolde hazırlanmış %20 sülfürik asit püskürtülmüştür ve plakalar 110-120°C'de bekletilmiştir (Aygan, 2008). Suşların ürettiği LBA'nın varlığı TLC'de standart LBA ile karşılaştırılarak saptanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 İzolasyon Sonuçları

Yapılan bu çalışmada, mikrobiyel LBA üreten bakterilerin izolasyonu için çeşitli yörelerinden toplanan 13 adet üzüm sirkesi, 5 adet elma sirkesi, 3 adet kiraz sirkesi, 1 adet erik sirkesi, 1 adet pirinç sirkesi, 3 adet farklı üzüm çeşidi, 1 adet erik, 1 adet şeftali, 1 adet kiraz ve 1 adet gilaburu meyvesi olmak üzere toplam 31 adet örnek kullanılmıştır. İzolasyon kaynaklarının pH değerleri ölçülmüştür. Sirke örneklerinin pH değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sirke örneklerinin pH değerleri

Suşlar	Kaynak	pH	Suşlar	Kaynak	pH
MÜ1	Üzüm sirkesi	3.29±0.02	IÜ6	Üzüm sirkesi	3.57±0.00
GÜ	Üzüm sirkesi	2.95±0.01	ME1	Elma sirkesi	3.17±0.00
IÜ1	Üzüm sirkesi	3.72±0.01	ME2	Elma sirkesi	3.12±0.01
IÜ2	Üzüm sirkesi	2.24±0.01	IE1	Elma sirkesi	3.45±0.01
IÜ3	Üzüm sirkesi	3.71±0.00	IE2	Elma sirkesi	3.32±0.01
IÜ4	Üzüm sirkesi	3.82±0.01	IK1	Kiraz sirkesi	3.43±0.01
IÜ5	Üzüm sirkesi	3.50±0.01	IK2	Kiraz sirkesi	3.41±0.02
AÜ1	Üzüm sirkesi	3.65±0.01	IK3	Kiraz sirkesi	3.51±0.00
DÜ	Üzüm sirkesi	3.27±0.01	IP	Pirinç sirkesi	3.54±0.01
MÜ2	Üzüm sirkesi	3.17±0.00	IE3	Erik sirkesi	3.05±0.01
MÜ3	Üzüm sirkesi	3.77±0.01			

Üzüm sirkesi örneklerinde pH değerleri 2.24 ile 3.82 arasında değişmektedir. En düşük pH’ya sahip olan IÜ2 ve IÜ4 örnekleri Isparta’dan alınan örnekleridir. Elma sirkesi örneklerinde pH değerleri 3.12-3.45 arasında değişmektedir. En düşük pH’ya sahip olan ME2 örneği Manisa’dan, en yüksek pH’ya sahip olan IE1 örneği

Isparta'dan alınmıştır. Isparta'dan temin edilen 3 adet kiraz sirkesinin pH'ları 3.41-3.51 arasında değişmektedir. Bilimsel çalışmalar için üretilmiş olan 1'er adet pirinç sirkesi ve erik sirkesi örneklerinin pH'ları sırasıyla 3.54 ve 3.05'tir. Çalışmada incelenen meyve örneklerinin pH değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Meyve örneklerin pH değerleri

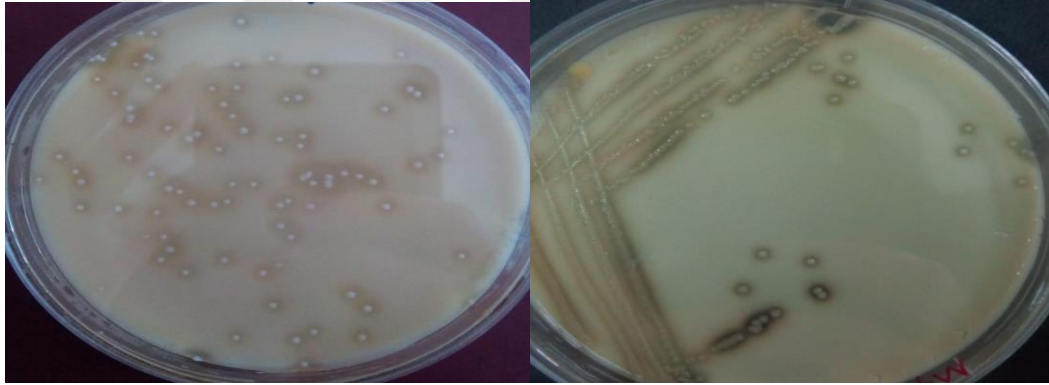
İzolasyon Kaynağı	Kodu	pH
Erik	IE4	3.14±0.02
Şeftali	AŞ	3.88±0.01
Kiraz	IK4	4.12±0.00
Emir üzüm	AÜ2	3.74±0.00
Sultani üzüm	MÜ4	3.68±0.01
Dimrit üzümü	IÜ8	3.20±0.02
Misket üzümü	IÜ9	3.81±0.02
Gilaburu meyvesi	MG	3.03±0.00

Isparta'dan temin edilen erik ve kiraz örneklerinin pH'sı sırasıyla 3.14 ve 4.12'dir. Antalya'dan alınan şeftali örneğinin pH'sı 3.88, Mersin'den getirilen gilaburu meyvesinin pH'sı 3.03'dür. İncelenen üzümlerin pH'ları ise 3.20-3.74 arasında değişmektedir. Bu çalışma kapsamında incelenen sirke örneklerinin pH'sı, diğer çalışmalarda elde edilen bulgular ile karşılaştırıldığında 15 sirke örneğinin daha yüksek pH'ya sahip olduğu belirlenmiştir.

Gerbi vd. (1998), İtalyan, Fransız, İspanyol ve İsviçre pazarlarından temin ettikleri 65 adet farklı sirke örneğinin ortalama pH değerlerini 2.78 olarak bulmuştur. Ünal (2007) tarafından yapılan çalışmada, Dimrit üzümlerinden yavaş ve derin kültür yöntemleri ile sirke üretilmiş yapılmıştır. Elde edilen sirkelerin pH değerleri 2.68 ile 2.85 arasındadır. Akbaş ve Cabaroğlu (2010), ülkemizde bulunan 12 farklı firmanın sirkelerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemiştir. Sirkelerin pH değerlerinin 2.63 ile 3.27 arasında

değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Sirke pH'larındaki bu farklılıklar sirke hammaddelerinin başlangıç pH'larındaki farklılıktan kaynaklanabileceği gibi sirke üretim koşulları ve AAB'nin asit toleransı açısından suş düzeyinde gösterebileceği farklılıklarından da kaynaklanabilir.

İzolasyon materyallerinden 3.2.2'de belirtildiği şekilde sikloheksimid içeren GYC Agar'a ekimi yapılmıştır. Muhtemel AAB'nin ayrımı, koloniler etrafında oluşan zon ile kolayca ayırt edildiği için bu besiyeri kullanımı tercih edilmiştir. Araştırmamızda kullanılan GYC agarın bileşiminde bulunan kalsiyum karbonat asit üretimini tamponlamak için kullanılır ve AAB'nin metaboliti olan asetik asit, CaCO_3 'ü çözer ve kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu gözlemlenir (Lynch vd., 2019). Besiyeri bileşimine sikloheksimid, penisilin ve basitresin gibi antimikrobiyel ajanlar eklenerek seçiciliği artırılır (Karahana vd., 2010; Lynch vd., 2019). Örneklerden yapılan ekim sonucunda GYC agarda petri görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. GÜ1 ve MÜ3 suşlarının GYC agardaki koloni görüntüleri

İzolasyon kaynaklarının g/mL'sindeki toplam bakteri sayısı ve elde edilen izolatlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolasyon kaynaklarının toplam bakteri sayımı ve izolatlar

Örnek	AAB sayısı (\log_{10} kob/mL)	İzolatlar
MÜ1	5,48±0,7	MÜ11, MÜ12, MÜ13, MÜ14, MÜ15, MÜ16
GÜ	4,45±0,8	GÜ1, GÜ2, GÜ3, GÜ4
IÜ1	-*	
IÜ2	-	
IÜ3	-.	
IÜ4	-	
IÜ5	-	
AÜ1	-	
DÜ1	2,97±0,84	DÜ11, DÜ12, DÜ13
MÜ2	4,07±0,10	MÜ21, MÜ22, MÜ23, MÜ24, MÜ25, MÜ26, MÜ27
MÜ3	-	
IÜ6	5,6±0,51	IÜ61, IÜ62, IÜ63, IÜ64, IÜ65
DÜ2	-	
IE1	5,15±0,08	IE11, IE12, IE13, IE14
ME1	4,32±0,45	ME11, ME12, ME13, ME14, ME15, ME16, ME17, ME18, ME19, ME110, ME111, ME112, ME113, ME114, ME115, ME116, ME117
ME2	-	
IE2	-	
IE3	2,97±0,09	IE31, IE32, IE33, IE34
İK1	2,93±0,08	İK11, İK12, İK13, İK14, İK15, İK16, İK17
İK2	-	
İK3	-	
IP	2,21±0,24	IP1, IP2, IP3
IE4	-	
IE5	4,19±0,27	IE51, IE52
AŞ	6,50±0,49	AŞ1, AŞ2, AŞ3, AŞ4
İK4	5,17±0,23	İK41, İK42, İK43
AÜ1	6,21±0,84	AÜ11, AÜ12, AÜ13, AÜ14, AÜ15
MÜ4	6,13±0,06	MÜ41, MÜ42
AÜ2	4,99±0,14	AÜ21, AÜ22, AÜ23, AÜ24, AÜ25, AÜ26, AÜ27, AÜ28
IÜ9	4,98±0,21	IÜ91, IÜ92, IÜ93
MG	2,53±0,20	MG1, MG2, MG3, MG4

