

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

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKARİT
(EPS) ÜRETİMİ ÜZERİNE FARKLI STRES KOŞULLARININ
ETKİSİ**

Müyesser GÜLCÜ

**Danışman
Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN**

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



© 2022 [Müyesser GÜLCÜ]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Polisakkaritler ve Ekzopolisakkaritler	3
2.2. Ekzopolisakkaritlerin Yapıları ve Çeşitleri.....	5
2.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS)	6
2.2.2. Heteropolisakkaritler (HePS).....	8
2.3. EPS'lerin Sentezlenmesi.....	9
2.3.1. EPS sentezini etkileyen faktörler	10
2.4. Ekzopolisakkaritlerin Sağlık Üzerine Etkileri	12
2.5. EPS'lerin Gıdalarda Kullanımları	14
2.6. Laktik Asit Bakterileri ve Ekzopolisakkaritler	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu	18
3.2.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması.....	19
3.2.2.1. Gram boyama	19
3.2.2.2. Katalaz testi.....	19
3.2.2.3. Laktik asit bakterilerinin pH 9.6'da gelişimlerinin belirlenmesi	19
3.2.2.4. % 6.5 Tuz oranında gelişimlerinin belirlenmesi.....	20
3.2.2.5. Farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin belirlenmesi	20
3.2.3. İzolatların EPS üretimlerinin belirlenmesi	20
3.2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin saflaştırılmasında TCA kullanımı.....	20
3.2.3.2. Ekzopolisakkaritlerin saflaştırılmasında etanol presipitasyon yöntemi	21
3.2.4. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesi.....	21
3.2.5. Üretilen EPS miktarlarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi.....	22
3.2.6. Farklı sükröz oranı, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde EPS üretimlerinin belirlenmesi	23
3.2.7. Farklı pH değerlerinde EPS üretimlerinin belirlenmesi	23
3.2.8. Farklı karbon kaynakları kullanımında EPS üretimlerinin belirlenmesi.....	24
3.2.9. 16S mikrobiyal tanımlama analizi	24
3.2.10. EPS'lerde protein miktarının belirlenmesi	24
3.2.11. Toplam indirgen şeker analizi.....	26
3.2.12. EPS'lerin şeker profilinin HPLC ile belirlenmesi.....	27
3.2.13. EPS'lerin taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmesi	27
3.2.14. İstatistiksel Analiz	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	28
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Genel Karakterizasyonu.....	28
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin EPS Üretimlerinin Belirlenmesi	31

4.3. Farklı Stres Koşullarının EPS Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	35
4.3.1. Sıcaklık ve inkübasyon süresinin EPS üretimine etkisi	35
4.3.2. Farklı pH değerlerinde EPS üretiminin belirlenmesi	38
4.4. Farklı Karbon Kaynaklarında EPS Üretimi	40
4.5. 16S Mikrobiyal Tanımlama	43
4.6. EPS'lerde Protein Miktarının Belirlenmesi	43
4.7. Toplam İndirgen Şeker Analizi	45
4.8. Ekzopolisakkaritlerin Monosakkarit Bileşimlerinin Belirlenmesi	46
4.9. EPS'lerin Taramalı Elektron (SEM) Mikroskopunda Görüntülenmesi	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	56
EKLER	67
EK A. <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> MG1 Dizi Sonuçları	68
EK B. <i>Lactiplantibacillus Curvatus</i> MG12 Dizi Sonuçları	69
EK C. <i>Enterococcus Hiraе</i> MG17 Dizi Sonuçları Dizi Sonuçları	70
EK D. <i>Lactiplantibacillus Curvatus</i> MG22 Dizi Sonuçları	71
EK E. <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> MG33 Dizi Sonuçları	72
EK F. <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> MG 36 Dizi Sonuçları	73
ÖZGEÇMİŞ	74

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ ÜZERİNE FARKLI STRES KOŞULLARININ ETKİSİ

Müeyesser GÜLCÜ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

Bu çalışmada, doğal kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin EPS üretimi, EPS üretimine sıcaklık (30, 37 ve 45 °C), farklı inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) ve farklı karbon kaynaklarının (Sükroz, Fruktoz, Galaktoz, Riboz, Ramnoz, Laktoz, Glikoz) etkileri incelenmiştir. Ayrıca üç farklı şeker kombinasyonunda (% 1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz ; %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, %0.5 Galaktoz ; %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, % 0.2 Galaktoz, % 0.2 Ramnoz, % 0.2 Laktoz) etkileri incelenmiştir.

EPS'lerin saflaştırması için TCA ve etanol bazlı iki farklı yöntem kullanılmış ve en yüksek EPS geri kazanımı etanol kullanılan yöntem ile elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kültürlerin 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında en yüksek EPS üretimi olduğu gözlemlenmiştir. EPS üreticisi izolatlarda sükroz konsantrasyonundaki artışın EPS üretim miktarında yükselmeye sebep olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde EPS üretiminin genellikle pH 6.2'de yüksek olduğu tespit edilmiş ve en yüksek üretim (871.35 mg/L) pH 6.2'de *Lactobacillus plantarum* MG1'de tespit edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisi incelendiğinde karbon kaynağı değiştiğinde kültürlerdeki EPS miktarlarında farklılıklara neden olduğu belirlenmiştir. Kültürler genel olarak ramnoz varlığında yüksek EPS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Farklı şeker denemelerinde en yüksek EPS üretimi *Lactobacillus curvaticus* MG22 kültüründe laktoz varlığında 1077.63 mg/L miktarı ile tespit edilmiştir. EPS'lerin temel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla monomer bileşimleri ve protein içerikleri araştırılmıştır. Analizler sonucunda çalışma kapsamında elde edilen EPS'lerin farklı monosakkaritlerden oluştuğu ve düşük oranda protein içerdikleri tespit edilmiştir. Yapılan HPLC analizi sonucunda kültürlerden elde edilen EPS'lerin hangi oranlarda hangi monomerleri içerdiği detaylı olarak tespit edilirken bazılarının yapılarında farklı olarak ksiloz ve arabinoz olduğu da tespit edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda, kültürlerden elde edilen EPS üretimlerinin her kültür için farklı ortam koşullarında maksimum üretim gerçekleştirdiği ve EPS üretim miktarlarının kültüre bağlı olarak değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bağırsak kökenli kültürlerin daha yüksek EPS üretim yeteneğine sahip olmaları, laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS'lerin bağırsak mikrobiyotasında tutunmalarını ve yerleşmelerini kolaylaştırmada önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, ekzopolisakkarit, şeker kompozisyonu, HPLC

2022, 74 sayfa

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT STRESS CONDITIONS ON EXOPOLISACCARIDE (EPS) PRODUCTION OF LACTIC ACID BACTERIA

Müyesser GÜLCÜ

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

Supervisor: Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

In this study, the effects of different incubation temperatures (30, 37 and 45 °C), incubation times (24, 48 and 72 hours) and carbon sources (sucrose, fructose, galactose, ribose, rhamnose, lactose, glucose) on EPS production of lactic acid bacteria isolated from natural sources were examined. In addition, the effects of three different sugar combinations (1.5% Glucose, 1.5% Sucrose; 1.5% Glucose, 1.5% Sucrose, 0.5% Galactose; 1.5% Glucose, 1.5% Sucrose, 0.2% Galactose, 0.2% Rhamnose, 0.2% Lactose) were investigated.

While two different methods based on TCA and ethanol were applied for the purification of EPS, and the highest EPS recovery was obtained by ethanol method. According to results, it was determined that the cultures provided the highest EPS production after 24 hours of incubation at 37 °C. It was determined that any increase in sucrose concentration caused an increase in EPS amounts produced by isolates. The analyses showed that, EPS production was generally high at pH 6.2 and the highest production (871.35 mg/L) was achieved by *Lactobacillus plantarum* MG1 at pH 6.2. When the effect of different carbon sources on EPS production was examined, alteration of carbon source caused differences in EPS production of the cultures. The cultures in general produced higher EPS when rhamnose was used. In different sugar application, the highest EPS production was done by *Lactobacillus curvaticus* MG22 with as 1077.63 mg/L in the presence of lactose as carbon source. In order to determine the basic properties, their monomeric composition and protein content of EPSs were revealed. As a result, it was determined that the EPS obtained within the scope of the study consisted of different monosaccharides and contained protein in low amounts. HPLC analysis given the details about proportions of each sugar monomer in the EPSs produced by isolates. Some of EPSs were determined to contain xylose and arabinose in their structures.

As a result of the study, it was determined that the highest EPS production of the cultures achieved under various environmental conditions for each culture varied. Besides the EPS production amounts were strain dependent. In addition, the higher EPS production ability of intestinal-derived cultures suggests that EPS produced by lactic acid bacteria play an important role in facilitating their attachment and settlement in the intestinal microbiota.

Keywords: Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, sugar composition, HPLC

2022, 74 sayfa

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bana yol gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım Danışman Hocam Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her gün yeni bir bilgi öğrenmemi ve akademik anlamda gelişmemi sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümündeki Sayın Hocalarıma,

Eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen, bütün kararlarımda yanımda olan, canım annem Ummahan GÜLCÜ'ye ve her zorlu koşulda yanımda olan, maddi manevi desteğini benden esirgemeyen canım babam Kadir GÜLCÜ'ye

Labaratuvarıda birlikte çalıştığım, yardımları ve bilgileri ile bana destek olan Yük. Gıda Müh. Aylin KORKUT ALTINTAŐ'a,

Yüksek lisansım boyunca çalışmalarımnda bana yardımcı olan fikirleri ile beni aydınlatan, her anlamda benim gelişmemi sağlayan Dr. Öğretim Üyesi Duygu ALP'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden manevi desteklerini esirgemeyen, bütün zorluklarda her zaman yanımda olan canım dostlarım Yük. Gıda Müh. Oğuzhan GEDİK, Yük. Gıda Müh. Pınar ÜNSAL, Yük. Gıda Müh. Beste FIRINCIOĞULLARI, Yük. Gıda Müh. Selma YAKUT ve Yük. Gıda Müh. Emel SAYIN YATIK'a,

FYL-2020-7480 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Müyesser GÜLCÜ
ISPARTA, 2022

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. MG 12 numaralı kültürün boyama sonrası ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	29
Şekil 4.2. Glikoz standart eğrisi.....	23
Şekil 4.3. Kültürlerin MRS sıvı besiyerinde EPS üretimi.....	33
Şekil 4.4. Protein analizi için hazırlanan örneklerdeki renk değişimleri	44
Şekil 4.5. Protein tayini standart kurve	25
Şekil 4.6. İndirgen şeker için hazırlanan örneklerin spektrofotometre ile belirlenmesi	45
Şekil 4.7. İndirgen şeker analizi standart eğrisi.....	26
Şekil 4.8. <i>Lactobacillus curvaticus</i> MG12 kültürden elde edilen EPS'nin SEM görüntüsü.....	52
Şekil 4.9. <i>Enterococcus hirae</i> MG17 kültürden elde edilen EPS'nin SEM görüntüsü.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Yapılan ön tanımlamalar sonucunda elde edilen 61 izolata ait sonuçlar	29
Çizelge 4.2. Kültürlerin EPS Üretim Miktarları.....	31
Çizelge 4.3. İzolatların EPS üretim Miktarları (mg/L) ve OD değerine karşılık mikroorganizma sayısı (Log10).....	33
Çizelge 4.4. Farklı sükröz konsantrasyonlarına (20 g/L ve 30 g/L) uygulanan farklı üretim koşulları	35
Çizelge 4.5. Kültürlerin Farklı pH'larda EPS üretimi	38
Çizelge 4.6. Farklı Karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları (mg/L).....	41
Çizelge 4.7. İzole edilen EPS'lerin içerisinde bulunan pretein yüzdeleri.....	44
Çizelge 4.8. EPS'lerdeki toplam indirgen şeker miktarları (g/L).....	46
Çizelge 4.9. Kültürlerden izole edilen ekzopolisakkaritlerin miktarları (mg/L) ve monomer kompozisyonları (%)	47
Çizelge 4.10. Moleküler tanısı yapılan suşların listesi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Da	Dalton
DNS	3,5-Dinitro Salisilik Asit
EPS'	Ekzopolisakkarit
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	gram
IgA	İmminoglobulin A
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mg	miligram
mL	mililitre
MRS	Man Rogosa Sharpe
OD	Optik Yoğunluk
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCA	Trikloraasetik asit
TFA	Trifloraasetik asit
UV	Ultraviyole
%	Yüzde
µL	mikrolitre

1. GİRİŞ

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS) bazı bakteriler, mikroalgler, mayalar ve funguslar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen biyolojik polimerlerdir (Mıdık vd., 2020; Nguyen vd., 2020). EPS'ler, hücre yüzeyine bağlı olarak bulunabildikleri gibi ortama da salınabilmektedirler. Genel olarak uzun zincirli, yüksek molekül ağırlığına sahip yapıdadırlar. EPS'ler yapılarında temel olarak glikoz, fruktoz ve farklı oranlarda, galaktoz ramnoz, mannoz, arabinoz ve ksiloz içermektedir. Bununla birlikte yapılarında bir miktar protein parçacıkları da yer almaktadır (Saadat vd., 2019).

EPS üreticisi bakterilerden olan laktik asit bakterileri (LAB), EPS üretim yeteneklerinden dolayı birçok araştırmanın konusu olmaktadır. Bu bakterilerden, özellikle *Fructilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleri EPS sentezleme yeteneğine sahiptir. Laktik asit bakterileri (LAB), "genel olarak güvenli (GRAS)" kabul edilen ve tüketilebilir sınıfta bulunan bakteriler olarak kabul gördüklerinden dolayı, başlatıcı kültür veya probiyotik olarak gıdalarda kullanılmaktadır. Farklı gıdalarda bulunabiliyor olmalarından dolayı laktik asit bakterileri bir çok farklı yapıya sahip EPS oluşturabilmektedir (Daba vd., 2021).

EPS'ler, doğrudan enerji kaynağı olarak kullanılımsalar da, LAB'lerinin ozmotik stres, dehidrasyon ve ortamdaki diğer mikroorganizmlara karşı hücre bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadırlar. Bu etkilerinin yanında, konakçı organizma bünyesinde bakterilerin kolonizasyonunda, bağışıklık sistemin uyarılmasında, biyofilm oluşumunda ve hücre tanımada görev almaktadır (Korczy ve Varga, 2021). EPS'ler konakçı bağışıklık sistemi üzerindeki yararlı etkilerinden ve laktik asit bakterilerinin tutunma ve hayatta kalmalarına olan katkılarından dolayı prebiyotik olarak da gıdalarda kullanım alanına sahiptir. Günümüz gıda endüstrisinde EPS'ler stabilizatör, koyulaştırıcı, jelleştirici ve emülgatör olarak, ayrıca gıda ambalajlarında kullanımı açısından büyük ilgi görmektedir (Moradi vd., 2021).

LAB'lerinin gıdalarda yapısal özelliklerin gelişmesini, viskozitenin artmasını, su bağlama kapasitesinin artmasını sağlayan metabolitlerden önemli bir tanesi EPS'lerdir. Ekzopolisakkaritler aynı zamanda tüketiciye de yararlı etkiler sağlamaktadır. Bununla birlikte, bağırsak florasında probiyotiklerin daha uzun süre kalmasını sağlayarak bağırsakta kolonizasyon şansını artırmaktadır.

Bu çalışmada, pek çok olumlu özelliği bulunan ve bundan dolayı gıda ve sağlık alanlarında kullanım potansiyeli olabileceği düşünülen EPS'lerin laktik asit bakterileri tarafından üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı doğal ortamlardan LAB'leri izole edilmiştir. İkinci aşamada izolatlar tarafından üretilen EPS'lerin yüksek miktarda geri kazanımlarının sağlanması amacıyla TCA veya etanolün kullanıldığı iki farklı yöntem denenmiştir. Ayrıca EPS'lerin farklı stres koşullarında (pH, sıcaklık, farklı karbon konsantrasyonu), farklı karbon kaynaklarında üretim miktarları belirlenmiştir. Saflaştırılan EPS'lerin karakterizasyonunu için yapılarındaki protein miktarları Lowry yöntemi ile tespit edilmiş ve monomer bileşimleri HPLC analizi yapılarak belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi gerçekleştiren ve farklı kaynaklardan izole edilen kültürlerin 16S dizi tanımlama analizleri yapılmıştır.

Çalışmada, laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS'lerin özellikleri ve hangi şeker gruplarından oluştuğunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca kültürlerin kendi biyolojik özelliklerine ilave olarak ortam koşullarının ve farklı şekerlerin de üretilen EPS'nin miktarı üzerinde etkili olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmanın bu konuda yapılacak olan farklı çalışmalara yeni bir bakış açısı sağlayarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Polisakkaritler ve Ekzopolisakkaritler

Polisakkaritler, çok sayıda monosakkarit veya monosakkarit türevi molekülün art arda O-glikozid bağları ile bağlanmasıyla oluşmuş uzun karbonhidratlardır. Doğada bulunan karbonhidratların büyük bir kısmı, çok yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler olan polisakkaritler halinde bulunmaktadır (Ceyhan, 2008). Canlı organizmalar için hayati önem taşıyan makromoleküllerden birisi olan polisakkaritler, homo veya hetero monosakkarit yapısında bulunmaktadır. Canlıların pek çok fizyolojik aktivitesinde kritik rol oynayan polisakkaritler, çoğunlukla bitkiler, hayvanlar, funguslar, bakteriler ve deniz yosunları gibi çeşitli canlı türleri tarafından sentezlenmektedir (Ullah vd., 2019).

Polisakkaritler genetik çeşitlilik ve endüstriyel kullanım açısından büyük potansiyele sahip olduklarından dolayı son yıllarda önem arz eder hale gelmişlerdir. Ayrıca bağışıklık sisteminde, probiyotik bakterilerin bağırsak epitellerine tutunmasını sağlayarak patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellemektedir. Buna paralel olarak bağırsak epiteline yararlı mikroorganizmaların tutunmalarını sağlamakla bunların salgıladığı maddeler sayesinde bağışıklık sistemi üzerinde uyarıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu ve benzeri yararlı etkilerinden dolayı polisakkaritlerin biyolojik aktiviteleri giderek daha fazla ilgi görmektedir (Chakraborty vd., 2019; Liu vd., 2019; Maity vd., 2021; You vd., 2020).

Çeşitli maya ve küf türlerinin ürettiği polisakkaritlerin, moleküler biyoloji, immünoloji, ilaç endüstrisi ve kimya endüstrisi gibi bir çok alanda kullanılabilecekleri tespit edilmiştir (Maity vd., 2021). Bitkilerde yaygın olarak bulunan polisakkaritler, biyolojik aktivitelerin pek çoğunda önemli rol oynayan biyolojik makromoleküllerdir (Sun vd., 2020). Günümüzde bitkiler tarafından üretilen çeşitli polisakkaritler, destekleyici tıp alanında gıda takviyesi olarak kullanımları nedeniyle gıda ve ilaç endüstrileri tarafından da dikkate değer bileşenler olarak kabul görmektedir (Liu vd., 2018). Polisakkarit kaynaklarından birisi olan hayvansal polisakkaritler ise, gıda endüstrisinde, ilaç geliştirme ve biyomedikal alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (You vd., 2020). Hayvansal polisakkaritler arasında glikojen,

heparin, kondroitin sülfat, keratin sülfat ve mukopolisakkaritler bulunmaktadır. Bitki ve hayvanlara ilaveten bazı mikroorganizmalar da ikincil metabolitler olarak bir takım polisakkaritler salgılamaktadır. Gram pozitif veya gram negatif birçok bakteri, ekzopolisakkaritler olarak adlandırılan karbonhidrat polimerleri ile çevrilidir (Salazar vd., 2016). Bakteriler dışında algler, funguslar, arkebakteriler ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmaların da EPS ürettiği bilinmektedir (Ergene ve Avcı, 2016; De Vuyst vd., 2001). Bakterilerde ve mikroalglerde EPS üretimi mayalar ve funguslara kıyasla daha fazla olmaktadır (De Vuyst vd., 2001). Mikrobiyal polisakkaritlerin hayvansal ve bitkisel polisakkaritlere kıyasla daha kısa üretim döngüsüne sahip olması, günümüzde kullanım potansiyellerini artırmıştır (Yang vd., 2020).

EPS'ler, bileşimleri ve fizikokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren uzun zincirli, yüksek molekül ağırlığına sahip bir polisakkarit grubudur. Bazı araştırmacılar EPS'yi hücre zarına gevşek bir şekilde bağlı olan veya hücre dışı ortama salınan polimerler olarak tanımlamaktadır. Bazıları ise bu terimi yalnızca bakteri yüzeyine kovalent bağlı olmayan ve ortama salınarak serbest bir şekilde bulunabilen polisakkaritleri tanımlamak için kullanmaktadır (Lynch vd., 2018). Sutherland 1982 yılında, mikroorganizmalar tarafından çevreye salgılanan yüksek moleküler ağırlıklı karbonhidrat polimerlerini tanımlamak için ekzopolisakkarit terimini kullanmıştır. Hücre dışı polimerik maddeler yüksek oranda polisakkarit içerdiklerinden dolayı, ekzopolisakkarit terimi bu bileşikler tanımlamak için de kullanılmaktadır (Rana ve Upadhyay, 2020). Mikrobiyal polisakkaritler, kapsül formunda hücrelere bağlanmış (Kapsüler polisakkarit-KPS), diğer bileşenler ile beraber hücre duvarında (Lipopolisakkarit-LPS) ve hücre dışına salgılanmış (EPS) olarak bulunmaktadır (Gürleyendağ, 2006). Mikrobiyal polisakkaritler, üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; hücre için gerekli olan karbon ve enerjinin depolanmasında görev alan intraselüler polisakkaritler, lipopolisakkaritler ve teikoik asit gibi hücre yapılarının bileşeni olan ve hücre duvarının ayrılmaz bileşeni olarak etki gösteren yapısal polisakkaritler ve hücre dışı polisakkaritlerdir (ekzopolisakkarit) (Başyigit-Kılıç vd., 2016). Ekzopolisakkaritler, kapsül ya da ortama salınmış mukus (salgı) formunda bulunmaktadır (Ceyhan, 2008).