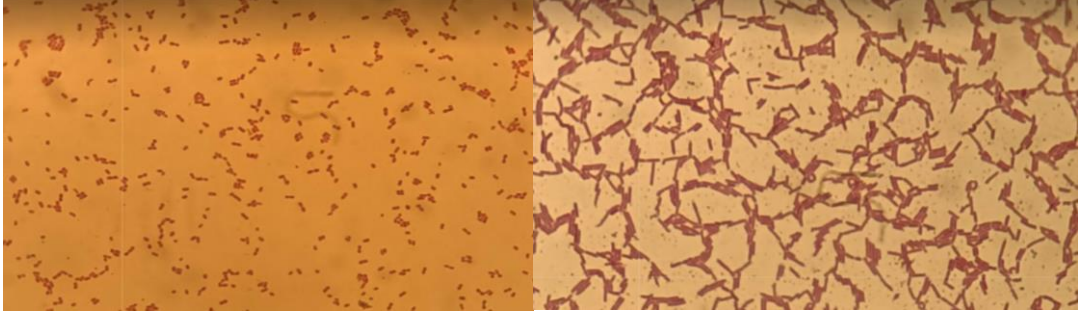
*-; gelişme gözlenmemiştir.

İzolasyon çalışmasında sirke örneklerinden GYC agara yapılmış ve plaklarda AAB gelişme durumu 48 saat sonra incelenmiştir, ancak herhangi bir gelişme belirlenmemiştir. AAB'nin gelişmesi için inkübasyon süresi 4-5 gün olarak bildirildiğinden (Karahan vd., 2010), inkübasyon bu sürenin sonunda tamamlanmıştır. Buna rağmen 31 adet izolasyon kaynağından 13 adedinde herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Bu çalışmada, pH değeri diğer kaynaklara göre yüksek olan sirke örneklerinin 8 adedinde bakteriyel gelişme gözlemlenmezken 7 adedinde gözlemlenmiştir. Meyve örneklerinde ise geniş pH aralığında bakteriyel gelişme gözlemlenmiştir. Bunun AAB türü farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

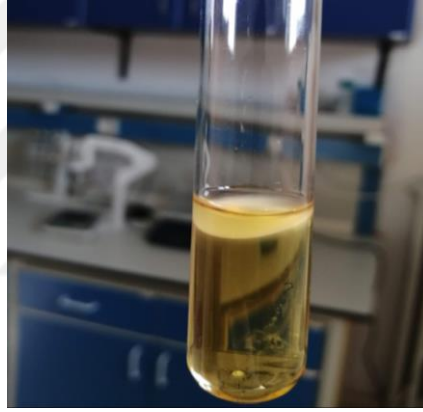
Sirke ve meyve örneklerinden GYC agara yapılan ekim sonucunda gelişen kolonilerin morfolojileri farklılık göstermiştir. Sirke örneklerinden yapılan ekimlerde koloniler mat beyaz renkliken bazı kolonilerin parlak beyaz renkli, düzgün kenarlı ve tümsek olduğu belirlenmiştir. Meyve örneklerinden yapılan ekimlerde ise koloniler daha büyük ve yaygın görünümlüken sirke örneklerinden orta büyüklükte ve küçük koloniler gözlemlenmiştir. Gilaburu meyvesinden yapılan ekimlerde ise sarı renkli koloniler gelişmiştir.

Saflaştırma işlemlerine geçilmeden önce farklı morfolojiye sahip kolonilerden seçim yapılarak hücre morfolojileri ve Gram tepkimeleri incelenmiştir. G-, kokobasil ve basil görünümlü izolatlar seçilmiştir. Saflaştırma işlemleri tamamlanan izolatların tekrar Gram boyaması yapılarak mikroskop görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. AÜ11 ve DÜ12 suşlarının mikroskop görüntüsü

Yapılan izolasyon çalışmasında 91 adet suş elde edilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucunda saf olduğu belirlenen suşlar HS sıvı besiyerinde geliştirilerek stoğa alınmıştır. Suşlar HS sıvı besiyerinde Şekil 4.3.'te görüldüğü şekilde gelişmiştir.



Şekil 4.3. HS sıvı besiyerinde geliştirilen MÜ1 suşun görüntüsü

4.2. LBA belirleme yöntemleri

LBA üreten mikroorganizmaların belirlenmesi için ve üretilen LBA'nın belirlenmesi için moleküler ve kromatografik yöntemler en sık kullanılan yöntemlerdir.

4.2.1. Gerçek zamanlı PZR bulguları

Muhtemel AAB suşu olduğu belirlenen 91 adet izolatın GDH enzimine ait gen bölgesi 3.1 'de belirttiği gibi tespit edilmiştir. qPZR sonuçlarına göre Cq ve Tm

değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Treshold çizgisine ulaşan bazı örneklerin GDH gen bölgesine ait çoğalma eğrileri Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. qPZR sonuçlarına göre Cq ve Tm değerleri

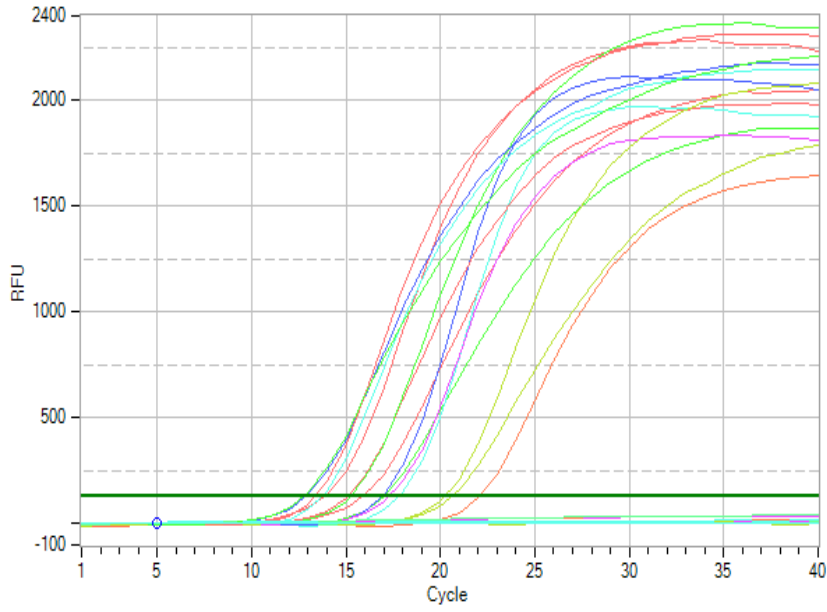
Suşlar	Cq	Tm(°C)	Sonuç	Suşlar	Cq	Tm(°C)	Sonuç
B759	14.56	79.99	pozitif	IP1	18.01	79.38	pozitif
IE51	13.17	79.67	pozitif	IP2	20.03	79.65	pozitif
IE52	12.4	80.58	pozitif	IP3	12.21	80.41	pozitif
GÜ1	11.26	79.19	pozitif	MÜ21	19.17	79.35	pozitif
GÜ2	17.83	80.37	pozitif	MÜ22	15.51	79.81	pozitif
GÜ3	12.64	79.72	pozitif	MÜ23	14.21	80.21	pozitif
GÜ4	21.21	79.81	pozitif	MÜ24	14.11	79.45	pozitif
MG1	17.71	80.09	pozitif	MÜ25	14.48	79.45	pozitif
MG2	23.65	78.83	pozitif	MÜ26	16.87	79.82	pozitif
MG3	20.21	79.65	pozitif	MÜ27	19.45	79.83	pozitif
MG4	17.28	79.65	pozitif	AŞ1	15.92	79.25	pozitif
IK1	15.09	79.87	pozitif	AŞ2	21.25	79.28	pozitif
IK2	17.66	80.18	pozitif	AŞ3	13.44	80.16	pozitif
IK3	22.5	79.05	pozitif	AŞ4	15.54	79.73	pozitif
IK11	20.21	79.32	pozitif	AÜ11	11.66	79.45	pozitif
IK12	19.94	79.12	pozitif	AÜ12	17.83	79.78	pozitif
IK13	13.09	79.48	pozitif	AÜ13	20.36	79.49	pozitif
IK14	15.9	80.26	pozitif	AÜ14	15.26	79.46	pozitif
IK15	15.04	79.26	pozitif	AÜ15	20.18	79.71	pozitif

Çizelge 4.4. qPZR sonuçlarına göre Cq ve Tm değerleri (Devam)

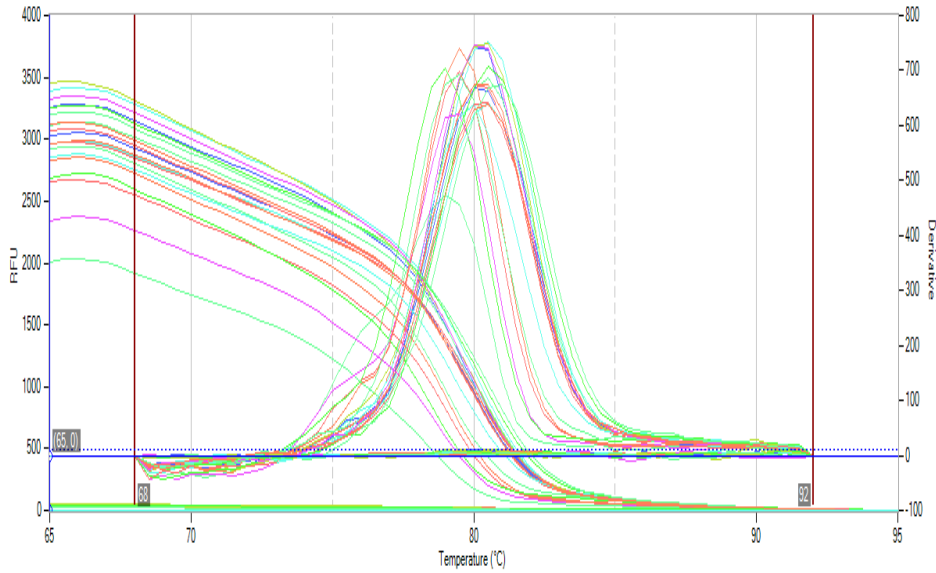
Suşlar	Cq	Tm(°C)	Sonuç	Suşlar	Cq	Tm(°C)	Sonuç
İK16	13.09	79.12	pozitif	MÜ42	17.44	79.91	pozitif
İK17	19.25	79.27	pozitif	AÜ21	19.69	78.67	pozitif
MÜ11	19.51	79.28	pozitif	AÜ22	15.86	79.29	pozitif
MÜ12	18.72	79.41	pozitif	AÜ23	16.34	79.12	pozitif
MÜ13	14.28	79.95	pozitif	AÜ24	19.89	79.88	pozitif
MÜ14	14.45	79.28	pozitif	AÜ25	15.63	79.31	pozitif
MÜ15	19.61	79.81	pozitif	AÜ26	20.43	79.70	pozitif
MÜ16	13.09	80.18	pozitif	AÜ27	20.82	79.49	pozitif
ME11	20.03	79.65	pozitif	AÜ28	14.59	78.78	pozitif
ME12	12.1	79.85	pozitif	IÜ91	13.35	80.51	pozitif
ME13	12.21	79.58	pozitif	IÜ92	13.71	80.47	pozitif
ME14	13.13	79.53	pozitif	IÜ93	15.36	79.38	pozitif
ME15	13.09	79.72	pozitif	IÜ61	13.08	79.67	pozitif
ME16	19.78	79.34	pozitif	IÜ62	17.69	79.29	pozitif
ME17	16.35	79.66	pozitif	IÜ63	19.62	78.63	pozitif
ME18	17.66	79.23	pozitif	IÜ64	20.63	79.46	pozitif
ME19	20.03	79.21	pozitif	IÜ65	11.96	78.94	pozitif
ME110	12.3	80.45	pozitif	IE31	20.13	79.48	pozitif
ME111	15.9	79.65	pozitif	IE32	17.78	79.30	pozitif
ME112	18.01	79.14	pozitif	IE33	15.7	79.25	pozitif
ME113	13.44	80.16	pozitif	IE34	14.29	79.57	pozitif
ME114	20.73	79.66	pozitif	IE11	13.68	80.29	pozitif

qPZR ile gerçekleştirilen analizde tüm örneklerin eşik değere ulaştığı gözlenmektedir. Eşik döngü sayısı (Cq) 40'ın altında olan DNA'lar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde, suşların Cq değerlerinin 12.1-21.25 ve Tm değerlerinin ise 78.57-80.58 arasında değiştiği görülmektedir. Bazı

suşların GDH genine ait çoğalma eğrileri Şekil 4.4’de, erime eğrisi grafiği ise Şekil 4.5’te gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Bazı örneklerin GDH genine ait çoğalma eğrileri



Şekil 4.5. Bazı örneklerin erime eğrileri

Kiryu vd. (2019), *Komagataeibacter medellinensis* NBRC3288’nin mGDH enzimini genetik tanımlama ile tespit etmişler ve dah sonra laktöz oksitleyen genin mGDH olup olmadığını belirlemek amacıyla mGDH’siz varyantını üretmişlerdir. Analiz

sonucunda LBA üretimi HPAEC-PAD ile incelendiğinde *Komagataeibacter medellinensis* NBRC3288'nin yüksek miktarlarda LBA üretirken mGDH'siz varyantının ise LBA üretmediği gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında sirke ve meyvelerden izole edilen tüm suşların GDH genine sahip olduğu görülmüştür.

4.2.1 TLC ile LBA üretimini belirleme

Bu çalışmada LBA üretimi yapabilen suşlar TLC ile belirlenmiştir. Suşlar 5 mL YPGL sıvı besiyerinde 27°C'de 3-4 gün inkübasyonla aktive edilmiştir. YPGL sıvı besiyerinde inkübasyonu tamamlanan aktif suşlardan durağan hücre elde etmek için %1 oranında 100 mL YPGL sıvı besiyerine inoküle edilerek 27°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra yaklaşık olarak aynı oranda inokülasyon için pelette sayım yapılarak 3.2.7'de verilgi gibi durağan hücre hazırlanmıştır. Laktobiyonik asit üreten suşların pelet sayım sonuçları Çizelge 4.5'de verilmektedir.

Çizelge 4.5. Pelet sayımı sonuçları

Suş	log ₁₀ kob
AÜ11	10.49
DÜ12	10.72
GÜ1	10.68
İK43	10.76
IÜ65	10.51
MG2	9.98
MÜ13	10.67
MÜ21	10.32
MÜ24	10.27
MÜ3	10.72

İlk olarak durağan hücre hazırlama işlemi yapılmadığı için plakada sürüklenme yolu çok yoğun bir görüntüye sahip olmuştur ve gözlem yapmakta zorlanılmıştır. Mikrobiyal yöntem ile LBA üretim yöntemleri incelenmiştir ve bir durağan hücre hazırlama yöntemi belirlenmiştir. Böylelikle besiyerinden kaynaklanan kirlilikler

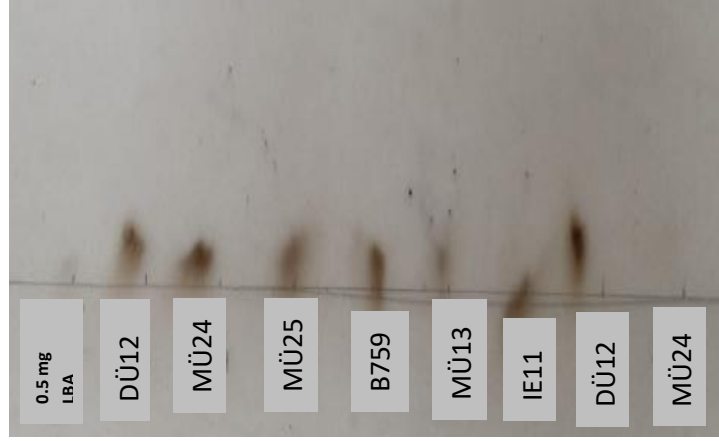
ortadan kaldırılmıştır (Murakami vd., 2003, 2006; Kiryu vd., 2015). Şekil 4.6.'da 100 mL YPGL sıvı besiyerinde geliştirilmiş bazı suşlara ait görüntü verilmiştir.



Şekil 4.6. YPGL sıvı besiyerinde geliştirilen suşların görünümü

TLC çalışmasının başlangıcında durağan hücrelerden LBA üretmek amacıyla iki farklı çözelti denenmiştir. Bunlardan biri Miyamoto vd. (2000) tarafından önerilen CaCO_3 'lü %2 laktoz çözeltisidir. Çalışma bu çözelti ile 5 adet plakada inceleme yapılmıştır ve hiçbir bulguya rastlanılmamıştır. Bunun nedeni LBA ile CaCO_3 'ün kompleks oluşturup, LBA'nın plakada gözlemlenmesini zorlaştırmasıdır. Bu nedenle Kiryu vd. (2012) tarafından önerilen %1 laktoz içeren 100 mM asetat tamponunda hazırlanmış farklı bir çözelti kullanılmıştır. Durağan hücreler, 100 mL 100 mM asetat tamponunda (pH 5.5) hazırlanmış %1 laktoz içeren çözeltilerde 27°C 'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlanınca santrifüj ile süpernatantlar ayrılmıştır. Süpernatantlar, standart LBA çözeltisi, standart LBA içeren %1 laktozlu asetat tamponlu çözelti ve laktoz çözeltisi plakaya damlatılmak üzere hazırlanmıştır.