Hücre zarının etrafını çevreleyerek hücreleri kaplar şekilde bulunan ekzopolisakkaritler, $0.5-2.0 \times 10^6$ Da molekül ağırlıklarına sahip olan, α - ve β -

glikozidik bağlarla bağlı karbonhidrat birimlerinden oluşan, yan zincirlere sahip uzun moleküler şeker birimleridir (Alp ve Ertürkmen, 2017; Berthold-Pluta vd., 2019; Rana ve Upadhyay, 2020). EPS'ler polisakkaritler, proteinler, lipitler, nükleik asitler, fosfolipidler, hümik asit ve diğer polimerik bileşikler gibi organik makromolekül olarak kabul edilmektedirler. Bunun yanı sıra, EPS'ler yapılarında asetil, süksinil, pirüvik asit gibi organik fonksiyonel grupları ve sülfat bileşikleri gibi inorganik bileşikleri barındırmaktadır (Avcı ve Ergene, 2016; Singh vd., 2011). Bu bileşiklerin yanı sıra EPS matriksi içerisinde hücre dışı DNA içerebildikleri tespit edilmiştir (Shukla vd., 2019).

EPS'ler, mikroorganizmalar tarafından biyolojik ve kimyasal stres koşullarına veya buldukları ortamdaki zorlayıcı faktörlere (sıcaklık, pH, osmotik basınç vb.) karşı üretilmektedir (Donot vd., 2012). Mikroorganizmalar, çevresel adaptasyonlarını artırmak ve yüzeylerde biyofilm oluşturarak sert ve elverişsiz büyüme koşullarıyla başa çıkmak için de EPS üretmektedir (Rana ve Upadhyay, 2020). EPS'lerin üretici hücreleri, fagositoz ve fajlardan korumak gibi görevleri bulunmaktadır. Ayrıca bunun yanında yüksek oksijen gerilimine, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi) karşı hücreleri koruma, biyofilm oluşturma ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Sarıkaya, 2014). Ekzopolisakkarit üreten mikroorganizmalar sıvı besiyerinde viskoz, katı besiyerinde ise mukoz bir yapı oluşturmaktadır (Ergene ve Avcı, 2016).

2.2. Ekzopolisakkaritlerin Yapıları ve Çeşitleri

Ekzopolisakkaritler, ana zincir bileşimine ve sentez mekanizmalarına göre heteropolisakkaritler (HePS) ve homopolisakkaritler (HoPS) olarak iki gruba ayrılmaktadır (Lynch vd., 2018). Polisakkaritlerin özelliklerini hücredeki konumları ve kimyasal yapılarına ek olarak, moleküler ağırlıkları ve üç boyutlu şekilleri gibi faktörler de etkilemektedir (Gürleyendağ, 2006). Tek tip monosakkarit birimlerinden oluşan EPS'ler homopolisakkaritler (selüloz ve dekstran), birden fazla monosakkarit biriminin birleşmesi ile meydana gelenler ise heteropolisakkaritler (ksantan) olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle EPS'ler yapılarındaki farklılıklar ile karakterize edilmektedir (Xu vd., 2019). HePS'ler hücre içi glikoziltransferazların aktivitesi ile

sentezlenirken, HoPS'ler ise hücre dışına salgılanan glikansükraz veya glukano transferaz enzimlerinin aktivitesi ile sentezlenmektedir (Lynch vd., 2018).

2.2.1. Homopolisakkaritler (HoPS)

Mikroorganizmalar, sakkaroz kullanarak hücre dışına salınmış veya hücre duvarına bağlı glikansükrazlar tarafından HoPS'leri sentezlemektedir (Van der Meulen vd., 2007). HoPS'lerin; tek tip bağlardan oluşan lineer nötral HoPS'ler, açıl grupları içeren polianyonik homopolimerler ve sikleroglukan tipi HoPS'ler olmak üzere üç türü bulunmaktadır (Gürleyendağ, 2006). LAB'leri tarafından üretilen HoPS'ler yalnızca glikozdan (Glukanlar) ve yalnızca fruktozdan (Fruktanlar) oluşanlar olarak ikiye ayrılmaktadır (Van der Meulen vd., 2007). HoPS'lerin yapısında, değişken derecelerde dallanma ve bağlantı bölgelerine sahip bir temel zincir bulunmasıyla birlikte bu zincir bakteri suşları arasında farklılık göstermektedir. HoPS'ler, 10^5 - 10^6 Da aralığında değişen yüksek moleküler ağırlığa sahiptir (Zannini vd., 2016). HoPS'ler, poligalaktanlar, fruktanlar, β -glukanlar ve α -D-glukanlar olmak üzere dört farklı gruptan oluşmaktadır. Bunlardan α -D-glukanlar, genellikle *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*, β -glukanlar *Pediococcus* spp. ve *Streptococcus* spp., fruktanlar *Streptococcus salivarius* tarafından üretilmektedir (Lynch vd., 2018; Monsan vd., 2001). HoPS'ler yapısında yer alan karbon çeşidine bağlı olarak, glukanlar; dekstran, mutan, reuteran ve alternan olmak üzere alt bölümlere ayrılmaktadır. Fruktanlar (β) ise levan ve inülin benzeri olmak üzere iki farklı gruptan meydana gelmektedir (Zannini et al., 2016).

Dekstran, ana omurga zinciri α -(1,6) glikozidik bağlarından oluşan büyük bir α -glukan grubunu oluşturmaktadır. Ayrıca dekstran α -(1,2), α -(1,3) ve α -(1,4) gibi çeşitli ikincil bağlantılar yoluyla da dallara ayrılabilir (Zannini vd., 2016). Dekstran, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Acetobacter* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir (Qader vd., 2006). Gıda, ilaç, klinik, kozmetik ve kimya endüstrisi gibi birçok alanda kullanıldığı bildirilmektedir (Saadat vd., 2019).

Mutan, çeşitli *Streptococcus mutans* serotipleri tarafından mutansükraz enzimi ile sentezlenen bir glukandır. Ek olarak, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinlerine ait farklı

suşlar mutan üretebilmektedir. Mutan, esas olarak α -(1,3) glikozidik bağ içermesi nedeniyle suda çözünmemektedir (Yıldız ve Karatas, 2018; Zannini vd., 2016).

Reuteran, *Lactobacillus reuteri* türü tarafından üretilen spesifik bir α -glukan çeşididir ve genellikle fermente süt ürünlerinde bulunmaktadır. Reuteran, α -(1,4) ve α -(1,6) glikozidik bağları içeren ve tekrar eden birimleri olmayan bir glukandır. Yapılan bir çalışmada α -glukanın sentezi reuteransükraz enzimi ile ilişkilendirilmiştir. Reuteran diğer glukanlar gibi, fermente süt ürünlerinin koyulaşmasında rol oynamaktadır. Buna ek olarak suda çözünbilmesi nedeniyle reuteranın fırıncılık sektöründe kullanılabileceği düşünülmektedir (Zannini vd., 2016).

Leuconostoc mesenteroides alternansükraz enzimi ile alternan üretmektedir. Alternan çoğunlukla α -(1,6) ve α -(1,3) glikozidik bağları içerirken α -(1,3) bağıyla dallanma dallanma yapan bir polimerlerdir. Alternan, yüksek çözünürlüğe, düşük viskoziteye sahiptir ve enzimatik hidrolize karşı yüksek oranda dirençlidir. Alternan, ticari olarak gıda ve kozmetik sektöründe düşük viskoziteli kıvam arttırıcı ve hacim arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Hücre dışı (ekstraselüler) alternan, alternanı oligosakkaritlere depolimerize etmektedir. Alternan polisakkaritinin parçalanmasıyla oluşan oligosakkaritler prebiyotik özelliklere sahip olmasının yanı sıra, şekerlemelerde düşük glisemik tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır (Patel vd., 2012).

Levan, β -(2,1) bağlı yan zincirlere sahip, ana zinciri β -(2,6) glikozidik bağdan oluşan bir fruktandır. Levansükraz enzimi, fruktozdan levan üretimini gerçekleştirmektedir. Mikroorganizmalar tarafından mikrobiyal fermantasyon yoluyla ve bitki türleri tarafından üretilen hücre dışı bir polisakkarittir. *Lactobacillus* ve *Saccharomyces* cinslerine ait mikroorganizma suşları levansükraz enzimlerini kullanarak levan biosentezi gerçekleştirmektedir (Yıldız ve Karataş 2018; Patel vd., 2012).

Bir çeşit EPS olan inülin, β -(1,2) glikozidik bağları içeren fruktanlar veya fruktooligosakkaritlerdir. *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, inülosükraz enzimi kullanarak sakkarozdan yüksek molekül ağırlığına sahip inülin üretmektedir (Anwar vd., 2008). *Streptococcus mutans* JC2 suşu, *Leuconostoc citreum* CW28 ve *Lactobacillus reuteri* 121, inülin üreten diğer bazı laktik asit bakterileridir. Ayrıca inülin prebiyotik özelliğe sahip bir EPS'dir (Patel vd., 2012). Yüksek derecede

polimerizasyona sahip inülin tipi fruktanlar, gösterdikleri belirgin in vitro prebiyotik etkileri nedeniyle özellikle ilgi çekmektedir. Gıda endüstrisinde inülin yağ ikame maddesi olarak, tatlılar, unlu mamuller, fermente süt ürünleri ve bebek maması gibi çeşitli ürünlerde yapı ve stabilite sağlamak için kullanılmaktadır. Ayrıca inülin polimerleri yüzey aktif maddeler olarak potansiyel bir uygulama alanına sahiptir. Karbamoillenmiş inülin, arayüzey gerilimini (katmanlar arası gerilimi) azaltma yeteneğine sahiptir, böylece biyolojik olarak parçalanabilen bir yüzey aktif madde sağlamaktadır (Anwar vd., 2008). Ayrıca inülin tipi fruktooligosakkaritler, enterositlerin gelişimini desteklemekte, patojenik mikroorganizmaların tutunmasını engellemekte ve bağırsak lümeninin pH'sını düşürmektedir (Zannini vd., 2016).

2.2.2. Heteropolisakkaritler (HePS)

HePS'ler 1.0×10^4 - 6.0×10^6 Da arasında molekül ağırlığına sahip doğrusal ve tekrarlanan dallanmış alt birimlerden oluşmaktadır (Fraunhofer, 2018; Werning vd., 2012). HePS'in tekrarlanan birimi, şeker birimlerini öncü moleküller olarak kullanarak hücre içinde üretilmektedir. Ardından hücre zarı boyunca yer değiştirmekte, polimerize olmakta ve ortama salınmaktadır (Van der Meulen vd., 2007). Şeker polimer zincirinde, en sık olarak D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnoz bulunmasıyla birlikte, alt birimlerin her biri üç ile sekiz farklı monosakkarit içermektedir. HePS'lerin içerisindeki monosakkaritler, piranoz veya furanoz formunda α - veya β - anomer olarak bulunmaktadır. HePS'ler bir mol üronik asit (D-glukuronik asit) içermesinin yanı sıra, HePS dallanmalarında nadiren fosfat, gliserol ve asetil grupları da bulunmaktadır (Lynch vd., 2018; Werning vd., 2012). HePS'ler, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus* spp. gibi birçok farklı laktik asit bakterileri tarafından sentezlenmektedir (De Vuyst vd., 2001). Besiyeri ortamının bileşimi, sıcaklık, pH, oksijen gerilimi ve LAB'lerinin farklı büyüme evreleri gibi faktörler HePS'lerin monomer bileşimini etkilemekte ve glikozidik bağlarda değişikliklere sebep olmaktadır. Bu faktörler aynı zamanda HePS'lerin biyosentezini, miktarını ve çeşidini değiştirmektedir (Saadat vd., 2019; Patel vd., 2012).

Kefiran, HePS olarak bilinen suda çözünür bir polisakkarittir. Ayrıca, yaklaşık olarak eşit oranda glikoz ve galaktoz alt birimlerini içermektedir. Asitli süt jellerinin viskozite ve elastikiyet gibi fiziksel özelliklerini geliştirmektedir. Yapılan çalışmalarda,

Lactobacillus kefiranofaciens, *L. kefirgranum*, *L. parakefir* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, gibi çeşitli laktik asit bakterilerinin kefiran ürettiği belirlenmiştir (Zannini vd., 2016b). Antimikrobiyal etki gösterme, yara iyileştirme, kan basıncını ve kolesterolü düşürme, tümör büyümesini önleme ve IgA düzeylerini artırma gibi faydaları bulunmaktadır. Ayrıca bağırsak bağışıklığının artmasına yardımcı olmaktadır (Saadat vd., 2019; Zannini vd., 2016).

2.3. EPS'lerin Sentezlenmesi

Ekzopolisakaritler, mikroorganizmalar tarafından logaritmik fazda veya ortamda besinlerin az olduğu durumlarda, pH ve sıcaklık gibi farklı stres koşullarında veya organizmaların besinleri kullanmadığı durumlarda büyümenin durağan fazının başlangıcında salgılanan hücre dışı metabolitlerdir (Sengupta vd., 2018). EPS biyosentezi, çok sayıda enzim ve düzenleyici protein içerdiğinden dolayı karmaşık bir süreçtir (Patel vd., 2012). LAB suşlarında HoPS'lerin sentezlenmesi tek bir gen üzerinden gerçekleşirken, HePS'lerin sentezlenmesi EPS gen kümeleri tarafından kodlanan birden fazla genin birlikte fonksiyonu ile gerçekleşmektedir. Çoğu laktik asit bakterisinde ekzopolisakarit sentez genleri kromozomdan ziyade plazmidler üzerinde bulunmaktadır (Donot vd., 2012).

EPS biyosentezi temel olarak dört aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada bir karbon kaynağının asimilasyonu gerçekleşmekte, ikinci aşamada, oligosakkarit tekrarlayan birimlerin sentezi veya glikoziltransferazların ardışık veya ilerleyici aktivitesi ile doğrudan sentez, daha sonra ise tekrar eden birimlerin birleştirilmesiyle polisakkaritler oluşturulmakta ve son olarak EPS'ler hücre dışına salınmaktadır (Barlecos vd., 2020).

Gram negatif bakterilerde EPS'lerin bir araya getirildiği ve hücre dışına sentezlenmesi farklı bir mekanizma ile açıklanmaktadır. Öncelikle polisakkarit sentezini başlatmak için ATP kullanan lipid yapısında bir hücre zarı elemanı kullanılmakta, ardından yine ATP sentezine bağlı olarak çalışan taşıyıcı kompleks lipoproteinlerine dayalı bir sentez yolu izlenmektedir (Whitney ve Howell, 2013).

Homopolisakkaritlerin sentezlenmesi, substrat olarak sakkaroz kullanılarak hücre dışı veya hücre duvarına bağlı glikoziltransferaz (GTF) veya fruktosiltransferaz (FTF)

enzimlerinin hücre dışı şeker birimleri arasında glikozidik bağ kurması ile gerçekleşmektedir. Glikozil transferazlar, d-glukopiranozil birimlerinin sakkarozdan alıcı moleküllere transferini gerçekleştirerek glikozidik bağlar oluşturmaktadır (Harutoshi, 2013; Patel vd., 2012). Bu sentez, substrat olarak sakkarozu kullanmaktadır. Sentez için gerekli olan enerji sakkaroz hidrolizinden sağlanmaktadır. EPS üretimi için enzim sentezi dışında enerji harcanmamaktadır, çünkü sakkaroz aktif taşıma proseslerini veya aktifleştirilmiş karbonhidrat öncülerini kullanmadan kolayca EPS'ye dönüştürülebilmektedir (Harutoshi, 2013).

HePS'ler, HoPS'lere göre daha karmaşık bir sentez mekanizması ile sentezlenmektedir. HePS'ler, hücre içi enzimleri kapsayan karmaşık bir yapı tarafından sentezlenmektedir (Harutoshi, 2013). HePS'i oluşturan tekrarlayan birimler, öncü moleküller olarak şeker birimlerini kullanarak stoplazmada sentezlenmektedir. Hücre zarı boyunca glikoziltransferazlar tarafından yer değiştirmekte, burada polimerizasyon, şeker nükleotit birimlerinin bir lipit taşıyıcıya tutturulmuş büyüyen zincire ardışık olarak eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Son olarak EPS ortama salınmaktadır (Patel vd., 2012).

2.3.1. EPS sentezini etkileyen faktörler

EPS sentezi, ortam bileşimi (karbon ve azot kaynağı, C/N oranı), çalışma koşulları (pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen), enzimler, iyonlar, stres ve diğer fermantasyon koşulları gibi birçok faktöre bağlıdır (Nouha vd., 2018; Sengupta vd., 2018). Mikroorganizmanın türü, genetik içeriği ve sahip olduğu metabolik yolları üretilen EPS'nin bileşimini belirlemektedir. Bununla beraber aynı kültür, ortamda farklı karbon veya azot kaynakları bulunduğu farklı konsantrasyon ve bileşimlerde EPS üretebilmektedir (Nouha vd., 2018). EPS üretimini ortamdaki karbon (örn. glikoz ve sakkaroz) ve azot kaynağı (örn. amonyum sülfat, pepton, sodyum nitrat) büyük ölçüde etkilemektedir (Barcelos vd., 2020). Azot kaynağının, bakteriyel EPS üretiminde ve optimizasyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bakteri ortamında azotun belirli bir düzeye kadar kullanımı, EPS'nin miktarını artırırken, ortamda fazla azot bulunması enzim yapısının bozulmasına neden olarak EPS sentezlenmesini azaltmaktadır (Barcelos vd., 2020; Sengupta vd., 2018). Ayrıca yüksek EPS verimi elde edebilmek için, karbon ve azot kaynağı arasında mutlaka optimal bir dengenin

kurulması gerekmektedir (De vuyst ve Degeest., 1999). Yapılan bir çalışmada normal şartlarda 50-60 mg/L EPS üreten *Lactobacillus casei*, besiyerinin optimizasyonu sırasında bileşimine glikoz ve sükroz birlikte eklenmesinden sonra, yaklaşık 200 mg/L EPS ürettiğini gözlemlemişlerdir (Başyigit-Kılıç vd., 2016).

Yüksekdağ ve Aslım (2008), yaptıkları çalışmada *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* için farklı karbon kaynaklarının büyüme ve EPS üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Aynı kültürün karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında 175 mg/L EPS ürettiğini, fruktozdan ise sadece 69 mg/L EPS üretebildiğini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda araştırmacılar karbon kaynağı olarak fruktoz kullanıldığında EPS üretiminin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

Kırma, (2016) yaptığı tez çalışmasında, şeker ve substratın EPS üretimine etkisini araştırmıştır. Çalışma sonunda, şekerli soyada, şekersiz soyaya göre EPS üretiminin fazla olduğunu belirlemiştir. Soya ve buğday suyu karşılaştırıldığında ise, soyada EPS üretiminin daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Çalışma sonucunda, bileşenlerin farklı olmasının ve özellikle soya da yağ oranının fazla olmasının üretimi artırdığını gözlemlemişlerdir. Soya ürünlerinde en fazla üretimi *Weissella confusa* bakterisinin gerçekleştirdiğini, buğdayda ise en fazla EPS üretimini *Streptococcus macedonicus*'un gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Analizleri sonucunda, her mikroorganizmanın kendine has gelişme faktörlerinin olması ve ürün farklılıklarının olması, iki ortam arasında farklı EPS üretimine neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Makro besin elementleri dışında, bazı mikro besin elementleri de mikroorganizmanın büyümesini ve EPS üretimini etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, ortamdaki fosfor varlığının EPS üretimini engellediği belirlenmiş, *Klebsiella* spp. türlerinin fosfor iyonlarının yokluğunda maksimum EPS üretebildiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak *Lactobacillus casei*'nin EPS üretiminin Ca^{+2} , SO_4^{-2} ve sitrat kombinasyonlarına mangan ve magnezyum eklenmesi ile hızlandığı belirlenmiştir (Shukla vd., 2019).

Bakteriyel ekzopolisakkarit üretimi çoğunlukla aerobik koşullar gerektirmektedir. Ancak ksantan gum gibi bazı ekzopolisakkaritlerin üretimi oksijen oranı yüksek ortamda gerçekleşirken, aljinat gibi EPS'lerin üretimi oksijen oranı düşük olan mikroaerofilik ortamlarda gerçekleşmektedir (Başyigit-Kılıç vd., 2016). EPS üretimini

etkileyen bir diğerk faktör ise sıcaklıktır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus acidophilus*'un 37°C ve 42°C'de 24 saatlik inkübasyonu sonucunda yüksek EPS ürettiği, 30°C'de ise çok daha düşük miktarda EPS ürettiği belirlenmiştir (Mozzi vd., 1995).

EPS üretimi, ayrıca büyüme aşamalarına ve mikroorganizmaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Her mikroorganizma için EPS üretimi farklı faz aşamalarında gerçekleşmektedir (Barlecos vd., 2019). EPS üretiminde ortamın pH dengesi de önemlidir. Ortam pH'sının sabit tutulması EPS üretiminin maksimum olmasını sağlamaktadır. Araştırmacılar tarafından yapılan bazı çalışmalar EPS üretiminin doğrudan pH değerlerine bağlı olabileceğini savunmaktadır (Barlecos vd., 2019). Petry vd., (2000) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'u kullanarak yaptıkları bir çalışmada, EPS üretimi üzerine sıcaklık, pH, ortam bileşenleri ve oksijen gibi faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda EPS üretiminde artışa yol açan en önemli faktörün pH'nın stabil tutulması olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda üretim esnasında diğerk faktörler sabit tutulduğunda ve pH kontrol edilerek üretim yapıldığında yüksek seviyelerde EPS üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

2.4. Ekzopolisakkaritlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin antioksidan, antikanser, immünomodülatör, biyoaktivite, antiviral, antikoagulan, antikoolesterolemik ve antitümör aktivitesi olmak üzere insan sağlığı üzerine çeşitli faydalı etkileri bulunmaktadır (Daba vd., 2021; Patel vd., 2012). EPS'ler patojenlerin biyofilm oluşturmalarını azaltmakta ve ayrıca bağırsak probiyotiklerinin kolonizasyonunu desteklemektedir (Daba vd., 2021). Bunların yanı sıra EPS'ler hücreler etrafında biyofilm oluşturarak hücrelerin olumsuz koşullara karşı korunmasını ve bu koşullarda canlı kalmalarını sağlamaktadır. EPS'lerin bakterileri dehidrasyona, asit ve safra tuzu gibi zorlu koşullara karşı koruması diğerk önemli özelliklerindedir (Dertli vd., 2015).