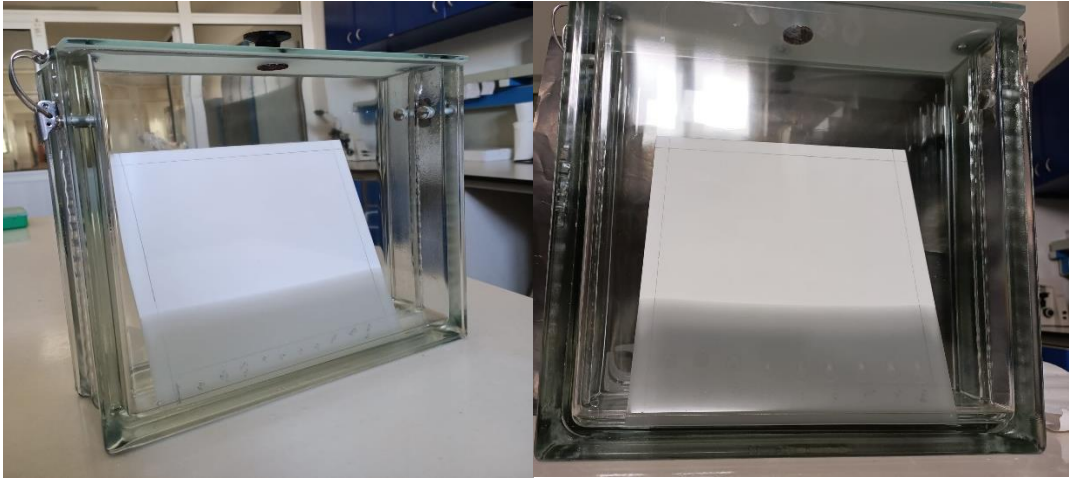
Tümü 3.2.7.'de verildiği gibi TLC plakalarına damlatılmıştır. Damlatma işleminde iyi bir ayrılma gözlemlenmek için damla çapının çok küçük yayılmasına dikkat edilmiştir. Daha sonra plakalar 2 saat laboratuvar ortamında, 15 dakika 100°C 'de kurutulmuştur. Kurutma yapılmayan plakanın görüntüsü Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Kurutma yapılmayan plakanın dağılma görüntüsü

Araştırmanın ilk aşamasında, Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi plakalardaki ayırım istenildiği ölçüde yapılamamıştır ve damlalarda dağılma görülmüştür. Çalışmalar incelendiğinde damlacıkların yeterince kurumamasından dolayı damlaların aşağıya kaydığı gözlenmiştir. Bu durumda da yatay konumda 2 saat boyunca laboratuvar ortamında ve daha sonra 15 dakika etüvde kurumaya bırakılmıştır (Çoban, 2007).

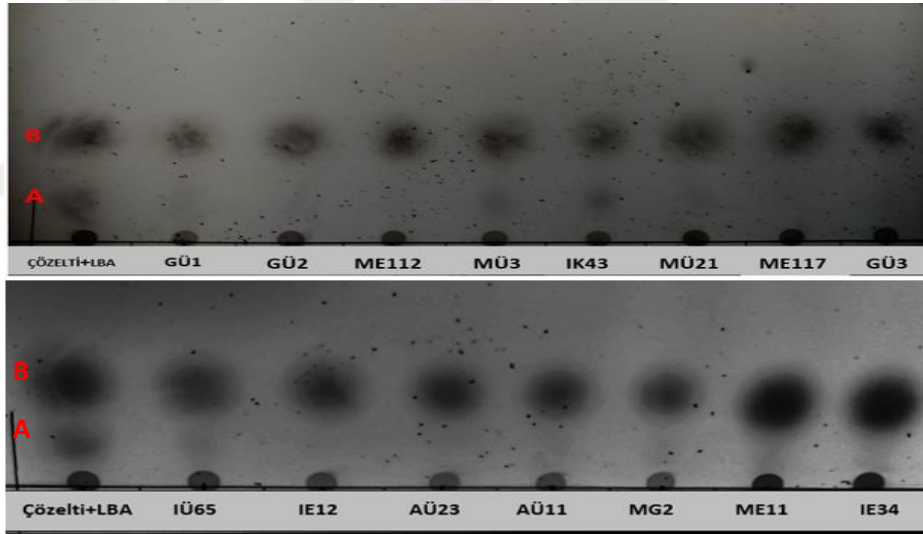
TLC tankına hazırlanan yürütücü solvent eklenmiştir. Yürütücü solvent olarak, 130 mL etil asetat:asetik asit:su, 3:1:1 (v/v/v) hazırlanmıştır (Kiryu vd., 2008; Murakami vd., 2002). Kurutulan plakalar tanka Şekil 4.7'de görüldüğü gibi eğimli bir şekilde yerleştirilmiştir.



Şekil 4.7. Plakaların tanka yerleştirilme görüntüsü ve yürütücü fazın ilerlemesi

Plakalarda Rf faktörü belirlenememiştir çünkü yürüme mesafesi noktasına mobil faz 4 saatte gelmektedir. Ancak moleküler ağırlığı fazla olan LBA'nın ve laktozun, yürüme mesafesi kısa olduğu için 4 saatte ayrılma gözlenememiştir. Aygan (2008) tarafından yapılan bir çalışmada TLC analizinin 4-8 saat süreceği bildirildiği için ayrılmanın gerçekleşmesi için 8., 12. ve 24. saatler beklenmiştir ve ayrım en iyi 24. saatte gözlenmiştir.

Yürütme işlemi sonlandığında damlaların hareketini görmek için reaktif çözelti kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıç aşamasında reaktif olarak etil alkol: sülfürik asit çözeltisi 50:50 oranında kullanılmıştır, ancak bu çözelti plakada fazla leke oluşturmuştur. Aygan (2008) tarafından önerilen sülfürik asit etil alkol çözeltisi (80:20) hazırlanmıştır. 3.2.7.2'de verildiği gibi TLC analizi tamamlanmıştır ve Şekil 4.9.'da LBA üreten suşlara ait TLC plakasının görünümü verilmiştir.



Şekil 4.9. LBA üreten suşların TLC'deki görünümü (Standart LBA: A, Laktoz: B)

Şekil 4.9.'de görüldüğü gibi standart LBA (A) plakanın başlangıç çizgisine daha yakın konumda yer alırken, laktoz (B) standart LBA'dan daha ileri bir konuma yürümüştür. LBA üretimi gerçekleştiren suşların tümü Şekil 4.9.'da gösterilmektedir. Bunlar AÜ11, DÜ12, GÜ1, İK43, İÜ65, MG2, MÜ13, MÜ21, MÜ24, MÜ3'dür. Yukarıda verilen şekilde LBA üretmeyen suşlar ise AÜ23, GÜ2, GÜ3, İE12, MG2, ME11, İE34, ME112, ME117'dir. TLC analizi sonucunda LBA üretimi belirlenen 10 adet suşun Cq ve Tm değerleri ile ilgili grafikler EK A'da verilmiştir.

Murakami vd. (2002) tarafından izolasyon kaynağı olarak toprak kullanılarak LBA üretimi yapan mikroorganizmaların taraması yapılmıştır. Bu amaçla laktozu oksitleyen mikroorganizmalar incelenmiştir. İzolasyonda %1 laktoz içeren agarlı besiyeri kullanılarak *Burkholderia cepacia* suşu elde edilmiştir. Suşun LBA üretimini gözlemek amacıyla 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış %1 laktoz ve %0.1 SDS içeren ortamda 40°C'de 4 saat inkübasyona bırakılarak TLC'de incelenmiştir. Suş, laktoz kaybı olmadan süpernatantında LBA üretimi gerçekleştirmiştir. Ayrıca *B. cepacia* suşu için LBA'nın mikrobiyel ve enzimatik üretimi karşılaştırılmıştır. *B. cepacia* suşu hem fermentasyon hem de enzimatik reaksiyon yoluyla LBA üretiminde kullanılabilir nitelikte bir bakteri olduğunu belirtmişlerdir.

Kiryu vd. (2015), 48 adet AAB'nin laktoz oksitleyici aktivitelerini TLC analizi ile incelemişlerdir. Laktoz oksidasyonu, LBA'nın Rf değeri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra daha önceki çalışmalarda laktozu oksitlemediği belirtilen *Acetobacter suboxydans* A621'in LBA üretimi de saptanmıştır. Fakat *A. suboxydans* A621'in *Gluconobacter* spp. ve *Gluconacetobacter* spp.'ye göre daha az düzeyde LBA üretimi gözlenmiştir. Sonuçlar laktoz oksitleme özelliğinin AAB'de yaygın olduğunu göstermiştir.

TLC plakaları incelendiğinde, LBA üretimi gözlenen suşların laktoz kullanımları ile gözlenmeyen suşların laktoz miktarları arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Bu çalışmadaki bulgular diğer çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bunun nedeni GDH'nin, laktoz ve maltoz üzerindeki enzimatik aktivitesinin D-glikoz üzerindeki aktiviteden çok daha düşük olmasıdır (Kiryu vd., 2020).

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında 31 adet sirke ve meyve örneğinden AAB'nin seçici besiyeri olan GYC agarda tipik koloni morfolojisi veren, Gram negatif, kokobasil veya basil olan izolatlar seçilmiştir. Çalışmada 91 adet izolat seçilmiştir. qPZR analizi ile suşlardaki GDH enzimi tespit etmek amaçlanmıştır. qPZR sonuçlarına göre 91 adet suşun GDH genine sahip olduğu görülmektedir. Suşların LBA üretimini saptamak amacıyla TLC analizi yapılmıştır. Analizi sonucunda AÜ11, DÜ12, GÜ1, İK43, İÜ65, MG2, MÜ13, MÜ21, MÜ24, MÜ3 olmak üzere toplam 10 adet suşta LBA üretimi görülmüştür.

qPZR analizine göre 91 adet suşun da GDH genine sahip olduğu görülmektedir fakat TLC analizi sonucunda sadece 10 adet suşun LBA ürettiği gözlenmiştir. Bunun iki nedeni olabilir:

1. Suşların ekspresyon düzeyleri farklılık gösterebilir. Bu yüzden bazı suşlar TLC analizinde saptanamayacak düzeyde LBA üretmiş olabilir. İleriki çalışmalarda LBA üretimi HPLC analizi ile incelenecektir. Böylelikle az miktarlarda üretilen LBA'nın da tespit edilebilmesi planlanmaktadır.
2. Tüm suşlar genlere sahip olmasına rağmen hepsinde gen ekspresyonu yapılmıyor olabilir. Çalışmamızda qPZR analizi için DNA'lar izole edilmiştir. Güvenli bir sonuç alabilmek için mRNA izolasyonu ve protein sentezi analizi yapılarak devam edilmelidir.

Gıda endüstrisinde kullanılan katkı maddelerinin gıdanın yapısına katkı sağlamasının yanında insan sağlığını da olumlu yönde etkilemesi çok önemlidir. Günümüzde teknolojik gelişmelerin hız kazanmasıyla artan sağlık problemleri ile tüketicilerin fonksiyonel gıdalara ilgisi artmaktadır. Gıda endüstrisi ise tüketici memnuniyetini arttırmak ve bununla birlikte ekonomik düzeyde çalışmayı amaçlayarak en iyi verim elde edebilecekleri hammaddeyi tercih etmektedir. Bu nedenle gıdanın yapısal özelliklerini iyileştiren ve aynı zamanda tüketici sağlığını olumlu etkileyen ürün bileşenlerini kullanmayı amaçlar.

Gıda endüstrisi gibi birçok alanda da kullanımını artmaya başlayan LBA yukarıda bahsedilgi gibi aranılan özelliklere sahiptir. Elde edilecek ürün nispeten ucuz bir hammaddeden, katma değeri yüksek bir ürün olarak doğal yollar ile üretileceği için gıda endüstrisi için kullanılma potansiyeli yüksektir. Peynir, yoğurt, et, yağ, fonksiyonel içeceklerin içeriğinde kullanılarak yapılan tüm çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Su tutma kapasitesinin yüksek olması, tat ve aromayı zenginleştirmesi, antioksidan madde olması ve kıvam arttırıcı özelliklere sahiptir. Yapılan çalışmalara ile nütrosötik ve prebiyotik özellikleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile doğal bir katkı maddesi olan mikrobiyel LBA üretimine yönelik bir adım atılacak ve daha sonra yapılacak çalışmalara ülkemiz gıda sanayinin önemli bir gereksiniminin karşılanmasına yönelik gelişmelere katkı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Akbaş, M. ve Cabaroğlu T., 2010. Ülkemizde Üretilen Bazı Üzüm Sirkelerinin Bileşimi ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine Bir Araştırma. *Dergipark*, 7(3), 183–88.
- Algiert-Zielińska, B., Paulina M., ve Rotsztej H., 2019. Lactic and Lactobionic Acids as Typically Moisturizing Compounds. *International Journal of Dermatology*, 58(3), 374–79.
- Alonso, S., 2018. Exploiting the Bioengineering Versatility of Lactobionic Acid in Targeted Nanosystems and Biomaterials. *Journal of Controlled Release*, 287, 216-234.
- Alonso, S., Manuel R., ve Díaz, M., 2013. Bio-Production of Lactobionic Acid: Current Status, Applications and Future Prospects. *Biotechnology Advances*, 31(8),1275–1291.
- Food And Drug Administration (FDA), 2021. Title 21 - Food and drugs. Chapter I - Part 172. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption Act 2011, Pub. L. No. 172, 72.
- Anthony, C. 1992. The Structure of Bacterial Quinoprotein Dehydrogenases. *International Journal of Biochemistry*, 24(1),29–39.
- Anthony, C. ve Ghosh, M., 1998. The Structure and Function of the Pqq-Containing Quinoprotein Dehydrogenases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 69(1),1–21.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 186s, Adana.
- Bilginer, H., 2018. Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Sirkelerin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Mikrobiyotasında Yer Alan Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı. Atatürk Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 72s, Erzurum.
- Çakmakçı, ML., Karahan AG., Çakır İ., ve Gündođdu A., 2008. Selüloz Üretiminde Kullanılacak Mikroorganizmaların İzolasyonu, Moleküler Tanısı ve Mikrobiyel Selülozun Gıda Sanayinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. TÜBİTAK TOVAG Proje No: 1050156 nolu proje raporu.
- Cardoso, T., Caroline M., Dagostin J., ve Masson ML., 2019. Lactobionic Acid as A Potential Food Ingredient: Recent Studies And Applications. *Journal Of Food Science*, 84(7), 1672–81.

- Çetinkaya, E. ve Kamuran A., 2012. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1), 53–62.
- Çoban, E., 2007. Yüzey Kültür Fermentasyon Yöntemi ile Bazı Asetik Asit Bakterilerinden Ekstrasellular Polisakkarit Üretimi. Adnan Mendres Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 227s, Aydın.
- García, C., Lucía B., Rendueles, M. ve Díaz, M., 2019. A New Synbiotic Dairy Food Containing Lactobionic Acid and *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 47–56.
- García, C, Rendueles M., ve Díaz, M., 2017. Synbiotic Fermentation For The Co-Production of Lactic and Lactobionic Acids from Residual Dairy Whey. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1250-1256.
- Gerbi, V., Giuseppe Z., Riccardo B., Alberta C., Andrea A., 1998. Characterisation of White Vinegars of Different Sources with Artificial Neural Networks. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 78(3):417–22.
- Gerling, K. G., Joisten, S., Wendler, K., ve Schreer, C., 1995. Lactobionic Acid Amide Compositions And Their Use, U.S. Patent No. 5.401.426, 19s.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., De Ley, J., 1989. *Acetobacter Diazotrophicus* sp. Nov., A Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), 361–364.
- Goderska, K., 2019. The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3737–3751.
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., Spinosa, W. A., 2018. Acetic Acid Bacteria in The Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139–151.
- Green, B. A., Edison, B. L., Sigler, ML., 2008. Antiaging Effects of Topical Lactobionic Acid: Results of a Controlled Usage Study. In *Cosmetic Dermatology-Cedar Knolls* 21(2), 76-83.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of Acetic Acid Bacteria in “Traditional Balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–212.
- Gullo, M., Giudici, P., 2008. Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar: Phenotypic Traits Relevant For Starter Cultures Selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 46–53.