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Harutoshi, 2013). Probiyotikler, ürettikleri metabolitlerle hücre yapı bileşenleri ile ve fermantasyon sonucu oluşan metabolitleri ile sağlık üzerine yararlı etkiler sağlamaktadır (Akpınar ve Kaplan Türköz, 2019).

Bağırsaklardaki probiyotik bakteriler, ince bağırsaktaki enzimler tarafından sindirilmeden kalın bağırsağa geçen, kolonda bulunan bakterilerin çoğalmasını ve aktivitesini seçici olarak artıran gıda bileşenleri olarak tanımlanan prebiyotikler tarafından güçlendirilmektedir. Böylece probiyotik bakteriler, konakçı sağlığını iyileştirmeye ve bağışıklık sisteminin güçlenmesine fayda sağlamaktadır (Demirci vd., 2017; Harutoshi, 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalar, probiyotik mikroorganizmaların ürettiği oldukları polisakkaritlerin bağırsaktaki kolonizasyonunda faydalar sağladığını ve sindirim sisteminde koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (Akpınar ve Kaplan-Türköz, 2019). EPS'ler *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi probiyotik bakterilerin gastrointestinal kanalda olumsuz etmenlere karşı korunmasını ve bağırsaktaki kolonizasyonlarını kolaylaştırmaktadır (Patel vd., 2012). EPS, bakteriler etrafında mukoz bir yapı oluşturarak bakterilerin düşük pH, safra tuzları, çeşitli sindirim enzimleri gibi olumsuz gastrointestinal sistem ortamına karşı koruyucu etki sağlamaktadır. Böylece bakterilerin bağırsak yolunda hayatta kalma şansını artırmaktadır (Xu vd., 2019). *Lactobacillus acidophilus* gibi laktik asit bakterileri, konakçı hücrelerin sağlığı ve bağışıklık sistemi için önemli fonksiyonlar içermektedir. Bu bakterilerin patojenlerin büyümesini kontrol ederek enfeksiyonların oluşmasını engellemek veya kontrol etmek için etkili olduğu iyi bilinmektedir (Singh ve Saini, 2017). Bu bakteriler tarafından üretilen EPS'ler ortamda, patojenlere karşı korucuyu biyofilm oluşturmaktadır. Bu konu ile yapılan bir çalışmada, yöresel bir fermente süt içeceğinden izole edilen EPS'nin birkaç enterik patojenin yapışmasını engelleyebildiği görülmüştür (Kim vd., 2009).

Bağışıklık sistemini etkileyen maddeler immünomodülatör olarak adlandırılmaktadır. Bu maddeler, enfeksiyonları bastırmak, sindirim sistemi kanserini önlemek veya iltihabi bağırsak hastalıkları gibi immün yetmezliğe bağlı hastalıkları tedavi etmek için gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Saadat vd., 2019). LAB tarafından sentezlenen bazı biyopolimerler, immünomodülatör gıda katkı maddeleri olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Singh ve Saini, 2017). EPS moleküllerinin, hem doğal olarak hem de adaptif yanıt olarak bağışıklık sistemini korudukları bilinmektedir (Saadat vd., 2019). EPS'lerdeki mitojenik aktivitenin polisakkaritlerdeki fosfat grubu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu durum, EPS yapısında bulunan bileşiklerin, EPS'nin biyoaktivitelerini doğrudan etkileyebileceğini düşündürmektedir (Surayot vd., 2014).

2.5. EPS'lerin Gıdalarda Kullanımları

Son yıllarda, polisakkarit üreten bakterilerin ve EPS'lerin farklı endüstriyel alanlarda kullanımı ilgi çekmektedir (Singh vd., 2011). Çeşitli fizikokimyasal özellikler oluşmasını sağlayan EPS'ler, gıda endüstrisinin yanında ilaç, kozmetik, petrol sondajı ve kağıt üretimi gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Roca vd., 2015). Ekzopolisakkaritler, bitkiler tarafından üretilmesine rağmen mikrobiyal EPS'lerin bitki polisakkaritlerine göre birçok avantajı bulunmaktadır. Bitkilerde EPS üretimi 3-6 ay arasında tamamlanırken mikroorganizmalarda bu süreç 1-2 gün kadar kısa bir süre de tamamlanmaktadır. Mikrobiyal EPS üretimi için güneş enerjisine ihtiyaç duyulmaması, yer ve mevsimden bağımsız olarak üretilmesi bundan dolayı arazi maliyetinin olmaması ve mikroorganizmaların bir çok organik maddeyi fermantasyon kaynağı olarak kullanabilmesi diğer avantajlarından (Barcelos vd., 2020; Avcı ve Ergene, 2016; Donot vd., 2012).

Günümüzde herhangi bir katkı maddesi içermeyen doğal gıda ürünlerinin popülaritesi artmıştır. Bundan dolayı endüstride EPS üreten LAB kullanılması, yeni ürünlerin geliştirilmesi için önemli bir etki oluşturmaktadır. Gıdalarda, EPS üreten LAB'lerinin kullanılması daha iyi bir dokuya ve stabiliteye sahip güvenli, doğal ve sağlıklı bir son ürün üretilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Lin ve Chien., 2007). EPS üretim yeteğine sahip, özellikle LAB, süt ürünlerinde kullanılacak propiyonik asit bakterileri (*Propionibacterium* spp.) ve bifidobakteriler başta olmak üzere, genel olarak güvenli (GRAS) gıda sınıfı mikroorganizmaların suşları, EPS'nin gıda kullanımları için bir alternatiftir (De Vuyst vd., 2001). Bazı EPS'ler hijyen sorunlarına neden olan biyofilm oluştursalar da, LAB tarafından üretilen EPS'ler gıda endüstrisinde fermente gıda formülasyonlarının reolojisini, dokusunu ve ağız hissini iyileştirmede önemli bir rol oynamaktadır (Sanlibaba ve Cakmak, 2016). EPS yapısında bulunan molekül içi glikozidik bağlar ve büyük moleküller arasında bulunan hidrojen bağları olmak üzere iki ana faktör, viskoziteye ve reolojiye katkıda bulunmaktadır (Zhou vd., 2019). Bu özelliklerine ek olarak, EPS'lerin gıdaların tat hissini artırma özelliklerinden dolayı yoğurt, peynir ve tahıl bazlı ürünler gibi fermente gıdaları geliştirmek amacıyla EPS üreten LAB'leri starter kültür veya yardımcı kültürler olarak kullanılmaktadır (Zannini vd., 2016; Yılmaz, 2014).

EPS, fermente süt ürünlerinin reolojisini geliştirmek için doğal biyoyoğunlaştırıcı ajanlar olarak, suyu bağlamak ve sineresisi sınırlamak için fiziksel stabilizatörler olarak önemli işleve sahiptir. Bu işlevler EPS'in bileşimine, yapısına ve süt bileşenleriyle, özellikle iyonlar ve proteinlerle etkileşimine bağlı olarak değişmektedir. Protein ve stabilizatör içeriği artırılmış, düşük yağ ve şeker içeriğine sahip, daha az katkı maddesi içeren, kremli, pürüzsüz yoğurt ürünlerine tüketiciler talepleri son zamanlarda artmıştır. Bütün bu özelliklerin yanında düşük maliyet faktörleri EPS kullanımını uygun bir alternatif haline getirmektedir (Duboc ve Mollet, 2001). EPS'lerin en iyi kullanımları yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin reolojisi, dokusu ve ağız hissi özelliklerini iyileştirmeleridir (Welman ve Maddox, 2003). LAB'leri tarafından üretilen EPS'ler kendi tadı olmamasına rağmen, süt ürünlerinin ağızda geçirdiği süreyi arttırarak daha iyi bir tat algısı oluşmasını sağlamaktadır. Bir diğer fizyolojik fayda ise, EPS'lerin gastrointestinal kanalda daha uzun süre kalmasından dolayı probiyotik bakterilerinin kolonizasyonunu arttırmasıdır (Welman ve Maddox, 2003).

İspirli vd., (2018) yaptıkları bir çalışmada, glukoz tipi EPS'nin çikolatalı puding üzerindeki fizikokimyasal rolünü ve prebiyotik etkilerini değerlendirmişlerdir. Simbiyotik etki için probiyotik olarak *Lactobacillus rhamnosus* ve prebiyotik olarak LAB tarafından üretilen EPS'yi kullanmışlardır. Probiyotik numunelerle karşılaştırıldığında, simbiyotik üründe sineresisin önemli ölçüde azaldığını ve yüksek miktarda probiyotik ürettiğini görmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada iyi sonuçlar elde etmelerinin yüksek miktarda % 1 (w/w) EPS kullanmalarından kaynaklandığını düşünmüşlerdir.

Ale vd., (2016) yaptıkları çalışmada, *L. fermentum* Lf2 tarafından üretilen EPS'nin yoğurt üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Katkı maddesi olarak *L. fermentum* Lf2'den izole ettikleri 300 mg/L düzeyinde EPS kullanılarak yapılan yoğurtların, kontrol numunelerine göre daha sert ve kıvamlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Costa vd., (2010), EPS reten *Lactococcus lactis* suşu kullanılarak yarım yağlı cheddar peyniri üretmişlerdir. EPS üreten starter ile yapılan peynirlerin, peynir veriminde (100 kg süt başına) % 8.17'lik bir artış, nem içeriğinde ise % 9.49'luk bir artış sağladığını

gözlemlemişlerdir. Ayrıca EPS'nin peynirdeki varlığının tat üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını bildirmişlerdir.

Bazı EPS türleri, fırıncılık endüstrisinde, hamur işlenebilirliğini, dokusunu, hacmini, reolojisini ve ekmeğin raf ömrünü iyileştirmede önemli bir rolü olan ancak pahalı hidrokoloidal polisakkaritlerin kullanım ihtiyacını azalmasını veya değişmesini sağlamaktadır. Bu nedenle fermentasyon sırasında EPS'nin LAB tarafından yerinde sentezlenmesi, ekmeğin kalitesinde tekstürel özelliklerinin iyileştirilmesini, ilave katkı maddelerinin kullanımının azalmasını ve bundan dolayı oluşacak maliyetin düşürülmesini sağlamaktadır. Tüketicinin sağlıklı gıda talepleri, lif açısından zengin ürünlere olan ilginin artmasına neden olmaktadır. Fırıncılık endüstrisinde, özellikle ekmeğin için, lif kaynağı olarak kepeğin kullanılması, gluten hidrasyonunu azaltmakta ve sonuç olarak buğday hamurunun yapısını olumsuz yönde değiştiren hidrolize gluten ağının oluşumunu engellemektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için buğday kepeğinde lifli buğday ekmeğinin kalitesini artıran bir hidrokoloid görevi gören dekstran üretmesinden dolayı *Weisiella confusa* kullanılmaktadır (Daba vd., 2021). Dekstran unlu mamüllerde yumuşaklığı, kırıntı dokusunu ve somun hacmini iyileştirmede de önemli görev üstlenmektedir. Reuteran ve levan, unlu mamüllerde yumuşaklığı artırmakta ve bayatlamayı geciktirmektedir (Korczyk ve Varga, 2021).

Dertli vd., (2016b) yaptıkları çalışmalarında, farklı fermentasyon koşulları altında EPS üreten *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının sucuğun fizikokimyasal, mikrobiyolojik, dokusal ve mikroyapısal özellikleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Fermentasyon sırasındaki EPS üretiminin, sucuklarda daha sert, daha az yapışkan özelliklerini sağladığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca mikroskop incelemelerinde sucuklarda EPS'ler tarafından ağ benzeri bir yapının oluşturulduğunu bildirmişlerdir (Dertli vd., 2016b).

2.6. Laktik Asit Bakterileri ve Ekzopolisakkaritler

LAB'leri, Gram pozitif, spor oluşturmeyen ve katalaz negatif mikroorganizmalardır. Ayrıca fakültatif anaerob, bazı üyeleri hariç hareketsiz, sitokrom içermeyen ve karbonhidrat fermentasyonu sonucunda başlıca ürün olarak laktik asit üreten mikroorganizmalardır (Alp, 2018; Sağlam ve Karahan, 2017). Morfolojik olarak

yuvarlak veya eliptik (*Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*) şeklinde ya da kısa veya uzun çubuk (*Lactobacillus*) şeklinde olabilmektedir. Bu bakteriler cins ve türe göre farklılık göstermektedir. Bitki ve bitki atıklarında, süt ve süt ürünlerinde, insan, hayvan ve diğer canlıların bağırsak sisteminde bulunmaktadır (Demirci, 2017). LAB'lerinin, fermantasyon sırasında oluşan metabolitlere göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki farklı grubu bulunmaktadır. Homofermantatif bakteriler glikozdan % 95-100 oranında laktik asit üretirken, heterofermantatif olanlar glikozdan % 50 oranında laktik asit üretmektedir ve bunun yanında asetik asit, etanol, gliserol ve mannitol oluşturmaktadır (Üstündağ ve Yalçın, 2017).

Gıda endüstrisi için önemli LAB'leri, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*'lardır (Üstündağ ve Yalçın, 2017). LAB'leri, yoğurt, peynir, ekşi hamur, turşu veya soya ürünleri gibi fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu bakteriler; organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosin gibi bileşikler sentezlediklerinden dolayı doğal koruyucu ve düşük maliyet talebi ihtiyacını karşılamaktadır (Yılmaz vd., 2014). LAB'lerinin bu metabolitlerin yanı sıra hücrede kapsül halinde bulunabilen ya da hücre dışına salgılanan ekzopolisakkarit (EPS) ürettiği bilinmektedir.

Laktik asit bakterileri, EPS üretimi için önemli mikrobiyal hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir (You vd., 2020). Ekzopolisakkaritler, şeker ve şeker türevlerinin monosakkarit birimlerinden oluşmaktadır (Dilna vd., 2015). LAB'lerinin ürettiği EPS'ler fermente gıdalarda yapı özelliklerini geliştirmektedir. Ayrıca EPS'nin insan bağırsak sağlığına da yararlı etkileri bulunmaktadır (Serin, 2016). Yapılan çalışmalar, bakterilerin benzersiz reolojik özelliklere ve yüksek su bağlama kapasitesine sahip olan EPS'yi, doğal ortamlarında ısı, kuruma, ozmotik ve asidik stres, deterjan veya ağır metal iyonlarının varlığı gibi stresli koşullardan korunmak için ürettiğini göstermektedir (Daba vd., 2021; Osińska-Jaroszuk vd., 2018).

LAB'leri tarafından üretilen EPS'nin varlığı, günümüzde kullanılan katkı maddelerine umut verici bir alternatif olarak kabul edilmektedir. LAB'leri küçük miktarlarda EPS üretse de, ucuz substratlar ve uygun maliyetli fermantasyon yöntemleri kullanılarak üretim parametreleri optimize edildiğinde, bunların kullanımı ekonomik açıdan uygulanabilir duruma geleceği düşünülmektedir (Korczy ve Varga, 2021).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda yer alan laktik asit bakterileri, Isparta ilindeki halk pazarından alınan çiğ süt ve çeşitli peynirlerden (lor peyniri, 2 farklı keçi peyniri, 2 farklı inek peyniri) ve 1 adet doğal fermente sucuktan izole edilmiştir. Ayrıca Antalya ve Isparta illerinden toplanan çeşitli bitki numuneleri, farklı metotlarla yapılmış turşular ve sirkeler ile ticari olarak kesilmiş hayvanların bağırsak ortamları'da (inek bağırsağı, keçi bağırsağı ve inek işkembesi) izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. İzolasyon aşaması Mart ve Kasım ayları arasında olmak üzere 6 ay süresince devam etmiştir. İzolasyon aşamasında 84 farklı muhtemel laktik asit bakterisi izole edilmiş ve çalışmada kullanılmak üzere -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Laboratuvara getirilen izolasyon materyallerine ait numuneler fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde homojenize edilerek 10^{-6} 'ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan De Man Rogosa Sharpe (MRS-Merck, Almanya) agar besiyerine yayma plak yöntemi ile ekimler yapılmıştır. MRS agar petripleri izolasyon kaynağına bağlı olarak 30 °C ve 37 °C sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi bittiğinde gelişme gözlemlenen besiyerlerinden beyaz/krem veya beyaz/şeffaf gri renkli atipik koloniler seçilmiştir. Seçilen koloniler MRS sıvı besiyeri içerisine aktarılmış ve tekrar 30 °C ve 37 °C sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda seçilen koloniler MRS agar besiyerine çizim yapılarak tek düşmesi sağlanmıştır. Muhtemel laktik asit bakterilerinin saflıkları kontrol edilerek sonraki aşamalarda kullanılmak amacıyla % 20 gliserol içeren MRS sıvı besiyerinde -18 °C'de muhafaza edilmiştir (Akoğlu vd., 2017).

3.2.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması

LAB'lerinin tanımlanması amacıyla, morfolojik inceleme ve biyokimyasal testler yapılmıştır. İzolatlar saf olarak elde edildikten sonra, ilk olarak Gram boyama, morfolojik inceleme ve katalaz testi uygulanmıştır. Yapılan analizlerden sonra Gram (+), çubuk ve kok şekilli, katalaz negatif bakteriler muhtemel laktik asit bakterileri olarak değerlendirilmiştir. Muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatlara bir sonraki aşamada, farklı sıcaklıklarda gelişim (10-45 °C), pH 9.6'da gelişim, % 6.5 tuz konsantrasyonunda gelişim testleri yapılmıştır (Yıldız, 2011).

3.2.2.1. Gram boyama

Testler öncesinde stok kültürler sıvı MRS besiyerinde 24 saat süresince inkübe edilmiş ve aktif hale getirilmiştir. Kültürler preperat hazırlandıktan sonra, gram boyama setinde (Merck, Almanya) belirtilen talimatlara uygun olarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. İzolatların morfolojik görüntüleri ve Gram reaksiyonları ışık mikroskobu (Zeiss, Almanya) altında incelenmiştir (Alp, 2018; Tokatlı, 2013).

3.2.2.2. Katalaz testi

Bu aşamada seçilen izolatların aerob ya da anaerob olma durumlarını belirlemek amacıyla katalaz testi uygulanmıştır. Bu test katalaz enziminin varlığında ortamdaki hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrılması temeline dayanmaktadır. Bilindiği üzere Laktik asit bakterileri katalaz negatif yani anaerob ya da mikroaerofilik bakterilerdir. Katalaz testi, bakteri kolonisi üzerine % 3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılarak yapılmıştır. İşlem sonrasında gaz çıkışı gözlemlenen bakteriler katalaz pozitif, gaz çıkışı olmayan bakteriler ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Yıldız, 2011).

3.2.2.3. Laktik asit bakterilerinin pH 9.6'da gelişimlerinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin pH 9.6'da gelişip gelişmediklerinin belirlenmesi amacıyla MRS sıvı besiyerinin pH'sı 1 N steril NaOH ile 9.6' ya ayarlanmıştır. Bu besiyerine, 18 saatlik aktif kültürler % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında pH 9.6'da gelişim gösteren izolatların muhtemel *Enterococcus* spp. olduğu düşünülerek sonraki analizlerle devam edilmiştir.

3.2.2.4. % 6.5 Tuz oranında gelişimlerinin belirlenmesi

18 saatlik aktif kültürlerden % 6.5 oranında tuz içeren steril MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılama yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerin bulanıklık durumları kontrol edilmiştir. Gelişim gözlemlenen kültürler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Yıldız, 2011).

3.2.2.5. Farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin belirlenmesi

İzolatların farklı sıcaklıklardaki gelişim durumlarını belirlemek amacıyla 18 saatlik aktif kültürden 10 ml sıvı MRS besiyerine % 0.1 oranında inoküle edilmiştir. Besiyerleri 10 °C ve 45 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüplerdeki bulanıklık durumuna göre pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Tokatlı, 2013).

Ön tanımlama testlerinin ardından laktik asit bakterisi olduğu belirlenen izolatların EPS üretimi yeteneklerinin belirlenmesi denemelerine başlanmıştır.

3.2.3. İzolatların EPS üretimlerinin belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında izole edilmiş olan laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS nin saflaştırılması amacıyla literatürde geçen iki farklı yöntem denenmiştir.

3.2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin saflaştırılmasında TCA kullanımı

İzolatların ekzopolisakkarit üretimlerini belirlemek için MRS besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır. Standart MRS bileşiminde yer alan glikoz şekeri yerine % 2 oranında sükroz eklenmiştir. EPS üretimi için öncelikle bakteriler normal MRS'de aktif hale getirilmiştir Daha sonra modifiye MRS katı besiyerine aktif kültürlerden ekim yapılmış ve 3 gün 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi

sonunda koloni üzerinde mukoz yapı görülen izolatların muhtemel EPS üreticisi olabileceği düşünülmüş ve bu koloniler EPS üretimi için seçilmiştir. Koloniler sükroz içeren MRS sıvı besiyerine tekrar inoküle edilerek 3 gün 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler 100 °C’de 10 dakika kaynatılmış ve sonrasında darası alınmış santrifüj tüpüne 900 µL örnek aktarılmıştır. Örnek üzerine 900 µL % 85’lik TCA çözeltisi ilave edilerek örnek tüpleri 10.000 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 500 µL alınmış ve üzerine 1500 µL soğuk etanol eklenerek 1 gece -18 °C’de bekletilmiştir. Ardından 10.000 rpm’de 25 dakika tekrar mikrosantrifüjde (Hettich Mikro 120) santrifüjlenmiş ve EPS’nin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj tüpündeki etanollü süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletteki etanolün ayrıca uzaklaştırılması amacıyla 1 gece boyunca 60 °C’de bırakılmıştır (Alp ve Kuleaşan, 2019).