- Gutiérrez, L. F., Hamoudi, S., Belkacemi, K., 2012. Lactobionic Acid: A High Value-Added Lactose Derivative For Food and Pharmaceutical Applications. *International Dairy Journal*, 26(2), 103–111.
- Hestrin, S., Schramm, M., 1954. Synthesis of Cellulose By *Acetobacter Xylinum*. II. Preparation of Freeze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose. *The Biochemical Journal*, 58(2), 345–352.
- İşyapan, B., 2011. Ellajik Asidin İnce Tabaka Kromatografisi ile Saflaştırılması. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63s, İstanbul.
- Karahan, A. G., Akoğlu, A., Çakır, İ., Kart, A., Çakmakçı, P. M. L., Uygun, A., Göktepe, F., 2010. Some Properties of Bacterial Cellulose Produced by New Native Strain *Gluconacetobacter* sp. A0602 Obtained from Turkish Vinegar. *Journal of Applied Polymer Science*, 116(5), 2658–2667.
- Kerstens, K., Linsdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J., 2006. The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, 163-200.
- Kiryu, T., Kiso, T., Nakano, H., Ooe, K., Kimura, T., Murakami, H., 2008. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the Production of Lactobionic Acid in Caucasian Yogurt “Caspian Sea yogurt” in Japan. *Journal of Dairy Science*, 92, 25-34.
- Kiryu, Takaaki, Kiso, T., Koma, D., Tanaka, S., Murakami, H., 2019. Identifying Membrane-Bound Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from Acetic Acid Bacteria That Produce Lactobionic and Cellobionic Acids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 83(6), 1171–1179.
- Kiryu, Takaaki, Kiso, T., Nakano, H., Murakami, H., 2015. Lactobionic and Cellobionic Acid Production Profiles of The Resting Cells of Acetic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(10), 1712–1718.
- Kiryu, T., Kiso, T., Sato, H., Murakami, H., 2020. Oxidation of Isomaltose, Gentiobiose and Melibiose by Membrane-Bound Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from Acetic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(3), 507–517.
- Kiryu, T., Yamauchi, K., Masuyama, A., Ooe, K., Kimura, T., Kiso, T., Murakami, H., 2012. Optimization of Lactobionic Acid Production By *Acetobacter orientalis* Isolated from Caucasian Fermented Milk “Caspian Sea Yogurt”. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(2), 361-363.

- Kiryu, T., Ooe, K., Kimura, T., Kiso, T., Nakano, H., Murakami, H., 2012. Sugar Oxidation Profiles of Membrane-Bound Dehydrogenase From *Acetobacter orientalis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3), 262–263.
- Kluyver, A. J., Ley, J. De, Rijven, A., 1950. The formation and Consumption of Lactobionic And Maltobionic Acids by *Pseudomonas* species. 9, 79–86.
- Kneifel, W., Rajal, A., Kulbe, K. D., 2000. In Vitro Growth Behaviour of Probiotic Bacteria in Culture Media With Carbohydrates of Prebiotic Importance. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(1), 27–34.
- Kowser, J., Aziz, M., Uddin, M., 2016. Isolation and Characterization of *Acetobacter Aceti* From Rotten Papaya. *Journal of The Bangladesh Agricultural University*, 13(2), 299–306.
- Lin, S. F., Yang, T. Y., Inukai, T., Yamasaki, M., Tsai, Y. C., 1991. Purification and Characterization of A Novel Glucosyltransferase Oxidase From *Acremonium Strictum* T1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1118(1), 41–47.
- Ludwig, R., Ozga, M., Zámocky, M., Peterbauer, C., Kulbe, K. D., Haltrich, D., 2004. Continuous Enzymatic Regeneration of Electron Acceptors Used by Flavoenzymes: Cellobiose Dehydrogenase-Catalyzed Production of Lactobionic Acid as An Example. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(2), 97–104.
- Lynch, K. M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L., Arendt, E. K., 2019. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 587–625.
- Matsutani, M., Yakushi, T., 2018. Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Dehydrogenases of Acetic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9531–9540.
- Miyamoto, Y., Ooi, T., Kinoshita, S., 2000. Production of Lactobionic Acid From Whey by *Pseudomonas* Sp. LS13-1. *Biotechnology Letters*, 22(5), 427–430.
- Murakami, H., Kawano, J., Yoshizumi, H., Nakano, H., Kitahata, S., 2002. Screening of Lactobionic Acid Producing Microorganisms. *Journal of Applied Glycoscience*, 49(4), 469–477.
- Murakami, H., Seko, A., Azumi, M., Kiso, T., Kiryu, T., Kitahata, S., Nakano, H., 2006. Microbial Conversion of Lactose to Lactobionic Acid by Resting Cells of *Burkholderia cepacia* No. 24. *Journal of Applied Glycoscience*, 53(1), 7–11.
- Murakami, H., Seko, A., Azumi, M., Ueshima, N., Yoshizumi, H., Nakano, H., Kitahata, S., 2003. Fermentative Production of Lactobionic Acid by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Glycoscience*, 50(2), 117–120.

- Nakano, H., Kiryu, T., Kiso, T., Murakami, H., 2010. Biocatalytic Production of Lactobionic Acid. *Biocatalysis and Biomolecular Engineering*, 391–404.
- Nordkvist, M., Nielsen, P. M., Villadsen, J., 2006. Oxidation of Lactose to Lactobionic Acid by a *Microdochium nivale* Carbohydrate Oxidase: Kinetics and Operational Stability. *Journal of Anatomy*, 14, 694–707.
- Oh, Y. R., Jang, Y. A., Lee, S. S., Kim, J. H., Hong, S. H., Han, J. J., Eom, G. T., 2020. Enhancement of Lactobionic Acid Productivity by Homologous Expression of Quinoprotein Glucose Dehydrogenase in *Pseudomonas taetrolens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(44), 12336–12344.
- Okur, Ö. D., 2015. Laktoz Türevi Olarak Laktobionik Asit. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 5(1), 56–59.
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., De Vuyst, L., 2009. (GTG)5-PCR Reference Framework For Acetic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 301(1), 44–49.
- Nielsen, P. M., 2012. Meat Based Food Product Comprising Lactobionc acid. U.S. Patent Application No. 13/588,304, 3s.
- Qiu, X., Zhang, Y., & Hong, H., 2021. Classification of Acetic Acid Bacteria and Their Acid Resistant Mechanism. *AMB Express*, 11(1), 1–15.
- Raspor, P., Goranovič, D., 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124.
- Ribeiro, J. C. B., Granato, D., Masson, M. L., Andriot, I., Mosca, A. C., Salles, C., Guichard, E., 2016. Effect Of Lactobionic Acid On The Acidification, Rheological Properties and Aroma Release of Dairy Gels. *Food Chemistry*, 207, 101–106.
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., Mättö, J., 2003. The Effect of Lactose Derivatives Lactulose, Lactitol and Lactobionic Acid on The Functional and Technological Properties of Potentially Probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*, 13(4), 291–302.
- Sainz, F., Torija, M. J., Matsutani, M., Kataoka, N., Yakushi, T., Matsushita, K., Mas, A., 2016. Determination of Dehydrogenase Activities Involved in D-Glucose Oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–14.
- Sarenkova, I., Ciprovica, I., & Cinkmanis, I., 2019. Effect of Different Salts on *Pseudomonas taetrolens* Ability to Lactobionic Acid Production. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 13(7), 208-213.

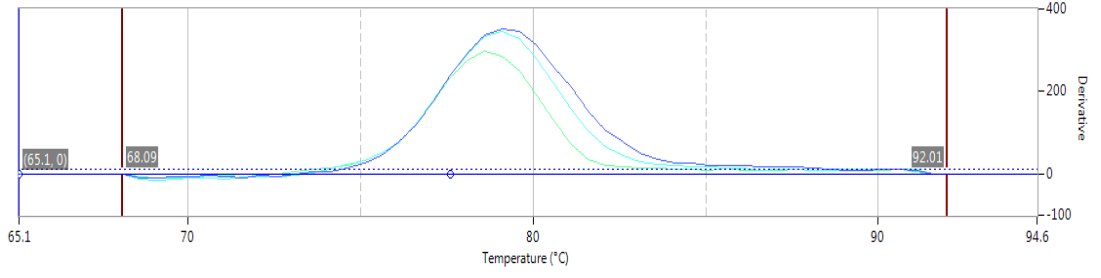
- Sarenkova, Inga, Ciprova, I., 2018. The current status and future perspectives of lactobionic acid production: A review. *Research for Rural Development*, 1, 233–239.
- Schaafsma, G., 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458–465.
- Sengun, I. Y., Karabiyikli, S., 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656.
- Şengün, İ. Y., Kılıç, G., 2016. Isolation, Identification and Current Taxonomy of Acetic Acid Bacteria. *Biological Diversity and Conservation*, 9, 154–162.
- Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S., Kim, Y. G., Lee, S. J., 2003. Increased Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 In Synthetic Media Under Shaking Culture Conditions. *Bioresource Technology*, 86(3), 215–219.
- Thermo Scientific, 2013. Thermo Scientific PikoReal Software 2. 1 User Manual.110s.
- Tutar, E., Köksalan, E., Akyol, İ., 2016. Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda Real Time PCR Teknolojisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 18(4), 26.
- Ünal, E., 2007. Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimi üzerine bir araştırma. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 60s, Adana.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G., 2012. Primer3-new Capabilities and Interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12.
- Wojciechowska, A., Klewicki, R. ve Klewicka, E., 2020. The Potential of New Bionic Acids as Prebiotics and Antimicrobials. *LWT*, 125, 109246.
- Yang, J., Xu, P., Long, L. ve Ding, S., 2021. Production of Lactobionic Acid Using An Immobilized Cellobiose Dehydrogenase/Laccase System On Magnetic Chitosan Spheres. *Process Biochemistry*, 100, 1-9.

EKLER

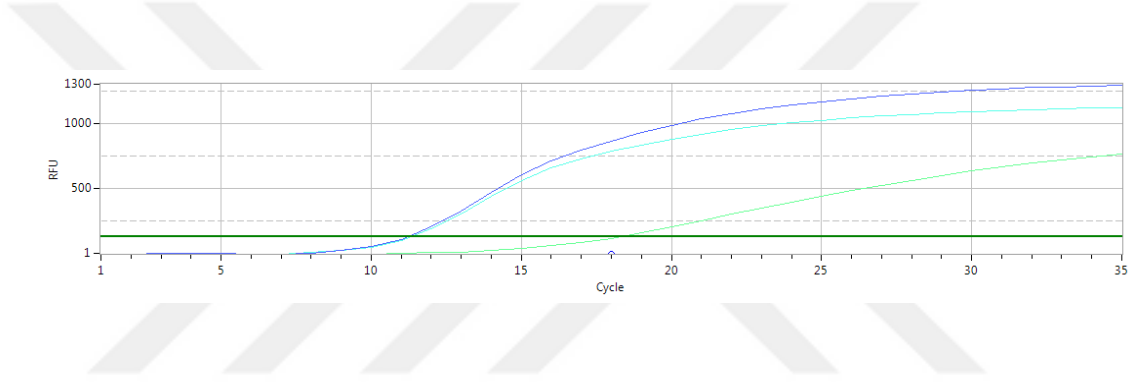
EK A. Grafikler



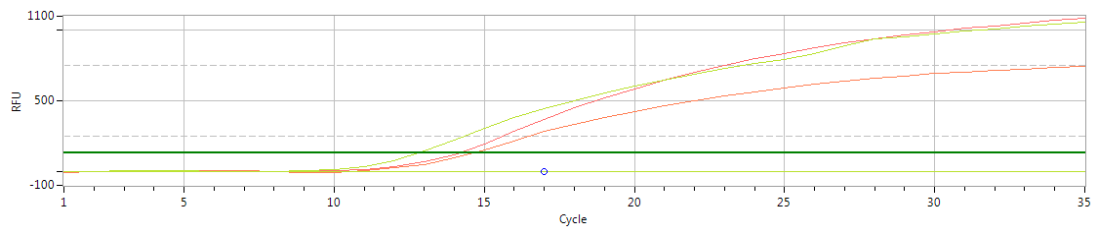
EK A. Grafikler



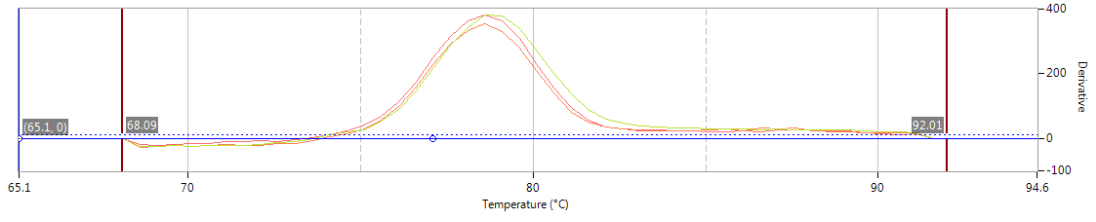
Şekil A.1. Laktobiyonik asit üreten GÜ1 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



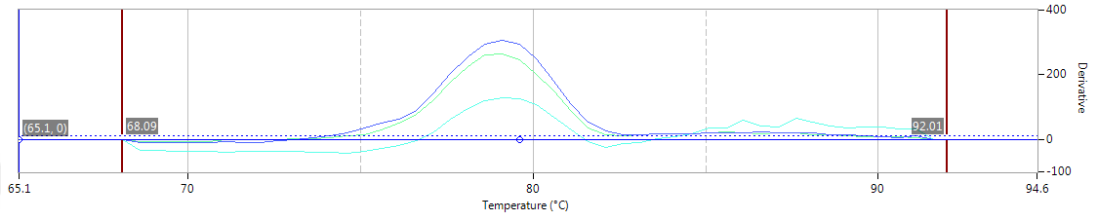
Şekil A.2. Laktobiyonik asit üreten GÜ1 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



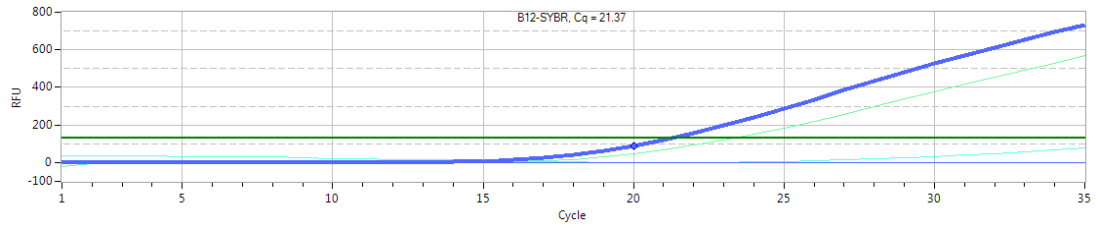
Şekil A.3. Laktobiyonik asit üreten MÜ3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



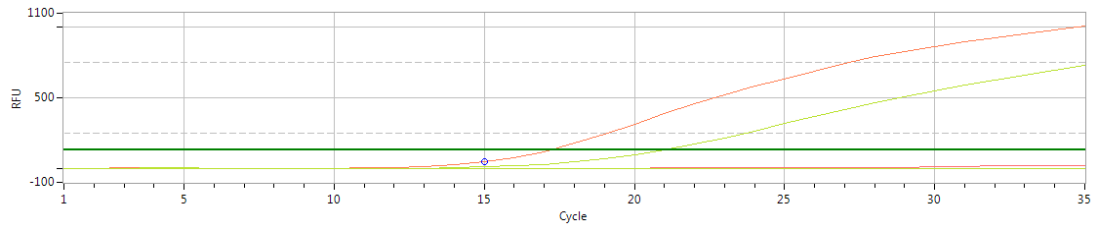
Şekil A.4. Laktobiyonik asit üreten MÜ3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



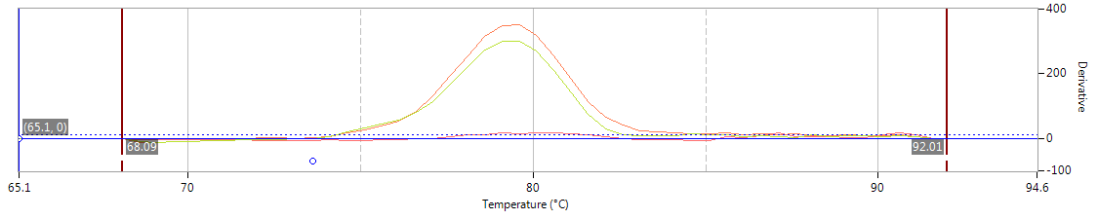
Şekil A.5. Laktobiyonik asit üreten IK3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



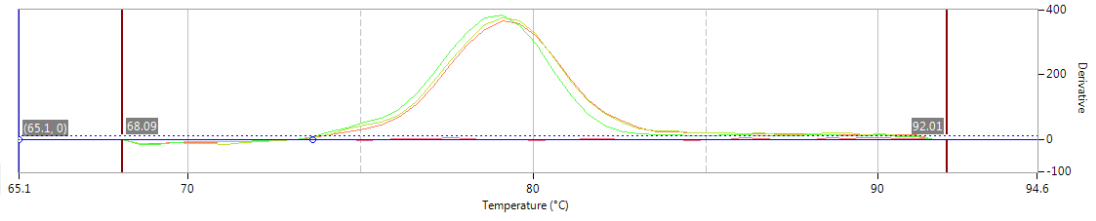
Şekil A.6. Laktobiyonik asit üreten IK3 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



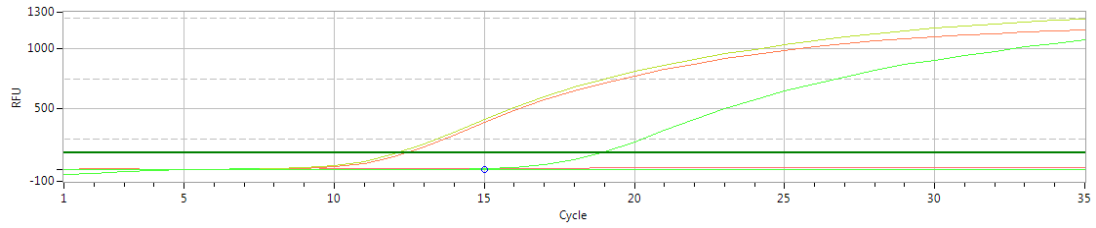
Şekil A.7. Laktobiyonik asit üreten MÜ21 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



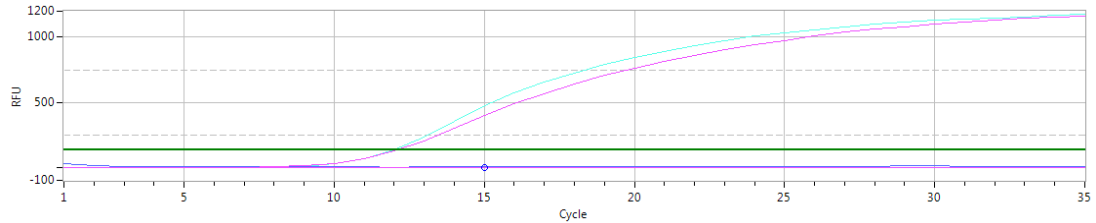
Şekil A.8 Laktobiyonik asit üreten MÜ21 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