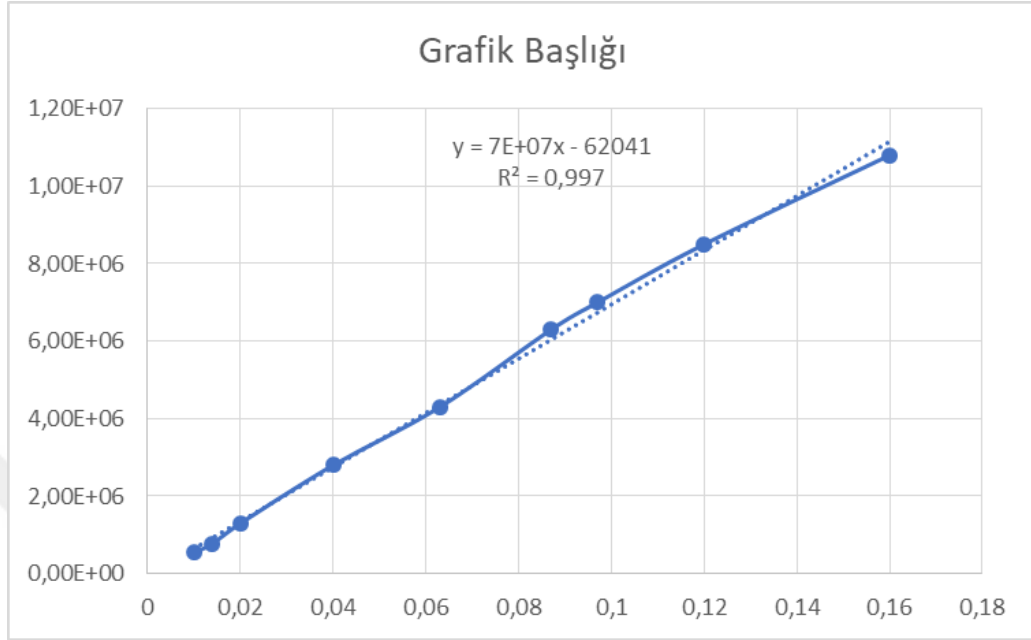
3.2.3.2. Ekzopolisakkartilerin saflaştırılmasında etanol presipitasyon yöntemi

Ekzopolisakkartilerin saflaştırılmasında Gänzle vd., (2002) tarafından uygulanan yöntem kullanılmış, presipitasyon için etanol kullanılmıştır. 18 saatlik taze kültürlerden % 2 oranında sükroz içeren MRS sıvı besiyeri içerisine %1 oranında aşılama yapılmış ve kültür 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda aktif sıvı kültürden santrifüj tüplerine 1 ml alınarak 8000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu sayede pelet ve süpernatant ayrılmıştır. Süpernatant 2 mikro santrifüj tüpüne bölünerek üzerine 2:1 (v/v) oranında -18 °C’de bekletilen % 95’lik soğuk etanol ilave edilmiş ve 3 saat +4 °C’de bekletilmiştir. Bu sayede EPS’nin etanol ile ayrılması sağlanmıştır. Süre sonunda tüpler 12000 rpm’de 25 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılarak dip kısımda kalan pelet EPS olarak ayrılmıştır. Peletler üzerlerine 50 mikrolitre ultra saf su koyularak çözülmüş ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Gänzle vd., 2002) .

3.2.4. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesi

İzolatlardan EPS saflaştırılması aşamasında mikroorganizmaların 24 saat sonundaki sayılarının belirlenebilmesi için gerekli seyreltmeler yapılmış ve spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Belirlenen absorban değerleri Şekil

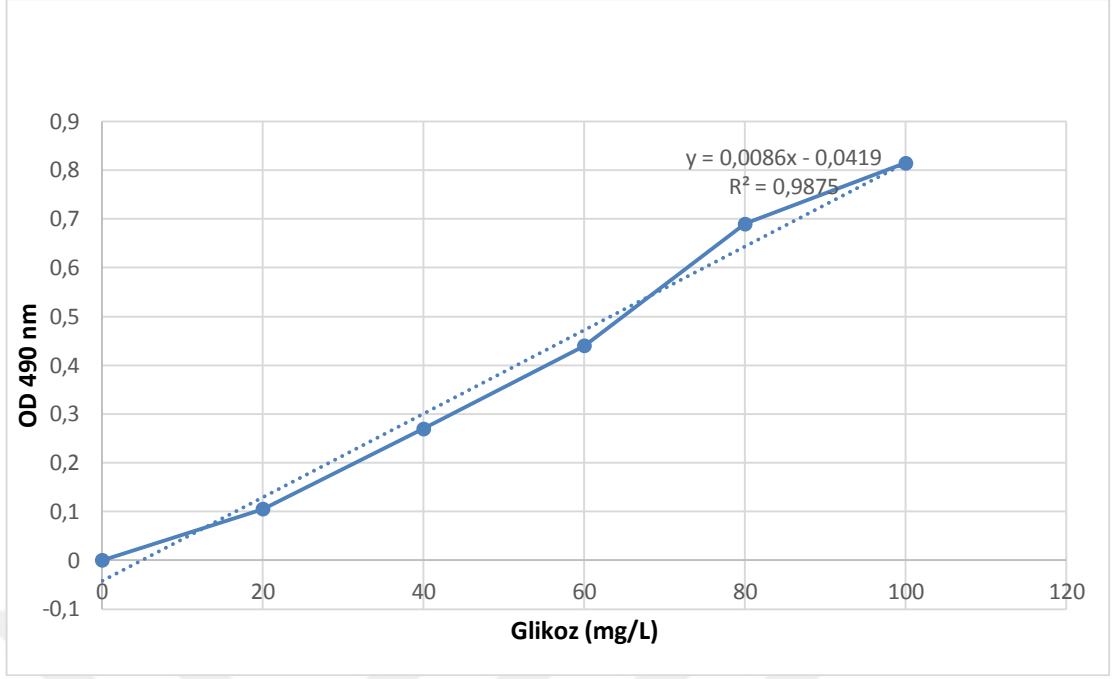
3.1.'de verilen kurve üzerinden hesaplanarak mikroorganizma sayıları log10 cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. OD 600 Standart Kurve

3.2.5. Üretilen EPS miktarlarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi

EPS saflaştırma aşamasından sonra üretilen EPS'lerin miktar analizleri fenol sülfirik asit yöntemine göre yapılmıştır. EPS miktarını belirlemek için ilk olarak glikoz (Merck, Almanya) standart kurvesi hazırlanmıştır. Glikoz standart kurvesi yönteminde ilk olarak 0.1 g glikoz 1 L ultra saf su içerisinde çözündürülmüş ve standart kurve için glikoz konsantrasyonu 0-100 mg/L aralığında olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Glikoz su karışımından 1 ml alınarak tüpe aktarılmıştır. Üzerine % 5'lik fenol çözeltisinden 0.5 mL ilave edilmiş daha sonra 5 mL saf sülfirik asit koyulmuştur. Hazırlanan örnekler 20 dk 30 °C'de inkübasyona bırakılmış ve örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kurve oluşturulduktan sonra, örneklere aynı miktarda fenol ve sülfirik asit koyularak absorbans değerleri belirlenmiştir. Şekil 3.2.'de verilen kurve üzerindeki denklemden EPS miktarları glikoz cinsinden, mg/L olarak hesaplanmıştır (Dubois vd., 1956; Dulekgurgen, 2004).



Şekil 3.2. Glikoz standart eğrisi

3.2.6. Farklı sükröz oranı, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde EPS üretimlerinin belirlenmesi

İki farklı sükröz konsantrasyonunda (20 g/L ve 30 g/L) farklı sıcaklık ve sürelerin EPS üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu aşamada MRS bileşimindeki glikoz yerine 20 ve 30 g/L oranlarında sükröz eklenerek steril edilmiştir. EPS üretiminin yüksek olduğu belirlenen ve morfolojik görüntüleri farklı olan iki izolattan (MG 1 ve MG 12) her bir deneme için hazırlanan besiyerine % 1 oranında eklenerek 30, 37 ve 42 °C’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda etanol çöktürme yöntemiyle üretilmiş oldukları EPS ayrılarak elde edilen EPS’lerin miktarları spektrofotometrik yöntemle belirlenerek en iyi EPS üretim koşulları belirlenmiştir.

3.2.7. Farklı pH değerlerinde EPS üretimlerinin belirlenmesi

Analiz için 4.0, 6.2 ve 7.0 pH değerlerine ayarlanan % 3 oranında sükröz içeren MRS sıvı besiyerine 18 saatlik kültürlerden % 1 oranında aşılama yapılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda EPS üretimi belirlenmiş ve yine spektrofotometrik yöntem ile miktarları mg/L olarak hesaplanmıştır.

3.2.8. Farklı karbon kaynakları kullanımında EPS üretimlerinin belirlenmesi

Mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını kullanma yeteneklerinin belirlenmesi için, modifiye MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. MRS bileşiminde bulunan glikoz yerine % 3 oranında farklı karbon kaynakları (Früktoz, Sükroz, Galaktoz, Riboz, Glikoz, Ramnoz, Laktoz) ilave edilerek 110 °C'de 15 dk sterilize edilmiş besiyeri içerisine % 1 oranında 18 saatlik aktif kültür inoküle edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra etanollü yöntem kullanılarak EPS'ler izole edilmiştir. EPS miktarları spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca kullanmış olduğumuz bu karbon kaynaklarının farklı kombinasyonları (% 1.5 Sükroz ve % 1.5 Glikoz; % 1.5 Sükroz, % 1.5 Glikoz, % 0.5 Galaktoz; % 0.2 Galaktoz, Ramnoz, Laktoz, % 1.5 Sükroz, % 1.5 Glikoz) oluşturularak, EPS miktarlarına şeker kombinasyonlarının etkileri de incelenmiştir.

3.2.9. 16S mikrobiyal tanımlama analizi

Tez çalışması kapsamında en yüksek EPS üreticisi olarak belirlenen ve farklı izolasyon kaynaklarından seçilmiş olan izolatlardan 6 tanesi belirlenerek tanımlamaları yapılmıştır. 16S rDNA dizi analizi tanımlama işlemi BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Bakteri üzerinden tür tayini istenilen örneklerin DNA izolasyonu için, EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra firma tarafından belirlenen prosedürlere göre işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. EPS'lerde protein miktarının belirlenmesi

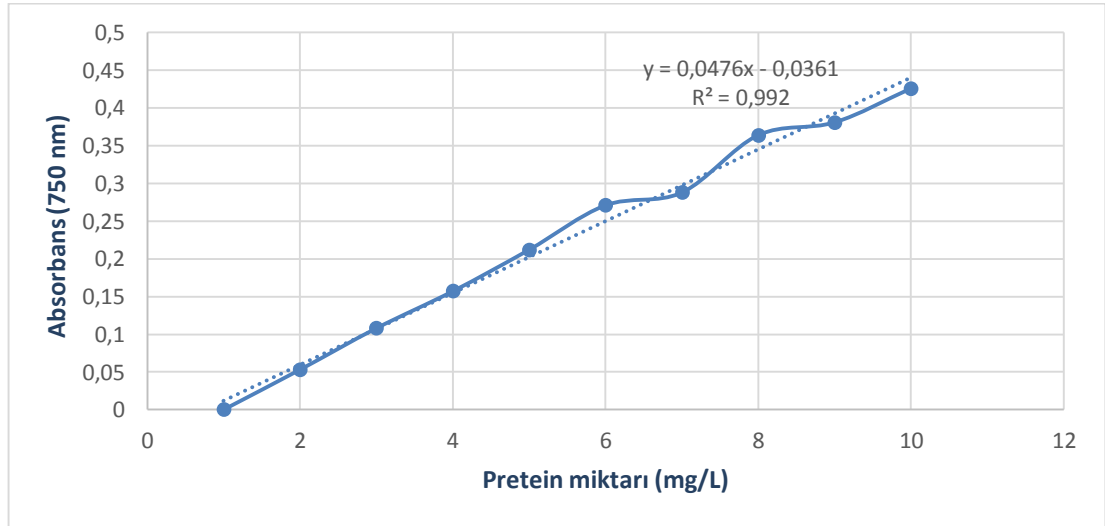
EPS'lerde protein miktarının belirlenmesi amacıyla % 0.2 Galaktoz, Ramnoz ve Laktoz, % 1.5 Sükroz, % 1.5 Glikoz şeker kombinasyonu kullanılarak EPS üretilmiş ve etil alkol yöntemiyle saflaştırılmıştır.

Deneyler kapsamında elde edilmiş EPS'lerde yapısal olarak bulunabilecek olası protein parçacıkları veya bulaşmış olabilecek proteinlerin miktarı Lowry Protein

Tespit yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemde kullanılan reaktifler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Reaktif A: 2 gr sodyum tartarat * 4H₂O, 100 gr Sodyum karbonat, 500 ml 1 N NaOH, 1 lt su içerisinde
- Reaktif B: 2 gr sodyum potasyum tartarat * 4 H₂O, 1 gr Bakır Sülfat (CuSO₄* 5 H₂O), 10 ml NaOH, 90 ml H₂O
- Reaktif C: Folin ciocalteau çözeltisi (1 hacim Folin Ciocalteau: 10 hacim su)

Öncelikle kurve hazırlamak için uygun oranda saf lizozim tartılarak distile su içerisinde çözündürülmüştür. Uygun konsantrasyonlarda seyreltmeler yapılarak 0-0.1 mg/mL arasında kurve hazırlanmıştır. 1 ml örnek üzerine 0.90 ml reaktif A eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 50 °C su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra örnek üzerine 0,1 ml reaktif B eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra hızlıca 3 ml Reaktif C eklenmiştir. 50 °C su banyosunda 10 dk inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Spektrofotometrede 750 nm’de absorbansları belirlenerek miktarlar mg/mL olarak verilmiştir. Protein tayininde kullanılan standart kurve Şekil 3.3.’de gösterilmiştir.

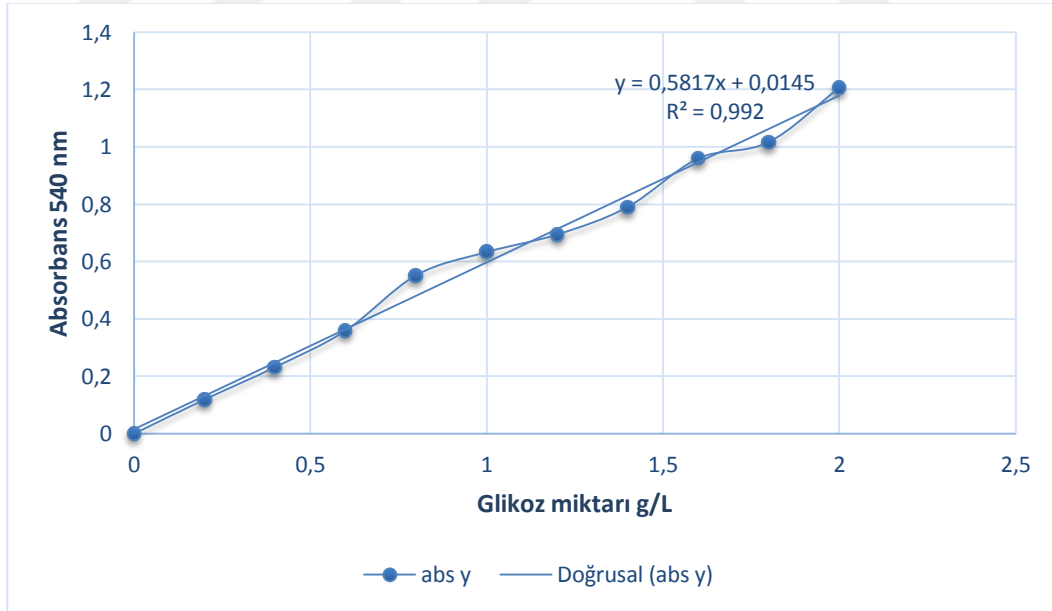


Şekil 3.3. Protein tayini standart kurve

3.2.11. Toplam indirgen şeker analizi

EPS'lerde toplam indirgen şeker analizi için % 0.2 oranlarında galaktoz, ramnoz ve laktoz, % 1.5 oranında sükröz ve % 1.5 oranında glikoz şeker kombinasyonu kullanılarak EPS üretilmiş ve etil alkol yöntemiyle saflaştırılmıştır.

EPS örneklerinde indirgen şeker analizi, 3.5-Dinitrosalisilik asit (DNS) kullanılarak, Miller yöntemi değiştirilerek yapılmıştır. Örnekler gerekli oranlarda seyreltildikten sonra tüplere 1 ml aktarılmış ve üzerine 2 mL DNS çözeltisi eklenip, kaynar su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. İşlem sonunda oluşan sarı kahverengi rengin stabilizasyonunu sağlamak amacıyla 1 mL Rachelle tuzu ilave edilmiştir. Ortam sıcaklığına gelen tüplerin üzerine 5 mL damıtık su ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Örneklerin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Tüm uygulamalarda şahit olarak damıtık su kullanılarak hazırlanmıştır. Toplam şeker miktarlarının hesaplamaları 0.0-2.0 g/L aralığında hazırlanan standart kurve üzerinden yapılmıştır (Şekil 3.4.) (Tokatlı, 2013).



Şekil 3.4. İndirgen şeker analizi standart eğrisi

3.2.12. EPS'lerin şeker profilinin HPLC ile belirlenmesi

Örneklerin hazırlanması

İlk olarak, EPS'ler, % 0.2 galaktoz, ramnoz ve laktoz % 1.5 sükroz, % 1.5 glikoz şeker kombinasyonu kullanılarak üretilmiş ve izole edilmiştir. Sonrasında EPS örneği içeren tüplere 1,8 mL 2 M Trifloraasetik asit (TFA) ilave edilerek 121 °C'de 2 saat ısıtılmıştır. Daha sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve 24 saat -18 °C'de bekletilmiştir. Örneklerdeki TFA'nın uzaklaştırılması işlemi liyofilizatör cihazı (Virtis K2, ABD) kullanılarak yapılmış ve kurumuş örneğin üzerine 1,5 ml deiyonize su ilave edilerek filtre edilmiş, örnekler HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir (Manns vd., 2014).

HPLC analizi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından Türk Standardı TS 13359 Bal Fruktoz, Glikoz, Sakaroz, Turanoz ve Maltoz Muhtevası Tayini-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Metodu ile hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Mobil faz olarak metanol:su (80:20) kullanılmıştır. Kullanılan C18 kolonunun sıcaklığı 30 °C akış hızı 1.0 ml/dk olarak ayarlanmıştır.

3.2.13. EPS'lerin taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmesi

% 0.2 galaktoz, ramnoz ve laktoz % 1.5 sükroz, % 1.5 glikoz şeker kombinasyonu kullanılarak üretilen ve saflaştırılan EPS örnekleri analiz gününe kadar saklanmak amacıyla liyofilize edilmiştir. EPS'lerin SEM'de görüntülenmesi Süleyman Demirel Üniversitesi YETEM (Enerji Teknolojileri Araştırma Birimi)'nde bulunan QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

Yapılan analizlerdeki, istatistiksel analizler ve gruplar arasındaki farklılıklar Minitab17 uygulamasında tek yönlü varyans analizi (0.05) ve TUKEY testi sonucu guruplandırma yapılarak belirlenmiştir.

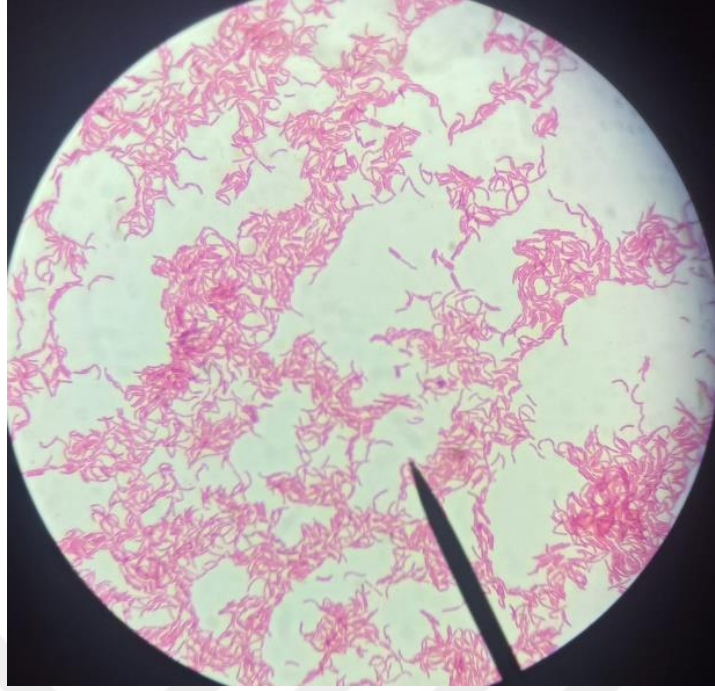
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Genel Karakterizasyonu

Ekzopolisakkarit üreticisi laktik asit bakterisi suşlarının izolasyonu amacıyla 28 adet materyal kullanılmış ve MRS agarda farklı morfolojik görüntüye sahip 84 adet koloni seçilmiştir. seçilen koloniler yine aynı besiyerinde çizim yapılarak 30 °C’de 18 saat geliştirilmiş ve saflık kontrolleri yapılmıştır. Saflaştırılan ve muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatlar, -18 °C’de %20 (v/v) steril gliserol içeren MRS sıvı besiyeri içerisinde muhafaza edilmiştir. Farklı bağırsak ortamlarından (inek ve keçi bağırsağı) 23, inek işkembesinden 8, doğal sirkelerden 3, doğal turşu örneklerinden 11, çiğ süttten 4, çeşitli bitki örneklerinden 16, farklı peynir çeşitlerinden 17, fermente sucuktan 2 adet izolat elde edilmiştir.

LAB’nin ön tanısında temel morfolojik özelliklerinin yanı sıra, farklı sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişim gibi kültürel özellikleri ile Gram reaksiyonu ve katalaz testi gibi biyokimyasal özellikler de kullanılmaktadır (Lyhs, 2002). İlk aşamada MRS agarda gelişim göstermiş olan izolatlar muhtemel LAB olarak kabul edilmişlerdir.

Ardından muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatlara, Gram boyama, katalaz testi, farklı sıcaklıklarda (10-45 °C) gelişim, pH 9.6’da ve % 6.5 tuz konsantrasyonunda gelişim testleri uygulanmıştır. İzolatlara ilk olarak MRS agar üzerinde katalaz testi yapılmış ve izolatların hepsinin katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir. İzolatların morfolojik görüntülerinin belirlenmesi için Gram boyama yapılarak ışık mikroskopu altında incelenmiştir. İnceleme sonucunda 61 izolatın laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiş kalan 23 izolatın ise morfolojik yapılarının birbirlerine çok benzemeleri veya izolasyon kaynaklarının aynı olmasından dolayı çalışmanın devamında yer almamışlardır. Şekil 4.1’de Gram (+) MG 12 numaralı kültür verilmiştir.



Şekil 4.1. MG 12 numaralı kültürün boyama sonrası ışık mikroskopundaki görüntüsü

İzolatların yüksek pH derecelerindeki gelişme durumlarının belirlenmesi ve cins düzeyinde tanımlanabilmesi amacıyla pH 9.6'ya ayarlanmış MRS sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat sonunda gelişimleri gözlemlenmiştir. Sonrasında % 6.5 tuz konsantrasyonunda gelişme ile 10 ve 45 °C'de gelişme testleri uygulanmıştır. Morfolojik görüntüleri ve pH 9.6'da gelişim testinin sonuçlarına göre 10 adet izolatın *Enterococcus* cinsine ait olduğu düşünülmüştür. % 6.5 tuz konsantrasyonunda ve 10-45 °C'de gelişim testlerinde tüplerin bulanıklık durumuna göre pozitif veya negatif olarak değerlendirmeler yapılmıştır. Uygulanan kültürel testlerin sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yapılan ön tanımlamalar sonucunda elde edilen 61 izolata ait sonuçlar

İzolat Numarası	İzole edildiği Ortam	Katalaz	pH 9.6'da Gelişim	% 6,5 NaCl'de Gelişim	10 °C' de Gelişim	45 °C'de Gelişim
MG 1	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 2	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 3	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 4	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 5	İnek Bağırsağı	-	-	+	-	+
MG 6	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 7	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+

Çizelge 4.1. Yapılan ön tanımlamalar sonucunda elde edilen 61 izolata ait sonuçlar (devamı)

MG 9	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 10	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 11	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 12	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 13	Keçi Bağırsağı	-	-	-	-	+
MG 14	Keçi Bağırsağı	-	+	+	+	+
MG 15	Keçi Bağırsağı	-	+	+	+	+
MG 17	Keçi Bağırsağı	-	+	-	+	+
MG 18	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 19	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 21	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 22	İnek Bağırsağı	-	+	+	+	+
MG 23	İnek Bağırsağı	-	-	+	+	+
MG 26	İnek Kalın Bağırsak	-	-	-	-	-
MG 27	İnek Kalın Bağırsak	-	-	+	+	-
MG 28	İnek Kalın Bağırsak	-	+	+	+	+
MG 31	İnek Kalın Bağırsak	-	-	+	+	+
MG 32	İnek Kalın Bağırsak	-	-	+	+	+
MG 33	Sirke Isparta 1	-	-	+	+	+
MG 34	Taze Fasülye Çiçeği	-	-	+	+	+
MG 35	Taze Fasülye Çiçeği	-	-	+	+	+
MG 36	Sucuk	-	-	-	+	+
MG 40	Keçi Peyniri 1. Numune	-	-	+	+	+
MG 41	Keçi Peyniri 2. Numune	-	+	-	+	+
MG 42	Keçi Peyniri 2. Numune	-	+	-	+	+
MG 46	İnek Peyniri 2. Numune	-	+	+	+	+
MG 48	İnek Peyniri 2. Numune	-	+	+	+	+
MG 49	İnek Peyniri 2. Numune	-	-	+	+	+
MG 54	Zeytin	-	-	+	+	-
MG 56	Kapari(Capparis spinosa)	-	-	+	+	-
MG 57	Kapari(Capparis spinosa)	-	-	+	+	+
MG 58	Kapari(Capparis spinosa)	-	-	+	+	-
MG 61	Sirke 2. Numune	-	-	+	+	+
MG 63	Hanımeli (Lonicera)	-	-	+	+	+
MG 65	Salatalık Turşusu	-	-	+	+	+
MG 66	Lahana Turşusu	-	-	+	+	+
MG 67	Lahana Turşusu	-	-	+	+	-
MG 68	Salatalık Turşusu	-	-	+	+	+
MG 69	Salatalık Turşusu	-	-	+	+	+

Çizelge 4.1. Yapılan ön tanımlamalar sonucunda elde edilen 61 izolata ait sonuçlar (devamı)

MG 70	Salatalık Turşusu	-	-	+	+	+
MG 71	Salatalık Turşusu	-	-	+	+	+
MG 72	Salatalık Turşusu	-	-	-	+	-
MG 73	Karışık Turşu	-	-	+	+	+
MG 74	Karışık Turşu	-	-	+	+	-
MG 75	Karışık Turşu	-	-	+	+	+
MG 76	Lor Peyniri	-	-	+	+	+
MG 77	Lor Peyniri	-	-	+	+	-
MG 78	Çiğ Süt	-	+	+		
MG 79	Çiğ Süt	-	-	-	+	-
MG 80	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
MG 81	İnek Peyniri	-	-	+	+	+
MG 82	İnek Peyniri	-	-	-	-	-
MG 83	İnek Peyniri	-	-	-	-	-
MG 84	Çiğ Süt	-	-	+	-	+

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin EPS Üretimlerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında elde edilen izolatların ürettiği EPS'lerin saflaştırılması iki farklı yöntem ile denenmiştir. Yapılan denemelerde bu iki yöntem aracılığıyla aynı kültürden geri kazanılan EPS'lerin miktarları karşılaştırılmıştır. Beş farklı kültür ile yapılan ilk denemelerde her iki yöntem ile EPS izolasyonu sağlanmış ve sonrasında spektrofotometrik yöntemle EPS üretim miktarları (mg/L) tespit edilmiştir. Çalışmada her iki yöntemde de besiyeri bileşenleri ve çevre koşulları gibi faktörler sabit tutularak sadece EPS saflaştırma yöntemi değiştirilmiştir. Çizelge 4.2'de her iki yöntem ile yapılan analiz sonucunda elde edilen EPS miktarları (mg/L) karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2. Kültürlerin EPS Üretim Miktarları

İzolat no	(TCA) EPS miktarı(mg/L)	(Etanol) EPS miktarı (mg/L)
MG 2	251.14	598.81
MG 6	228.12	628.12
MG 7	223.00	544.86
MG 12	326.72	590.67
MG 67	182.30	444.16

Geri kazanılan EPS miktarları, TCA ile yapılan yöntemde 182.30 mg/L ile 326.72 mg/L arasında değişiklik gösterirken, etanol ile yapılan yöntemde 444.16 mg/L ile 628.12 arasında olduğu saptanmıştır. Ön çalışma yapılan 5 farklı kültürde, etanol presipitasyonu ile yapılan analizde, TCA ile yapılan analize kıyasla geri kazanılan EPS miktarlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin yararlı bazı etkilerinin belirlenmiş olması, gıdaların tekstürel ve duyuşal özelliklerini iyileştirmeleri vb. etkilerinden dolayı üretimleri ve saflaştırılmaları önem arz etmektedir. LAB'nin gıdalarda ve insan sindirim sisteminde yaptıkları olumlu etkilerin büyük bir çoğunluğu ürettikleri çeşitli metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu açıdan bakıldığında EPS üreticisi olan laktik asit bakterilerinin gıdalarda kullanımı günümüzde biraz daha önem kazanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada laktik asit bakterilerinden EPS üretimi yapmak ve en iyi üretim koşullarını belirlemek için testler yapılmış, belirlenen en iyi üretim koşulları uygulanarak kültürlerin EPS üretimleri artırılmıştır. Etanol çöktürme yöntemi ile daha iyi EPS kazanımı sağlandığı belirlenmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarında ve diğer izolatların EPS üretimlerinin belirlenmesinde bu yöntem ile devam edilmiştir.

Kültürlerin üretmiş oldukları EPS miktarının belirlenmesi amacıyla fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla kültürler sükrozca (%3) zenginleştirilmiş MRS besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.2.). Gelişme sonrasında fenol-sülfürik asit yöntemine göre örnekler hazırlamıştır. Yönteme uygun olarak örneklerin spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. İzolatların EPS üretim miktarları ve kültür içerisinde bulunan mikroorganizma sayıları belirlenerek Çizelge 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Kültürlerin MRS sıvı besiyerinde EPS üretimi

Çizelge 4.3. İzolatların EPS üretim Miktarları (mg/L) ve OD değerine karşılık mikroorganizma sayısı (Log10)

İzolat No	M.org sayısı (Log10)	EPS Üretimi (mg/L)	İzolat No	M.org sayısı (Log10)	EPS Üretimi (mg/L)
MG 1	8.08	880.42±7.98	MG 46	5.90	279.72±8.16
MG 2	8.53	277.40±1.33	MG 48	7.46	298.09±7.98
MG 3	9.06	282.74±1.52	MG 49	8.75	193.67±4.75
MG 4	8.54	817.86±20.32	MG 54	8.78	215.77±4.94
MG 5	8.81	314.14±1.33	MG 56	7.46	247.63±3.23
MG 6	8.61	239.26±0.57	MG 57	8.80	318.33±11.96
MG 7	8.73	356.47±1.33	MG 58	5.90	162.28±3.04
MG 9	8.81	264.14±0.76	MG 61	8.17	454.60±9.68
MG 10	8.73	359.26±0.19	MG 63	8.57	199.49±2.66
MG 11	8.74	318.56±0.0	MG 65	8.88	279.95±6.84
MG 12	7.80	579.95±1.14	MG 66	8.75	226.00±5.70
MG 13	7.85	296.93±0.95	MG 68	7.46	298.56±45.57
MG 14	8.74	322.28±0.76	MG 69	8.95	232.98±5.322
MG 15	8.63	314.60±0.19	MG 70	8.84	191.35±3.61
MG 17	8.66	322.28±0.76	MG 71	8.88	207.16±5.13
MG 18	7.34	235.07±0.95	MG 72	7.80	271.35±7.03
MG 19	8.64	371.12±0.38	MG 73	7.55	228.56±5.13
MG 21	8.32	716.47±0.57	MG 74	7.93	312.74±8.16
MG 22	7.46	672.05±1.14	MG 75	7.46	298.79±2.85
MG 23	8.82	363.67±0.38	MG 76	8.67	209.26±3.42
MG 26	8.84	817.16±4.18	MG 77	7.46	261.58±8.16
MG27	8.86	360.88±0.38	MG 78	5.90	593.91±5.70
MG 28	8.70	631.58±1.90	MG 79	8.49	437.40±1.33
MG 32	8.71	443.44±0.57	MG 80	7.63	656.70±2.28
MG 33	8.85	449.95±0.95	MG 81	7.75	445.07±0.76
MG 36	5.90	820.19±1.71	MG 82	8.43	563.21±0.76
MG 41	6.89	247.40±6.08	MG 83	8.46	522.28±1.14
MG 42	8.81	183.91±5.13	MG 84	8.38	426.93±1.90

Laktik asit bakterilerinin üretmiş oldukları EPS'ler fermente gıdaların dokusuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin ticari kıvam artırıcılara yeni bir alternatif olabilme potansiyeline sahip olduklarını düşündürmektedir (Nachtigall vd., 2020). Bu çalışmada izolatların 162.28 mg/L ile 880.42 mg/L arasında EPS ürettiği belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimin inek bağırsak ortamından izole edilen MG 1 numaralı izolatta, en düşük üretimin ise *Capparis spinosa*'dan (Kapari) izole edilen MG 58 numaralı izolatta olduğu görülmüştür. Sucuktan izole edilen MG 36, MG 1 izolatına yakın miktarda EPS ürettiği ve EPS üretiminin 820.19 mg/L olduğu belirlenmiştir.

İspirli (2016), yaptığı tez çalışmasında tulum peyniri örneklerinden izole edilen LAB türlerinin EPS üretimlerini incelemiştir. İzolatların $1694.615 \mu\text{g}/10^7$ kob ile $1858.462 \mu\text{g}/10^7$ kob arasında değişen miktarlarda EPS ürettiklerini belirlemiştir. Yaptığı çalışma sonucunda, türlerin farklı besiyeri ortamlarında EPS üretim kabiliyetlerinin farklı olduğunu bildirmiştir. Demir vd., (2017) çalışmalarında 40 farklı yoğurt örneğinden izole ettikleri 55 laktik asit bakterisinin EPS üretimini belirlemiştir. Bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının 5.89 mg/L ve 134.60 mg/L arasında olduğunu saptamışlardır. Salazar vd., (2009) insanların bağırsak mikrobiyotasından izole ettikleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının EPS üretimlerini ve EPS üreten suşların sütteki metabolizmasını inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Toplamda 21 adet EPS üreticisi *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşunun en yüksek EPS üretim miktarının 51.4 mg/100 mL olduğunu belirtmişlerdir. Adebayo-tayo ve Onilude, (2008) yaptıkları çalışmada çeşitli gıdalardan ve fermente süt ürünlerinden 115 adet laktik asit bakterisi izole ederek bu bakterilerden 103 tanesinin EPS üretim aktivitelerini incelemiştir. İzole ettikleri bakteri suşlarının farklı oranlarda aktif olarak EPS ürettiğini belirlemiştir. Çalışma sonucunda izolatların ürettiği EPS miktarlarının 01.00-196.0 mg/L aralığında değiştiğini belirlemiştir. Enkhtur, (2021) tez çalışmasında fermente gıdalardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinden EPS izole ederek, EPS'lerin karakterizasyonu ve reolojik özelliklerini belirlemiştir. Çalışma sonucunda izole ettikleri laktik asit bakterilerinin EPS üretim miktarlarının 120-310 mg/L arasında olduğunu saptamıştır.

Bu çalışmada elde edilen EPS miktarları diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, EPS üretim miktarları bakımından laktik asit bakterilerinin geniş bir yelpaze oluşturduğu ve suşa bağlı olarak çok farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Analizlerde elde edilen sonuçlara göre bazı kültürlerin EPS üretim miktarının yapılan diğer çalışmalardaki EPS miktarlarına yakın olduğu, bazılarının ise daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

4.3. Farklı Stres Koşullarının EPS Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

EPS üretiminin suşa bağlı olduğu ve kültür ortamının bileşimi, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi vb. üreme koşullarından etkilendiği belirtilmektedir (Torino vd., 2015). Bundan dolayı EPS üretimi üzerindeki kültür koşullarının, sıcaklık, pH, besiyeri bileşimi gibi koşulların incelenmesi üretimi optimize edebilmek için büyük önem arz etmektedir (Dueñas vd., 2003). Çalışma kapsamında bu amaçla yapılan denemelerde pH, sıcaklık, inkübasyon süresinin EPS üretiminde etkili oldukları doğrulanmıştır. Analizlerde yüksek EPS miktarı belirlenen, farklı kaynaklardan izole edilen ve morfolojik görüntüleri farklı olan kültürler ile analizlere devam edilmiştir.

4.3.1. Sıcaklık ve inkübasyon süresinin EPS üretimine etkisi

Yapılan ön denemelerde en yüksek EPS üretim yeteneğine sahip oldukları belirlenen MG 12 ve MG 1 numaralı kültürlerde EPS üretiminin optimize edilmesine çalışılmıştır. Kültürlerin farklı konsantrasyonlardaki sükröz oranlarında (% 2 ve % 3), farklı sıcaklıklarda (30, 37 ve 42 °C) ve farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) EPS üretimleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.4’de iki farklı sükröz oranında denemeleri yapılan inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı sükröz konsantrasyonlarına (%2 ve %3) uygulanan farklı üretim koşulları

Değişen faktörler		Üretim Koşulları	
Sıcaklık (°C)	30	37	42
Süre (saat)	24	48	72

Bu iki izolat ile yapılan ön denemeler sonucunda bakterilerin 37 °C ve 30 g/L sükröz içeriğinde en çok EPS ürettiği gözlemlenmiş ve bundan sonraki aşamalarda çalışmalara bu koşullar dikkate alınarak devam edilmiştir. MG 1 numaralı izolat % 3 sükröz içeren besiyerinde 37 °C’de 24 saat sonunda 815.14 mg/L EPS üretmiştir. MG 12 numaralı izolatın ise 37 °C’de 24 saat sonunda 805.20 mg/L EPS ürettiği saptanmıştır. MG 1 izolatının en düşük EPS üretiminin (338.09 mg/L) 20 g/L sükrözle 30 °C’de 72 saat inkübasyon sonrasında, MG 12 izolatının ise en düşük EPS üretiminin (290.9 mg/L) 20 g/L sükrözle 30 °C’de 24 saatlik üreme sonunda olduğu gözlemlenmiştir.

Aslım vd., (2005) yaptıkları çalışmada MRS ve M17 besiyerinde *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* için farklı büyüme koşullarının (sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi) kültür gelişimi ve EPS üretimleri üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Sıcaklığın EPS üretimine etkisinin belirlenmesi aşamasında dört farklı sıcaklık (30, 37, 42 ve 45 °C) test etmişlerdir. Tüm suşlarda EPS üretimi ile kültür gelişme sıcaklığı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gözlemledikleri çalışmalarında tüm suşlarda en fazla EPS üretiminin 45 °C’ de olduğunu, en fazla EPS üreten suşun ise *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus* B3 (263 mg/L) olduğunu belirlemişlerdir. Fessard ve Remize, (2019) çalışmasında, tropikal ortamda yetiştirilen meyve ve sebzelerden izole edilen LAB kullanarak sıcaklığın EPS üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. *L. pseudomesenteroides*, *Leuconostoc lactis* ve *Weissella cibaria* 30 °C’de EPS üretebilmiş ancak 37 °C’de EPS üretimi olmadığını belirlemişlerdir. *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları 5 ile 48 saat inkübasyona bırakılarak inkübasyon süresinin etkisini araştırdıklarında en fazla üretimin 18 saat sonunda elde edildiğini belirlemişlerdir. 24 saat sonunda EPS üretiminde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Mıdık vd., (2020) çalışmasında, farklı kültür koşullarının (sıcaklık, inkübasyon süresi ve pH vb.) EPS üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Fermente edilen turşulardan elde ettikleri suşlarda maksimum EPS üretimini 30 °C’de belirlemişlerdir ve test edilen suşların çoğu için karbon kaynağı olarak glikoz kullanmışlardır. *L. plantarum* suşunun 30 °C’de 48 saat sonunda en fazla EPS miktarını (515.48 mg/L) ürettiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada LAB suşlarının 30 ve 37 °C’de EPS üretimleri karşılaştırılmış ve analizler sonucunda 37 °C’de daha yüksek EPS miktarı tespit edilmiştir (Dertli vd., 2016a). Pingitore vd., (2016) *Lactobacillus plantarum* suşunun EPS üretimine sıcaklığın etkisini araştırmış

ve araştırma sonucunda büyüme hızı ile EPS üretimi arasında ters bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Analizlerde 30 °C'de 37 °C'ye göre daha fazla büyüme gözlemlenirken, EPS üretiminin 30 °C'de yüksek (133.23 mg/L) 37 °C'de ise daha düşük (13.18 mg/L) olduğunu belirlemişlerdir. Bennama vd., (2012) çalışmalarında, *Streptococcus thermophilus*'un EPS üretimini analiz etmişler ve çalışma sonucunda 37 °C'de 16 saat sonunda 58.9 mg/L, 42 °C'de 6 saat sonunda 48.3 mg/L EPS üretimi olduğunu saptamışlardır. 42 °C'de 12 saat sonunda 36.9 mg/L EPS miktarı belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda optimum koşulların 37 °C'de 16 saat olduğunu gözlemlemişler ve termofilik bakterilerde EPS üretiminin genellikle büyüme ile ilişkili olduğu kanısına varmışlardır. Yapılan bir çalışmada EPS üreten *Bifidobacterium* suşlarının en iyi gelişme koşullarını belirlemişlerdir. Sıcaklığın EPS üretimi üzerine etkilerini inceledikleri analizlerinde 25, 30, 37 ve 42 °C'de 48 saat sonunda EPS miktarlarını belirlemişlerdir. Analizler sonucunda her iki *Bifidobacterium* suşu da en yüksek EPS üretimini *Bifidobacterium* spp. için optimal gelişme sıcaklığı olarak kabul edilen 37 °C'de göstermiştir. 37 °C'de 24 saat sonunda *B. infantis* ve *B. longum* subsp. *infantis* suşları sırası ile 237 ve 364 mg/L EPS üretmişlerdir. 25 °C'de EPS üretimi gözlemlenmezken, 42 °C'de 37 °C'ye göre daha düşük EPS üretimi gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda bakterilerin optimal gelişme sıcaklıklarına yaklaştıkça daha yüksek EPS üretimi olduğu kanısına varmışlardır (Prasanna vd., 2012). Abid vd., (2018) çalışmalarında fermente gıdalardan EPS üreten dört farklı LAB suşu izole etmiş ve suşların probiyotik potansiyelleri, EPS üretimleri ve EPS'lerinin yapısal karakterizasyonunu test etmişlerdir. EPS üretimlerinin, büyüme ile ilişkili olduğunu belirledikleri çalışmalarında 30 saatlik inkübasyon sonunda maksimum EPS üretim miktarlarının 2900 ile 3850 mg/L arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Uzun süreli inkübasyon sonrasında EPS'lerin enzimler tarafından parçalamalarından dolayı EPS miktarının azaldığını düşünmüşlerdir. Bundan dolayı EPS'nin optimum koşullarda üretimleri sonrasında uygun sürede yapılan izolasyonunun verimi artıracığını bildirmişlerdir.

Yapılmış çalışmaların incelenmesi sonucunda her bakteri için farklı sıcaklıklarda optimum EPS üretim miktarı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada analizler sonucunda izolatlarda en yüksek EPS üretiminin 37 °C'de gerçekleşmiş olmasının kültürlerimizin genellikle 37 °C'de optimum gelişme göstermesinden ve izole edildiği ortamdan kaynaklandığı kanısına varılmıştır. EPS'lerde inkübasyon süresi arttıkça, enzimatik

reaksiyonlardan dolayı parçalanmalarının olduğu ve bundan dolayı EPS miktarında bir azalma olduğu düşünülmektedir.

Yapılan araştırmalarda ortamdaki sükroz varlığının EPS üretimini arttırdığı, sükroz miktarı arttıkça EPS miktarının yükseldiği gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, ortamda % 5 sükroz varlığında daha fazla EPS üretimi olduğunu belirlemişlerdir (Loeffler vd., 2020; Palomba vd., 2012; Van Gell-Schutten vd., 1998). Tez kapsamında yapılan denemelerde sükroz konsantrasyonu arttıkça EPS miktarında artış olduğu gözlemlenmiş ve daha sonra yapılan analizlerde % 3 oranında sükroz kullanılmıştır.