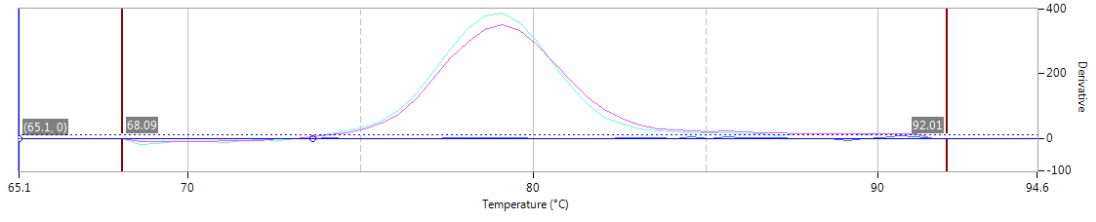
Şekil A.9. Laktobiyonik asit üreten DÜ12 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



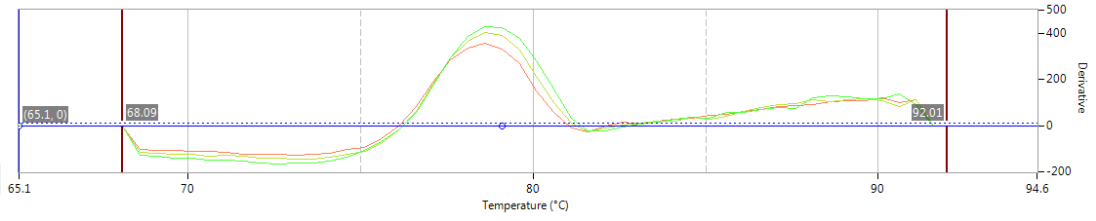
Şekil A.10. Laktobiyonik asit üreten DÜ12 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



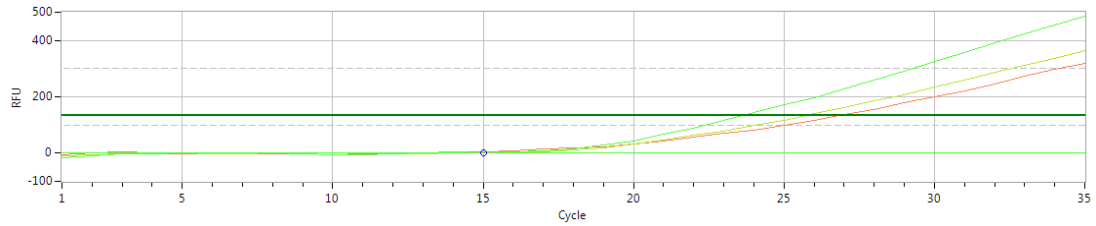
Şekil A.11. Laktobiyonik asit üreten IÜ65 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



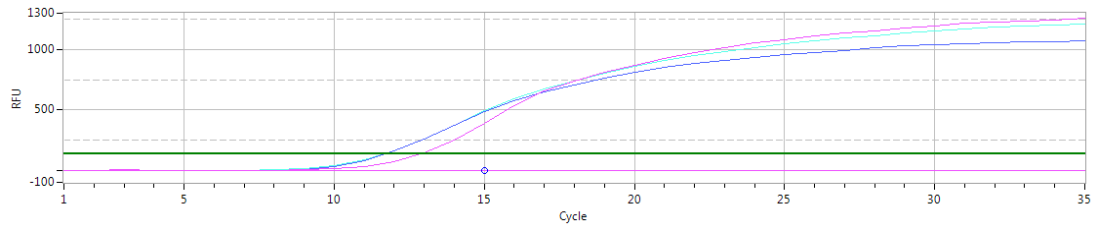
Şekil A.12. Laktobiyonik asit üreten IÜ65 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



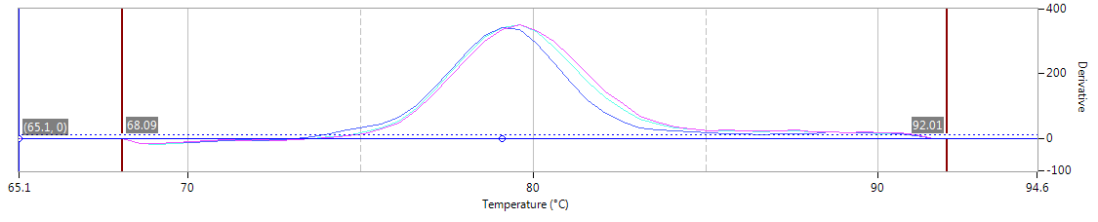
Şekil A.13. Laktobiyonik asit üreten MG2 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



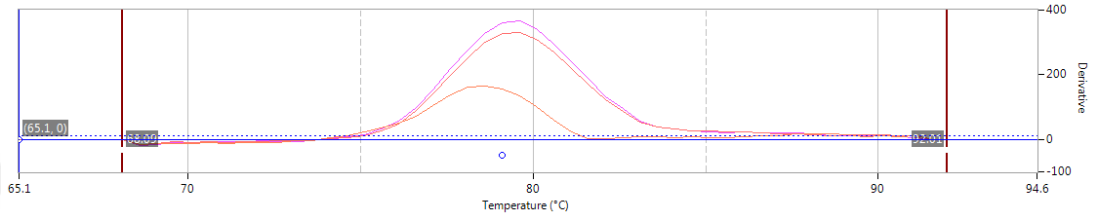
Şekil A.14. Laktobiyonik asit üreten MG2 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



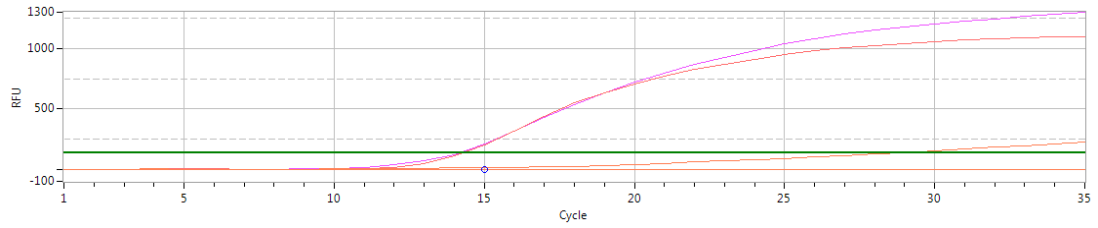
Şekil A.15. Laktobiyonik asit üreten AÜ11 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



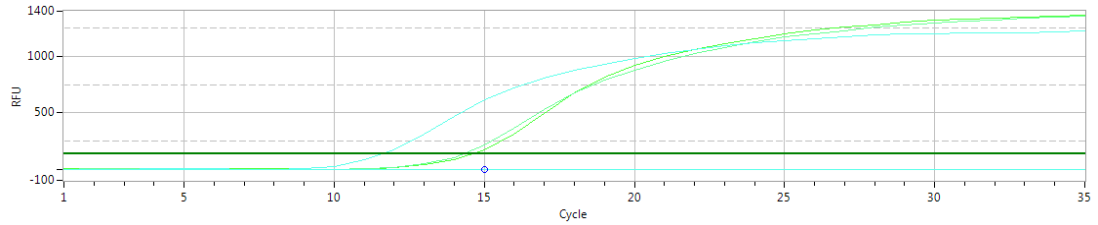
Şekil A.16. Laktobiyonik asit üreten AÜ11 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



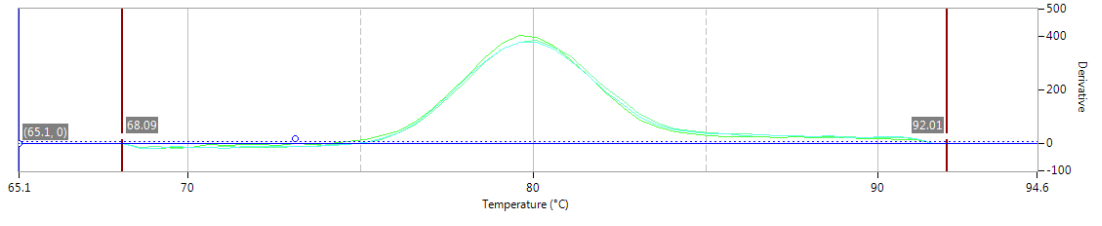
Şekil A.17. Laktobiyonik asit üreten MÜ24 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



Şekil A.18. Laktobiyonik asit üreten MÜ24 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi



Şekil A.19. Laktobiyonik asit üreten MÜ13 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi çoğalma eğrisi



Şekil A.20. Laktobiyonik asit üreten MÜ13 suşunun glikoz dehidrogenaz bölgesi erime eğrisi