4.3.2. Farklı pH değerlerinde EPS üretiminin belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında EPS üretimine pH etkileri kıyaslanmış ve aktif kültürler sükroz içeren MRS sıvı besiyerinin pH'ları 4.0, 6.2 ve 7.0'ye ayarlandıktan sonra % 1 oranında inoküle edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, izole edilen EPS'lerin absorbans değerleri spektrofotometrede belirlenerek miktarları hesaplanmıştır. Seçilen kültürlerin EPS üretim miktarları Çizelge 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Kültürlerin farklı pH'larda EPS üretimi

İzolat No	EPS miktarı (mg/L)		
	pH 4.0	pH 6.2	pH 7.0
MG 1	429.72 ± 1.86 ^{Cc}	871.35 ± 1.63 ^{Aa}	538.33 ± 2.56 ^{Bb}
MG 12	536.93 ± 3.02 ^{Bb}	603.21 ± 1.86 ^{Da}	382.98 ± 3.49 ^{Fc}
MG 17	378.33 ± 2.56 ^{Fc}	621.35 ± 5.12 ^{Ca}	582.98 ± 3.02 ^{Ab}
MG 22	546.93 ± 3.72 ^{Aa}	509.02 ± 2.09 ^{Fb}	409.02 ± 2.09 ^{Dc}
MG26	418.56 ± 1.86 ^{Dc}	817.40 ± 2.56 ^{Ba}	430.42 ± 1.63 ^{Cb}
MG 33	401.35 ± 2.33 ^{Eb}	448.56 ± 1.16 ^{Ga}	392.05 ± 1.40 ^{Ec}
MG 36	422.51 ± 0.70 ^{Dc}	813.44 ± 0.93 ^{Ba}	582.51 ± 3.49 ^{Ab}
MG 82	542.51 ± 3.02 ^{A^{Bb}}	562.28 ± 0.93 ^{Ea}	282.28 ± 0.93 ^{Gc}

*Aynı satırda farklı harflerle (a-c) gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

*Aynı sütunda farklı harflerle (A-F) gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

Suşların EPS üretim miktarlarının pH ile değiştiği gözlemlenmektedir. Bu değişkenliğin sebebinin; suşların izolasyon kaynakları veya ortama adaptasyon yeteneklerindeki arasındaki farklılık olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde kültürlerin ağırlıklı olarak pH 6.2'de yüksek EPS ürettiği görülmüştür

($p < 0.05$). Diğer kültürlerden farklı olarak MG 22 numaralı kültürde pH 4.0'de en yüksek EPS üretimi (546.93 mg/L) olduğu saptanmıştır. En yüksek EPS üretimi bağırsaktan izole edilen MG 1 numaralı kültürde (871.35 mg/L) pH 6.2'de belirlenmiştir. MG1, MG 33 ve MG 36 kodlu suşlar *Lactiplantibacillus plantarum* olmasına rağmen izolasyon kaynakları farklıdır. Özellikle MG 33 kodlu suşun sirkeden izole edildiği göz önüne alındığında hızlı bir adaptasyon yeteneğine sahip olduğu düşünülmüştür. Suşların genel olarak pH4.0'dan pH 6.2'ye geçince EPS üretimlerinin arttığı görülmüş, bunun stres faktörü oluştuğunda suşların kendini koruma amacıyla üretmiş olabilecekleri düşünülmüştür.

Mıdık vd., (2020) yaptıkları çalışmalarında EPS üretimi üzerine pH faktörünü incelemişlerdir. Çalışmalarında 5.0, 6.0 ve 7.0 pH'da denemeler yapmışlardır. pH 5.0 ve pH 7.0 de EPS veriminde önemli ölçüde düşüş olduğunu ve en fazla EPS üretiminin normal MRS pH'sına en yakın olan pH 6.0'da gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda pH ile EPS konsantrasyonu arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Wang vd., (2017) yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus plantarum* KX041'den izole ettikleri EPS'nin optimizasyonunu, karakterizasyonunu ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda optimum EPS üretiminin (599.52) fermantasyon sıcaklığının 35 °C, başlangıç pH'sının 6.38, soya fasülyesi peptonunun 20 g/L olduğu koşullarda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Zhang vd., (2011) çalışmasında *S. thermophilus* ST1 tarafından üretilen EPS miktarının pH 6.5'da maksimum olduğunu ve EPS miktarını 45.10 mg/L olarak belirlemişlerdir. Çalışmalarında pH 5.0, 6.0 ve 7.0'de daha az miktarda EPS ürettiğini, en uygun pH'nın 6.5 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR tarafından EPS üretimi için optimum kültür koşulları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda EPS üretimi için optimum sıcaklıkların 36-39 °C ve pH koşullarının 4.5-5.5 olduğunu belirlemişlerdir (Harutoshi, 2013).

Mikroorganizmaların gelişmesi ve dolayısı ile EPS biyosentezi çok düşük (pH 2.0-3.0) ve çok yüksek ($pH \geq 10$) pH değerlerinde engellenmektedir. Genel olarak, pH 5.5-6.5 değerleri, *Lactobacillus* türleride EPS üretimi için optimal olduğu rapor edilmiştir (Czaczyk ve Myszka, 2007). Tez kapsamında EPS üretiminde optimum pH değerlerinin belirlenebilmesi için yapılan analizler sonucunda kültürlerimizde genellikle pH 6.2'de en iyi EPS üretimi ve en yüksek EPS miktarı gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Kültürlerde genel olarak pH 6.2'de en yüksek EPS miktarının elde edilmesi, MRS besiyerinin pH'sının 6.2'ye yakın olmasından kaynaklandığı ve bundan dolayı kültürlerin optimum gelişme aralığında EPS verimlerinin yüksek olduğu kanısına varılmıştır.

4.4. Farklı Karbon Kaynaklarında EPS Üretimi

Farklı şeker kaynaklarında EPS miktarlarında farklılık görülmektedir. EPS üretimi için şekerler üretimin ana bileşenlerinden biridir (Padmanabhan vd., 2018). EPS'nin mikrobiyal üretimi, büyüme ortamındaki karbon ve nitrojen kaynaklarının mevcut olmasına bağlıdır (Loeffler vd., 2020). Bazen tek bir suş birden fazla polisakkarit sentezleyebilmektedir. Suşlar tarafından üretilen EPS yapısının kullanılan karbon kaynağına bağlı olduğu bulunmuştur (Polak-Berecka vd., 2015). Bundan dolayı EPS'nin karakterizasyonunda, optimizasyonunda karbon kaynakları büyük önem taşımaktadır.

Kültürlerin farklı şekerlerde EPS üretim miktarlarının belirlenebilmesi için MRS bileşiminde bulunan glikoz yerine % 3 oranında sükroz, galaktoz, fruktoz, riboz, laktoz, glikoz ve ramnoz şekerleri eklenmiştir. Ayrıca EPS üretimini artırmak için farklı oranlarda şekerler birleştirilerek kombinasyonlar yapılmış ve kültürlerin bu şeker kombinasyonlarında da EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Analizler sonunda elde edilen farklı karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları mg/L olarak Çizelge 4.6'de verilmiştir.

Tez kapsamında yapılan analizler sonucunda, MG 1 (1051.35 mg/L), MG 17 (1055.53 mg/L), MG 26 (974.84 mg/L), MG 33 (968.08 mg/L) ve MG 82 (669.26 mg/L) numaralı kültürlerin ramnoz varlığında MG 12 (854.37 mg/L) ve MG 22 (1077.63 mg/L) numaralı kültürlerin laktoz varlığında ve MG 36 (1012.51 mg/L) kültürün ŞK 2 (% 1.5 glikoz, % 1.5 sükroz, % 0.5 galaktoz) kombinasyonunda en yüksek EPS ürettiği belirlenmiştir (p<0.05). Analizlerde, şeker kombinasyonlarında MG 36 numaralı kültür dışında EPS miktarlarının beklenildiği kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı Karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları (mg/L)

İzolot no	Sükroz	Glikoz	Fruktoz	Galaktoz	Riboz	Ramnoz	Laktoz	ŞK 1	ŞK2	ŞK 3
MG 1	843.12±3.71 ^{Ba}	356.47±0.23 ^{Ic}	366.70±3.49 ^{Hc}	360.19±0.23 ^{Hh}	398.79±0.23 ^{Gh}	1051.35±2.09^{Aa}	606.93±3.26 ^{Ec}	558.33±2.56 ^{Fc}	665.77±2.56 ^{Dd}	754.37±3.26 ^{Cb}
MG 12	653.44±2.79 ^{Dc}	376.70±1.40 ^{Jc}	400.88±1.40 ^{Ib}	579.95±1.40 ^{Gb}	449.49±0.70 ^{He}	625.77±1.63 ^{Ee}	854.37±3.72^{Ab}	607.86±2.79 ^{Fb}	759.95±2.33 ^{Cb}	821.81±3.26 ^{Ba}
MG 17	647.86±2.79 ^{Cc}	498.79±2.09 ^{Ia}	411.58±1.40 ^{Ja}	621.35±5.12 ^{Ea}	529.72±0.93 ^{Ha}	1055.53±2.09^{Aa}	853.44±2.79 ^{Bb}	605.07±3.26 ^{Fb}	553.91±0.93 ^{Ge}	637.63±4.65 ^{Dd}
MG 22	443.67±33.02 ^{Gd}	450.65±1.40 ^{Gb}	408.56±2.09 ^{Ha}	509.02±2.09 ^{Fc}	472.28±0.23 ^{Gc}	913.44±2.33 ^{Cc}	1077.63±6.98^{Aa}	947.16±4.88 ^{Ba}	761.35±2.79 ^{Db}	645.77±1.16 ^{Ec}
MG 26	704.84±0.23 ^{Bb}	338.33±0.23 ^{Ig}	398.33±2.09 ^{Gb}	380.19±0.23 ^{Hg}	433.67±1.16 ^{Ff}	974.84±4.19^{Ab}	582.51±3.49 ^{Dd}	492.05±1.86 ^{Ed}	496.70±1.86 ^{Ef}	593.81±2.86 ^{Ce}
MG33	435.77±2.33 ^{Gd}	347.63±0.70 ^{Jf}	398.09±1.86 ^{Ib}	421.58±2.56 ^{He}	453.44±1.86 ^{Fd}	968.09±8.14^{Ab}	545.77±3.49 ^{De}	500.42±4.65 ^{Ed}	673.21±0.23 ^{Bc}	612.98±2.33 ^{Ce}
MG 36	823.21±6.05 ^{Ba}	363.67±0.47 ^{Hd}	410.19±1.40 ^{Ga}	410.42±2.56 ^{Gf}	421.81±0.47 ^{Fg}	673.67±4.42 ^{Cd}	428.79±2.79 ^{Ff}	464.84±3.49 ^{Ee}	1012.51±3.26^{Aa}	614.60±0.70 ^{Df}
MG 82	303.44±1.63 ^{He}	331.81±1.63 ^{Gh}	274.60±1.16 ^{Id}	457.16±2.33 ^{Ed}	513.44±2.79 ^{Db}	669.26±2.79^{Ad}	597.86±3.95 ^{Bc}	275.77±0.93 ^{Jf}	406.70±1.63 ^{Fg}	580.76±4.73 ^{Cg}
ORT	606.6686	383.0058	386.1744	467.4826	459.0814	866.4942	693.4128	383.0058	666.2616	657.7166

* Aynı satırda farklı harflerle (A-H) gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

* Aynı sütunda farklı harflerle (a-i) gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

ŞK 1: % 1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz kombinasyonu

ŞK 2: %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, %0.5 Galaktoz kombinasyonu

ŞK 3: %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, % 0.2 Galaktoz, % 0.2 Ramnoz, % 0.2 Laktoz kombinasyonu

Zehir, (2017) yaptığı tez çalışmasında tarhanadan izole ettiği laktik asit bakterilerinden EPS üretenleri belirlemiş ve EPS'lerin karakterize edilmesini amaçlamıştır. Farklı şeker tiplerinin EPS üretimi üzerine etkisini belirlemek için sakkaroz, maltoz, laktoz ve fruktoz MRS bileşimindeki glikoz yerine kullanmıştır. *L. plantarum*'un farklı suşlarında EPS üretiminin karbon kaynağına göre farklılık gösterdiğini belirlemiştir. *L. plantarum*'un bazı suşlarının sakkaroz varlığında bazılarının ise maltoz varlığında en fazla EPS ürettiği gözlemiştir. Tüm *L. plantarum* suşları fruktoz varlığında en düşük EPS üretimini gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Padmanabhan vd., (2018) çalışmasında, glikoz, sakkaroz ve laktoz kullanımında EPS üretimini belirlemiştir. Çalışma sonucunda kültürlerin, diğer iki şeker bileşimine kıyasla sakkaroz varlığında daha yüksek miktarda EPS (430 mg/L) ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, EPS üretiminin her şekerde önemli ölçüde farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Zhang vd., (2011) yaptıkları çalışmalarında, *Streptococcus thermophilus* ST1 tarafından üretilen EPS miktarına pH, sıcaklık, ortamdaki çeşitli protein ve karbon kaynaklarının etkilerini araştırmıştır. Karbon kaynağı olarak glikoz, laktoz, sakkaroz, galaktoz ve fruktoz kullanmışlardır. Sonuç olarak %2 sükroz varlığında en yüksek EPS (72.28 mg/L) ürettiğini bildirmişlerdir. Yu vd., (2018) kimchiden izole edilen *W. cibaria* suşunun, sakkaroz ortamında daha yüksek oranda EPS ürettiğini belirlemişler ve aynı türdeki farklı suşların sakkaroz içeren MRS sıvı besiyerinde EPS üretiminde yaklaşık 2.8 kat değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada Brezilya peynirlerinden izole edilen 220 LAB izolatının farklı şekerlerde EPS üretimleri belirlenmiştir. Suşlardan 74'ü glikoz, 64'ü laktoz, 62'si sükroz ve 57'si fruktoz varlığında yüksek EPS üretmişlerdir (Margalho vd., 2020). Lin vd., (2019) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium adolescentis* suşlarının normal MRS sıvı besiyerinde ve MRS bileşimine ayrı ayrı 5 gr glikoz, laktoz ve fruktoz eklenmiş besiyerinde EPS üretmişler ve sonuçları değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda şeker eklenmiş modifiye MRS besiyerinde EPS üretimlerinin normal MRS'ye göre çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. *Lactobacillus acidophilus* MRS bileşimine laktoz eklendiğinde en yüksek EPS'yi (491.0 mg/L) üretirken, *Bifidobacterium adolescentis* MRS bileşimine ekstra glikoz eklendiğinde en yüksek EPS'yi (498.7 mg/L) üretmiştir. Yapılan bir çalışmada, sakkaroz eklenmiş ve eklenmemiş ekşi hamurlarda mikrobiyal HoPS oluşumu araştırılmıştır. Sakkaroz olmadan ekşi hamur viskozitelerinde değişiklik gözlemlenmezken, % 5 sakkaroz varlığında EPS üretren

suşlar ile elde edilen ekşi mayanın reolojik özellikleri EPS oluşturmeyen numunelere göre daha yüksek olarak saptanmıştır (Palomba vd., 2012).

Yapılan literatür araştırmalarında, her kültür için farklı şeker kaynaklarında EPS miktarlarının farklılık gösterdiği ve maksimum EPS üretiminin her kültür için farklı şekerlerde olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan ve yapılan araştırmalardan yola çıkarak, en uygun karbonhidratın büyük ölçüde kültüre bağımlı olduğu kanısına varılmıştır.

4.5. 16S Mikrobiyal Tanımlama

Yapılan analizler sonucunda en yüksek EPS üretimi gözlemlenen kültürler belirlenmiştir. Farklı kaynaklardan seçilen kültürün, biyokimyasal testleri tekrar değerlendirilmiş ve morfolojik görüntüleri tekrar incelenmiştir. Sonuçlar tekrardan değerlendirilerek seçilen 6 adet mikroorganizma 16S mikrobiyal mikrobiyal tanımlama analizi BM Yazılım Danış. ve Lab.Sis. Ltd. Şti. tarafından yapılmıştır. Bakterilerin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial bu yöntem ile tanımlanan izolatlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Moleküler tanısı yapılan suşların listesi

İzolat Numarası	16S Mikrobiyal Tanımlama Analiz Sonucu
MG 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MG1
MG 12	<i>Lactiplantibacillus curvatus</i> MG12
MG 17	<i>Enterococcus hirae</i> MG17
MG 22	<i>Lactiplantibacillus curvatus</i> MG22
MG 33	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MG33
MG 36	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MG 36

4.6. EPS’lerde Protein Miktarının Belirlenmesi

EPS, mikrobiyolojik kümeleşmelerin oluşumunda rol oynayan biyolojik kökenli hücre dışı polimerik maddeler (biyopolimerler) olarak tanımlanmaktadır. Fosfolipitler ve glikoproteinler dahil olmak üzere protein, nükleik asitler ve hidrofobik ve hidrofilik özellik gösteren kimyasal bileşikler de EPS yapısında bulunmaktadır (Loeffler vd., 2020). Kültürlerden izole edilen EPS’lerin kimyasal kompozisyonlarını belirlemek

amacıyla monosakkarit bileşenlerinin yanında, yapılarındaki olası protein oranları Lowry yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.3) Analiz sonucunda EPS'lerdeki protein miktarı standardizasyon kurvesine göre hesaplanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Protein analizi için hazırlanan örneklerdeki renk değişimleri

Çizelge 4.8. İzole edilen EPS'lerin içerisinde bulunan protein yüzdeleri

İzolat No	Protein Miktarı (%)
MG 1	0.12 ^B
MG 12	0.07 ^E
MG 17	0.09 ^D
MG 22	0.10 ^C
MG 33	0.15 ^A
MG 36	0.15 ^A

*Aynı sütunda farklı harflerle (A-E) gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

Tez kapsamında, yapılan analiz sonucunda EPS içindeki protein miktarları en düşük % 0.07, en yüksek % 0.15 olarak belirlenmiştir. Protein miktarları değerlendirilen suşların, MG 1, MG 12, MG 17, MG 22 numaralı suşlardan izole edilen EPS'lerdeki protein miktarları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p < 0.05$), MG 33 ve MG 36 numaralı kültürlerden izole edilen EPS'lerin protein miktarları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p < 0.05$).

Hu vd., (2021) *Lactobacillus rhamnosus* suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin yapılarında farklı konsantrasyonlarda protein bulunduğunu belirlemiştir. Çalışma

sonucunda elde edilen dört farklı ekzopolisakkaritin protein oranlarının % 0.44 ile % 2.16 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Solmaz, (2015) tez çalışmasında *Bacillus pseudomycooides*'den izole edilen EPS'nin karakterizasyonunu belirlemiştir. Bu kapsamda Lowry yöntemi ile EPS'lerin protein içeriklerini incelemiştir. Farklı ortamlarda geliştirilen *Bacillus pseudomycooides*'den izole edilen EPS'deki protein miktarlarının 64 mg/g ile 308 mg/g arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda protein miktarının farklı ortamlarda üretilen EPS'lerde değişiklik gösterdiğini belirlemiştir.

4.7. Toplam İndirgen şeker Analizi

Çalışma kapsamında EPS'de bulunan toplam indirgen şeker miktarının belirlenmesi amacıyla DNS yöntemi kullanılmıştır. Modifiye MRS besiyerine ekilen aktif kültürler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak EPS'ler izole edilmiştir. Sonrasında rnekler hazırlanarak spektrofotometrede 540 nm'de okumalar yapılmıştır (şekil 4.4) Kurve zerindeki denklemden miktarları (g/L) belirlenmiş ve sonuçlar izelge 4.9.'de verilmiştir.



şekil 4.4. İndirgen şeker için hazırlanan örneklerin spektrofotometre ile belirlenmesi

Çizelge 4.9. EPS'lerdeki toplam indirgen şeker miktarları (g/L)

İzolat No	Şeker miktarı (g/L)
MG 1	5.13±0.57 ^C
MG 12	17.28±0.14 ^A
MG 17	18.25±.021 ^A
MG 22	9.37±0.28 ^B
MG 33	4.04±0.14 ^C
MG 36	4.78±0.21 ^C

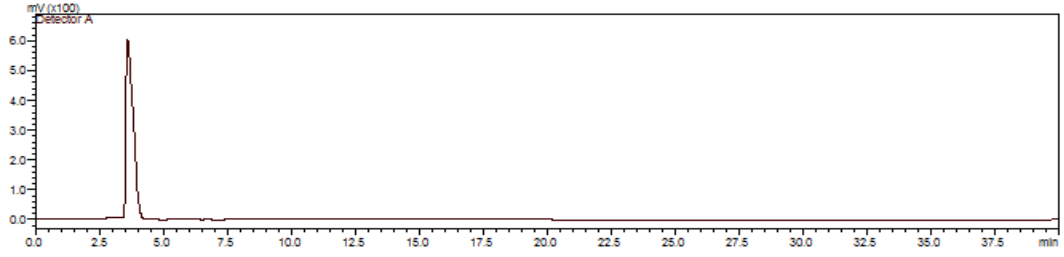
^{A, B, C} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

Bu yöntem ile EPS içerisindeki indirgen şekerler belirlenmiş ve MRS'den gelen şeker miktarı da hesaplanmıştır. EPS ve MRS besiyerinden gelen şeker miktarlarının toplamı tespit edilerek saf EPS miktarlarının kesin sonuçları bulunmuştur. Hesaplamalar sonunda indirgen şeker miktarı 4.04 ile 18.25 g/L arasında olduğu tespit edilmiştir. İndirgen şeker miktarlarının belirlenmesi analizlerinde MG1, MG 33, MG 36 suşlarından izole edilen EPS'lerdeki indirgen şeker miktarları arasındaki farklılık ile MG12 ve MG 17 suşlarından izole edilen EPS'lerdeki indirgen şeker miktarlarının arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmazken (p<0.05), MG 22'den izole edilen EPS'deki toplam indirgen şeker miktarındaki farklılık diğer suşlardan izole edilenlere göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

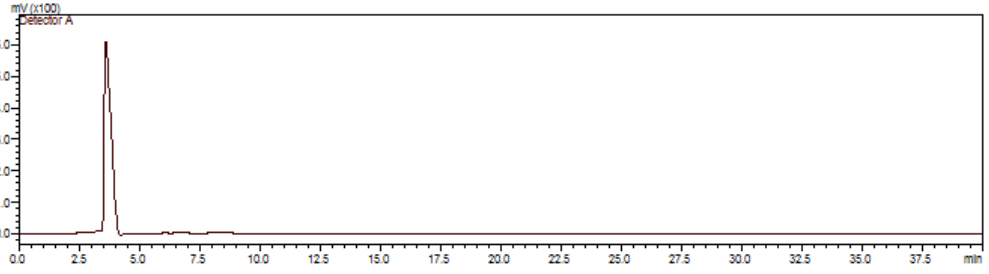
4.8. Ekzopolisakkaritlerin Monosakkarit Bileşimlerinin Belirlenmesi

Ekzopolisakkaritler, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler sadece tek tip monosakkarit (glikoz veya fruktoz) içermektedir. Buna karşılık heteropolisakkaritler ise, çoğunlukla galaktoz, fruktoz ve ramnoz başta olmak üzere üç ila sekiz şeker biriminin tekrar etmesi ile oluşmaktadır (Oleksy ve Klewicka, 2017; Zeidan vd., 2017). Hidrolize edilmiş EPS'nin (monomerlerin) miktarını ve bileşimini araştırmak için HPLC yaygın olarak kullanılmaktadır (Loeffler vd., 2020). Çalışmamızda monomer bileşimini belirlemek amacıyla yapılan analizlerde, izolatlar modifiye MRS (%1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, % 0.2 Galaktoz, % 0.2 Ramnoz, % 0.2 Laktoz) bileşiminde geliştirilerek EPS izole edilmiş ve liyofilize edilmiştir. Sonrasında HPLC analizi ile monomer bileşimi ve miktarı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'de gösterilmiştir. HPLC

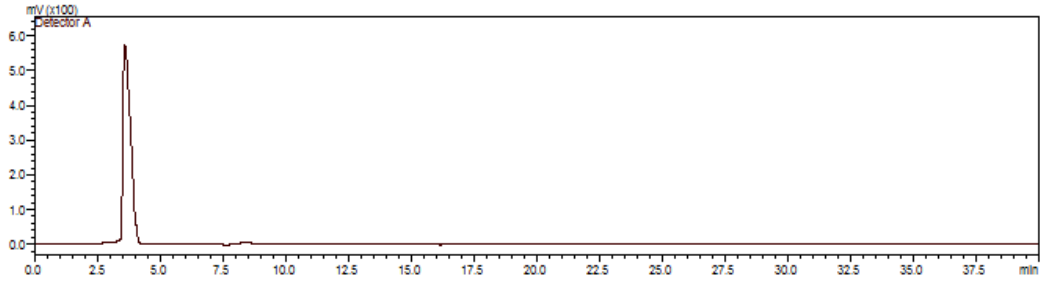
analizlerind elde edilen kromotogramlar Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



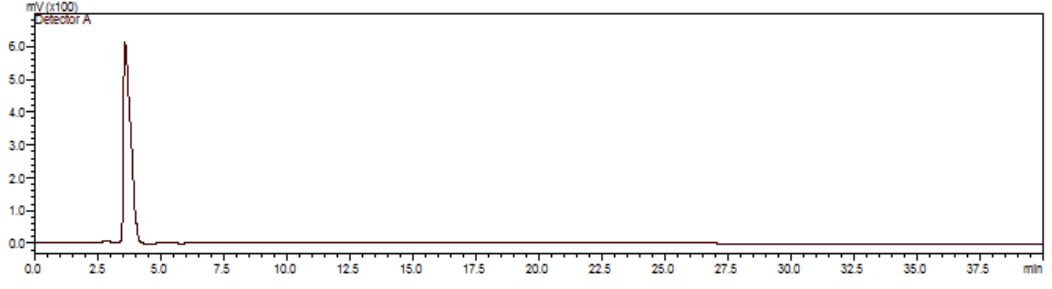
Şekil 4.5. *Lactiplantibacillus plantarum* MG1 tarafından üretilen EPS'nin HPLC kromotogramı



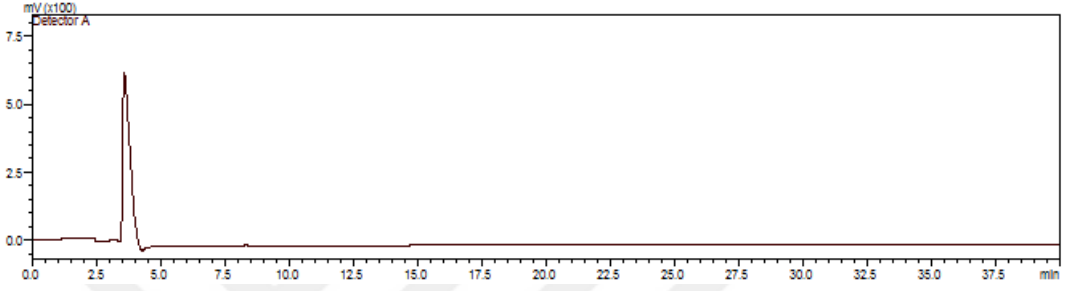
Şekil 4.6. *Latilactobacillus curvatus* MG12 tarafından üretilen EPS'nin HPLC kromotogramı



Şekil 4.7. *Enterococcus hirae* MG17 tarafından üretilen EPS'nin HPLC kromotogramı



Şekil 4.8. *Lactiplantibacillus plantarum* MG33 tarafından üretilen EPS'nin HPLC kromotogramı



Şekil 4.9. *Lactiplantibacillus plantarum* MG36 tarafından üretilen EPS'nin HPLC kromotogramı

Çizelge 4.10. Kültürlerden izole edilen ekzopolisakkaitlerin miktarları (mg/L) ve monomer kompozisyonları (%)

EPS üreten suşlar	EPS miktarı (mg/L)	Monomer Kompozisyonu (%)									
		Ram	Rib	Ksi	Ara	Fru	Gli	Gal	Sük	Lak	Raf
MG 1	754.37±3.26	3.81	-	15.85	9.16	43.19	26.51	-	0.92	0.18	0.38
MG 12	821.81±3.26	2.74	0.26	10.42	12.88	41.24	26.19	2.84	1.59	1.82	-
MG 17	637.63±4.65	2.53	-	7.51	14.04	31.22	33.66	7.51	2.27	1.87	-
MG 33	612.98±2.33	6.79	1.58	30.49	2.01	28.33	28.81	-	1.98	-	-
MG 36	614.60±0.70	4.46	0.51	31.52	-	42.34	19.64	-	1.53	-	-

Ram: Ramnoz, Rib: Riboz, Ksi: Ksiloz, Ara: Arabinoz, Fru: Fruktoz, Gli: Glikoz, Gal: Galaktoz, Sük: Süktroz, Lak: Laktoz, Raf: Rafinoz
 (-): şeker kompozisyonunda bulunmayan şekerler

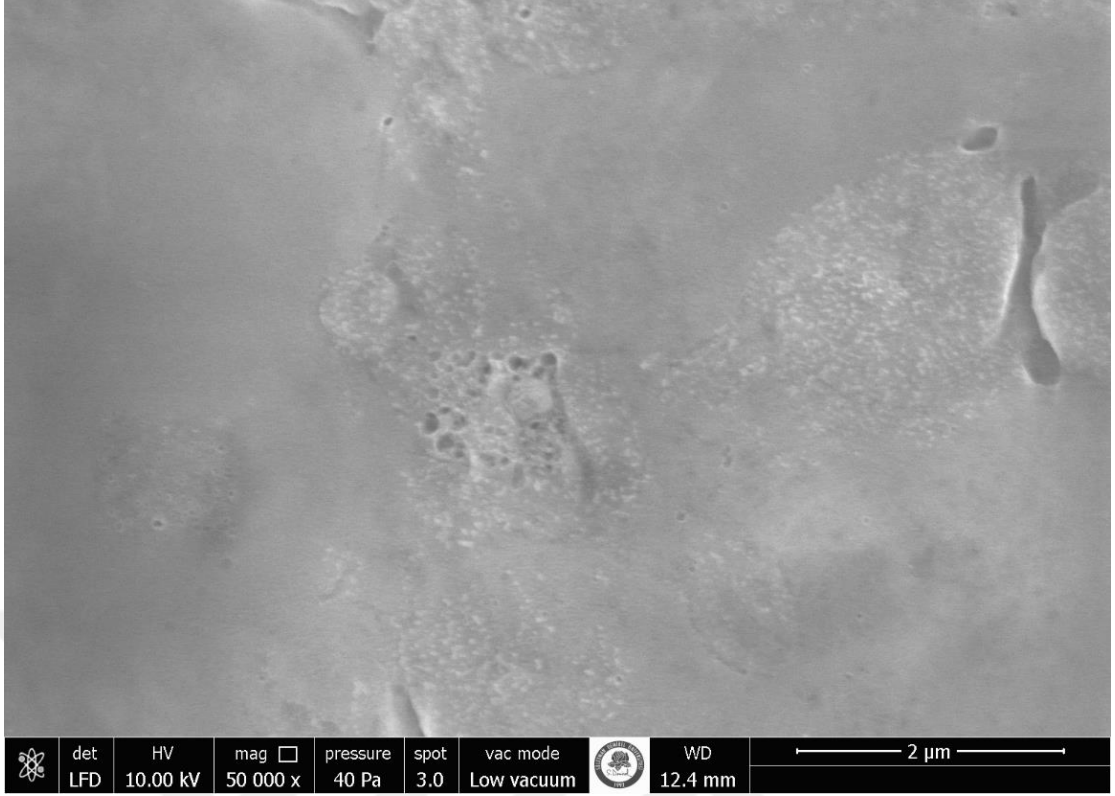
Tez kapsamında, EPS'lerin monomer bileşimlerinde genellikle fruktoz ve glikoz başta olmak üzere farklı şekerlerin olduğu belirlenmiştir. MG 1, MG12 ve MG 36 numaralı kültürlerden izole edilen EPS'nin bileşiminde en yüksek şeker miktarlarının fruktoz olduğu belirlenmiş ve bileşimlerinde sırası ile % 43.19, % 41.24, % 42.34 fruktoz tespit edilmiştir. MG 17 numaralı kültürden izole edilen EPS'nin bileşiminde en yüksek glikoz (% 33.66), MG 33 numaralı kültürden izole edilen EPS'de ise en yüksek ksiloz (%33.49) olduğu belirlenmiştir.

Tsuda ve Miyamoto (2010), *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen EPS'lerin monosakkarit bileşimini belirlemek için analizler yapmıştır. Standartlarda EPS bileşenleri olarak bilinen glikoz, galaktoz, fruktoz, mannoz, arabinoz ve ksiloz kullanmış ve kendi ürettikleri EPS'lerde sadece glikoz ve mannoz olduğunu belirlemişlerdir. Kim vd., (2008), çalışmalarında *Weisiella hellenica* suşundan üretilen EPS'nin bileşimini HPLC yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda standart olarak kullanılan şekerlerin alıkonma sürelerine göre, EPS'nin asit hidrolizatının sadece glikozdan oluştuğunu belirlemişlerdir. Zhang vd., (2013) *Lactobacillus plantarum* C88 suşu tarafından üretilen EPS'nin monomer bileşimini yüksek performanslı anyon değişim kromatografisi sistemi ile belirlemiştir. Çalışma sonucunda elde edilen EPS'nin heteropolisakkarit olduğu ve yapısında glikoz ve galaktoz bulunduğunu bildirmişlerdir. Sharma vd., (2020) anne sütünden izole edilen *Lactobacillus paraplantarum* suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu amaçla yaptıkları HPLC analizlerinde, saflaştırılmış EPS'nin sırası ile 615 mg/ml, 22.1 mg/ml, 4.1 mg/ml glikoz, mannoz ve galaktoz içerdiğini belirlemişlerdir. Hu vd., (2021) *Lactobacillus rhamnosus* suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritleri saflaştırarak 4 farklı fraksiyon elde etmişlerdir. Çalışmalarında elde edilen EPS'lerin şeker kompozisyonlarını GC-MS analizi ile incelemişlerdir. EPS-1 ve EPS-2'de mannoz bileşiminin baskın olduğunu, fakat EPS-1'de glikoz içeriğinin yüksek olduğunu, EPS-3 bileşiminde mannoz, galaktoz, ramnoz ve glikoz bulunduğunu EPS-4'de ise galaktoz içeriğinin en yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda bu EPS'lerin hipolipidemik aktivitesinin, çeşitli monosakkarit bileşimleri ile ilgili olduğu kanısına varmışlardır. Zhang vd., (2016) *Lactobacillus plantarum* suşundan elde edilen EPS fraksiyonunun ksiloz ve galaktozdan oluştuğunu, galaktozun toplam monosakkarit bileşiminin %98.3'ünü oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

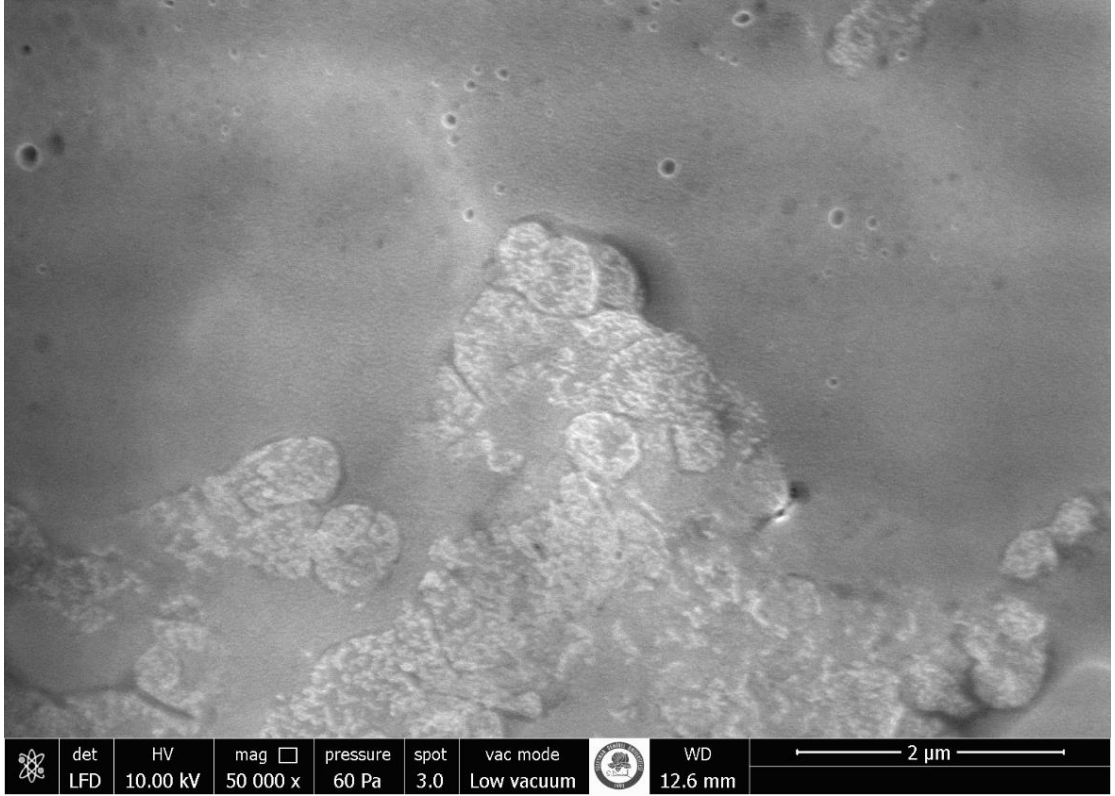
Arabinoz ve ksiloz, bakteriyel EPS'lerde yaygın olarak bulunmamaktadır (Sardari vd., 2017). Yapılan analizlerde elde edilen EPS'lerin monomer bileşimlerinde farklı şekerler tespit edilmiştir. Elde edilen EPS'lerin hepsinde ksiloz bulunması ve her birinin farklı şeker kombinasyonlarından oluşuyor olması, EPS'lerinin benzersiz olduğunu göstermektedir. Monosakkarit oranları da her suş için farklılık göstermektedir. Bundan dolayı, üretilen EPS'lerin farklı fonksiyonel özelliklere sahip olabileceği ve gıdalarda doku ve viskozite özelliklerini geliştirmeye yararlı olabilecekleri düşünülmektedir.

4.9. EPS'lerin Taramalı Elektron (SEM) Mikroskobunda Görüntülenmesi

Tez çalışması kapsamında kültürlerin EPS miktarları, karakterizasyonu belirlenmiş; MRS besiyeri modifiye edilerek şeker kombinasyonu ayarlanmış (% 1.5 sükröz, % 1.5 glikoz, % 2 ramnoz, %2 laktoz ve %2 oranında galaktoz) ve EPS üretimi yapılmıştır. Saf olarak elde edilen EPS'lerin görüntüsünün daha net belirlenmesi için SEM analizi yapılmıştır. SEM analizi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.10. ve 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10. *Lactobacillus curvaticus* MG12 kültürden elde edilen EPS'nin SEM görüntüsü



Şekil 4.11. *Enterococcus hirae* MG17 kültürden elde edilen EPS'nin SEM görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında doğal kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin EPS üretimleri incelenmiştir. Yüksek EPS üretimi gözlemlenen kültürlerin farklı sıcaklık, pH ve karbon kaynaklarında üretimleri optimize edilmiş, EPS'lerin monomer bileşimleri ve protein içerikleri belirlenmiştir.

Tez kapsamında doğal kaynaklardan örnekler alınarak izolasyon yapılmıştır. Toplamda 84 izolat elde edilmiş ve seçilen izolatlara, Gram boyama, katalaz, pH 9.6, % 6.5 NaCl'de ve farklı sıcaklıklarda (10 ve 45 °C) gelişim testleri yapılmıştır. Toplam 61 adet izolatın EPS üretimleri belirlenmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalarda bakterilerden EPS saflaştırılması amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan analizlerimizde izolatlardan EPS'nin saflaştırılması iki farklı yöntem (TCA ve etanol) kullanılarak en yüksek EPS miktarı elde edilen yöntem belirlenmiştir. Elde edilen EPS'lerin miktarları fenol sülfirik asit yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Analizler sonucunda kültürlerden yüksek EPS miktarı etanol ile saflaştırma yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve sonraki aşamalarda etanol ile saflaştırma yöntemi uygulanmıştır.

EPS miktarları, besiyeri bileşimi, sıcaklık, pH, farklı karbon kaynağının kullanımı gibi durumlarda değişkenlik göstermektedir. Bu amaçla yapılan analizlerimizde bu koşulların EPS üretimine etkileri araştırılmıştır.

Farklı sükroz oranlarında (%2 ve %3), sıcaklıklarda (30, 37 ve 42 °C) ve inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) kültürlerin EPS üretim miktarları belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* MG1 ve *Lactobacillus curvaticus* MG12 ile yapılan analizler sonucunda kültürlerin en yüksek EPS üretimini optimum gelişme gösterdiği aralıkta, 24 saat süre sonunda 37 °C'de gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda sükroz konsantrasyonu arttıkça EPS miktarının arttığı gözlemlenmiştir.

EPS üretimine pH faktörünün etkilerinin incelendiği analizlerimizde pH 4.0, 6.2 ve 7.0 değerlerinde seçilen kültürlerimizin EPS üretim miktarları araştırılmıştır. En yüksek üretim MRS besiyeri pH'sına yakın olan pH 6.2'de gözlemlenmiştir. Diğer kültürlerden farklı olarak sadece *Lactobacillus curvaticus* MG22 kültüründe pH 4.0'da en yüksek EPS üretimi gözlemlenmiştir.

Farklı karbon kaynaklarında EPS üretimlerinin belirlenmesi için MRS besiyerinde bulunan glikoz yerine %3 oranında farklı karbon kaynakları (Sükroz, fruktoz, galaktoz, Riboz, Ramnoz, Laktoz, Glikoz) eklenmiş, ayrıca farklı şeker kombinasyonlarının (% 1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz; %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, %0.5 Galaktoz; %1.5 Glikoz, %1.5 Sükroz, % 0.2 Galaktoz, % 0.2 Ramnoz, % 0.2 Laktoz) EPS üretimine etkileri incelenmiştir.

Kültürler genellikle ramnoz varlığında en yüksek EPS üretimlerini gerçekleştirmişlerdir. Ortamda laktoz varlığında da kültürlerin EPS üretimleri diğer karbon kaynaklarına oranla yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Şeker kombinasyonlarında beklenen sonuçlar elde edilememiş, tek karbon kaynağı kullanımının EPS üretimini daha çok artırdığı gözlemlenmiştir.

Kültürlerin farklı karbon kaynaklarında farklı miktarlarda EPS üretmeleri, EPS biyosentez yolundaki aşamalarda her bir şekerin farklı aşamalarda görev almasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.

EPS, yüksek moleküler ağırlığa sahip, uzun zincirli karbonhidrat biyopolimerleridir. Yapılarında mosakkaritler dışında farklı organik ve inorganik bileşikler de bulunabilmektedir ve EPS karakterizasyonlarının biyolojik özelliklerini etkilediği bilinmektedir.

EPS karakterizasyonlarının belirlenmesi amacı ile yapılan analizlerimizde protein içerikleri ve monomer bileşimleri incelenmiştir. Protein içeriklerinin belirlenmesi için Lowry yöntemi kullanılmış ve içeriklerinde % 0.09 ile % 0.15 aralığında protein olduğu tespit edilmiştir.

Yapılarındaki proteinlerin, EPS sentezlenirken hücre zarındaki polimerizasyonu aşamasında yapıdaki proteinlerin EPS'lere katılmış olabileceği düşünülmüştür.

EPS yapısındaki monomer bileşimlerinin tespit edilmesi için HPLC yöntemi kullanılmış ve EPS'lerin farklı oranlarda monosakkarit birimlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Elde edilen EPS'lerin yapılarında genellikle fruktoz ve glikoz oranlarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca yapılarında ksiloz ve arabinoz miktarlarının yüksek olmasının EPS'lere farklı biyolojik ve teknolojik özellikler kazandıracığı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., Azabou, S. (2018). Production And Structural Characterization of Exopolysaccharides From Newly Isolated Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719–728.
- Adebayo-Tayo, BC., Onilude, AA. (2008). Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Applied Sciences Journal*, 4(5), 741–747.
- Akça, S. (2018). *Lactobacillus* sp. Cinsine Ait Farklı Probiyotik Türlerin Oksalat (Böbrek Taşı) Degredasyonu ve Ekzopolisakkarit Üretimleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 95s, Aksaray.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., Sari, K. (2017). Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi, 21(2), 453–459.
- Akpınar, D. D., Kaplan Türköz, B. (2019). Probiyotik-İnsan Bağışıklık Sistemi Etkileşimleri. *Food and Health*, 5(4), 265–280.
- Ale, E. C., Perezlindo, M. J., Pavón, Y., Peralta, G. H., Costa, S., Sabbag, N., Bergamini, C., Reinheimer, J. A., Binetti, A. G. (2016). Technological, Rheological and Sensory Characterizations of a Yogurt Containing an Exopolysaccharide Extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a New Food Additive. *Food Research International*, 90, 259–267.
- Alp, D. (2018). Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması ve İn Vitro Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 124s, Isparta.
- Alp, D., Ertürkmen, P. (2017). Probiyotik Olarak Kullanılan *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Düşürücü Etkileri ve Olası Mekanizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(1), 108–113.
- Alp, D., Kuleşan, H. (2019). Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi ve Kolesterol Asimilasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 44(2), 191–201.
- Anwar, M. A., Kralj, S., Van Der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2008). The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Produces High-Molecular-Mass Inulin from Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3426–3433.

- Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., Mercan, N. (2005). Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains :Under Different Growth Conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 673-677.
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., Molina, G. (2020). Current Status of Biotechnological Production and Applications of Microbial Exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475-1495.
- Başıyigit Kılıç, G., Soyuçuk, A., Ekiz, T. (2016). Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332–344.
- Bennama, R., Fernández, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., Rechidi-Sidhoum, N., Bensoltane, A. (2012). Isolation of an Exopolysaccharide-Producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian Raw Cow Milk. *European Food Research and Technology*, 234(1), 119–125.
- Berthold-Pluta, A., Stanisław Pluta, A., Garbowska, M., Stasiak, L., Berthold-Pluta, A. M., St Pluta, A., Stasiak-Róžańska, L. (2019). Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria-Health-Promoting Properties and Application In the Dairy Industry. *Advancements of Microbiology*, 58, 191–204.
- Ceyhan, N. (2008). Çeşitli Sistemlerde Sorun Oluşturan Hücre Dışı Polisakkarit Üreten Mikroorganizmaların Polisakkaritlerinin Biyoparçalanması ve Parçalanma Etkinliğinin Saptanması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 279s, İzmir.
- Chakraborty, I., Sen, I. K., Mondal, S., Rout, D., Bhanja, S. K., Maity, G. N., Maity, P. (2019). Bioactive Polysaccharides from Natural Sources: A Review on the Antitumor and Immunomodulating Activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101425.
- Costa, N. E., Hannon, J. A., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., McSweeney, P. L. H., Beresford, T. P. (2010). Effect of Exopolysaccharide Produced by Isogenic Strains of *Lactococcus lactis* on Half-Fat Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3469–3486.
- Czaczyk, K., Myszka, K. (2007). Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Bioilm Formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6), 799–806.
- Daba, G. M., Elnahas, M. O., Elkhateeb, W. A. (2021). Contributions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria as Biotechnological Tools in Food, Pharmaceutical, and Medical Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79–89.

- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B. (2001). Recent Developments in the Biosynthesis and Applications of Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 687–707.
- De Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides From Lactic Acid Bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23 (2), 153-177.
- Demir, E., Kaygusuz, E., Başığit Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A. (2017). D Yoğurt Örneklerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit Üretimlerinin Belirlenmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(Ek (Ek) 1), 262–267.
- Demirci, A. (2017). Ağrı Yöresindeki Bazı Yoğurt Örneklerinde Çeşitli Bakterilerin İzolasyon ve Karakterizasyonu. *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 91s, Ağrı.
- Demirci, M., Sağdıç, O., Çavuş, M., Pehlivanoğlu, H., Çağlar, M. Y., Yılmaz, M. T. (2017). Prebiyotik Oligosakkaritlerin Kaynakları, Üretimleri ve Gıda Uygulamaları. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(10), 20–31.
- Dertli, E., Mayer, M. J., Narbad, A. (2015). In Silico identification of pathogenic strains of Cronobacter from Biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity. *BMC Microbiology*, 15(8), 2–9.
- Dertli, E., Mercan, E., Arici, M., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O. (2016a). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 116–124.
- Dertli, E., Yılmaz, M. T., Tatlısu, N. B., Toker, O. S., Cankurt, H., Sağdıç, O. (2016b). Effects of In Situ Exopolysaccharide Production and Fermentation Conditions on Physicochemical, Microbiological, Textural and Microstructural Properties of Turkish-Type Fermented Sausage (sucuk). *Meat Science*, 121, 156–165.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an Exopolysaccharide with Potential Health-Benefit Properties from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1179–1186.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr- Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

- Dueñas, M., Munduate, A., Perea, A., & Irastorza, A. (2003). Exopolysaccharide Production By *Pediococcus damnosus* 2.6 In A Semidefined Medium Under Different Growth Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 113–120.
- Dulekgurgen E. Total Carbohydrates Protocol. 2004. University of Illinois, Urbana Champaign.
- Enkhtur, B. (2021). Fermente Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Karakterizasyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doktora Tezi, 122s, Samsun.
- Ergene, E., Avcı, A. (2016). Mikrobiyel Ekzopolisakkaritler. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 20(2), 193–202.
- Fessard, A., Remize, F. (2019). Genetic And Technological Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Tropically Grown Fruits And Vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 61–72.
- Fraunhofer, M. E. (2018). Characterization Of EPS-Producing Brewery-Associated Lactobacilli. Technical University Of Munich, PhD Thesis, 98 S, Munich.
- Gänzle, M. G., Korakli, M., Vogel, R. F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958–965.
- Gürleyendağ, B. (2006). Polisakkarit Üreten Ekstremofillerin Belirlenmesi ve Ekzopolisakkarit Üretimi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 89 s, İstanbul.
- Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen.
- Hu, S. M., Zhou, J. M., Zhou, Q. Q., Li, P., Xie, Y. Y., Zhou, T., Gu, Q. (2021). Purification, Characterization And Biological Activities Of Exopolysaccharides From *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 Isolated From Milk. *LWT*, 147, 111561.
- İspirli, H. (2016). Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması Ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi. Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104s, Bayburt.
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E. (2018). Glucan Type Exopolysaccharide (EPS) Shows Prebiotic Effect And Reduces Syneresis In Chocolate Pudding. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3821–3826.

- Kim, M. J., Seo, H. N., Hwang, T. S., Lee, S. H., Park, D. H. (2008). Characterization Of Exopolysaccharide (EPS) Produced By *Weissella hellenica* SKkimchi3 Isolated From Kimchi. *The Journal of Microbiology*, 46(5), 535–541.
- Kim, Y., Oh, S., & Kim, S. H. (2009). Released Exopolysaccharide (r-EPS) Produced From Probiotic Bacteria Reduce Biofilm Formation Of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 324–329.
- Kırma, İ. (2016). Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Ekzopolisakkarit Üretimi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 105s, İstanbul.
- Korcz, E., Varga, L. (2021). Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria: Techno-Functional Application In The Food Industry. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 375–384.
- Lin, T., Chen, C., Chen, B., Shaw, J., Chen, Y. (2019). Optimal Economic Productivity Of Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria With Production Possibility Curves. *Food Science & Nutrition*, 7(7), 2336–2344.
- Lin, T. Y., Chien, M. F. C. (2007). Exopolysaccharides Production As Affected By Lactic Acid Bacteria And Fermentation Time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419–1423.
- Liu, J., Zhao, Y., Wu, Q., John, A., Jiang, Y., Yang, J., Liu, H., Yang, B. (2018). Structure Characterisation Of Polysaccharides In Vegetable “Okra” And Evaluation Of Hypoglycemic Activity. *Food Chemistry*, 242, 211–216.
- Liu, L., Li, M., Yu, M., Shen, M., Wang, Q., Yu, Y., Xie, J. (2019). Natural Polysaccharides Exhibit Anti-Tumor Activity By Targeting Gut Microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 743–751.
- Loeffler, M., Hilbig, J., Velasco, L., & Weiss, J. (2020). Usage Of In Situ Exopolysaccharide-Forming Lactic Acid Bacteria In Food Production: Meat Products—A New Field Of Application?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2932–2954.
- Lyhs, U. (2002). Lactic Acid Bacteria Associated With The Spoilage Of Fish Products.
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E. K. (2018). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 155–176.
- Maity, P., Sen, I. K., Chakraborty, I., Mondal, S., Bar, H., Bhanja, S. K., Mandal, S., Maity, G. N. (2021). Biologically Active Polysaccharide From Edible Mushrooms: *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 408–417.

- Manns, D., Deutschle, A. L., Saake, B., Meyer, A. S. (2014). Methodology For Quantitative Determination Of The Carbohydrate Composition Of Brown Seaweeds (Laminariaceae). *RSC Advances*, 4(49), 25736–25746.
- Margalho, L. P., Feliciano, M. D. E., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., Sant’Ana, A. S. (2020). Brazilian Artisanal Cheeses Are Rich And Diverse Sources Of Nonstarter Lactic Acid Bacteria Regarding Technological, Biopreservative, And Safety Properties—Insights Through Multivariate Analysis. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 7908–7926.
- Midik, F., Tokatlı, M., Elmacı, S. B., Özçelik, F. (2020). Influence Of Different Culture Conditions On Exopolysaccharide Production By İndigenous Lactic Acid Bacteria İsolated From Pickles. *Archives of Microbiology*, 202 (4), 875–885.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.
- Moradi, M., Guimarães, T. J., Şahin, S. (2021). Current Applications Of Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria İn The Development Of Food Active Edible Packaging. *Current Opinion in Food Science*, 40, 33–39.
- Mozzi, B. F., Oliver, G., S. De Giori, G., Valdez, F. de. (1995). Influence Of Temperature On The Production Of Exopolysaccharides By Thermophilic Lactic Acid Bacteria. *Milchwissenschaft*, 50(2), 80–82.
- Nachtigall, C., Surber, G., Herbi, F., Wefers, D., Jaros, D., Rohm, H. (2020). Production And Molecular Structure Of Heteropolysaccharides From Two Lactic Acid Bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116019.
- Nguyen, P.-T., Nguyen, T.-T., Bui, D.-C., Hong, P.-T., Hoang, Q.-K., Nguyen, H.-T. (2020). Exopolysaccharide Production By Lactic Acid Bacteria: The Manipulation Of Environmental Stresses For Industrial Applications. *AIMS Microbiology*, 6(4), 451-469.
- Nouha, K., Kumar, R. S., Balasubramanian, S., Tyagi, R. D. (2018). Critical Review Of EPS Production, Synthesis And Composition For Sludge Flocculation. *Journal of environmental sciences*, 66, 225-245.
- Oleksy, M., Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides Produced By *Lactobacillus* Sp.: Biosynthesis And Applications. *Critical Reviews İn Food Science And Nutrition*, 58 (3), 450-462.
- Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Starosielec, M., Sulej, J., Matuszewska, A., Janczarek, M., Bancercz, R., Wydrych, J., Wiater, A., Jarosz-Wilkolażka, A. (2018). Bacterial Exopolysaccharides As A Modern Biotechnological Tool For Modification Of Fungal Laccase Properties And Metal İon Binding. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(7), 973–989.

- Padmanabhan, A., Tong, Y., Wu, Q., Zhang, J., Shah, N. P. (2018). Transcriptomic insights into the growth phase- and sugar-associated changes in the exopolysaccharide production of a high EPS-producing *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1919.
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventorino, V., Pepe, O. (2012). Polyphasic Screening, Homopolysaccharide Composition, And Viscoelastic Behavior Of Wheat Sourdough From A *Leuconostoc Lactis* And *Lactobacillus Curvatus* Exopolysaccharide-Producing Starter Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2737–2747.
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J., Desmazeaud, M. (2000). Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production By *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* Grown In A Chemically Defined Medium. *Applied and environmental microbiology*, 66 (8), 3427-3431.
- Pingitore, V. E., Pessione, A., Fontana, C., Mazzoli, R., Pessione, E. (2016). Comparative Proteomic Analyses For Elucidating Metabolic Changes During EPS Production Under Different Fermentation Temperatures By *Lactobacillus plantarum* Q823. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 96–102.
- Polak-Berecka, M., Choma, A., Waśko, A., Górska, S., Gamian, A., Cybulska, J. (2015). Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 117, 501–509.
- Prasanna, P. H. P., Grandison, A. S., Charalampopoulos, D. (2012). Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. *Food Research International*, 47(1), 6–12.
- Qader, S. A. U., Iqbal, L., Aman, A., Shireen, E., Azhar, A. (2006). Production of Dextran by Newly Isolated Strains of. *Glass*, 31(November 2005), 21–26.
- Rana, S., Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial Exopolysaccharides: Synthesis Pathways, Types And their Commercial Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577–583.
- Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides Enriched In Rare Sugars: Bacterial Sources, Production, And Applications. In *Frontiers in Microbiology*, 6, 288.
- Saadat, R. Y., Khosroushahi, A. Y., Gargari, B. P. (2019). A Comprehensive Review Of Anticancer, Immunomodulatory And Health Beneficial Effects Of The Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79–89.

- Sağlam, H., Karahan, A. G. (2017). Laktik Asit Bakterilerinin Plazmidleri ve Bunların Özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (2), 252–285.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., Ruas-Madiedo, P. (2009). Production Of Exopolysaccharides By *Lactobacillus* And *Bifidobacterium* Strains Of Human Origin, And Metabolic Activity Of The Producing Bacteria In Milk. *Journal of Dairy Science*, 92 (9), 4158–4168.
- Salazar, Nuria, Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (9), 1440-1453.
- Sanlibaba, P., Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology; Open Access*, 2(2), 1000115.
- Sardari, R. R. R., Kulcinskaja, E., Ron, E. Y. C., Björnsdóttir, S., Friðjónsson, Ó. H., Hreggviðsson, G. Ó., Karlsson, E. N. (2017). Evaluation Of The Production Of Exopolysaccharides By Two Strains Of The Thermophilic Bacterium *Rhodothermus Marinus*. *Carbohydrate Polymers*, 156, 1–8.
- Sarikaya, H. (2014). Laktik Asit Bakterilerinin Kültür Filtratları Ve Ekzopolisakkaritlerin Bifidobakterilerin Gelişimini Düzenleyici (BGD) ve Antibiyofilm Etmenlerinin Belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 108S, Ankara.
- Sengupta, D., Datta, S., Biswas, D. (2018). Towards A Better Production Of Bacterial Exopolysaccharides By Controlling Genetic As Well As Physico-Chemical Parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1587–1598.
- Serin, Y. (2016). Bakteri Kaynaklı Ekzopolisakkaritlerin Viskoziteye Etkisinin Belirlenmesi. *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi* 90 s, İstanbul.
- Sharma, K., Sharma, N., Handa, S., & Pathania, S. (2020). Purification and characterization of novel exopolysaccharides produced from *Lactobacillus paraplantarum* KM1 isolated from human milk and its cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1–10.
- Shukla, A., Mehta, K., Parmar, J., Pandya, J., Saraf, M. (2019). Depicting The Exemplary Knowledge Of Microbial Exopolysaccharides In A Nutshell. *European Polymer Journal*, 119, 298–310.
- Singh, P., Saini, P. (2017). Food and Health Potentials of Exopolysaccharides Derived from *Lactobacilli*. *Microbiology Research Journal International*, 22 (2), 1–14.

- Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B. (2011). Isolation And Characterization Of Exopolysaccharides From Seaweed Associated Bacteria *Bacillus Licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84 (3), 1019–1026.
- Solmaz, K. B. (2015). *Bacillus pseudomycooides*'ten EPS Üretimi Ve Karakterizasyonu. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63s, Denizli.
- Sun, Q., Cheng, L., Zeng, X., Zhang, X., Wu, Z., Weng, P. (2020). The Modulatory Effect Of Plant Polysaccharides On Gut Flora And The İmplication For Neurodegenerative Diseases From The Perspective Of The Microbiota-Gut-Brain Axis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1484–1492.
- Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Tabarsa, M., Lee, Y. J., Kim, J. K., Park, W. J., & You, S. G. (2014). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 233–240.
- Tokatlı, M. (2013). Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik Ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi Ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, doktora Tezi, 183s, Ankara.
- Torino, M. I., de Valdez, G. F., Mozzi, F. (2015). Biopolymers From Lactic Acid Bacteria. Novel Applications İn Foods And Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 834.
- Tsuda, H., Miyamoto, T. (2010). Note Production Of Exopolysaccharide By *Lactobacillus plantarum* And The Prebiotic Activity Of The Exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res*, 16(1), 87–92.
- Tükenmez, Ü., Aslım, B. (2018). Probiyotik Kaynaklı, Muhtemel Prebiyotik Özelliğe Sahip Ekzopolisakkarit (EPS)'lerin Biyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(4), 487–497.
- Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., Song, Y. (2019). Sources, Extraction and Biomedical Properties of Polysaccharides. *Foods*, 8(8), 304.
- Üstündağ, H. Ç., Yalçın, H. (2017). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanımı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(1), 53–65.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vanningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. (2007). Screening Of Lactic Acid Bacteria İsolates From Dairy And Cereal Products For Exopolysaccharide Production And Genes İnvolved. *International Journal of Food Microbiology*, 118 (3), 250–258.

- Van Gell-Schutten, G. H., Flesch, F., Brink, B. ten, Smith, M. R., Dijkhuizen, L. (1998). Screening and Characterization of Lactobacillus Strains Producing Large Amounts of Exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* , 50, 697–703.
- Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., Lü, X. (2017). Optimization, Partial Characterization And Antioxidant Activity Of An Exopolysaccharide From Lactobacillus plantarum KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173–1184.
- Welman, A. D., Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria: Perspectives And Challenges. *Trends in biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Werning, M. L., Notararigo, S., Nacher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., López, P. (2012). Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Food Additive*,. 83–114.
- Whitney, J. C., Howell, P. L. (2013). Synthase-Dependent Exopolysaccharide Secretion In Gram-Negative Bacteria. *Trends in Microbiology*, 21(2), 63-72.
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., ... Lü, X. (2019). Exopolysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria: Structures, Physiochemical Functions And Applications In The Food Industry. *Food hydrocolloids*, 94, 475-499
- Yang, X., Li, A., Li, X., Sun, L., Guo, Y. (2020). An Overview Of Classifications, Properties Of Food Polysaccharides And Their Links To Applications In Improving Food Textures. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 1–15.
- Yildiz, H., Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. In *Process Biochemistry* , 72, 41-46.
- Yıldız, H. (2011). Turşu Ve Zeytinlerden Laktik Asit Bakterileri İle Mayaların İzolasyonu-İdentifikasyonu Ve Elde Edilen İzolatların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tez,, 134s, Erzurum.
- Yılmaz, M. T., (2014). Ekzopolisakkarit (EPS) Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Gıdaların Tekstürel , Reolojik Ve Mikroyapısal Özelliklerine Etkisi.
- You, X., Li, Z., Ma, K., Zhang, C., Chen, X., Wang, G., Yang, L., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q., Li, W. (2020). Structural Characterization And Immunomodulatory Activity Of An Exopolysaccharide Produced By Lactobacillus helveticus LZ-R-5. *Carbohydrate Polymers*, 235, 115977.
- Yu, Y. J., Chen, Z., Chen, P. T., Ng, I. S. (2018). Production, Characterization And Antibacterial Activity Of Exopolysaccharide From A Newly Isolated Weissella Cibaria Under Sucrose Effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(6), 769–777.

- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. (2008). Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. *Gıda Dergisi*, 34(2), 91–98.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016). Production, Properties, And Industrial Food Application Of Lactic Acid Bacteria-Derived Exopolysaccharides. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121–1135.
- Zehir, D. (2017). Tarhandan İzole Edilen Laktik ASit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Karakterizasyonu. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71s, Denizli.
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., Neves, A. R. (2017). Polysaccharide Production By Lactic Acid Bacteria: From Genes To Industrial Applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), 168–200.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., Li, S. (2013). Antioxidant Activity Of An Exopolysaccharide Isolated From *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 270–275.
- Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y., Yang, Z. (2011). Growth And Exopolysaccharide Production By *Streptococcus thermophilus* ST1 In Skim Milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1470–1478.
- Zhang, Z., Liu, Z., Tao, X., Wei, H. (2016). Characterization And Sulfated Modification Of An Exopolysaccharide From *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and Its Biological Activities. *Carbohydrate Polymers*, 153, 25–33.
- Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate polymers*, 207, 317-332.

EKLER

EK A. *Lactiplantibacillus plantarum* MG1 dizi sonuçları

EK B. *Lactiplantibacillus curvatus* MG12 dizi sonuçları

EK C. *Enterococcus hirae* MG17 dizi sonuçları dizi sonuçları

EK D. *Lactiplantibacillus curvatus* MG22 dizi sonuçları

EK E. *Lactiplantibacillus plantarum* MG33 dizi sonuçları

EK F. *Lactiplantibacillus plantarum* MG 36 dizi sonuçları



EK A. *Lactiplantibacillus Plantarum* MG1 Dizi Sonuçları

TCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGC
GACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGT
GGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTTTCA
CATCAAACCTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACACCCAATAAATCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTA

EK B. *Lactiplantibacillus Curvatus* MG12 Dizi Sonuçları

TCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGC
GACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGT
GGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTTTCA
CATCAAACCTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACACCCAATAAATCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTA

EK C. *Enterococcus Hirae* MG17 Dizi Sonuçları Dizi Sonuçları

CTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAGAAACCGCATGGTTTT
GATTTGAAAGGCTCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAT
TATCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGGCGACGATGCATACCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACTTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACAAAAGTCTGACC
GAGCAACCCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCATAAAACTCTGTTG
TTAGAGAAAAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCCCTCCCTTGACGGTATCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGGGTAAAGCGAGCGCGGGCGGT
TTCTTAAGTATGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTC
TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGG
AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTG
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGG
GGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
TTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATC
TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA
AGCCGGAATCGTTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

EK D. *Lactiplantibacillus Curvatus* MG22 Dizi Sonuçları

TCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGC
GACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGT
GGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTTTCA
CATCAAACCTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACACCCAATAAATCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTA

EK E. *Lactiplantibacillus Plantarum* MG33 Dizi Sonuçları

TCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGC
GACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGT
GGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTTTCA
CATCAAACCTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACACCCAATAAATCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTA

EK F. *Lactiplantibacillus Plantarum* MG 36 Dizi Sonuçları

TCCGCGATTACTAACGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGC
GACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGT
GGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCAT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATA
TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTTTCA
CATCAAACCTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACACCCAATAAATCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTA